



Rôle des polynucléaires neutrophiles et du FcγRIV dans les effets vaccinaux induit par immunothérapie antivirale par anticorps monoclonaux

Jennifer Lambour

► To cite this version:

Jennifer Lambour. Rôle des polynucléaires neutrophiles et du FcγRIV dans les effets vaccinaux induit par immunothérapie antivirale par anticorps monoclonaux. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT064 . tel-02353233

HAL Id: tel-02353233

<https://theses.hal.science/tel-02353233>

Submitted on 7 Nov 2019

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche IGMM-UMR5535-CNRS

Rôle des polynucléaires neutrophiles et du Fc γ RIV dans les effets vaccinaux induit par immunothérapie antivirale par anticorps monoclonaux

Présentée par Jennifer LAMBOUR

Le 31 Octobre 2018

Sous la direction de Mireia PELEGRIN-ZURILLA

Devant le jury composé de

Valérie GOUILLEUX-GRUART, MCU-PH, GICC

Gisèle CLOFENT-SANCHEZ, Directeur de Recherche, CRMSB

Julià BLANCO, Directeur de Recherche, IrsiCaxia

Pascale LOUIS-PLENCE, Chargé de Recherche, IRMB/ INSERM U1183

Gilles UZE, Directeur de Recherche, DIMNP

Mireia PELEGRIN-ZURILLA, Chargé de Recherche, IGMM

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Président du Jury

Directrice de Thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

« Le progrès des sciences est l'ouvrage du temps et de la hardiesse de l'esprit ».

Voltaire

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du Jury, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de Thèse et qui ont fait preuve d'une grande compréhension.

Je tiens à remercier tout particulièrement les rapporteurs, qui ont pris le temps de me corriger et de me faire part de leurs remarques.

Je remercie Marc Piechaczyk, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma Thèse au sein de son équipe, et pour l'initiation à l'escalade.

Je remercie chaleureusement ma directrice de Thèse Mireia Pelegrin avec qui j'ai traversé cette aventure scientifique et humaine. Je te remercie de m'avoir conseillé, d'avoir pris en compte mes idées dans l'évolution de la Thèse. Tu as été une directrice de Thèse particulièrement à l'écoute, qui m'a fait progresser sans jamais dénaturer ma pensée.

Merci également de ton investissement, au cours de ces années riches en rebondissements et en émotions. Car au-delà d'être une aventure scientifique et professionnelle, cela a aussi été une belle aventure humaine; que j'ai été heureuse de partager avec toi.

Je remercie également particulièrement Mar Naranjo-Gomez, avec laquelle j'ai eu la chance de travailler et d'interagir au cours de ma Thèse. J'ai beaucoup appris à ton contact, je te remercie de m'avoir transmis tes connaissances. Merci aussi pour ton éternel optimisme, même dans les situations difficiles, de ton soutien et de ton sourire.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de Thèse qui ont évalué régulièrement mon travail et qui m'ont conseillé avec bienveillance au cours de ma Thèse.

Merci à nos collaborateurs qui ont apporté un regard critique et une aide technologique.

Je remercie particulièrement les membres de l'équipe MPL, passé et présent, pour l'ambiance chaleureuse dans laquelle j'ai eu la chance d'évoluer pendant ces années. Merci à Isa, Guillaume, et Marc pour vos remarques toujours constructives.

Un grand merci aux Thésards et post-doc, Emilie et Rosy, et Fred, qui ont fait partie de l'équipe MPL. Vos sourires et votre bonne humeur, ont égayer ces années. Je ne pouvais rêver meilleurs collègues de travail.

Je remercie particulièrement les Thésards, Claire, Hayeon, Fabienne, Pierre qui ont été plus que des collègues, et qui m'ont aidé et soutenu pendant ma Thèse, comme de vrais amis.

Un merci spécial pour Mathias (non je ne t'ai pas oublié !), ça été un plaisir de partager un bureau avec toi pendant ces années de Thèse. Merci de m'avoir supporté, de ta gentillesse, de nos nombreux fous rires, qui m'ont toujours remonté le moral et pour les supers playlists !

Merci également aux membres de l'IGMM, Thésards et post-doc, spécialement les utilisateurs de la SCII, qui ont contribué à l'agréable ambiance de travail.

Merci également aux personnels et responsables des plateformes (animalerie, cytométrie), ainsi qu'aux organismes qui m'ont financé, l'ANRS et la Ligue régionale contre le cancer, sans qui ces travaux n'auraient pas été possibles.

Je finirai ces remerciements par une note plus personnelle, mais essentielle à mes yeux, car je remercie mes proches, famille et amis, qui ont été d'un soutien indéfectible et qui m'ont porté par leur amour et leur affection tout au long de ce périple.

**ROLE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES
ET DU Fc γ RIV, DANS LES EFFETS VACCINAUX
INDUIT PAR IMMUNOTHERAPIE ANTIVIRALE
PAR ANTICORPS MONOCLONAUX**

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	15
TABLE DES TABLEAUX.....	19
TABLE DES ANNEXES.....	21
ABBREVIATIONS	23
INTRODUCTION.....	27
I. Les anticorps monoclonaux antiviraux	27
I.1. Les anticorps monoclonaux antiviraux en quelques définitions.....	28
I.1.1. Structure des AcM antiviraux	28
I.1.2. Fonctions effectrices des AcM antiviraux.....	29
I.1.3. Histoire des techniques de production et d'isolation d'AcM.....	31
I.1.3.L'évolution des formats d'AcM en thérapeutique :.....	35
I.2. L'avènement des anticorps monoclonaux antiviraux.....	37
I.3. Enjeux sociétaux, perspectives thérapeutiques	39
II. Modulation de la réponse immune par les AcM antiviraux.....	39
II.1. Rôle des immuns complexes (IC) dans la modulation de la réponse immune.....	40
II.2. Effets vaccinaux des anticorps monoclonaux antiviraux.....	41
II.2.1. Modèle murin d'infection par le virus FrCas ^E : un modèle de mise en évidence des effets vaccinaux des AcM antiviraux.....	41
II.2.2. Mis en évidence des effets vaccinaux induits par une immunothérapie antivirale par AcM.....	42
II.3. Effets vaccinaux induits par des AcM antiviraux dans le cadre d'infections virales humaines	44
III. Les FcγRs, atout des AcM antiviraux :	46
III.1. Définition et classification des FcγRs	46
III.2. Les FcγRs de type I, similitudes et différences entre l'Homme et souris	47
III.3. Le FcγRIV	50
III.4. Conséquences immunologiques induites par des FcγRs.....	51
III.4.1. Rôle des FcγRs sur les fonctions effectrices des AcM.....	51
III.4.2. FcγRs et fragment Fc : variants et conséquences sur la réponse immunitaire	52
IV. Les polynucléaires neutrophiles : des cellules aux multiples talents	54
IV.1. Les polynucléaires neutrophiles	54
IV.1.1. Présentation générale	54

IV.1.2. Fonctions effectrices des neutrophiles	55
IV.1.3. Fonctions immunomodulatrices des neutrophiles.....	58
IV.2. Rôle des neutrophiles dans le cadre d'une infection virale	61
RESULTATS	69
I. Rôle clé des polynucléaires neutrophiles dans l'immunité induite par les immunothérapies antivirales.....	69
II. Potentialisation de l'activation des polynucléaires neutrophiles <i>in vitro</i> par les IC....	89
II.1. Activation phénotypique des neutrophiles <i>in vitro</i>	90
II.2. L'activation phénotypique des neutrophiles par les IC <i>in vitro</i> est dépendante du fragment Fc.....	92
II.3. Activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC <i>in vitro</i>	93
II.4. Potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC dans des conditions inflammatoires et/ou immunomodulatrice <i>in vitro</i>	99
II.4.1. Effet du TNF α sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par des IC <i>in vitro</i>	100
II.4.2. Effet du IFN γ sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC <i>in vitro</i>	103
II.4.3. Effet du IFN-I sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC <i>in vitro</i>	105
II.5. Bilan de la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC <i>in vitro</i>	107
III. Modulation de l'expression des FcγRs dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM	109
III.1. Définition des populations étudiées : Une population inattendue.....	110
III.2. Expression des différents Fc γ Rs sur les cellules immunitaires à J8 p.i.	112
III.2.1. Expression des Fc γ Rs sur les neutrophiles et les monocytes à J8.....	112
III.2.2. Expression des Fc γ Rs sur les cellules dendritiques à J8 p.i.....	114
III.2.3. Expression des Fc γ Rs sur les cellules de la lignée lymphoïde à J8 p.i.....	116
III.3. Expression des différents Fc γ Rs sur les cellules immunitaires à J14 p.i.	118
III.3.1. Expression des Fc γ Rs sur les neutrophiles et monocytes à J14 p.i.	118
III.3.2. Expression des Fc γ Rs sur les cellules dendritiques à J14 p.i.....	119
III.3.3. Expression des Fc γ Rs sur les cellules de la lignée lymphoïde à J14 p.i.....	120
III.4. Conclusions sur les modulations de l'expression des Fc γ Rs sur les cellules immunitaires à J8 et J14 p.i.....	121
IV. Rôle du FcγRIV dans l'effet thérapeutique de l'immunothérapie antivirale par AcM	123
IV.1. Mise au point du blocage du Fc γ RIV.....	123
IV.2. Approche expérimentale.....	125
IV.3 Rôle du Fc γ RIV sur la protection des animaux traités par immunothérapie antivirale par AcM	126
IV.3.1. Rôle du Fc γ RIV sur le développement de la pathologie et la survie des animaux ...	126
IV.3.2. Rôle du Fc γ RIV sur la propagation virale.....	128
IV.3.3. Rôle du Fc γ RIV sur le développement de la réponse cellulaire CD8 ⁺	128

IV.3.4. Rôle du FcγRIV sur le développement de la réponse humorale.....	130
V. Etude des fonctions immunomodulatrices des cellules exprimant le FcγRIV	133
V.1. Approche expérimentale.....	133
V.2. Rôle immunomodulateur des neutrophiles <i>in vivo</i>.....	136
V.2.1 Rôle du FcγRIV dans le recrutement et l'activation des neutrophiles Ly6G ^{hi}	136
V.2.2 Rôle immunomodulateur des neutrophiles Ly6G ^{int}	141
V.3. Rôle immunomodulateur des monocytes <i>in vivo</i>	148
V.3.1. Étude du recrutement et de l'activation phénotypique des monocytes	148
V.3.2. Étude de l'activation fonctionnelle des monocytes.....	150
V.4. Bilan des profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique <i>ex vivo</i> des cellules exprimant le FcγRIV dans les différents contextes de notre modèle expérimental	152
ROLE IMMUNOMODULATEUR DES MONOCYTES <i>IN VITRO</i>.....	161
I. Activation différentielle des monocytes <i>in vitro</i> par les IC	161
II Modulation de l'activation des monocyte <i>in vitro</i> par des cytokines inflammatoires	165
II.1. Modulation de l'activation des monocytes <i>in vitro</i> par le TNFα	167
II.2. Modulation de l'activation des monocytes <i>in vitro</i> par l'FNγ.....	169
II.3. Modulation de l'activation des monocytes <i>in vitro</i> par l'IFNα11	171
DISCUSSION.....	177
CONCLUSION	197
MATERIELS ET METHODES	203
ANNEXES.....	215
BIBLIOGRAPHIE	243

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre de publications portant sur les anticorps fortement neutralisants (bNAbs) au cours des 28 dernières années	28
Figure 2 : Structure d'un anticorps monoclonal (AcM)	29
Figure 3 : Fonctions effectrices des anticorps monoclonaux (AcM) antiviraux (Lambour et al., 2016)	30
Figure 4 : Technique de formation des hybridomes chez la souris. (L'Italien, 2008).	32
Figure 5 : Techniques de production d'AcM (Marasco and Sui, 2007).....	33
Figure 6 : Techniques d'isolation des AcM à partir de lymphocytes B mémoires.....	34
Figure 7 : Paramètres à considérer pour optimiser la modulation de la réponse antivirale par les IC. (Lambour et al., 2016)	41
Figure 8 : Induction d'une immunité protectrice sur le long terme contre le virus FrCas ^E , par des AcM antiviraux neutralisants (Pelegrin et al., 2015).	43
Figure 9 : Les différents types de FcγRs chez l'Homme. ((Bournazos et al, 2017).....	46
Figure 10 : Conséquences immunologiques de l'engagement des FcγRs par des AcM (Bournazos and Ravetch, 2017)	51
Figure 11 : Migration sur le site de l'infection et phagocytose des pathogènes par les neutrophiles.....	55
Figure 12 : Composition des granules cytoplasmiques des neutrophiles (site Epo Medecine)	56
Figure 13 : Schéma de la génération des formes réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles. (Baordel et al, 2014)	57
Figure 14 : Schéma du processus de génération de Neutrophil Extracellular Trap (NET) par les neutrophiles lors d'une infection. (Selder et al , 2017)	57
Figure 15 : Classification des facteurs solubles pouvant être sécrétés par les polynucléaires neutrophiles humains et murins (Tecchio et al, 2014)	58
Figure 16 : Modulation de la réponse immunitaire par la sécrétion de chimiokines par les neutrophiles.(<i>Tecchio and Cassatella</i> , 2016).....	59
Figure 17 : Élimination des pathogènes extracellulaires par les différentes fonctions des neutrophiles.....	60
Figure 18 : Schéma expérimental de la déplétion des neutrophiles dans le model d'infection rétrovirale par FrCas ^E , traité par l'AcM 667.....	69
Figure 19 : Rôle clé des neutrophiles dans l'établissement de l'immunité protectrice induite par les AcM antiviraux.	71
Figure 20 : Protocole de purification et d'activation des neutrophiles issus de la moelle osseuse.	89
Figure 21 : Étude de l'activation phénotypique des neutrophiles (PNN) par l'analyse des marqueurs de surface.....	91

Figure 22 : Effet du blocage des Fc γ Rs sur l'activation des neutrophiles les exprimant.	93
Figure 23 : Méthode de quantification du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique par l'utilisation du Kit LegendPlex TM	94
Figure 24 : Profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles stimulés <i>in vitro</i>	96
Figure 25 : Effet du blocage des Fc γ Rs sur le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles activés par des stimuli viraux.....	97
Figure 26 : Schéma bilan de la production de chimiokines par les neutrophiles stimulés <i>in vitro</i> par les IC (flèche violette) et les virus (flèche rouge) et impact sur le recrutement d'autres cellules immunitaires.	98
Figure 27 : Schéma expérimental de l'activation des neutrophiles <i>in vitro</i> par des stimuli viraux associés à des cytokines inflammatoires et/ou immunomodulatrices.	100
Figure 28 : Effet du TNF α sur l'activation des neutrophiles stimulés par des antigènes viraux.	102
Figure 29 : Effet de l'IFN γ sur l'activation des neutrophiles stimulés par des antigènes viraux.	104
Figure 30 : Effet du IFN α 11 sur l'activation des neutrophiles stimulés par des antigènes viraux.	106
Figure 31 : Bilan de la potentialisation de l'activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC et le virus FrCas ^E <i>in vitro</i>	108
Figure 32 : Approche expérimentale permettant l'élaboration d'un répertoire d'expression des Fc γ Rs présents à la surface des cellules du système immunitaire.....	109
Figure 33 : Zoom sur la population de neutrophiles Ly6G ^{int}	111
Figure 34 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés sur les neutrophiles et monocytes issus de la rate à J8 p.i.	113
Figure 35 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés sur les cellules dendritiques issues de la rate à J8 p.i.....	115
Figure 36 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés à la surface des cellules de la lignée lymphoïde issues de la rate, à J8 p.i.....	117
Figure 37 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés sur les neutrophiles et monocytes issus de la rate à J14 p.i.	118
Figure 38 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés à la surface des cellules dendritiques issues de la rate à J14 p.i.....	119
Figure 39 : Répertoire de l'expression des Fc γ Rs exprimés à la surface des cellules de la lignée lymphoïde issues de la rate à J14 p.i.....	120
Figure 40 : Évaluation de l'efficacité du blocage du Fc γ RIV.....	124
Figure 41 : Schéma expérimental du blocage du Fc γ RIV dans le model d'infection rétrovirale par FrCas ^E , traité par l'AcM 667.....	126
Figure 42 : Impact du blocage du Fc γ RIV sur la survie et la propagation virale.	127

Figure 43 : Impact du blocage du Fc γ RIV sur le pourcentage de lymphocytes T CD8 spécifiques du virus FrCas ^E	129
Figure 44 : Impact du blocage du Fc γ RIV sur la réponse humorale et le développement de l'érythroleucémie.	131
Figure 45 : Schéma expérimental de l'étude du blocage du Fc γ RIV sur la réponse immune innée, par immunophénotypage par cytométrie en flux et isolation des cellules immunitaires exprimant le Fc γ RIV, à J8 et J14 p.i.....	134
Figure 46 : Stratégie d'isolation des cellules exprimant le Fc γ RIV.....	135
Figure 47 : Effet du blocage du Fc γ RIV sur la fréquence et activation des neutrophiles Ly6G ^{hi} à J8 p.i. et J14 p.i., issus des différents groupes d'études.....	137
Figure 48 : Profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G ^{hi} à J8 p.i.....	139
Figure 49 : Profil de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G ^{hi} à J8 p.i.....	140
Figure 50 : Effet du blocage du Fc γ RIV sur la fréquence et activation des neutrophiles Ly6G ^{int} à J8 p.i. et J14 p.i., issus des différents groupes d'études.	142
Figure 51 : Profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G ^{int} à J8 p.i.	144
Figure 52 : Profil de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G ^{int} à J8 p.i.....	145
Figure 53 : Profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles Ly6G ^{int} à J14 p.i.....	146
Figure 54 : Effet du blocage du Fc γ RIV sur la fréquence et l'activation des monocytes Ly6G ^{hi} à J8 p.i. et J14 p.i., issus des différents groupes d'études.....	149
Figure 55 : Profil de sécrétion chimiokinique des monocytes Ly6C ^{hi} à J8 p.i.	150
Figure 56 : Profil de sécrétion cytokinique des monocytes Ly6C ^{hi} à J14 p.i.	151
Figure 57 : Cinétique de production des chimiokines/cytokines par les cellules exprimant le Fc γ RIV issus des animaux infectés-traités à J8 et J14 p.i.....	157
Figure 58 : Protocole de purification et d'activation des monocytes issus de la moelle osseuse	162
Figure 59 : Étude de l'activation des monocytes par l'analyse des marqueurs de surface.	163
Figure 60 : Profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des monocytes stimulés <i>in vitro</i>	164
Figure 61 : Schéma bilan de la production de chimiokines par les neutrophiles Ly6G ^{hi} et les monocytes Ly6C ^{hi} stimulés <i>in vitro</i> par les IC ou les virus et impact sur le recrutement d'autres cellules immunitaires.	165
Figure 62 : Schéma expérimental de l'activation des monocytes <i>in vitro</i> par des stimuli viraux associés à des cytokines inflammatoires.....	166
Figure 64 : Effet du TNF α sur l'activation des monocytes stimulés par des antigènes viraux.	168
Figure 65 : Effet de l'IFN γ sur l'activation des monocytes stimulés par des antigène viraux.	170

Figure 66 : Effet de l'IFN α 11 sur l'activation des monocytes stimulés par des antigène viraux.	172
Figure 67 : Bilan de la potentialisation de l'activation fonctionnelle des monocytes par les IC et les virus <i>in vitro</i>	173

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractérisation des FcγRs, chez la souris, par leurs expressions à la surface des cellules immunitaires, leurs affinités pour les différents isotypes d'IgGs, et leurs fonctions (activateur, inhibiteur) (Bruhns and Jönsson, 2015)	48
Tableau 2 : Caractérisation des FcγRs, chez l'Homme, par leurs expressions à la surface des cellules immunitaires, leurs affinités pour les différents isotypes d'IgG et leurs fonctions (activateur, inhibiteur) (Bruhns and Jönsson, 2015).	49
Tableau 3 : Bilan de l'expression des différents FcγRs exprimés sur les cellules immunitaires issues de la rate à J8 p.i. dans les différentes conditions expérimentales.	122
Tableau 4 : Bilan de l'expression des différents FcγRs exprimés sur les cellules immunitaires issues de la rate à J14 p.i. dans les différentes conditions expérimentales.	122
Tableau 5 : Profils de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G ^{hi} (<i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>) et Ly6G ^{int} (<i>ex vivo</i>) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM153	
Tableau 6 : Profils de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G ^{hi} (<i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>) et Ly6G ^{int} (<i>ex vivo</i>) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM ...	154
Tableau 7 : Profils de sécrétion chimiokinique des neutrophiles (Ly6G ^{hi} et Ly6G ^{int}) et monocytes Ly6C ^{hi} <i>ex vivo</i> à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM	156
Tableau 8 : Profils de sécrétion cytokinique des neutrophiles (Ly6G ^{hi} et Ly6G ^{int}) et monocytes Ly6C ^{hi} <i>ex vivo</i> à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM	156
Tableau 9 : Profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique des monocytes Ly6C ^{hi} (<i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.....	174
Tableau 11 : Anticorps de cytométrie utilisés pour caractériser les cellules de la lignée myéloïde	209
Tableau 12 : Anticorps de cytométrie utilisés pour caractériser les cellules de la lignée lymphoïde	209
Tableau 13 : Limites de détections des cytokines et des chimiokines par la technique du LegendPlex.	212

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : “Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play”. Lambour J, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M, Pelegrin M. 2016; <i>Emerging Microbes & Infections</i>	215
Annexe 2 : Efficacité du blocage des FcγRs exprimés sur les neutrophiles	225
Annexe 3 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα	226
Annexe 4 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout de l'IFNγ	227
Annexe 5 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout de l'IFNα11	228
Annexe 6 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles Ly6G ^{hi} , stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.	229
Annexe 7 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines par les neutrophiles Ly6G ^{hi} , stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J14 p.i.	230
Annexe 8 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles Ly6G ^{int} , stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.	231
Annexe 9 : Profil de sécrétion de cytokines par les neutrophiles Ly6G ^{int} , stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J14 p.i.	232
Annexe 10 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.	233
Annexe 11 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales J8 p.i.	234
Annexe 12 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα	235
Annexe 13 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα	236
Annexe 14 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout d' l'IFNγ	237
Annexe 15 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout d' l'IFNγ	238
Annexe 16 : Profil de sécrétion de cyhimiokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout d' l'IFNα11	239
Annexe 17 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes, stimulés par des antigènes viraux <i>in vitro</i> , n'étant pas modulé par l'ajout d' IFNα11.	240

ABBREVIATIONS

Ac : anticorps
AcM : anticorps monoclonaux
ADC: antibody drug conjugate
ADCC : antibody-dependent cell cytotoxicity
ADCP : antibody-dependent cell phagocytosis
ADCVI : antibody-dependent cell-mediated virus inhibition
ADN : acide désoxyribonucléique
AEM : agence européenne du médicament
ART: antiretroviral treatment
CDC : Complement-dependent cytotoxicity
CDR: Complementarity-determining region
CH : constant heavy
CL : constant light
CMV: cytomégalovirus
DC : cellule dendritique
ETM : erreur type des valeurs moyennes
Fab : fragment antigen binding
Fc : fragment cristalisable
FDA : food and drug administration
HAART: highly active antiretroviral treatment
IC : immun complexe
IFN: interferon
IgG : immunoglobuline G
M :milieu
MPO : myéloperoxydase
NET : neutrophil extracellular trap
NK : natural killer
NS : non stimulé
PAMPs : pathogen associated molecular patterns
PNN: polynucléaire neutrophile
PRR: pattern recognition receptor
ROS : reactive oxygen species
SEM: standard error of the mean
SHIV: simian-human immunodeficiency virus
SIV: simian immunodeficiency virus
TNF: Tumor necrosis factor
TLR: toll like receptor
V : virus
VH :variable heavy
VHC : virus de l'hépatite C
VHB : virus de l'hépatite B
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VL : variable ligh

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Les anticorps monoclonaux antiviraux

A l'ère de la course effrénée aux nouvelles technologies, l'une des révolutions majeures dans le domaine de la santé a été l'apparition et le développement des biothérapies. Elles peuvent se définir par l'utilisation de molécules issues de la biologie du vivant, qui vont être ensuite transformées par l'industrie biotechnologique, en vue de produire des médicaments. L'un des meilleurs exemples est sans doute les anticorps monoclonaux (AcM).

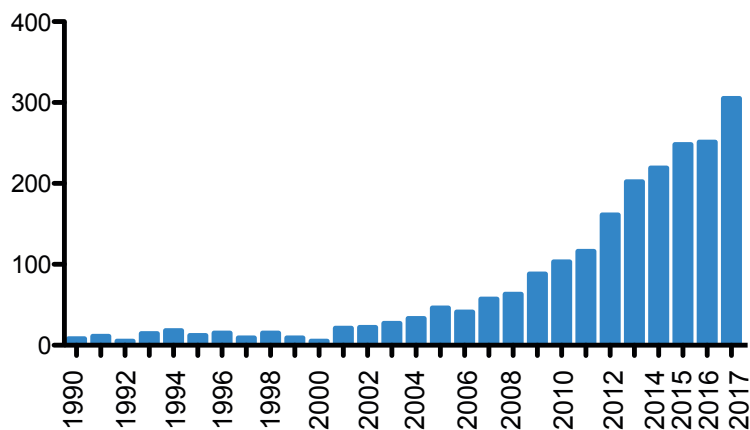
En effet les AcM représentent à l'heure actuelle la plus grande classe de médicaments biothérapeutiques en occupant plus de 50 % du marché des biothérapeutiques. A l'heure actuelle plus de 70 AcM sont commercialisés (TreDenick et al, 2018), permettant de cibler 28 pathologies différentes et plus de 50 sont en dernière phase d'essais cliniques.

Depuis une dizaine d'années, on assiste à une véritable accélération de l'approbation de nouveaux AcM que ce soit par les organismes de santé Européen (AEM) ou des Etats Unis (FDA); 6 ont été approuvés en 2009, contre 10 fin 2017 (Reichert, 2017), leur nombre continuant d'augmenter chaque année. Pour preuve pas moins de 12 nouveaux anticorps sont en dernière phase d'essai clinique et sont pressentis pour être à leur tour autorisés sur les marchés européens et américains d'ici fin 2018 (Kaplon and Reichert, 2018). Cet engouement s'explique par les extraordinaires propriétés des AcM, de par leur spécificité et leurs diverses fonctions sur la réponse immunitaire.

Néanmoins malgré le fait que la découverte des propriétés thérapeutiques des anticorps soit ancienne (Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato, 1890), ce n'est que bien plus tard que l'amélioration des connaissances et des technologies ont permis de révéler et d'exploiter toute la mesure du potentiel thérapeutique des AcM ; ce qui est d'autant plus vrai pour les AcM antiviraux.

En effet jusqu'à cette année, un seul AcM antiviral était commercialisé, le Palivizumab (1998), utilisé en tant que traitement prophylactique contre le RSV (Canfield and Simoes, 1999). Il a été rejoint vingt ans plus tard par un AcM ciblant le CD4, visant à traiter les patients infectés par le VIH, l'Ibalizumab (2018). Cet AcM, n'est pas encore autorisé sur le marché Européen, mais il est sur le point d'être approuvé par la FDA. Par ailleurs la compagnie le fabriquant (Theratechnologies INC et TaiMed Biologics) a déjà conclu un accord pour sa commercialisation aux USA et au Canada. Un tel écart temporel entre la commercialisation de ces deux AcM s'explique notamment par une évolution tardive des technologies permettant d'isoler et de produire des AcM antiviraux efficaces.

Après une longue période d'attente, on assiste depuis une dizaine d'années à une véritable explosion du nombre de publications portant sur les AcM antiviraux hautement neutralisants (**Figure 1**), ainsi qu'à la multiplication de leur nombre engagé dans des essais cliniques. Les AcM antiviraux apparaissent aujourd'hui comme une alternative thérapeutique viable contre les infections virales, aussi bien aiguës que chroniques.



Adapté de Cohen J . Bound for glory. Science 2013.

Figure 1 : Nombre de publications portant sur les anticorps fortement neutralisants (bNAbs) au cours des 28 dernières années

I.1. Les anticorps monoclonaux antiviraux en quelques définitions

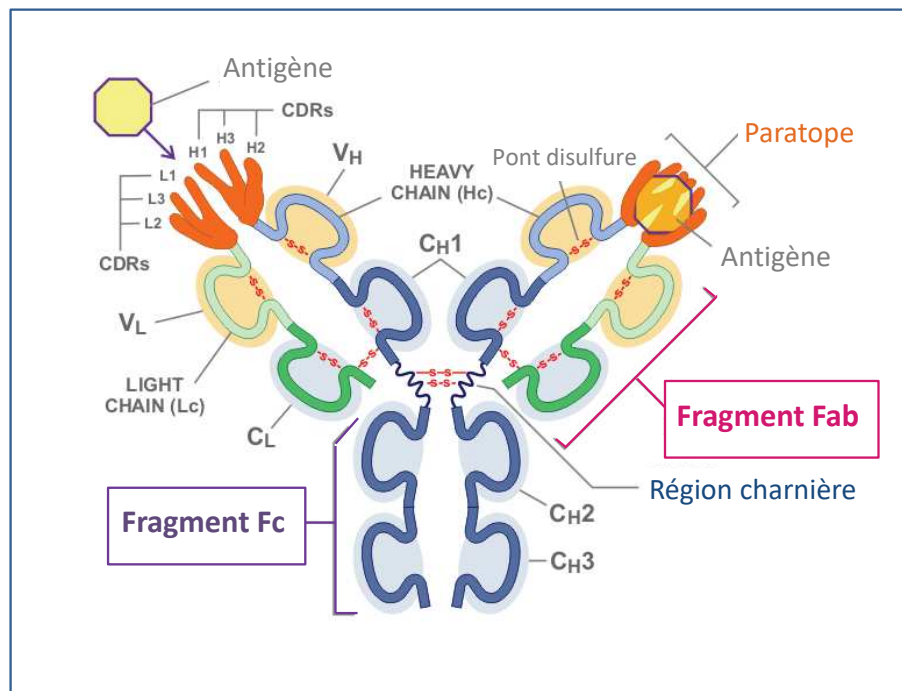
I.1.1. Structure des AcM antiviraux

Tout d’abord, revenons plus en détails sur la nature et les fonctions des AcM. (**Figure 2**)

Les AcM sont des immunoglobulines de la classe des IgG. Ce sont des glycoprotéines hétérodimériques constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, reliées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes se structurent en différents domaines, un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) pour les chaînes légères et un domaine variable (VH) et trois domaines constants pour les chaînes lourdes (CH). On distingue plusieurs types de chaînes. Les chaînes légères en possèdent deux, κ et λ , qui ont 30 à 40 % d’homologie. Les chaînes lourdes en possèdent cinq, α , δ , ϵ , γ , μ , qui vont définir la classe de l’anticorps IgGA, IgGD, IgE, IgG, IgM, respectivement. A noter également que certaines classes possèdent aussi des sous-classes, c’est le cas des IgG qui possèdent quatre sous classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), chez l’Homme.

D’autre part ces domaines constituent deux fragments qui confèrent aux anticorps des fonctions distinctes. Le fragment Fab, par les domaines variables (VL et VH), composés en réalité de trois régions hypervariables, les CDR (complementarity-determining regions), forment le paratope, une région qui va permettre de reconnaître spécifiquement la région de l’antigène cible ou épitope. (Rosenberg and Demeule, 2015).

Les domaines constants forment le fragment cristallisable (Fc) qui va permettre la liaison entre l’anticorps et ces récepteurs à la surface des cellules immunitaires, les Fc γ Rs ou au complément (C1q), permettant la mise en place des fonctions effectrices des anticorps. De plus, le fragment Fc peut aussi se lier au récepteur intracellulaire FcRn impliqué dans la pharmacocinétique des anticorps. Il permet notamment le recyclage des IgG augmentant ainsi leur demi-vie. Entre le domaine CH1 et CH2 se situe la région charnière (H) qui va apporter de la flexibilité à l’anticorps pour lui permettre d’optimiser sa liaison à l’antigène. (Rosenberg and Demeule, 2015)



Adapté de teaching.ncl.uk

Figure 2 : Structure d'un anticorps monoclonal (AcM)

Un AcM est constitué de 2 chaînes lourdes (HC) (bleu) et de 2 chaînes légères (LC) (vert). Chaque chaîne est composée d'un domaine variable (VL ou VH) et d'un ou plusieurs domaines constants (CL ou CH). Les chaînes se regroupent pour former 2 fragments. Le fragment Fab (rose), permet la reconnaissance de l'antigène via le paratope (orange), constitué de 6 régions hypervariables CDR (complementary-determining régions) et le fragment constant, Fc (violet), est responsable des fonctions effectrices de l'AcM.

I.1.2. Fonctions effectrices des AcM antiviraux

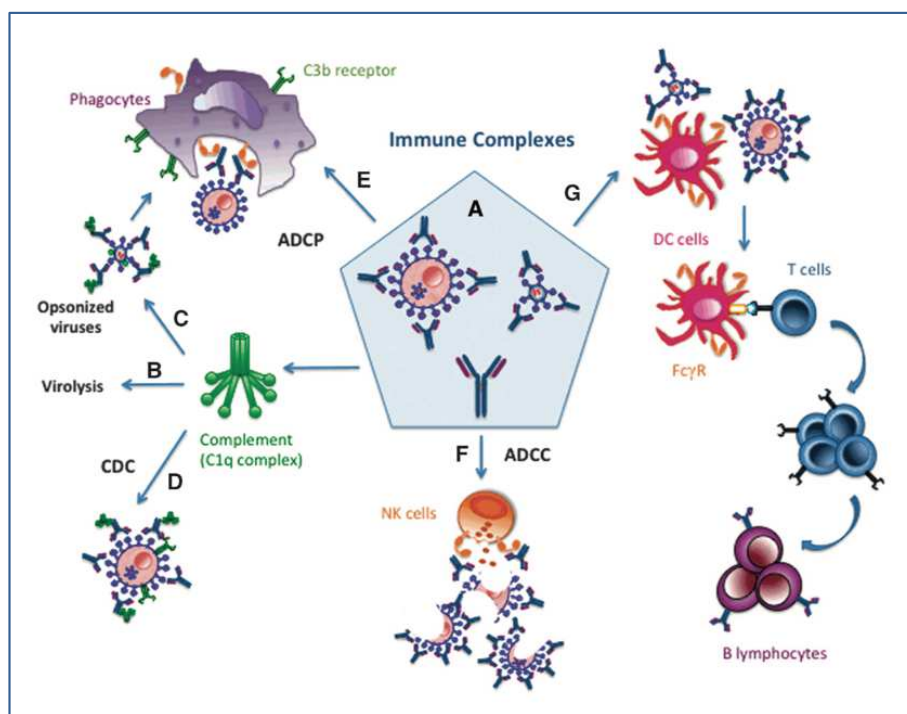
Les AcM antiviraux ont à leur disposition un véritable arsenal thérapeutique pour lutter efficacement contre les infections virales. (**Figure 3**)

Les antigènes viraux sont d'abord reconnus de façon hautement spécifique par le fragment Fab. Dans le cas d'AcM antiviraux neutralisants, cette fonction leur permet non seulement de cibler efficacement l'antigène mais aussi de réduire la quantité de virions circulants et de cellules infectées, par opsonisation, contrôlant ainsi la propagation virale. (Forthal, 2014)

Le fragment Fc est responsable des fonctions effectrices de l'AcM, en interagissant avec les récepteurs (FcγRs ou complément) exprimés à la surface des cellules immunitaires. Ainsi, un virus peut être directement lysé par l'interaction du fragment Fc avec le complément via le C1q ou être phagocyté, après avoir été opsonisé, par interaction avec les FcγRs exprimés à la surface des phagocytes (macrophages, neutrophiles). (Marasco and Sui, 2007)

D'autre part les cellules infectées peuvent aussi être reconnues par les AcM à condition que l'antigène ciblé soit exprimé à leur surface. Ils disposent alors, par leur fragment Fc, de plusieurs moyens pour éliminer les cellules infectées. Via l'interaction avec le complément par CDC (Complement-dependent cytotoxicity) qui active la voie classique du complément qui permet la formation du complexe d'attaque membranaire, créant des pores entraînant la lyse de

la cellule. Via interaction avec les FcγRs, par ADCP (antibody-dependent cellular phagocytosis) (Euler and Alter, 2015; Nimmerjahn et al., 2015), où différentes cellules du système immunitaire (neutrophiles, macrophages) vont phagocyter les cellules infectées recouvertes d'anticorps, ou par ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Su and Moog, 2014) où l'interaction avec les cellules immunitaires (surtout les cellules « natural killer » NK) déclenche la sécrétion de granules cytotoxiques menant à la lyse de la cellule infectée. De plus, l'interaction entre le fragment Fc et les FcγRs peut impacter la propagation virale par ADCVI (antibody-dependent cell-mediated virus inhibition). (Malbec et al., 2013) (**Figure 3**). En effet, une cellule immunitaire exprimant des FcγRs reconnaissant une cellule infectée peut entraîner son élimination par un mécanisme lytique (ADCC) ou non lytique (sécrétion de chimiokines ou de cytokines), ayant pour conséquence la réduction de la propagation virale.



Lambour et al, 2016

Figure 3 : Fonctions effectrices des anticorps monoclonaux (AcM) antiviraux (Lambour et al., 2016)

Les AcM antiviraux peuvent opsoniser des virus et des cellules infectées dans la mesure où l'antigène ciblé est exprimé à leur surface (A). Ceci conduit à l'élimination du virus par différents mécanismes impliquant les cellules immunitaires. Le fragment Fc permet la liaison des virions circulants au complément, induisant une virolyse directe (B). La reconnaissance des virions opsonisés par les FcγRs et le complément conduit à leur phagocytose par les cellules de l'immunité innée. (C). Les cellules infectées peuvent aussi être éliminées par complément-dépendent cytotoxicité (CDC), antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) et/ou antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) induit par les cellules effectrices de l'immunité innée exprimant des FcγRs (D–F). Les complexes immuns (IC) formés par l'AcM et les déterminants viraux (virions ou cellules infectées) peuvent être reconnus par les cellules présentatrices d'antigènes exprimant les FcγRs telles que les cellules dendritiques (DC) (G). La reconnaissance des IC par les DC peut augmenter la présentation antigénique permettant l'induction d'une forte réponse immunitaire antivirale. (Michaud et al., 2010)

I.1.3. Histoire des techniques de production et d'isolation d'AcM

Tout a commencé en 1890 avec les travaux de Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato qui ont développé le premier traitement par immunisation passive, en montrant qu'une injection de sera contenant des anticorps anti-toxine diphtérique pouvait soigner la diphtérie.

Ces résultats ont été reproduits en 1894 en France, par Emile Roux à l'Institut Pasteur, sur 300 enfants traités avec succès. C'est alors l'avènement de la sérothérapie qui sera très développée dans les années qui suivirent. Par la suite, durant une cinquantaine d'années des transferts de sera ont été utilisés pour traiter efficacement de nombreuses infections (méningite, pneumonie à pneumocoque, infection à streptocoque). Cependant le développement des antibiotiques a considérablement réduit l'utilisation de sérum, à partir de 1940, excepté pour les toxines virales (Berry and Gaudet, 2011).

D'autre part, des problèmes liés à la production des anticorps se sont multipliés, avec notamment des agrégats d'anticorps. Dans les années 1920-1930, la purification du sérum par fractionnement et élimination du fragment Fc par l'ajout de pepsine, a limité les problèmes d'agrégations. Mais la production était d'une part très hétérogène et aléatoire en fonction des lots, et d'autre part polyclonale, plusieurs anticorps avec des épitopes différents étaient présents dans le sérum. Ce sont les avancées sur la caractérisation structurale des anticorps qui ont permis une réelle avancée dans la production des anticorps.

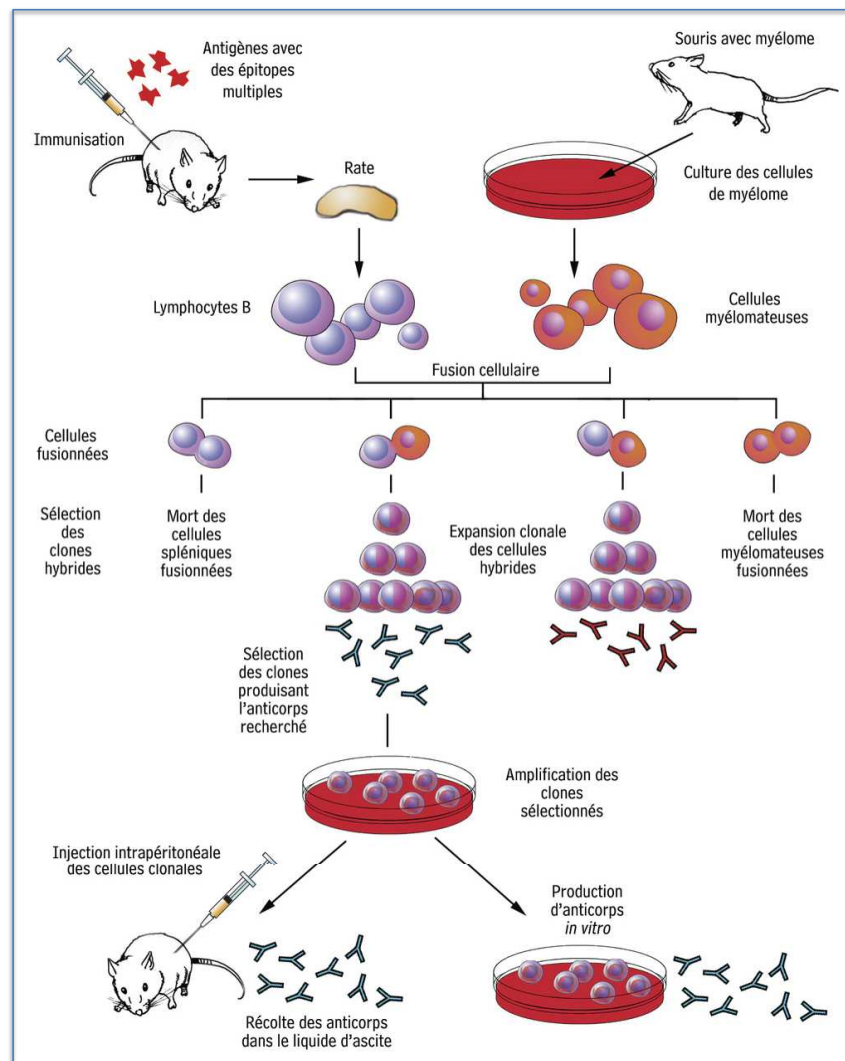
Le premier modèle de la structure d'une immunoglobuline a été présenté par Pauling en 1940. (Pauling, 1940). Il a été complété par les travaux de Porter et Edelman en 1959, sur la structure moléculaire des anticorps (Edelman, 1959; Porter, 1959), ce qui leur vaudra le prix Nobel en 1972.

L'année suivante, en 1960, Georges Barski, Boris Ephrussi et John Littlefield ont publié leurs travaux sur la fusion cellulaire et la synthèse d'ADN ce qui a permis d'envisager la fusion cellulaire entre des cellules de myélomes et des lymphocytes B.

Une quinzaine d'année plus tard, en 1975 ces nouvelles connaissances ont permis à César Milstein et Georges Köhler de mettre au point les hybridomes (Köhler and Milstein, 2005), ce qui leur vaudra d'être récompensés d'un prix Nobel en 1984.

Les hybridomes sont des cellules hybrides, entre des lymphocytes B qui sécrètent des anticorps, les plasmocytes, et des cellules de myélomes, pouvant se cloner et être cultivées *in vitro*. Chaque clone est unique et va produire le même anticorps indéfiniment, c'est un AcM. **(Figure 4)**

La production par hybridome possède plusieurs avantages. Tout d'abord, la fusion avec les cellules myéломateuses, est nécessaire car les lymphocytes B ne survivent pas longtemps en culture. Ensuite les hybridomes garantissent une production monoclonale, constante et homogène. De nos jours la production d'AcM par hybridome, a bénéficié des améliorations technologiques et peut être désormais utilisée à grande échelle. Cependant, d'autres techniques de production et de sélection se sont également développées au cours du temps grâce au développement de l'ingénierie.

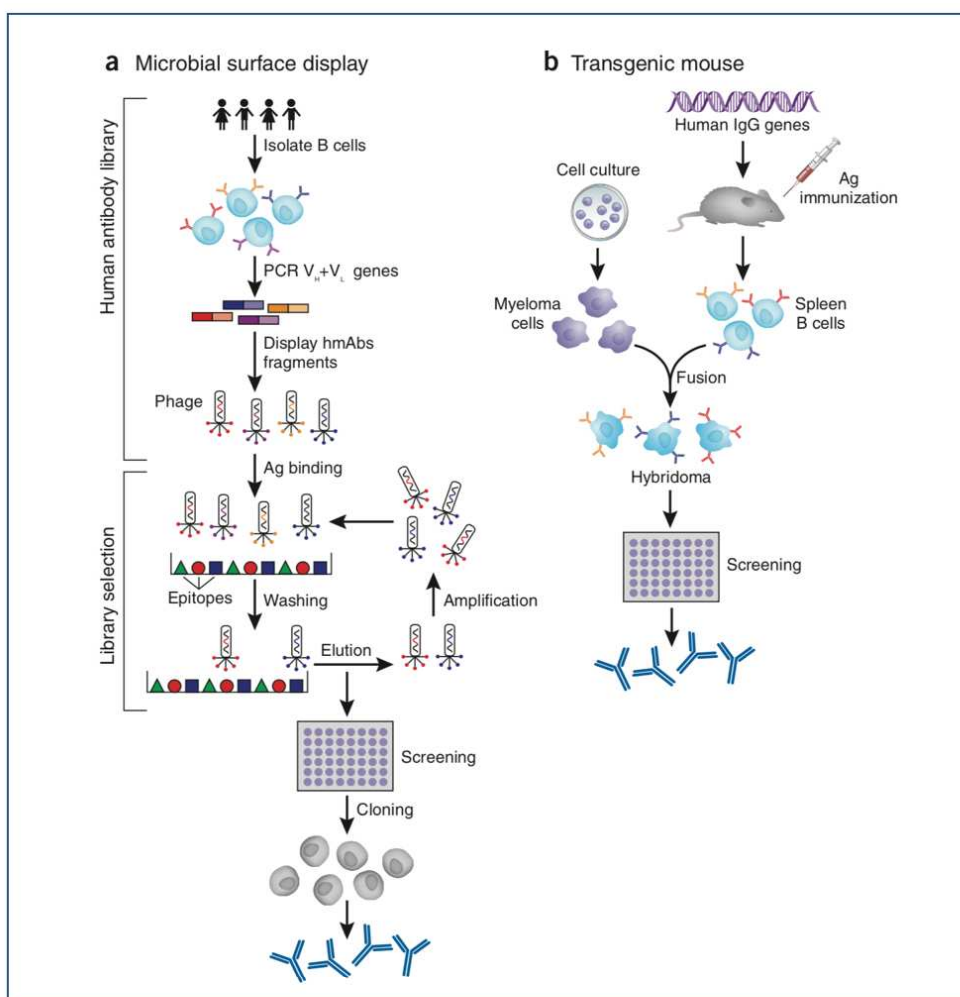


Source: Immunohématologie. Roselyne L'Italien

Figure 4 : Technique de formation des hybridomes chez la souris. (L'Italien, 2008) La technique consiste à injecter un antigène d'intérêt chez la souris, puis après quelques semaines les rates sont prélevées, et les plasmocytes, sont collectés. La fusion des plasmocytes avec les cellules myéломateuses qui ont perdu leur capacité à produire des anticorps, est possible par la fusion membranaire, induite par l'ajout de PEG (polyéthylène glycol). Chaque hybridome est isolé à une cellule par puits. Le clonage est effectué par dilution limite et le criblage des clones a été fait par ELISA. Les clones produits sont identifiés et amplifiés, puis les anticorps sont purifiés et concentrés. Anciennement l'amplification était réalisée en réinjectant les hybridomes dans le péritoine de souris, provoquant des ascites dans lesquelles était prélevés les anticorps. De nos jours cette technique n'est plus utilisée et a été remplacée par des techniques *in vitro* ou des bioréacteurs, à plus grande échelle.

Les techniques de sélection et de criblage des AcM produits ont également évoluées, avec notamment la technique de présentation à la surface des phages filamenteux, ou phage display (Clementi et al., 2012). **(Figure 5a)** Brièvement, cette technique consiste à cloner les gènes des chaînes lourdes et légères d'anticorps, d'animaux ou d'hommes, immunisés ou naïfs, sous forme de scFv ou Fab, fusionné au gène du bactériophage qui exprime une protéine de capside

afin de pouvoir exposer le Fab à la surface du phage filamentueux; qui sont ensuite produit par infection de bactérie *Escherichia coli*. Ces phages exprimant le Fab des anticorps sont ensuite mis au contact de l'antigène cible. Les phages ne présentant pas de reconnaissance pour l'antigène sont éliminés par lavage, ceux fixant l'antigène vont effectuer plusieurs cycles, afin de valider la spécificité du Fab et de le cloner sous forme d'AcM. Cette approche a été notamment utilisée pour isoler des anticorps neutralisants issus de macaques immunisés avec un virus recombinant exprimant le gène de l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe (influenza)(Meng et al., 2013). Cette approche a permis de constituer des bibliothèques de fragments d'anticorps, notamment de patients infectés par le VIH. (Burton et al., 1991). Cette technique présente cependant quelques inconvénients. Elle n'est pas aussi représentative que le répertoire naturel d'anticorps d'un individu, et les modifications post-traductionnelles sont différentes, en particulier la glycosylation. De plus, elle nécessite un antigène pré-définie pour constituer la librairie, et n'est peut être donc pas la méthode optimale pour identifier de nouveaux épitopes neutralisants viraux.



Adapté de [Marasco and Sui, 2007](#).

Figure 5 : Techniques de production d'AcM (Marasco and Sui, 2007)

a) Méthode de production par phage display.(b). Utilisation de souris transgéniques exprimant des IgG humaines.

Une autre des technologies pour générer des anticorps humains sont les souris transgéniques exprimant des IgG humaines. (**Figure 5b**). Pour cela le locus du gène immunoglobuline des souris a été remplacé par le gène humain par une technique de knock-in (KI) et des lymphocytes B exprimant des IgG humains sont isolés de souris transgéniques, après une immunisation par un antigène. Les cellules sont ensuite immortalisées par fusion avec des cellules myélomateuses. (Marasco and Sui, 2007). Cette technique a été utilisée pour produire des AcM contre le SARS-Cov ou syndrome respiratoire aiguë du coronavirus. (Greenough et al., 2005)

Mais l'avancée majeure dans l'isolation d'AcM antiviraux de ces dernières années, fut la capacité de cloner des anticorps provenant de lymphocyte B mémoire unique issu d'individus sains ou infectés. (**Figure 6**)

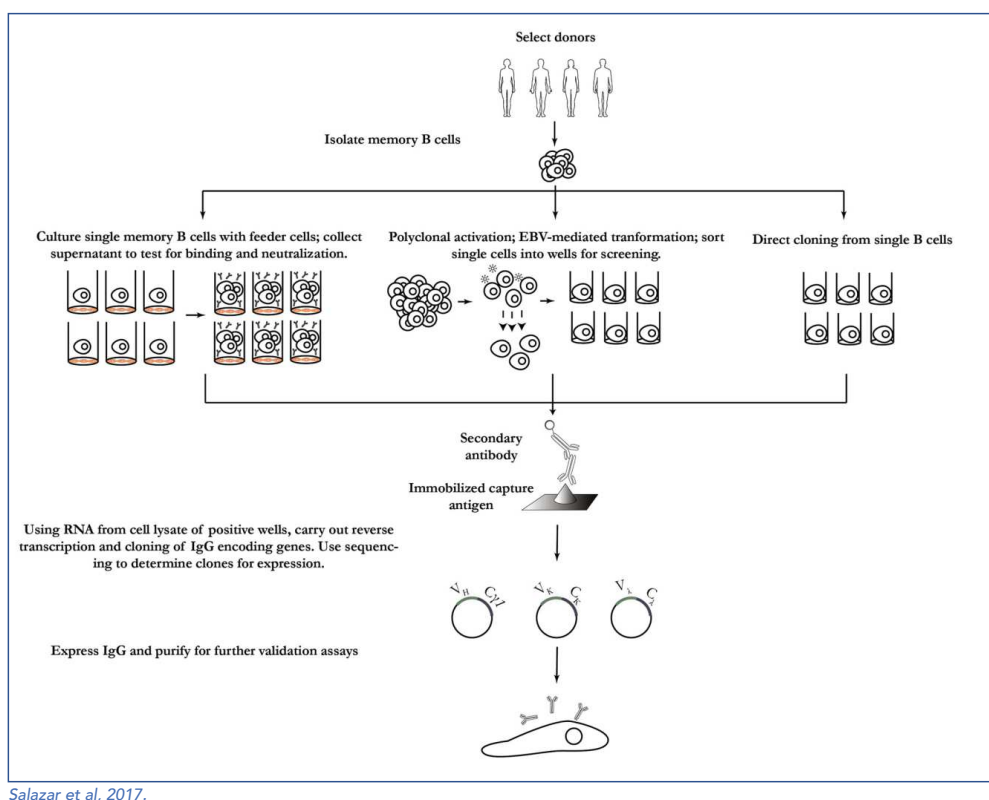


Figure 6 : Techniques d'isolation des AcM à partir de lymphocytes B mémoires

Isolation des lymphocytes B mémoires d'intérêts, puis collecte de leur production d'anticorps par différentes méthodes (culture, clonage, immortalisation). Sélection de l'anticorps souhaité en fonction de l'antigène cible. Clonage des chaînes lourdes et légères en vue de la production de l'AcM.

Différentes méthodes ont été mises au point pour cette approche, et ont permis d'isoler des AcM neutralisants antiviraux. Une méthode consiste à isoler les lymphocytes B mémoires spécifiques d'un antigène viral par cytométrie en flux et à cloner les gènes codants pour les anticorps. Elle a été utilisée pour isoler des AcM neutralisants issus d'individus infectés par le virus Zika (Wang et al., 2016a), HIV (Shields et al., 2002), RSV (Gilman et al., 2016). Cette approche ne permet cependant pas, d'isoler de nouveaux AcM neutralisants car elle requiert que l'antigène viral soit connu, pour sélectionner les lymphocytes B mémoires.

Pour identifier de nouveaux épitopes d'intérêts, une autre méthode consiste à récupérer le surnageant d'un grand nombre de lymphocytes B mémoires cultivés individuellement dans du milieu enrichi, et d'établir contre quels antigènes ces anticorps sont dirigés. Cette technique est

à l'origine de la découverte d'anticorps hautement neutralisants contre le VIH, et la découverte d'une nouvelle cible pour l'élaboration d'un vaccin contre le VIH.(Walker et al., 2009). Une dernière approche consiste à immortaliser des cellules B par le virus d'Epstein Barr en présence de TLR, elle a permis d'isoler des anticorps neutralisants contre la grippe H5N1 (Simmons et al., 2007), ou le SARS-CoV (Traggiai et al., 2004).

Les anticorps sont clonés à partir de cellule unique (plasmocyte ou B mémoire), et représentent le répertoire génétique d'anticorps d'un individu à un moment donnée et suite à une infection, mais il n'est pas forcément représentatif des anticorps circulants. Des techniques ont été développées en combinaison avec une approche de séquençage haut débit (NGS : next-generation sequencing) pour isoler à partir d'anticorps polyclonaux circulants d'individus infectés les séquences des anticorps spécifiques de l'antigène (Cheung et al., 2012). Cette approche permet la création d'une base de données du répertoire des IgG d'un individu immunisé par un virus. Les séquences des chaînes lourdes et légères sont associées et exprimées comme un anticorps recombinant. Cette technique a été utilisée avec succès pour isoler des anticorps ciblant le cytomégalo virus humain (HCMV)(Sato et al., 2012).

Une autre technique consiste à utiliser des lymphocytes B mémoires humains, issus du sang de patients ayant été infectés par une infection virale. Ces cellules sont ensuite transformées avec le virus d'Epstein Barr associé à un agent activant les cellules B mémoires (oligonucléotide CpG, cellules mononucléaires irradiée), qui augmente l'efficacité de la transformation. Ainsi les cellules B mémoires issus du sang de patients infectés par la grippe aviaire H5N1, ont été immortalisées par cette méthode pour obtenir des AcM neutralisants contre ce virus (Kwakkenbos et al 2016).

L'isolement des cellules rares et du clonage des anticorps, expliquent en partie les raisons de l'explosion des AcM antiviraux.

I.1.3.L'évolution des formats d'AcM en thérapeutique :

Au cours du temps et de l'évolution des connaissances et des technologies, le format des AcM thérapeutique a évolué, pour être de plus en plus spécifique et efficace.

Le premier AcM produit chez la souris, est le muromomab anti-CD3 (Orthoclone OKT3)(Van Wauwe et al., 1980) commercialisé en 1986, utilisé en tant qu'immunosuppresseur contre le rejet de greffe. La structure de cet anticorps est entièrement murine.

Par la suite une multitude d'autres anticorps produit chez la souris ont été testés mais leur efficacité s'est montrée décevante en raison de la faible affinité des FcγRs humains pour le fragment Fc des IgGs de souris, réduisant ainsi considérablement les fonctions effectrices des anticorps ainsi que leur demi-vie. De plus ils sont aussi à l'origine de l'induction d'une forte immunogénicité se manifestant par la production d'HAMA (human anti-mouse antibodies ou anticorps humain anti-souris), dû à l'interaction entre une molécule murine dans un organisme humain.

Il a fallu attendre les progrès de la génie-génétique pour passer aux AcM chimériques (Liu, 2014), qui consistent à isoler l'ADN des régions variables VH et VL d'un AcM murin et à les lier au fragment Fc d'une IgG humaine. Ces modifications n'affectent normalement pas la spécificité et l'affinité de l'anticorps, mais là encore la présence de fragment Fc murin limite considérablement la réponse immunitaire.

Puis dans le but de diminuer l'immunogénicité et d'augmenter les fonctions effectrices, les AcM sont devenus humanisés (le daclizumab :anti-chaîne alpha d'IL2 , utilisé comme anti

rejet), seule une partie des domaines variables VH et VL, la région CDR reste encore murine, le reste des domaines VH et VL ainsi que le fragment Fc sont humains.

Pour finir, les avancées technologiques nous permettent désormais d'obtenir des AcM intégralement humain tel que l'Adalimumab (2002) qui est un anti-TNF α , utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins l'humanisation des anticorps de souris peut conduire à une diminution de l'affinité de l'AcM pour sa cible, nécessitant l'utilisation de technologies complémentaires, pour améliorer l'efficacité de l'AcM notamment par des modifications au niveau des fragments Fc.

Désormais il est donc possible de produire des AcM entièrement humanisés, ce qui permet d'éviter une réaction du système immunitaire en réponse à un composé d'une autre espèce et d'augmenter la durée de vie des AcM, mais les améliorations ne se sont pas arrêtées à l'optimisation d'anticorps « nu ». Les avancées technologiques en matière d'ingénierie, ont permis d'aboutir à la synthèse de nouveaux formats d'anticorps.

Maintenant il est possible de coupler les anticorps à d'autres composés (toxine, radioisotope, drogue, agent biologique...), dans le but d'augmenter leur efficacité ce sont les immunoconjugués ou ADC (antibody drug conjugate). En effet ces AcM possèdent tous des fonctions effectrices et une spécificité qui fait d'eux des guides amenant la molécule toxique aux cellules indésirables, ils sont particulièrement utilisés dans le traitement de cancers. (Haeuw et al., 2009)

D'autres approches consistent à fusionner non pas le Fc comme les immunoconjugués mais le Fab avec des molécules pouvant agir sur les cellules immunitaires comme les cytokines. C'est le cas des immunocytokines (List and Neri, 2013) ou des AcTakines (Garcin et al., 2014). Ces dernières permettent d'avoir une forte activité sur les cellules cibles tout en réduisant les effets indésirables, liés à la forte réponse inflammatoire induite par les cytokines. Ceci par l'utilisation de cytokines mutées qui ont une affinité réduite pour leur récepteur naturel et ne s'activent qu'au contact de la cible antigénique.

On peut également citer les anticorps bispécifiques, dont le premier fut commercialisé en 2009 (catumaxomab anti-CD3 et anti-tumeur) qui peuvent reconnaître deux antigènes différents, ce qui peut permettre de lier un antigène tumoral à une de leur région Fab et une cellule immunitaire à l'autre et permettant aussi d'administrer qu'un seul AcM, ce que limite les effets secondaires dû à l'immunothérapie. Dans le cas des AcM antiviraux des bispécifiques peuvent aussi être formés contre deux épitopes différents d'un même virus afin d'optimiser l'efficacité de l'immunothérapie.

Il est aujourd'hui aussi possible d'utiliser des composés plus petits, dont certains ne comportent que les fragments VH et VL des AcM, (Hamers-Casterman et al., 1993) ce sont les scFv (single chain variable fragment) et d'autres comme les nanobodies (Flajnik et al., 2011) (12 à 15 kDa) qui s'inspirent des anticorps des camélidés qui ne possèdent pas de chaînes légères et ne disposent donc que de la chaîne lourde (domaine VHH) pour reconnaître les antigènes (Gholamreza et al 2013). Ceux-ci possèdent l'avantage d'être des composés très stables et faciles à produire comparés aux VH humains ou murins. En revanche ils ont aussi l'inconvénient d'avoir une demi vie courte et sont rapidement éliminés par l'organisme. Leur utilisation en thérapeutique nécessite donc l'adjonction de molécules qui vont augmenter leur durée de vie.

Les quelques exemples de formats d'anticorps présentés ci-dessus, nous donne un aperçu de l'éventail de possibilités qu'offrent les AcM et ses dérivées. Les avancées technologiques ont permis le développement de ces immunothérapies par AcM et ne cessent de participer à leur

amélioration pour les rendre toujours plus efficaces, contre des pathologies de plus en plus variées.

1.2. L'avènement des anticorps monoclonaux antiviraux

La majorité des AcM thérapeutiques autorisés aujourd'hui en clinique sont destinés à lutter contre le cancer ainsi qu'à limiter les réponses immunes dans le cadre de maladies auto-immunes. En revanche la possibilité d'utiliser les AcM pour traiter des infections virales ou bactériennes, a longtemps été négligée. Ceci est d'autant plus curieux qu'historiquement les premières immunisations passives par du sérum d'animaux immunisés ont vu le jour dans le cadre de la lutte contre les nombreuses infections qui décimaient les populations à la fin du XIX^{ème} siècle.

Cette sous-exploitation et le sous-développement des AcM antimicrobiens peut s'expliquer pour plusieurs raisons (Casadevall, 2006). Outre les effets secondaires liés à l'utilisation de sérum (Casadevall and Scharff, 1995), l'une des raisons principales est la disponibilité d'autres thérapeutiques, plus accessibles, et moins coûteuses, tels que les antibiotiques pour les infections bactériennes ou des molécules antivirales. De plus, les virus ont une forte capacité à s'adapter au système immunitaire et élaborent sans cesse des stratégies d'échappement qui sont pour certains virus, accompagnées de mutations, ce qui peut rendre les immunothérapies par AcM inefficaces. C'est le cas du virus Influenza, qui de par ses mutations fréquentes entraîne l'émergence de nouvelles souches, obligeant l'élaboration annuelle d'un nouveau vaccin, ou dans le cas du VIH, ce qui a considérablement ralenti la conception d'une thérapie efficace. Néanmoins la multiplication inquiétante du nombre de résistances aux antibiotiques (methicillin-resistance *S. aureus*, MRSA), l'émergence de nouveaux virus (Zika, chikungunya, Ebola), ou la réémergence d'anciens pathogènes qui sont souvent associés à une résistance aux traitements actuels (*Mycobacterium tuberculosis*), ainsi que les crises épidémiques récentes (Ebola), pour lesquelles aucuns traitements curatifs n'existent, ont positionné les AcM antiviraux sous la lumière des projecteurs.

Le premier AcM commercialisé fut un AcM antiviral, le Palivizumab en 1998, indiqué dans le traitement prophylactique d'une infection respiratoire infantile induite par le virus RSV (respiratory syncytial virus) (Canfield and Simoes, 1999; Wu et al., 2008). Puis le nombre d'anticorps antiviraux a stagné jusqu'à ces dix dernières années qui ont été le témoin d'un véritable essor dans le domaine des AcM antiviraux (cf **Figure 1**), non seulement en termes d'amélioration de leur efficacité thérapeutique mais aussi par la diversification de leurs cibles (H5N1, -HIV, -HBV, -Ebola, -SARS, -West Nile).

L'infection par le HIV est sans doute l'infection virale pour laquelle il y a eu le plus de recherches effectuées dans le domaine des AcM antiviraux. Malgré ces efforts et de nombreux faux espoirs, il n'y a toujours pas de vaccin disponible contre cette infection. Néanmoins les révolutions technologiques de ces dernières années en matière d'isolation de lymphocyte B unique, issu de patients infectés, ont redonné un nouveau souffle aux AcM anti-VIH. Les anticorps hautement neutralisants VRC01, 3BNC117, 10-1074, 4E10, identifiés par cette technique, sont actuellement testés dans des essais cliniques et fournissent pour certains des résultats prometteurs (Salazar et al., 2017; Schoofs et al., 2016a; Smith and Derdeyn, 2016). On peut notamment citer le VRC01 qui est un AcM hautement neutralisant dirigé contre le CD4 et isolé à partir de lymphocyte B de patient infecté par le VIH-1. En dehors de ces fonctions neutralisantes, il a été montré que lorsqu'il était administré à des patients infectés qui avait suspendus leur traitement anti-retroviral (ART), il permettait de retarder le rebond viral. Il est

actuellement en phase II d'essai clinique. Un autre AcM anti-VIH encore plus prometteur est sans nul doute l'AcM hautement neutralisant 3BNC117. Il a lui aussi été isolé à partir de lymphocyte B de patient infecté, et cible la glycoprotéine gp120. Dans des essais cliniques de phase IIa, et Shield al ont montré qu'il pouvait supprimer le rebond viral, pendant l'interruption du traitement ART (Scheid et al., 2016) et qu'il exerçait une forte pression de sélection sur les VIH-1 émergents provenant de réservoirs. Schoofs et al ont également montré que le 3BNC117 est capable non seulement de supprimer la virémie d'individus infectés mais aussi d'augmenter la réponse humorale (Schoofs et al., 2016a). D'autres AcM ne ciblent pas directement le virus mais ces récepteurs sur les cellules immunitaires. C'est le cas de l'Ibalizumab (iMab), qui a récemment obtenue la désignation de « médicament orphelin et de thérapie révolutionnaire » par la FDA (Kaplon and Reichert, 2018), ce qui inclut les résultats de la phase III de l'étude TMB-301 (NCT02475629). C'est AcM est une IgG4 ciblant le CD4, afin d'éviter l'entrée du virus, est a été conçu dans le cadre d'une utilisation contre le VIH multi-resistant.(<https://theratechnologies.s3.amazonaws.com/prod/media/nr-th-10042017-en.pdf>)

La découverte d'AcM antiviraux fortement neutralisants (bNAbs : broadly neutralizing antibodies), ainsi que l'amélioration des techniques permettant leur isolation a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique des AcM antiviraux, dont certains, aujourd'hui testés dans des essais cliniques, fournissent des résultats encourageants. Il est vrai que même si les traitements actuels (HAART :highly active anti-retroviral therapy) sont relativement efficaces, en particulier pour maîtriser la charge virale, ils ne permettent pas d'éradiquer totalement l'infection notamment à cause de la persistance de foyers réservoirs. (Sadanand et al., 2016)(Klein et al., 2013)(Kwong et al., 2013). L'utilisation de bNAbs permet de lyser les cellules infectées et apportent donc de nouvelles perspectives dans l'élimination des réservoirs (Julg et al., 2017)(Gautam et al., 2016).

Les AcM antiviraux ne concernent pas uniquement que les infections virales chroniques, ils peuvent parfois apparaître comme une alternative thérapeutique pour résoudre des crises sanitaires majeures et imprévues comme ça a été le cas de la récente épidémie induite par le virus Ebola-Zaire, survenue en Afrique de l'Ouest entre 2013 et 2016. Ce type de situations épidémiologiques critiques de par la rapidité de la propagation du virus et surtout le fort taux de mortalité, a entraîné une mobilisation et un développement important de la recherche sur les AcM luttant contre des virus émergents, en particulier Ebola. Néanmoins, même si le cocktail expérimental ZMapp formé de la combinaison de 3 AcM avait montré des résultats encourageants chez le macaque (Qiu et al., 2014), ça n'a malheureusement pas été le cas lors des essais chez l'Homme, où l'administration de ce cocktail n'a pas montré de résultats meilleurs que le traitement standard utilisé contre l'infection par Ebola (NCT02363322)(Cardile et al., 2016). Le but est désormais d'isoler des lymphocytes B de patients ayant survécu afin d'identifier, comme cela a été fait pour le VIH des AcM hautement neutralisants, qui pourraient être des candidats prometteurs dans la résolution de futures épidémies par le virus Ebola.

D'autres virus émergents font aujourd'hui l'objet de recherches intensives en particulier dans le but d'élaborer des vaccins, comme c'est le cas du virus Zika. Suite à l'épidémie de 2015-2016, 2 anticorps avec des fonctions potentiellement neutralisantes, isolés à partir d'un patient immunisé ont induit une protection post-exposition chez des souris (Wang et al., 2016a). Ces résultats bien que préliminaires s'inscrivent dans la dynamique actuelle qui considère les AcM antiviraux comme une thérapie crédible pour lutter contre des infections chroniques ou émergentes.

I.3. Enjeux sociétaux, perspectives thérapeutiques

Les AcM représentent un véritable espoir dans le traitement d'infections virales chroniques mais aussi aiguës, qui lorsqu'elles évoluent en épidémie ou en pandémie peuvent conduire à de véritables désastres sanitaires. Preuve en est les pandémies annuelles induites par le virus Influenza, qui entraîne la mort de 300 000 à 650 000 personnes et de 3 à 5 millions de cas sévères par an (Morçöl et al., 2017), ou la récente épidémie engendrée par le virus Ebola entre 2013 et 2016, en Afrique de l'ouest (Guinée, Sierra Leone, Liberia) qui a frappé plus de 28 000 personnes dont 11 000 décès, ainsi que des séquelles importantes chez les survivants.

D'autre part les infections chroniques sont toutes aussi dévastatrices, tant en termes de bilan humain que de bilan économique pour la société. Les infections par le VHB et le VHC concernent plus de 500 millions de personnes à travers le monde (Ng et al., 2013a), alors que celle par le VIH est responsable de la contamination de 77,3 millions d'individus depuis le début de l'épidémie, dont 36,9 millions encore contaminées à l'heure actuelle, et 940 000 décès (ONU SIDA : www.unaids.org). En effet, des infections chroniques sévères, nécessitent des traitements lourds sur de longue période qui impactent gravement la qualité de vie des patients.

L'amélioration des immunothérapies antivirales par AcM permettrait de réduire la durée des traitements et d'en augmenter l'efficacité, ce qui se traduirait par un bénéfice à la fois pour la société mais aussi et surtout pour les patients.

Les immunothérapies antivirales par AcM permettent d'entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques en apportant de nouveaux traitements pour des maladies encore incurables (Ebola), soit d'apporter une valeur ajoutée à des thérapies existantes (infections bactériennes, VIH).

II. Modulation de la réponse immune par les AcM antiviraux

Jusqu'à présent les AcM antiviraux ont été synthétisés et modifiés afin de potentialiser leurs effets directs sur leurs cibles. En effet ils sont le plus souvent sélectionnés pour leur pouvoir neutralisant, et leurs fonctions effectrices. Cependant peu d'études se sont concentrées sur les conséquences de l'administration des AcM sur la réponse immune des patients traités, c'est-à-dire leur effet immunomodulateur ou leur capacité à influencer l'efficacité de la réponse immune endogène. Ceci est assez surprenant, car les récepteurs des fragments Fc des AcM sont exprimés sur les cellules immunitaires et l'interaction entre le fragment Fc des AcM et les FcγRs pourrait donc influencer leur activation. En effet lors d'une immunothérapie par AcM, les AcM vont se fixer à leur cible antigénique et former un complexe immun (dorénavant désigné comme IC). Dans le cas d'une immunothérapie antivirale, l'antigène en question peut être soit le virus seul soit une cellule infectée (**Figure 3**). Ces IC vont être ensuite reconnus par le biais de leur fragment Fc sur les récepteurs FcγRs, exprimés à la surface des cellules immunitaires dont certaines sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comme les cellules dendritiques (DC) ce qui peut avoir un impact sur la réponse immunitaire et notamment sur la réponse adaptative. Ainsi, même si les fonctions immunorégulatrices des anticorps, par le biais des IC, sont connues depuis de nombreuses années dans différents contextes pathologiques, notamment de cancer et de maladies auto-immunes, (Bournazos and Ravetch, 2017a; Bruhns, 2012; Bruhns and Jönsson, 2015; DiLillo and Ravetch, 2015a; Getahun and Heyman, 2006) ce n'est que très récemment qu'elles sont exploitées dans le but de soigner des infections virales.

II.1. Rôle des immuns complexes (IC) dans la modulation de la réponse immune

Différentes études *in vitro* sur les IC dans un contexte viral, ont pu montrer que les IC pouvaient renforcer les propriétés effectrices et immunomodulatrices des cellules immunitaires, notamment des DC, par la potentialisation de leurs fonctions présentatrices d'antigènes qui induisent une forte réponse antivirale par les lymphocytes T. (Celis and Chang, 1984) (Yamamoto et al, 2009). Des expérimentations ont été réalisées avec des IC formés à partir de protéines virales issues du VHB (HBsAg) et d'un AcM anti-HBV. Elles ont montré que les IC affectaient les fonctions des DC avec une augmentation de l'expression du MHCII et une plus forte production d'IL12, ce qui contribuait à augmenter la prolifération des lymphocytes T spécifiques du virus ainsi que leur production d'IFN γ . Ils ont fait l'objet d'un essai clinique, mais les résultats n'ont pas été à la hauteur de leurs espérances. (Xu et al., 2008) D'autre part il a également été mis en évidence les fonctions immunomodulatrices des IC, via leur fragment Fc qui contribue à recruter les acteurs de la réponse immunitaire de l'hôte. Ceci montre le potentiel des IC dans des stratégies de type vaccinales associées à des adjuvants. Ceci a été réalisé dans des modèles d'infections chroniques, telles que celles par le VHB (Basalp et al, 2000; He LF et al, 2001;) ou le VIH (Hioe et al., 2009; Kumar et al., 2011, 2013). De plus les IC utilisés en tant que thérapie vaccinale contre le VHB dans des modèles de souris, ont montré une augmentation de la production d'anticorps endogènes spécifiques du virus. (Başalp et al., 2000)

En outre des résultats comparables ont été observés dans d'autres modèles réalisés avec des IC constitués par des virions entiers. Dans ce cas, les IC étaient formés par le virus SIV et des anticorps hautement neutralisants spécifiques du SIV retrouvés dans le sérum des animaux (Yamamoto et al., 2009).

Enfin d'autres études ont pu montrer ce rôle activateur des IC *in vivo* dans différentes infections virales, influenza (León et al., 2014), RSV (Kruijsen et al., 2010), LCMV (Duhan et al., 2016).

Par ailleurs des études similaires ont été menées sur le VIH, en 1988 où un peptide du VIH a été administré à des volontaires sains et a induit une augmentation de la réponse T (Berzofsky et al., 1988). Ces résultats ont été reproduits chez des souris immunisées avec des IC contenant une protéine recombinante du VIH-1, la gp120, et un AcM dirigé contre le CD4 (654-D). Les IC combinés à l'injection d'un adjuvant ont permis une augmentation de la réponse humorale des animaux (Hioe et al., 2009).

L'ensemble de ces différentes études a démontré que pour optimiser l'activation de la réponse immune antivirale par des IC, différents paramètres doivent être pris en compte, tels que la nature de l'antigène (protéines virales, virions, cellules infectées) et la nature de l'anticorps (AcM, anticorps polyclonaux, isotype, fragment Fc). De plus l'addition de molécules immunostimulatrices en combinaison avec les IC doit aussi être considérée, de même que la voie d'administration des IC, qui peuvent toutes deux influencer sur la réponse immune. (**Figure 7**)

Le rôle des IC formés à partir d'AcM antiviraux sur l'induction de la réponse immune endogène est détaillé dans la revue présentée en **Annexe 1**, « *Converting monoclonal antibody-based immunotherapy from passive to active : bringing immun complexe into play* ». Lambour J, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M, Pelegrin M. 2016. *Emerging Microbes and infections*.

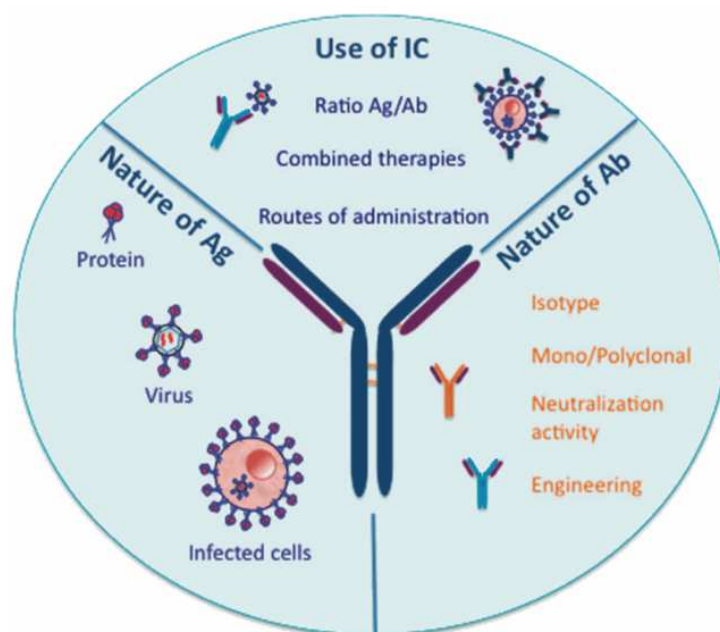


Figure 7 : Paramètres à considérer pour optimiser la modulation de la réponse antivirale par les IC. (Lambour et al., 2016)

II.2. Effets vaccinaux des anticorps monoclonaux antiviraux

II.2.1. Modèle murin d'infection par le virus FrCas^E : un modèle de choix dans la mise en évidence des effets vaccinaux des AcM antiviraux

Le manque de considération pour les fonctions immunomodulatrices des AcM antiviraux a participé à réduire leur exploitation mais ce n'est pas la seule raison. Le manque de modèles adéquats d'infections virales, en particulier d'infections virales chroniques humaines, chez des animaux immunocompétents, est sous doute, une des raisons majeures qui a conduit à sous-estimer leur potentiel thérapeutique.

La plupart des modèles murins utilisent des animaux immunodéficients, ce qui empêche de pouvoir évaluer le potentiel immunomodulateur de l'AcM testé. Ceci est particulièrement vrai pour les études d'AcM anti-VIH qui utilisent des modèles murins immunodéficients qui malgré le fait d'être des souris humanisées ne possèdent qu'un système immunitaire partiellement reconstitué (Shultz et al., 2012). Les autres modèles d'animaux non murins sont des modèles de primates non humain, très utiles pour déterminer l'effet protecteur des AcM anti-VIH mais ils possèdent également de lourdes contraintes techniques et sont extrêmement coûteux.

En revanche, les modèles murins disposent de nombreux outils expérimentaux et immunologiques, et permettent de réaliser des études sur de larges cohortes d'animaux à un coût raisonnable. De plus, le fait de réaliser des expérimentations *in vivo* avec un AcM qui a été produit dans la même espèce, que celle sur laquelle il est expérimenté, permet de conserver les fonctions effectrices de cet AcM et d'évaluer son potentiel immunomodulateur.

Enfin, il est clair que les résultats obtenus à partir de modèles murins, bien qu'extrêmement utiles dans la compréhension des mécanismes d'action des AcM, ne sont bien sûr pas toujours

extrapolables à l'Homme, mais de telles expérimentations chez l'Homme, ne seraient pas réalisables en raison de limitations économiques, techniques mais surtout éthiques.

Afin d'étudier les effets immunomodulateurs des AcM antiviraux, le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma Thèse a mis en place un modèle. Celui-ci est d'autant plus pertinent qu'il est l'un des rares modèles d'infections virales chroniques sur des souris immunocompétentes, ce qui permet d'étudier l'impact de l'immunothérapie par AcM sur la modulation de la réponse immune des animaux traités par immunothérapie.

L'infection est réalisée par le rétrovirus murin écotrope FrCas^E (Portis et al., 1990). Ce virus est un hybride entre le virus de Friend auquel l'enveloppe a été remplacée par l'enveloppe du virus CasBr.

Plus précisément, ce modèle d'infection par le virus FrCas^E est hautement reproductible avec une incidence de 100%. S'il est injecté entre 1 et 5 jours après la naissance des animaux, il va entraîner une neurodégénérescence fatale dans les 2 mois qui suivent. Le virus va alors d'abord se propager en périphérie avant d'atteindre le système nerveux central. (Gros et al., 2005)

Par contre s'il est injecté 8 jours après la naissance il va déclencher une érythroleucémie fatale dans les 3 à 5 mois (Michaud et al., 2010) qui suivent l'infection ceci par intégration au niveau du locus fli 1 des érythroblastes (DesGroseillers et al., 1983).

Le développement de cette pathologie est associé à une faible réponse immune tant au niveau cellulaire qu'humorale.

L'AcM utilisé pour traiter cette infection, est l'AcM 667 (McAtee and Portis, 1985), d'isotype IgG2a. C'est un AcM neutralisant qui va reconnaître la protéine d'enveloppe gp70 du virus FrCas^E, permettant de cibler les virions libres mais aussi les cellules infectées qui expriment la gp70 à leur surface. De plus, c'est un AcM de souris ce qui permet de conserver les fonctions effectrices et d'étudier son rôle immunomodulateur de la réponse immune.

II.2.2. Mis en évidence des effets vaccinaux induits par une immunothérapie antivirale par AcM

En utilisant ce modèle d'infection, l'équipe a montré de façon originale que lorsque les animaux sont traités sur une courte période (trois injections à 1h, 2j et 5J post infection) par l'AcM neutralisant 667, ils survivent plus d'un an, sans le moindre symptôme.

Ce qui est d'autant plus important c'est que les fonctions effectrices jouent un rôle clé dans l'effet protecteur de cette immunothérapie antivirale par AcM (**Figure 8**).

En effet la survie et par conséquent la protection des animaux est le résultat d'un contrôle de la propagation virale mais surtout de l'induction d'une forte réponse immune endogène de type Th1. En particulier une forte réponse humorale endogène spécifique du virus et une réponse T cytotoxique dirigée contre les cellules infectées (Gros et al., 2008; Nasser et al., 2010) (Michaud et al, 2010). De plus, les animaux réexposés au virus et ayant reçu l'immunothérapie par AcM ont développé une forte réponse mémoire. L'établissement de ces réponses est dû aux différentes fonctions de l'AcM sur les cellules immunitaires par le biais notamment de mécanismes dépendant des récepteurs aux IgG, les FcγRs. (Nasser et al., 2010 ; Michaud et al, 2010)

Tout d'abord, l'AcM 667 de par sa fonction neutralisante, diminue la propagation du virus libre et limite l'infection entre les cellules. Par le biais de son fragment Fc l'AcM va induire la lyse de cellules infectées par divers mécanismes dont l'ADCC, avec la contribution des cellules natural killer (NK) (Michaud et al, 2010).

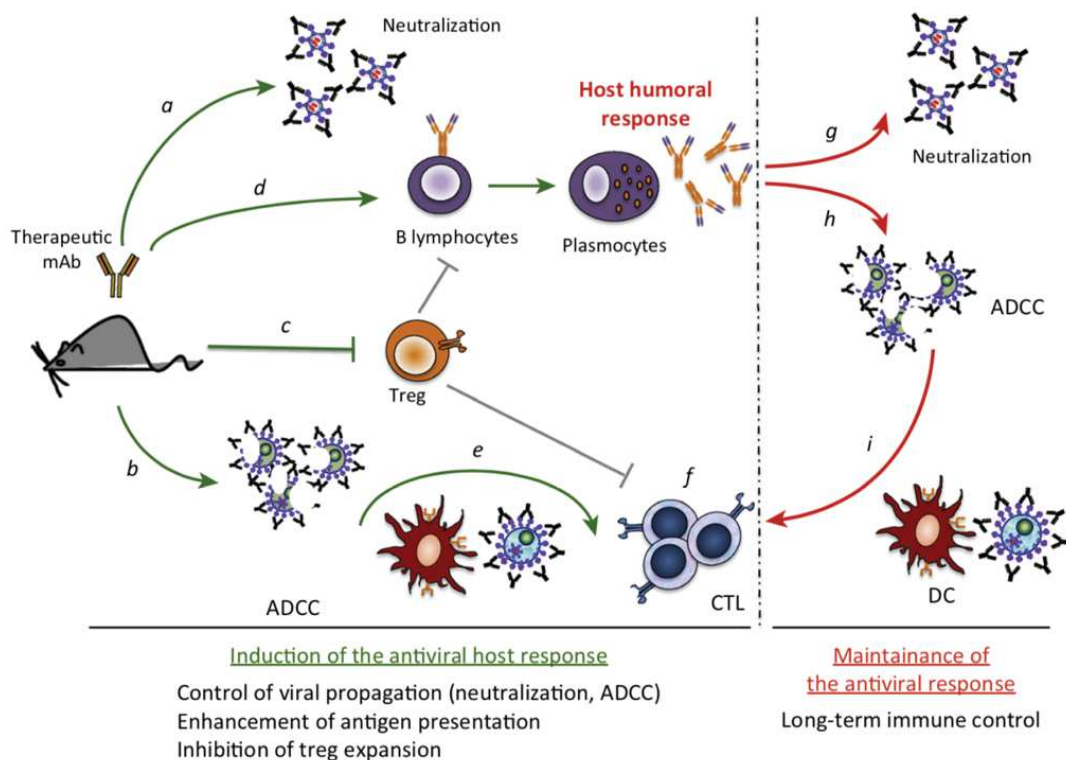


Figure 8 : Induction d'une immunité protectrice sur le long terme contre le virus FrCas^E, par des AcM antiviraux neutralisants (Pelegrin et al., 2015).

L'administration d'un AcM antiviral neutralisant dirigé contre la glycoprotéine d'enveloppe virale, à des souris infectées par le virus FrCas^E, limite la propagation du virus par neutralisation (a) et l'élimination des cellules infectées (b). En parallèle les complexes immuns (ICs) formés par le virus ou les cellules infectées qui expriment la glycoprotéine d'enveloppe à leur surface, prévient l'expansion des cellules T régulatrices (Treg) (c), ce qui est nécessaire au développement d'une réponse protectrice humorale (d) et cellulaire (e, f). En particulier les IC formés avec les cellules infectées et l'AcM thérapeutique activent les cellules dendritiques (DCs), ce qui engendre une augmentation de la réponse T-CD8 spécifique du virus. (f). Une fois que les anticorps thérapeutiques ont été éliminés des animaux infectés traités, c'est l'immunité adaptative qui contrôle la propagation virale à la fois par les anticorps antiviraux endogènes, induit par l'immunothérapie, (g, h) et par la maintenance de la réponse cellulaire T mémoire. Ceci requiert la formation d'ICs avec des cellules infectées résiduelles et l'activation des DC (i). Abbreviation : ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

Par ailleurs, les IC formés à partir de l'AcM 667 et du virus ou des cellules infectées, sont reconnus par les FcγRs exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et notamment les cellules dendritiques (DC). La capture des IC par les DC entraîne l'activation de ces dernières et mène à l'augmentation de la réponse cytotoxique des lymphocytes T (T CD8) spécifiques du virus FrCas^E.

D'autre part, outre une potentialisation de la réponse cellulaire, l'immunothérapie antivirale par l'AcM 667 induit une forte production d'anticorps endogènes spécifiques du virus, démontrant un fort impact de l'immunothérapie sur la réponse humorale (Gros et al, 2005 ; Michaud et al, 2010).

De plus, la réponse adaptative ainsi mise en place (réponse CTL et réponse humorale), contribue à la maintenance d'une réponse T mémoire, permettant de protéger les animaux en cas d'infection secondaire.

De façon plus inattendue, l'immunothérapie par l'AcM 667 entraîne non seulement l'activation d'une variété de réponses à la fois cellulaire et humorale mais permet également d'empêcher le développement de la réponse T régulatrice, renforçant ainsi l'induction la réponse immune protectrice. (Nasser et al, 2013)

Les travaux précédents de l'équipe ont aussi montré que les effets vaccinaux induits par l'immunothérapie antivirale par AcM était strictement dépendent du fragment Fc de l'AcM. En effet l'administration d'un anticorps d'un isotype différent, ou du Fab seul ne permet pas d'induire une forte réponse immune et de protéger les animaux (Nasser et al, 2010). Ces résultats montrent la dépendance du fragment Fc et dans l'effet immunomodulateur de l'AcM 667.

Ainsi, ces travaux ont permis d'établir la preuve de concept qu'une immunothérapie par AcM antiviraux pouvait être à l'origine « d'effets vaccinaux » par le biais de l'activation des cellules immunitaires (notamment les DC) par les IC via les FcγRs. En effet le modèle d'infection chronique par le virus FrCas^E, a permis de montrer qu'une immunothérapie sur le court terme pouvait être à l'origine non seulement du contrôle de la propagation virale mais également de l'induction d'une immunité protectrice sur le long terme.

II.3. Effets vaccinaux induits par des AcM antiviraux dans le cadre d'infections virales humaines

Les travaux dans le modèle FrCas^E ont été pionniers dans la preuve de concept des effets vaccinaux induits par des AcM antiviraux. Il est intéressant de constater que l'induction de la réponse immunitaire suite à une immunothérapie antivirale par AcM a également été démontrée dans d'autres modèles d'infections aussi bien aiguës que chroniques, et notamment dans des infections sévères pouvant toucher l'Homme.

En effet, il a été mis en évidence dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë par le RSV (respiratory syncycial virus), qu'un traitement prophylactique par AcM (131-2G) dirigé contre une protéine G d'attachement du virus, pouvait augmenter sensiblement la réponse immunitaire des animaux immunotraités. Il a été montré que l'AcM 131-2G, entraînait une augmentation de la réponse humorale spécifique du virus, caractérisée par une orientation de la réponse vers une réponse de type Th1. Ajouté à son action sur la réponse humorale, l'AcM entraînait aussi une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8 dirigés contre les cellules infectées. Une différence notable comparée à notre modèle est que l'effet de l'AcM sur les réponses T et B n'est pas dépendent du fragment Fc car des expérimentations réalisées avec un F(ab')₂ 131-2G ont montré les mêmes résultats.

Des constatations similaires, ont été faites dans des modèles d'infections chroniques sévères. Les modèles les plus développés étant ceux qui visent à l'étude de l'infection par le VIH.

Des macaques infectés par différentes souches de SIV (Simian immunodeficiency virus), chez des primates non humains, et traités par immunothérapie ont vu une augmentation de leur réponse immune antivirale (Haigwood et al., 2004). Cependant, ils n'ont pas été traités par des anticorps monoclonaux mais par un cocktail d'anticorps polyclonaux neutralisants. Différentes études ont été réalisées sur ce modèle, elles ont montré que l'immunothérapie par anticorps permettait de retarder la pathologie et d'induire une protection sur le long terme notamment par

une réduction de la charge virale, l'induction d'une réponse humorale anti-SIV, (Haigwood et al., 2004) et l'augmentation de la réponse T spécifique du virus, à la fois dans la phase aiguë (lymphocyte T CD4), et la phase chronique (lymphocyte T CD8) de la pathologie. De plus ces études ont également montré le rôle des CPA, en particulier les DC, dans l'induction de l'activation de la réponse T (Yamamoto et al., 2007).

En outre, toujours dans le but de se rapprocher des pathologies humaines, des modèles de primates non humains, plus représentatifs ont été mis au point. L'infection par le SHIV (Simian HIV), virus hybride entre le virus SIV et l'enveloppe du virus du VIH sur des macaques rhésus en est un exemple.

Différentes études ont été menées sur ce type de modèle et ont montré que l'administration d'AcM permettait d'agir sur le contrôle de la virémie et sur la réponse immune antivirale, qu'elle soit humorale ou cellulaire.

Des macaques d'un mois infectés par une souche de SHIV (SF162P3), et qui ont été traités avec un des premiers AcM humains anti-VIH produits (AcM b12) combiné à des immunoglobulines polyclonales anti-SHIV hautement neutralisantes (SHIVIG), ont vu une diminution de leur virémie plasmatique pendant 6 mois mais aussi une augmentation rapide de la synthèse d'anticorps neutralisants endogènes, attestant d'un impact sur la réponse humorale (Ng et al., 2010).

Nishimura et al, dans un modèle de macaque infecté par le SHIV_{AD8-EO} ont démontré qu'une administration précoce (pendant la phase aiguë de l'infection) d'AcM hautement neutralisants de seconde génération actuellement en cours d'essais cliniques (3BNC117 ou 10-1074) permettait de réduire la virémie à un faible taux. Ce taux résiduel constant permet d'entretenir une réponse CD8 spécifique du virus et de contrôler l'infection sur le long terme. (Nishimura et al., 2017)

D'autres études ont également confirmé un effet de l'administration d'AcM anti-SHIV sur la réponse cellulaire. Watkins et al, (Watkins et al., 2011) ont montré que des macaques infectés par voie intra-rectal par le SHIV-115ipEL-p et traité avec un AcM neutralisant HGN194, ont développé une réponse T CD4 et CD8, spécifique du virus. De même que Barouch et al (Barouch et al., 2013) qui dans un modèle de macaques infectés par SHIV_{SF162P3} et traités par un cocktail d'AcM anti-HIV (3BNC117, PGT121, b12), ont observé également une diminution rapide de la virémie et une augmentation de la réponse T spécifique du virus associée à une production d'anticorps neutralisants *de novo*. Ce qui est d'autant plus intéressant dans cette étude c'est que l'administration d'AcM a été effectuée 9 mois après l'infection, contrairement aux études précédentes. Ce contexte est en effet plus représentatif de ce qui se déroule durant l'infection par le VIH chez l'Homme où la plupart des patients ne sont traités que plusieurs mois, voire années après l'exposition au virus.

Ces travaux sont particulièrement encourageants, et montrent qu'un AcM antiviral peut potentiellement non seulement contrôler la virémie mais aussi moduler les réponses immunes antivirales à différents niveaux et sur des périodes plus ou moins longues en fonction de l'étude. Ils prennent encore davantage d'importance quand ils se concrétisent chez l'Homme. En effet des travaux sur l'AcM hautement neutralisant 3BNC117, dirigé contre la glycoprotéine gp120 du VIH-1, actuellement en essai clinique de phase 2a ont montré que l'administration de cet anticorps à des patients atteint du VIH-1, permettait d'une part de supprimer la virémie durant le rebond du virus lors de l'interruption du traitement (Scheid et al., 2016) attestant de son fort pouvoir neutralisant, et d'autre part d'augmenter la réponse humorale spécifique du VIH-1, montrant également un fort pouvoir immunomodulateur de la réponse immune adaptative. (Schoofs et al., 2016b)

Ces dernières études attestent de l'importance de la capacité neutralisante dans l'efficacité des AcM antiviraux, notamment pour le contrôle de la charge virale, mais elles soulignent aussi le rôle des fonctions effectrices et immunomodulatrices des AcM antiviraux dans l'établissement et la maintenance d'une réponse immune antivirale efficace sur le long terme. Or ces dernières fonctions sont induites par l'interaction du fragment Fc de l'AcM avec des FcγRs exprimés à la surface des cellules du système immunitaire.

III. Les FcγRs, atout des AcM antiviraux :

III.1. Définition et classification des FcγRs

Les FcγRs se répartissent en deux types (**Figure 9**). Les FcγRs de type I qui font partie de la superfamille des récepteurs aux IgG, à cause de leur région extracellulaire qui peut lier les IgG, tandis que les FcγR de type II appartiennent à la famille de récepteur de lectine de type C, qui peuvent lier le fragment Fc des IgG uniquement dans la conformation fermée, à l'interface entre le CH2 et le CH3 (Bournazos et al, 2017). Dans cet état de conformation, la liaison au récepteur de type I est inhibée, car la région où il censé se lier en CH2 n'est plus accessible. De plus, les FcγR de type II peuvent également lier d'autres ligands dont des IgE. (Pang et al, 2012).

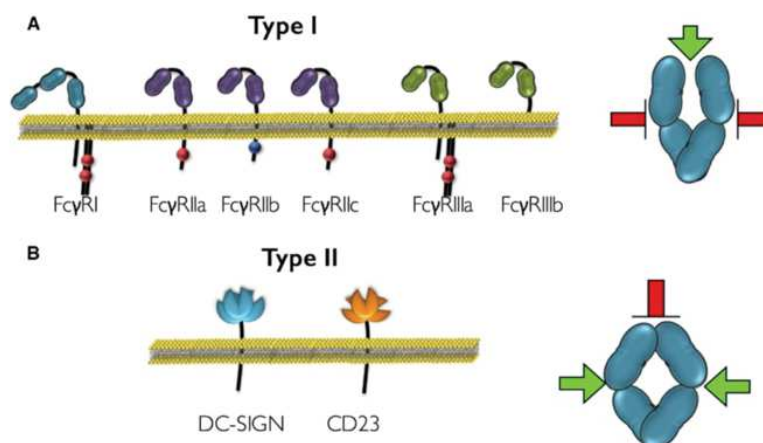


Figure 9 : Les différents types de FcγRs chez l'Homme. (A). Récepteur de type I. Conformation ouverte du CH2 (B). Récepteur de type II. Conformation fermée du CH2. (Bournazos et al, 2017)

L'engagement des FcγRs de type I par le fragment Fc des IgG, entraîne par le biais de la signalisation induite par leurs motifs intracellulaires, des réponses pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. C'est par ces différents types de réponses que les récepteurs sont classés en récepteurs activateurs et récepteur inhibiteur. (Bruhns and Jönsson, 2015)

La fixation des IC sur les récepteurs activateurs (FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB), entraîne l'agrégation des FcγRs qui conduit au recrutement de kinases (Syk, Src) via le motif ITAM (immunoreceptor tyrosine based activating motifs) (sauf pour le FcγRIIIB), du domaine intracellulaire des FcγRs. Cette interaction entraîne la phosphorylation et l'activation de plusieurs voies de signalisations pro-inflammatoires. Ceci détermine les fonctions effectrices de l'anticorps et influence l'activation des cellules immunitaires (Bournazos and Ravetch, 2017a).

En ce qui concerne le seul récepteur inhibiteur, le FcγRIIB, son rôle est de contrebalancer l'activation induite par la signalisation via le motif ITAM des FcγRs activateurs, par la phosphorylation du motif ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs) du FcγRIIB. Pour cela des phosphatases (SHIP :SH2-containing phosphatase) sont recrutées, et inhibent le recrutement et l'activation de kinases de la famille Src et PLCγ (Phospholipase C). Le FcγRIIB a aussi un rôle particulier en inhibant également le signal du BCR (B cell receptor) sur les lymphocytes B. Le FcγRIIB a pour principal rôle de contrôler l'inflammation induite par les IgG, et est impliqué dans les mécanismes de tolérance.(Li et al., 2014)

Les FcγRs de type II, sont le CD23 et DC-SIGN. La signalisation CD23 est initiée par la liaison de CD23 au IgE. Le CD23 possède deux isoformes à l'expression distincte. L'isoforme CD23a est constitutivement exprimée sur les lymphocytes B et l'isoforme CD23b est induite par l'IL4 à la surface des lymphocytes T et des monocytes (Yokota et al, 1988). Le CD23 peut activer de nombreuses voies d'activation dont les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et NFκB.

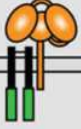
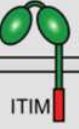
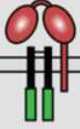
Pour l'autre récepteur de type II, DC-SIGN, on ne connaît pas exactement les conséquences biologiques de la signalisation induite par l'engagement de ce récepteur, principalement en raison de la diversité de ces possibles ligands (McGreal et al., 2005). Il a été établi que via une protéine adaptatrice (LPS1) située au niveau de son domaine intracellulaire, il entraîne une signalisation qui va activer les GTPases Rho et Ras, qui peuvent conduire à la stimulation de nombreuses voies d'activation immunologiques (Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

III.2. Les FcγRs de type I, similitudes et différences entre l'Homme et la souris

Les récepteurs activateurs sont au nombre de 3 chez la souris (FcγRI, FcγRIII et FcγRIV) et de 5 chez l'Homme (hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIC, hFcγRIIIA, hFcγRIIIB), alors qu'un seul récepteur inhibiteur est retrouvé chez les deux espèces (FcγRIIB). (Bournazos and Ravetch, 2017b; Bruhns and Jönsson, 2015)

L'expression des FcγRs varie à la surface des cellules immunitaires. Certaines cellules en expriment plusieurs à leur surface comme les neutrophiles murins (FcγRIIB, FcγRIII, FcγRIV) et certaines en expriment un seul comme les cellules NK murin (FcγRIII). De plus un même récepteur peut être exprimé à la fois sur la surface des cellules myéloïdes ou des cellules lymphoïdes sans pour autant entraîner les mêmes conséquences biologiques, qui vont être spécifiques pour chaque cellule immunitaire.

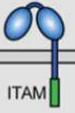
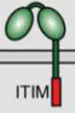
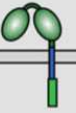
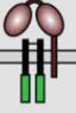
Chez la souris (**Tableau 1**), l'expression du FcγRI (CD64) est très faible, restreinte aux macrophages tissulaires et aux DC dérivées des monocytes. Elle peut être aussi induite sur les monocytes macrophages et polynucléaires neutrophiles dans des conditions inflammatoires. Le FcγRIIB (CD32) et le FcγRIII (CD16) sont tous les deux exprimés sur différentes cellules myéloïdes (DC, monocytes /macrophages, granulocytes) ainsi que sur des cellules B (FcγRIIB) et les cellules NK (FcγRIII). Le FcγRIV (CD16-2) est exprimé constitutivement sur les monocytes/macrophages et sur les polynucléaires neutrophiles. En revanche son expression sur les DC est controversée, certaines études affirment son expression (DiLillo and Ravetch, 2015a) et d'autres non (Bruhns and Jonsson, 2015 ; Rosales, 2017).

Name	FcγRI	FcγRIIB	FcγRIII	FcγRIV	FcRn
Gene	<i>Fcgr1</i>	<i>Fcgr2b</i>	<i>Fcgr3</i>	<i>Fcgr4</i>	<i>Fcgrt</i>
					
Alleles	/	Ly17.1/ Ly17.2	V, T, H	/	/
IgM	–	–	–	–	–
IgG1	–	3x10 ⁶	3x10 ⁵	–	8x10 ⁶
IgG2a	3x10 ⁷	4x10 ⁵	7x10 ⁵	3x10 ⁷	+
IgG2b	1x10 ⁵	2x10 ⁶	6x10 ⁵	2x10 ⁷	+
IgG3	+	–	–	–	+
IgE	–	2x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ⁵	–
IgA	–	–	–	–	–
Major role	Activation	Inhibition	Activation: ITAMI- inhibition	Activation	IgG recycling; transport. Ag pres.
B cell	–	+	–	–	–
T cell	–	–	–	–	–
NK cell	–	–	+	–	–
Mono/MΦ	+/-	+	+	+	+
Neutrophil	–	+	+	+	+
DC	+/-	+	+	–	+
Basophil	–	+	+	–	?
Mast cell	–	+	+	–	?
Eosinophil	–	+	+	–	?
Platelet	–	–	–	–	–

Bruhns and Jönsson, 2015

Tableau 1 : Caractérisation des FcγRs, chez la souris, par leurs expressions à la surface des cellules immunitaires, leurs affinités pour les différents isotypes d'IgGs, et leurs fonctions (activateur, inhibiteur) (Bruhns and Jönsson, 2015)

Chez l'homme (**Tableau 2**), l'expression du hFcγRI (CD64) est limitée aux monocytes/macrophages et DC, et peut être aussi induite, comme chez la souris à la surface des polynucléaires neutrophiles et sur les mastocytes. L'expression du hFcγRIIA (CD32A) est restreinte aux cellules myéloïdes, les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles, ainsi que les mastocytes. Le hFcγRIIB est très fortement exprimé à la surface des lymphocytes B, et est retrouvé faiblement à la surface des monocytes, DC et des polynucléaires neutrophiles. Le hFcγRIIIA (CD16A) est quant à lui retrouvé à la surface des NK, et des monocytes/macrophages, tout comme le hFcγRIIC (CD32C) qui est exprimé également sur les polynucléaires neutrophiles. Le hFcγRIIIB (CD16B) est retrouvé principalement sur les polynucléaires neutrophiles, et un sous type de polynucléaires basophiles. (Bruhns, 2012)

Name	FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIC		FcγRIIIA		FcγRIIIB		FcRn
CD	CD32A		CD32B		CD32C		CD16A		CD16B		-
Gene	FCGR2A		FCGR2B		FCGR2C		FCGR3A		FCGR3B		FCGRT
											
Alleles	H ₁₃₁	R ₁₃₁	I ₂₃₂	T ₂₃₂	Q ₁₃	stop ₁₃	V ₁₅₈	F ₁₅₈	NA1, NA2, SH	/	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgG1	5x10 ⁶	3x10 ⁶	1x10 ⁵	ND	1x10 ⁵	-	2x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	8x10 ⁷	
IgG2	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁴	ND	2x10 ⁴	-	7x10 ⁴	3x10 ⁴	-	5x10 ⁷	
IgG3	9x10 ⁵	9x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	1x10 ⁷	8x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁷	
IgG4	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	2x10 ⁷	
IgE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Major role	Activation; ITAMi-inhibition		Inhibition		Activation		Activation; ITAMi-inhibition		Decoy; Activation		IgG recycling; transport. Ag pres.
B cell	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	low
T cell	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK cell	-	-	-1	+	-	+	-	-	-	-	-
Mono/MΦ	+	+	+/-	+	-	+	-	-	-	+	+
Neutrophil	+	+	+/-	+	-	-	-	-	+	+	+
DC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Basophil	+	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-
Mast cell	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?
Eosinophil	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Platelet	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?

Bruhns and Jönsson, 2015

Tableau 2 : Caractérisation des FcγRs, chez l'Homme, par leurs expressions à la surface des cellules immunitaires, leurs affinités pour les différents isotypes d'IgG et leurs fonctions (activateur, inhibiteur) (Bruhns and Jönsson, 2015).

Les FcγRs ont été bien conservés durant l'évolution des mammifères, c'est pourquoi on retrouve des récepteurs communs à l'Homme et la souris (FcγRIIB). Néanmoins on retrouve aussi des différences, par exemple le FcγRIII unique chez la souris possède plusieurs isoformes chez l'Homme (hFcγRIIIA et hFcγRIIIB). De plus le FcγRIV, présent chez la souris est absent chez l'homme et a pour homologue structural le hFcγRIIIA. On note aussi que si tous les FcγRs activateurs de la souris possèdent une sous unité γ, qui contient le domaine ITAM, ce n'est pas le cas de tous les FcγRs activateurs humains, ou seuls les hFcγRI et le hFcγRIIIA possèdent la chaîne γ. En effet, les autres hFcγRs activateurs (FcγRIIA et FcγRIIC), possèdent un motif ITAM directement inséré dans leur domaine intracellulaire. Le récepteur activateur FcγRIIIB, n'a pas de domaine cytoplasmique et ne possède pas de motif ITAM mais est lié, à la place, à une ancre GPI dont la signalisation est encore méconnue. (Rosales, 2017). Par ailleurs, on remarque également que tous les FcγRs de souris peuvent lier les IgG murines et humaines alors que les hFcγRs ne vont pouvoir interagir efficacement qu'avec des IgG humaines. De,

plus tous les hFcγR peuvent lier les hIgG1, classe majoritaire d'IgG chez l'Homme, alors que seul le FcγRIII peut lier les IgG1 de souris. (**Tableaux 1 et 2**)

Chaque FcγR possède sa propre affinité. Chez les souris le FcγRI est un récepteur de haute affinité qui peut lier des IgG monomériques. Le FcγRIV est considéré comme un récepteur d'affinité intermédiaire de façon globale mais il lie les IgG2a et IgG2b avec une forte affinité, alors que le FcγRIIB et FcγRIII sont catégorisés en récepteurs de faible affinité et ne sont engagés que quand des immuns complexes multivalents sont liés. Cette affinité est dépendante du type d'isotype d'IgG rencontré, les IgG2a de souris se lient à tous les types de FcγRs murin alors que les IgG1 de souris vont préférentiellement se lier au FcγRIIB. En ce qui concerne les FcγRs humains, ils ont une faible affinité pour les IgG2 et IgG4, alors que les IgG1 et IgG3, interagissent fortement avec tous les FcγRs. (**Tableaux 1 et 2**)

Un récepteur commun à l'Homme et la souris, est différent des autres, il s'agit du FcRn. Il est apparenté au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHCI) (Kacskovics et al, 1989) et est exprimé par les cellules myéloïdes. Il est principalement impliqué dans le recyclage des IgG et de l'albumine, (Anderson et al., 2006) par un mécanisme dépendant du pH, ainsi que dans la transcytose (McCarthy et al., 2001) permettant la distribution des IgG et est surtout associé à la pharmacocinétique des anticorps (Magdelaine-Beuzelin et al., 2009; Roopenian and Akilesh, 2007).

III.3. Le FcγRIV

Comme dit précédemment le FcγRIV est un des récepteurs activateurs exprimés par les cellules myéloïdes, chez la souris. Il possède une forte affinité pour les IgG2a et IgG2b ainsi qu'une faible affinité pour les IgE. Ceci fait de lui un récepteur particulièrement intéressant pour notre étude car l'AcM thérapeutique utilisé est un anticorps d'isotype IgG2a.

Depuis sa découverte en 2005 (Nimmerjahn et al., 2005) le FcγRIV n'a quasiment pas été étudié dans un contexte viral. Son rôle a été surtout évalué dans des contextes d'anaphylaxie (Balbino et al., 2017; Jönsson et al., 2011), de maladies auto-immunes dans des modèles d'épidermolyse bulleuse acquise (Baudino et al., 2008; Nimmerjahn et al., 2005), de polyarthrite rhumatoïde (Nimmerjahn et al, 2010), d'hypersensibilité de type III, (Stamatiades et al., 2016) ou de cancer dans un modèle de mélanome (Nimmerjahn, 2005; Simpson et al., 2013) et de métastase hépatiques (Otten et al., 2008).

Dans le contexte d'hypersensibilité de type III, (Geissmann F et al, 2016) il a été montré que la fixation des small immuns complexes (SIC) (700 kDa), par les macrophages des reins été médiée par le FcγRIV. Cette étude a également permis de montrer qu'il y avait un effet synergique entre le FcγRIV et la voie des TLR (TLR9) dans l'activation des macrophages résidents par les SIC.

Dans un modèle pré-clinique de mélanome traité par anti-CTLA4, Simpson et al, (Simpson et al., 2013); ont montré que le FcγRIV était impliqué dans l'élimination des cellules T régulatrices infiltrées dans la tumeur, en réponse à l'anti-CTLA4. De plus Lehmann et al (Lehmann et al., 2017) ont montré que le FcγRIV permettait de renforcer les fonctions présentatrices d'antigènes des DC et était ainsi capable dans des conditions inflammatoires (modèle OVA, antigène d'ovalbumine) de potentialiser les réponses T CD4 et T CD8.

D'autre part outre son rôle dans des contextes pathologiques divers, il occupe également un rôle physiologique dans le contrôle de la formation osseuse en régulant la formation des ostéoclastes (Negishi-Koga et al., 2015).

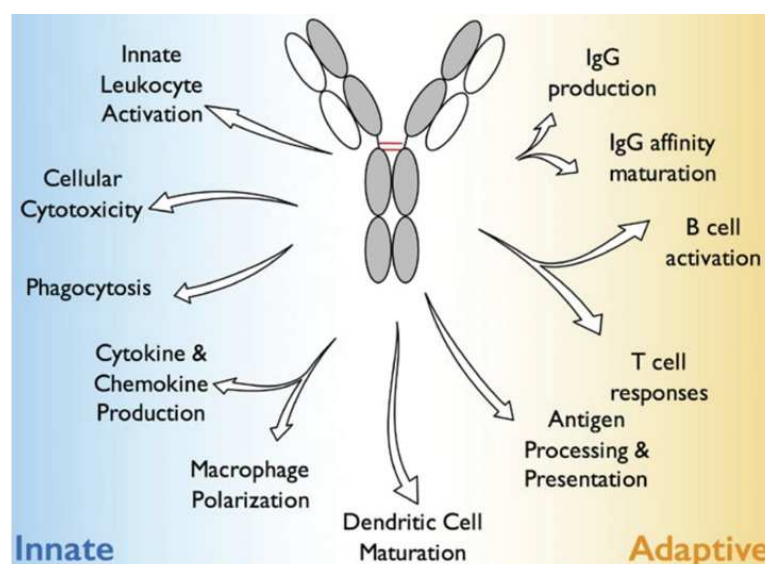
Cependant la majorité de ces études se sont focalisées sur le rôle du Fc γ RIV dans les fonctions effectrices des cellules, peu mentionnent son rôle dans les fonctions immunomodulatrices des cellules immunitaires. De plus son rôle dans un contexte d'infection virale n'a jamais été décrit, ni celui dans le cadre d'une immunothérapie antivirale.

III.4. Conséquences immunologiques induites par des Fc γ Rs

III.4.1. Rôle des Fc γ Rs sur les fonctions effectrices des AcM

Les Fc γ Rs appartiennent à un système complexe, dont la variation des nombreux paramètres (isotypes, affinité, expression différentielle à la surface des cellules immunitaires) permet une organisation et une modulation fine de la réponse immune. (Bournazos and Ravetch, 2017)

Ainsi les différents Fc γ Rs, par le biais de leur engagement par des IgG, contribue à la modulation de la réponse immune en régulant les fonctions effectrices et immunomodulatrices des cellules immunitaires qui les expriment. (**Figure 10**)



Bournazos and Ravetch, 2017.

Figure 10 : Conséquences immunologiques de l'engagement des Fc γ Rs par des AcM (Bournazos and Ravetch, 2017)

La capacité des IgG à interagir avec les Fc γ Rs induit l'activation de diverses fonctions, par des cellules appartenant aussi bien à l'immunité innée qu'acquise, modulant ainsi finement la réponse immunitaire.

Il est connu par exemple, que l'engagement de Fc γ Rs activateurs sur les neutrophiles ou les mastocytes entraîne le relargage de granules cytotoxiques et de ROS (reactive oxygen species), qui sont des composés microbicides (Bracke et al., 1998; Sobota et al., 2005). L'engagement du Fc γ RIIIA sur les cellules NK entraîne une réaction similaire avec la sécrétion d'enzymes de type perforine, granzyme qui vont perforer la membrane de la cellule cible cancéreuse ou infectée fixée par le biais de l'AcM. (Perussia et al., 1987; Vivier et al., 2011).

D'autre part, l'engagement des FcγRs sur les cellules présentatrices d'antigènes peut avoir des conséquences sur l'immunité cellulaire et humorale, en modulant leur maturation et leur fonction présentatrice d'antigène ce qui influe directement sur la réponse T. Ainsi l'engagement des FcγRs à la surface des macrophages, couplé à d'autres stimulations, comme le TLR4 (Toll like receptor), entraîne une polarisation spécifique qui induit la sécrétion d'IL6, d'IL10, et augmente les fonctions de migration et de phagocytose des macrophages. (Clynes et al., 1999)

La signalisation déclenchée par la sollicitation des FcγRs activateurs entraîne également des modifications au niveau du programme transcriptionnel de la cellule avec une augmentation de sécrétion de cytokines et de chimiokines aux propriétés immunomodulatrices.

Cette production de chimiokines et de cytokines peut elle-même agir sur l'expression des FcγRs. Par exemple l'IFNγ peut induire une augmentation de l'expression du récepteur humain FcγRIIIB à la surface des polynucléaires éosinophiles (Uciechowski et al., 1998), ou l'IL4 qui peut augmenter celle du FcγRIIB à la surface des cellules myéloïdes et induire l'expression de CD23 sur diverses cellules (les lymphocytes T, monocytes, macrophages..)(Anthony et al., 2011)(Chan et al, 2010). Ces modifications d'expression vont impacter l'activation des voies de signalisations et ainsi moduler les différentes fonctions des cellules immunitaires exprimant ces récepteurs.

De nombreuses études ont montré que l'engagement des FcγRs pouvait orienter la réponse immune dans divers contextes pathologiques mais très peu concernent celui des immunothérapies antivirales.

III.4.2. FcγRs et fragment Fc : variants et conséquences sur la réponse immunitaire

a). Impact du polymorphisme des FcγRs sur la réponse immune

Certains FcγRs humains, possèdent des polymorphismes, qui peuvent influencer sur l'efficacité des réponses immunitaires. Les polymorphismes influent surtout sur l'affinité et l'activité des FcγRs, et donc des fonctions effectrices des IgG (Bournazos et al., 2009). Il a été démontré dans des modèles de cancer que les variants V158 du FcγRIIIA au lieu du F158 augmentait l'affinité pour les IgG1 humains et l'allèle H131 du FcγRIIA permet d'augmenter la liaison au IgG1 humain, comparé à l'allèle 131R. Ceci permettant de potentialiser la réponse immune suite à l'administration d'AcM anti-tumoraux (Musolino et al, 2008 ; Weng et al 2003).

De même, dans le cadre d'une infection virale certains polymorphismes permettent d'amplifier la réponse induite par des AcM neutralisant antiviraux (DiLillo.2014, Bournazos.2014). Le polymorphisme R131H du FcγRIIA a été décrit comme important dans la réponse antivirale dans diverses infections virales, comme par le virus de la Dengue (Loke et al, 2002) ou le virus Influenza H1N1 (Zuniga et al, 2012).

Certains polymorphismes peuvent aussi être des mauvais pronostiques ou sensibiliser à certaines infections. Munde al (Munde et al., 2017) ont montré dans une étude menée au Kenya que l'haplotype FcγRIIIA 176F, FcγRIIA-131R et FcγRIIIB-NA2, était associé à une plus grande susceptibilité pour l'anémie sévère dû à la malaria, chez l'enfant.

De la même façon le polymorphisme du FcγRIIA-131R est aussi associé à une persistance des symptômes lors de l'infection par le virus de la dengue (Dettogni et al., 2015). Dans le cadre de l'infection par le VIH, le polymorphisme du FcγRIIIA-V158-F, n'est pas associé à une

réponse antivirale en soi mais à une susceptibilité au développement du sarcome de Kaposi (Forthal et al., 2007).

b).Impact des modifications du fragment Fc sur la réponse immunitaire

Des techniques de bio-ingénierie ont été développées pour modifier les fragments Fc dans le but d'améliorer les immunothérapies par AcM.

Les mutations du fragment Fc peuvent influencer l'affinité de la liaison aux FcγRs, comme la mutation G236A qui favorise la liaison au FcγRIIA, exprimé sur les monocytes et les macrophages, augmentant ainsi la phagocytose (Richards et al, 2008.) ou la mutation S239D:E330L:I332E , qui induit une liaison spécifique pour le FcγRIIA exprimé sur les NK, potentialisant l'ADCC d'un facteur 100 (Lazar et al, 2006) .

De plus les mutations, au-delà d'augmenter les fonctions effectrices peuvent aussi allonger la demi-vie de l'anticorps en augmentant la liaison au FcRn, comme la substitution naturelle H435A qui augmente la demi-vie des IgG3 (Stapleton et al, 2011). Des AcM thérapeutiques sont aussi conçus avec des modifications similaires c'est le cas du mutant VRCO1-LS, qui est un AcM hautement neutralisant dont le fragment Fc a été muté pour augmenter son affinité de liaison au FcRn, ce qui a permis d'augmenter significativement sa demi-vie et d'augmenter l'effet protecteur, comparé à l'AcM non muté, dans un modèle d'infection intra-rectale par le SHIV (Simian-human immunodeficiency virus), chez des primates non humains (Ko et al., 2014).

D'autres modifications des fragments Fc des AcM peuvent également influencer la réponse immunitaire. En effet les anticorps sont en partie constitués de glycannes qui représentent 2 à 3 % de la masse de l'IgG (150 kDa). De façon intéressante la composition en glycannes du fragment Fc des IgG est hétérogène et varie en fonction de la région géographique (Alter et al., 2018a) Maha et al, 2016). De plus la source de production des AcM a aussi son importance dans le profil de glycosylation des AcM car il varie en fonction de l'espèce AcM (mammifère, levure, baculovirus) en raison de différences dans les modifications post-traductionnelles.

De façon générale, les 7 unités saccharidiques présentes sur le fragment Fc permettent l'interaction de l'anticorps avec les FcγRs (Thulin et al, 2018) est a donc de multiples conséquences sur les fonctions des anticorps (fonctions effectrices, immunogénicité, solubilité, sécrétion, conformation) (Jefferis et al, 2012). Plusieurs glycoformes possèdent des affinités de liaison différentes en fonction des FcγRs. (Tang et al, 2015).

Le contexte physiologique ou pathologique influe aussi sur la composition en glycannes des Fc avec des conséquences multiples sur la réponse immunitaire.

En effet le nombre des résidus de galactose et d'acide sialique est augmenté durant la grossesse (Van de Geijn et al, 2009) alors qu'il est réduit dans un contexte de maladie auto-immune (Kaneko et al, 2006), dans des cas de polyarthrite rhumatoïdes (Hazes et al, 2014) et de granulomatose de Wegener (Kavian et al, 2011).

Par exemple des IgG dont le fragment Fc est afucosylé entraine une plus grande affinité pour le FcγRIIA (Alter et al., 2018b), et une augmentation de l'ADCC, notamment par l'augmentation de sa liaison avec des cellules exprimant le FcγRIIA telles que les NK, dans des contextes de maladie auto-immune, inflammatoire, infectieux.(Thulin et al, 2018 ; Liu et al, 2015). Dans le cas de l'infection par le VIH on note une augmentation du nombre d'anticorps

agalactosylés et afucosylés qui est associée à une meilleure activation des NK (Royle et al, 2008 ; Alter et al, 2018).

Des thérapies, comme une vaccination contribuent également à modifier la glycosylation des anticorps. Une étude a montré, suite à la vaccination d'une cohorte de patients vaccinés contre le virus de la grippe (Influenza), qu'il y avait une augmentation de l'expression d'enzymes responsables de l'addition de sucre telles que la sialyltransférase et la fucosyltransférase dans les cellules B mémoires et ceci, de façon corrélée à l'augmentation de certaines glycoformes d'IgG (Tan et al 2015).

Ainsi, ces différentes études montrent que les modifications de la glycosylation lors de l'induction de réponses immunes ont de réelles conséquences sur la modulation des réponses innées et acquises et qu'une meilleure compréhension de leur effet pourrait contribuer à l'amélioration des immunothérapies par AcM.

IV. Les polynucléaires neutrophiles : des cellules aux multiples talents

IV.1. Les polynucléaires neutrophiles

IV.1.1. Présentation générale

Les polynucléaires neutrophiles, désormais désignés dans le texte par neutrophiles, sont des cellules du système immunitaire appartenant à la lignée myéloïde, et ont été décrits par Paul Ehrlich en 1900. Ils ont un diamètre de 10 à 15 μm chez l'Homme, avec un noyau unique mais segmenté qui leur vaut le nom de polynucléaire et des granules cytoplasmiques qui restent de couleur neutre lors d'une coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa), qui leur vaut le nom de neutrophiles. Ils représentent la population majoritaire des leucocytes humains avec 60 à 70 % des leucocytes circulants, alors qu'ils ne représentent que 30% des leucocytes chez la souris. Ils ont une durée de vie courte, 1,5h pour la souris et 8h chez l'Homme en conditions contrôlées (Naumenko et al., 2018a). Cependant en cas d'infection leur durée de vie peut être allongée jusqu'à 12,5h pour la souris et 5,4 jours pour l'Homme (Pillay et al., 2010). Ils sont également renouvelés extrêmement rapidement par la moelle osseuse, qui consacre 55 à 60% de ses fonctions à leur production (Edwards, 2005), avec environ 100 millions de cellules produites en une minute chez l'Homme, soit $1,5 \times 10^{11}$ par jour (Parker et al 2000). De plus ces cellules sont l'un des principaux acteurs de l'immunité innée, et sont les premières cellules à être recrutées sur le site d'infection (Kay, 2016). Cet allongement de la survie peut être le résultat de la présence de facteur de croissance tel que le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), ou de cytokines inflammatoires telles que l'interféron (IFN), ou le TNF (tumor necrosis factor) connues pour prolonger la survie des neutrophiles (Colotta et al., 1992).

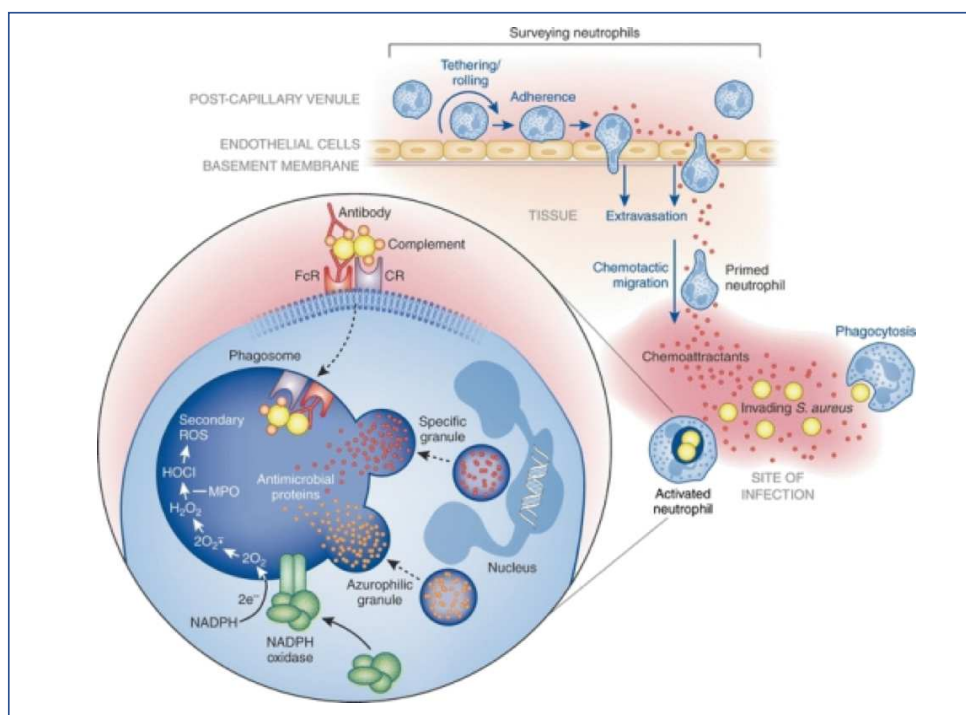
Les neutrophiles ont longtemps été perçus comme des cellules effectrices destinées à éliminer rapidement les pathogènes de l'organisme. Pour cela, elles migrent de la circulation vers le site de l'infection où elles ont à leur disposition de nombreuses fonctions effectrices et immunomodulatrices pour éliminer les pathogènes (Petri et al., 2008).

La vision des neutrophiles a évolué au cours du temps, et depuis quelques années nous assistons à un véritable changement de paradigme. Les neutrophiles ne sont plus simplement définies comme des soldats de première ligne destinés à éliminer rapidement la menace puis à être éliminés à leur tour. Désormais ils sont considérés avec tout l'intérêt qu'ils méritent et sont même désignés comme orchestrateurs de la réponse immune notamment grâce à leurs fonctions

immunomodulatrices qui leur permet dans divers contextes pathologiques de coordonner la mobilisation des cellules impliquées aussi bien dans l'immunité innée que l'immunité acquise.

IV.1.2. Fonctions effectrices des neutrophiles

Les neutrophiles font parties des toutes premières cellules de l'immunité innée à intervenir lors d'une infection en migrant jusqu'aux tissus (**Figure 11**). Pour cela les neutrophiles s'attachent fortement à l'endothélium, par le biais de molécules d'adhésion exprimées à leur surface et à celles des cellules endothéliales, puis ils roulent le long de l'endothélium, c'est le « rolling », avant de se faufiler entre les cellules endothéliales par un processus de diapédèse, et d'atteindre la zone d'infection ou d'inflammation guidés par des gradients chimiotactiques (Sundd et al., 2013).



Rigby et al, 2011.

Figure 11 : Migration sur le site de l'infection et phagocytose des pathogènes par les neutrophiles. Les neutrophiles émigrent de la circulation vers le site de l'infection. Pour cela ils adhèrent progressivement à l'endothélium par un processus de « rolling ». Ils détectent ensuite un signal chimiotactique diffusé depuis le site de l'infection qui les activent et traversent l'endothélium par un mécanisme de diapédèse. Une fois sur le site de l'infection ils phagocytent les pathogènes extracellulaires. Les pathogènes phagocytés sont ensuite détruits par la sécrétion de ROS, de granules cytotoxiques et de peptides antimicrobiens à l'intérieur du phagosome.

Une fois sur le site de l'infection, ils peuvent être activés et utiliser ses nombreuses fonctions effectrices pour éliminer les pathogènes (**Figure 11**). Parmi ces fonctions, la phagocytose, qui est réalisée par la reconnaissance des pathogènes ou PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) par des récepteurs exprimés à sa surface, les PRR (pattern-recognition receptors) ou pour le cas de particules opsonisées par les FcγRs, ou le complément, (comme décrit précédemment)(Kolaczowska and Kubes, 2013). Une fois reconnue ils les emprisonnent à l'intérieur d'une vacuole, le phagosome, (Greenberg et al, 1993 ; (Nordenfelt and Tapper, 2011)) qui fusionne avec des granules contenant des enzymes hydrolytiques qui vont dégrader

les pathogènes. Ce procédé est extrêmement efficace, les particules peuvent être phagocytées en moins de 20s, pour le cas des particules opsonisées par les IgG (Segal et al, 1980).

Les neutrophiles sont également caractérisés par la dégranulation de granules cytotoxiques (**Figure 12**). Plusieurs types de granules gravitent dans le cytoplasme des neutrophiles, et apparaissent aux différents stades de développement des neutrophiles.(Bardoel et al., 2014; Evrard et al., 2018) Les granules primaires ou azurophiles, représentent 20% des granules totales des neutrophiles, elles sont constituées de myéloperoxydase ainsi que de peptides cationique anti-microbien , qui par interaction avec les charges négatives des membranes vont induire la création de pores à l'intérieur du pathogène. Ces granules sont destinés à être sécrétés dans les phagosomes lors de la phagocytose. Les granules secondaires ou spécifiques, constituent 60 à 80 % des granules totales et sont riches en substances anti-microbiennes et en α -défensines. Elles sont destinées à être larguées dans le milieu extracellulaire, pour dégrader les pathogènes. Les granules gélatinases ou tertiaires sont impliquées dans la migration des neutrophiles car elles sont composées de substances permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et facilitent le passage des neutrophiles entre les tissus. Les vésicules sécrétoires sont les premières à être libérées en présence de stimuli inflammatoires et libèrent des phosphatases alcalines. Elles sont formées par endocytose avec la membrane externe des neutrophiles et constituent donc une source de récepteurs, qui peut être rapidement mobilisée en cas de stimulation du neutrophile. Toutes les granules ne sont pas sécrétées en même temps, une petite activation suffit à faire sécréter les vésicules et les granules tertiaires alors que les granules primaires et secondaires, ne seront sécrétés que si la phagocytose n'a pas été suffisante pour éliminer les pathogènes (Mayadas et al., 2009).

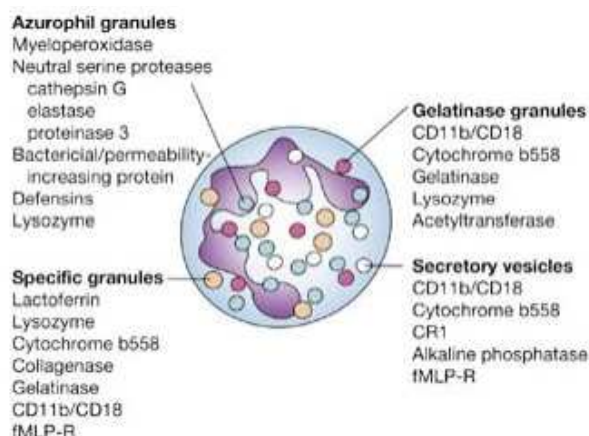


Figure 12 : Composition des granules cytoplasmiques des neutrophiles (site Epo Medecine)

Ajouté aux nombreux composés enzymatiques sécrétés par les granules cytotoxiques, les neutrophiles peuvent générer des formes réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species), particulièrement efficace pour lutter contre les infections bactériennes ou fongiques. Elles sont formées à partir d'anions superoxyde (O_2^-) par le complexe NADPH oxydase (Kuijpers and Lutter, 2012), localisé sur la membrane des phagosomes ainsi que sur la membrane externe des neutrophiles, ce qui permet une libération rapide dans le milieu extracellulaire. (**Figure 13**). L'anion superoxyde est le précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène encore plus toxiques, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut lui même être transformé en acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase (MPO) (Lambeth, 2004) se trouvant dans les granules cytotoxiques. Ces composés sont certes efficaces pour lutter contre les infections, mais s'ils sont sécrétés en trop grande quantité, ils peuvent aussi créer des

dommages importants aux niveaux tissulaires et entrainer une réaction inflammatoire exacerbée (Gougerot-Pocidallo et al., 2002).

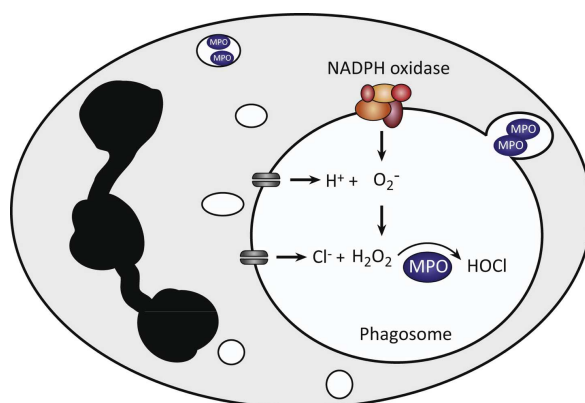


Figure 13 : Schéma de la génération des formes réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles. (Baordel et al, 2014)

Parmi les fonctions effectrices des neutrophiles, la plus décrite est sans doute la formation de NET (Neutrophil extracellular trap), qui est aussi associé à une forme d'apoptose, la NETose (Figure 14). Les NET ont été décrits par Brinkmann et al (Brinkmann et al., 2004) dans le cadre d'une infection bactérienne mais on les retrouve également dans d'autres contextes pathologiques comme les maladies auto-immune, notamment le Lupus érythémateux systémique (LES) (Garcia-Romo et al., 2011) ou le diabète (Wong et al., 2015). Les NET se composent de chromatine décondensée et du contenu des granules cytotoxiques décrites précédemment, telle que la myéloperoxydase. Leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, entraine la dissolution des membranes nucléaires et de celles des granules, aboutissant à la mort du neutrophile (Fuchs et al., 2007).

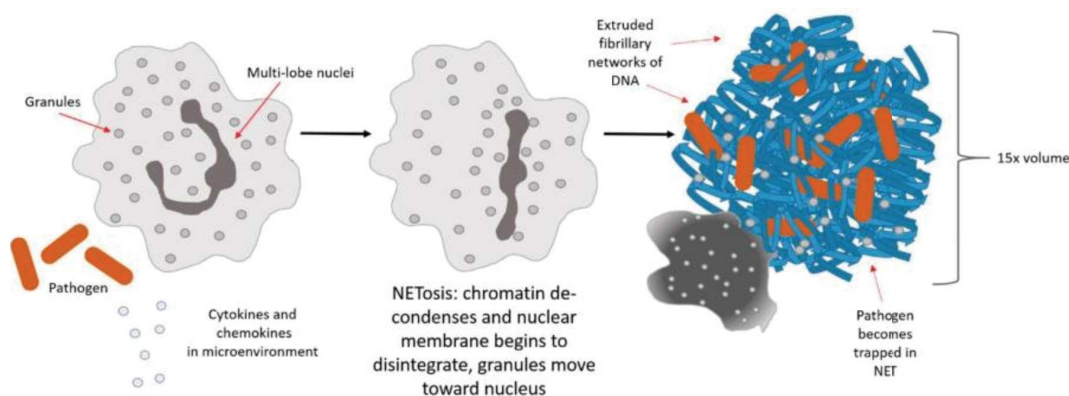


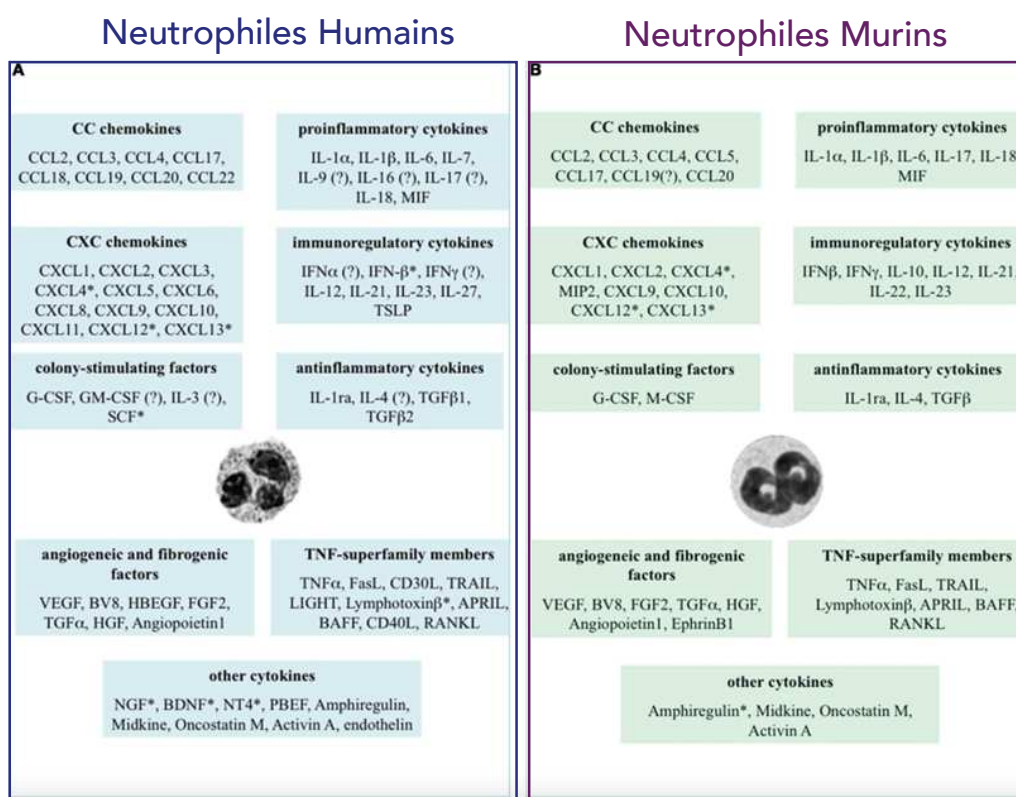
Figure 14 : Schéma du processus de génération de Neutrophil Extracellular Trap (NET) par les neutrophiles lors d'une infection. (Selder et al , 2017)

La formation de NET est régulée par plusieurs signaux, notamment les ROS, les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL8, IFN) ou est stimulé par la liaison d'IC ou de PAMPs à la surface du neutrophile. Contrairement aux ROS ou aux granules, leur sécrétion n'est pas immédiate et leur formation peut prendre entre 2 et 4h (Clark et al., 2007), mais ils représentent tout de même une arme puissante pour lutter contre les infections. Les NET permettent de piéger littéralement les pathogènes au sein du filet de chromatine et de les neutraliser par le cocktail d'enzymes et de peptides antimicrobiens sécrétés de façon concentrée (Huang, 2006). Tout comme la

sécrétion de ROS la réaction inflammatoire causée par le relargage de NET peut occasionner des dommages collatéraux importants, comme des vascularites. Ils sont également une source d'auto-antigène.

IV.1.3. Fonctions immunomodulatrices des neutrophiles

La résolution d'une infection par les neutrophiles n'est pas seulement dépendante de ces fonctions effectrices qui agissent directement sur l'élimination des pathogènes. Ils disposent également de fonctions immunomodulatrices, qui peuvent être induites par le biais de leur fonctions effectrices mais aussi par la production de facteurs solubles dont une pléiade de chimiokines et de cytokines qui module la réponse immunitaire, par un dialogue complexe entre les différentes cellules du système immunitaire (Cassatella, 2013; Mantovani et al., 2011; Tecchio et al., 2014) . (Figure 15)



Adapted from Tecchio et al, *Front Immunol*, 2014

Figure 15 : Classification des facteurs solubles pouvant être sécrétés par les polynucléaires neutrophiles humains et murins (Tecchio et al, 2014)

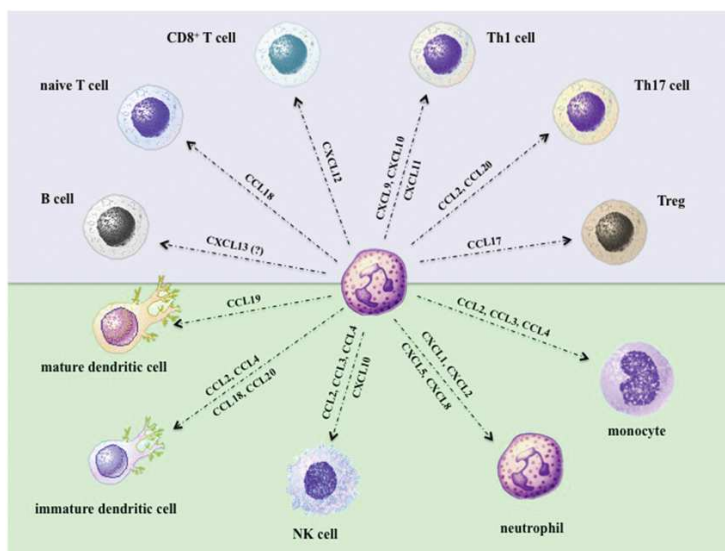
Les chimiokines sont sécrétées dans l'espace extracellulaire en tant que facteurs solubles ou liées à la matrice extracellulaire, formant un gradient de concentration. Elles ont pour principale fonction d'orienter la migration des cellules via leur reconnaissance sur les récepteurs CCR, ou CXCR qui sont des protéines à 7 domaines transmembranaires et qui vont induire une signalisation via une protéine G. En influant sur le trafic cellulaire, les chimiokines occupent un rôle important dans la coordination de la réponse immune. Une même cellule possède plusieurs récepteurs et peut donc répondre aux signaux de plusieurs chimiokines. Les neutrophiles sont parmi les plus gros producteurs de chimiokines (Luster et al 2014).

Les cytokines du grec « cyto » (cellule) et « kine » (mouvement) régissent la communication et la signalisation cellulaire. Elles peuvent aussi, comme les chimiokines, être détectées à distance et induire le recrutement de cellules, sur le lieu d'une inflammation. (Tamassia et al., 2018)

La sécrétion de ces facteurs solubles permet la mise en place d'un dialogue entre les neutrophiles et les autres cellules du système immunitaire. (**Figure 16**)

Les neutrophiles peuvent interagir avec les cellules dendritiques (DC) et les macrophages, par la sécrétion de CCL3 qui permet un recrutement rapide de ces cellules (Charmoy et al., 2010). Les DC recrutées qui interagissent directement avec les neutrophiles voient leur fonction présentatrice d'antigène augmenter (van Gisbergen et al., 2005). Cela a été montré dans le syndrome de Crohn. Les NET peuvent aussi agir sur la production d'IFN α par les pDC, l'IFN sécrété stimule les neutrophiles, entraînant la production de NET, formant une boucle d'auto-inflammation retrouvée dans des processus auto-immuns, comme le SLE (Lande et al., 2011). Les granules primaires des neutrophiles permettent également d'activer les macrophages et d'augmenter leur fonction de phagocytose et la sécrétion de cytokines (Soehnlein et al 2009).

Les neutrophiles peuvent également impacter la maturation des NK dans des conditions homéostatiques (Jaeger et al., 2012a). Durant l'infection par *Legionella* (Sporri et al., 2008) les cytokines sécrétées par les neutrophiles, comme l'IL8, est nécessaire pour la production d'IFN γ par les NK. De la même façon les cytokines sécrétées par les NK peuvent impacter les fonctions des neutrophiles, notamment l'IFN γ (Costantini et al., 2011) qui peut potentialiser leur activation, et le GM-CSF qui contribue à augmenter leur durée de vie.



Tecchio and Cassatella et al, 2016.

Figure 16 : Modulation de la réponse immunitaire par la sécrétion de chimiokines par les neutrophiles. (Tecchio and Cassatella, 2016). Les chimiokines sécrétées par les neutrophiles peuvent impacter le recrutement ou l'activation de nombreuses cellules du système immunitaire aussi bien de l'immunité innée (fond vert) que de l'immunité adaptative (fond mauve).

Les neutrophiles peuvent aussi interagir avec les lymphocytes. Lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN γ , ils expriment une faible quantité de MHCII, ce qui leur confère le statut de cellules présentatrices d'antigènes, et facilite la différenciation Th1 ou Th17, comme cela a été montré dans des contextes auto-immuns (polyarthrite rhumatoïde) (Iking-Konert et al., 2005). Les

neutrophiles peuvent aussi avoir des fonctions immunosuppressives en inhibant la prolifération de lymphocytes T produisant l'IFN γ .

La connexion entre les neutrophiles et les lymphocyte B est médiée par la sécrétion de BAFF (B cell-activating factor) ou APRIL (a proliferation-inducing ligand) qui sont des facteurs essentiels pour la survie et l'activation des lymphocytes B (Scapini et al., 2008). Mais cette fonction B-helper des neutrophiles n'a été observée que pour les neutrophiles de la rate, pas pour les neutrophiles circulants, suggérant l'importance du microenvironnement de la rate (Puga et al., 2011).

La plupart des données présentées dans la littérature en matière de production chimiokinique par les neutrophiles, ont été réalisées *in vitro*. Même si les fonctions des chimiokines sur la mobilisation des cellules immunitaires sont connues, le rôle qu'elles confèrent aux neutrophiles dans des contextes pathologiques *in vivo*, doit être approfondi, notamment dans un contexte d'infection virale où peu de données existent.

En somme les neutrophiles sont des puissants acteurs de l'immunité innée capables d'éliminer efficacement les pathogènes extracellulaires par ses fonctions effectrices ou immunomodulatrices. (**Figure 17**)

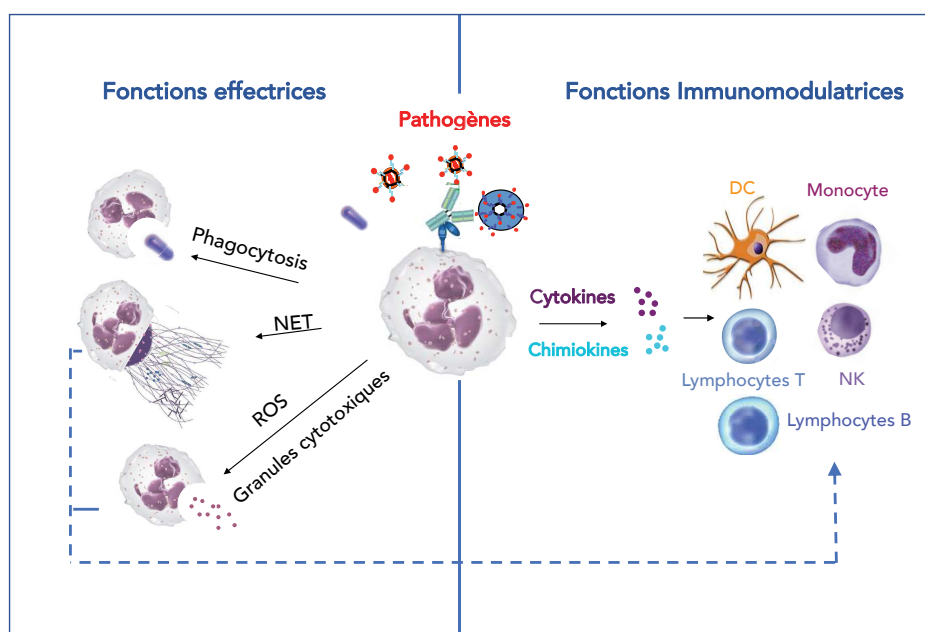


Figure 17 : Élimination des pathogènes extracellulaires par les différentes fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles détectent les pathogènes (bactérie ou virus), libres ou opsonisés, par ses récepteurs extracellulaires (TLR, Fc γ R, Complément), ce qui entraîne l'activation de ses fonctions effectrices (phagocytose, génération de NET, sécrétion de ROS et des granules cytotoxiques) et immunomodulatrices, par la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui modulent la mobilisation et l'activation des cellules du système immunitaire. Les fonctions effectrices (NET, ROS, granules) pouvant elles aussi jouer un rôle sur la modulation de la réponse immunitaire.

IV.2. Rôle des neutrophiles dans le cadre d'une infection virale

Le rôle des neutrophiles, dans la lutte contre les infections bactériennes est bien documenté dans la littérature (Amulic et al., 2012), en revanche leur implication dans un contexte d'infection virale n'est pas décrite de façon aussi exhaustive.

Il a été montré que les neutrophiles sont recrutés très rapidement suivant une infection virale. Le nombre de neutrophiles recrutés en périphérie augmente et leur durée de vie s'allonge, afin de limiter la dissémination virale. Cela a été notamment démontré dans le cas d'infection par le virus Influenza H5N1 ou par le RSV (Perrone et al., 2008; Smith et al., 2001) Leur déplétion entraîne d'ailleurs une aggravation de l'infection dans des modèles d'infections par influenza (Tate et al., 2009).

Les neutrophiles peuvent aussi détecter les virus en phagocytant les pathogènes opsonisés seuls, que ce soit sous forme de virions libres ou de cellules infectées, comme il a été montré dans le cas de l'infection par RSV (Kurt-Jones et al, 2000). Ils peuvent également être alertés de la présence de virus par la stimulation de ces récepteurs PRR (pattern recognition receptors) ou des TLR (Toll-like receptors) (Prince et al, 2011), qui peuvent être à l'origine de réponses inflammatoires et du déclenchement de l'activation des fonctions effectrices des neutrophiles. Saitoh et al (Saitoh et al, 2012) ont décrit que l'engagement des TLR, comme le TLR7 ou le TLR8, qui sont impliqués dans la reconnaissance d'ARN simple brin, peut induire le relargage de NET par les neutrophiles (Saitoh et al, 2012).

Une fois recrutés sur le site d'infection les neutrophiles peuvent éliminer les virus par différentes stratégies, soit en interagissant avec le virus ou la cellule infectée, soit en modulant la réponse immune antivirale.

Les fonctions effectrices des neutrophiles sont particulièrement efficaces pour éliminer les pathogènes extracellulaires, notamment par la sécrétion de ROS (Cassatella et al, 1999) ou du contenu des granules cytotoxiques comme la myéloperoxidase qui peuvent directement neutraliser HIV-1 (Klebanoff and Coombs, 1992), ou les α défensines qui peuvent inactiver HSV1 et HSV2 (Daher et al., 1986). La génération de NET peut aussi limiter la propagation virale du VIH (Saitoh et al, 2012), ou du HSV (Wang et al, 2004;).

De plus il a été montré que les neutrophiles peuvent occuper la fonction de cellules présentatrices d'antigènes auprès des lymphocytes T CD8, modulant ainsi leur prolifération et l'établissement d'une réponse mémoire dans un modèle d'infection par le virus Ankara (Duffy et al., 2012).

En revanche peu de données existent sur la production de chimiokines par les neutrophiles suite à une stimulation par un agent viral. Des études ont montré que des neutrophiles humains stimulés *in vitro* par le VIH induisait la sécrétion de CXCL8 qui est impliquée dans le recrutement des neutrophiles eux-mêmes, alors que leurs stimulations par le RSV a montré en plus du relargage de CXCL8, une sécrétion de CCL3 et de CCL4, impliqués dans le recrutement des monocytes et des cellules NK. Une stimulation par HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1), entraîne quant à lui une production de CXCL9, impliqué entre autres dans la mobilisation des lymphocytes T.

De par les nombreuses interactions des neutrophiles avec les autres cellules immunitaires (de l'immunité innée et acquise), ils apparaissent comme des orchestrateurs de la réponse immune. De même il a été montré que les neutrophiles recrutent les monocytes ou les macrophages sur

le site d'une infection par la sécrétion de CCL2, et de CCL4 et module leur activation en fonction du microenvironnement. (Kumar et al 2010).

Les neutrophiles apparaissent donc être centraux dans la protection de l'organisme contre les virus, mais ils peuvent aussi jouer un rôle délétère malgré eux. En effet la sécrétion de ces nombreuses enzymes ou facteurs inflammatoires crée un environnement hostile pour l'agent infectieux mais aussi pour les cellules de l'organisme hôte, causant des dommages collatéraux importants. C'est ce que l'on observe notamment lors d'un phénomène appelé « tempête cytokinique » (Cytokine storm), qui correspond à une production massive de cytokines inflammatoires, qui peut advenir notamment lors de l'infection par Influenza A (Shirey et al., 2013).

De la même façon, la sécrétion excessive de NET, contribue à l'exacerbation de l'inflammation, dans le cas de l'infection par le RSV chez de jeunes enfants (Cortjens et al., 2016).

Dans certains cas ils peuvent même servir de véritable « cheval de Troie », et faciliter l'entrée du virus. Ce phénomène est observé dans plusieurs infections virales, par le WNV (West Nile Virus), qui utilise les neutrophiles pour se répliquer et proliférer (Bai.2010), ou du HCMV (Heo.2015). Les travaux de Casulli et Elbim (Casulli and Elbim, 2014) ont montré que les neutrophiles pouvaient même être impliqués dans la transmission du virus VIH-1.

D'un autre côté cette propriété des virus à infecter les leucocytes peut aussi être détournée en avantage thérapeutique pour des stratégies de thérapie par oncolyse virale, qui consiste à infecter volontairement un patient avec un virus utilisé en tant qu'agent thérapeutique (Naumenko et al., 2018b).

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DE THESE

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Cette dernière décennie a été le témoin de l'avènement des immunothérapies antivirales par AcM. En effet la littérature récente a exposé un réel potentiel thérapeutique des immunothérapies par AcM appliquées à un contexte d'infection virale. Désormais comprendre les multiples mécanismes d'action des AcM antiviraux, et notamment leur pouvoir immunomodulateur, est crucial dans la perspective de l'amélioration de leurs effets thérapeutiques.

Les travaux précédents de l'équipe ont montré qu'une immunothérapie antivirale par AcM pouvait induire une immunité protectrice sur le long terme assimilable à un effet vaccinal, et ce de façon dépendante du fragment Fc de l'AcM. Ils ont aussi démontré un rôle important des immuns complexes (IC) dans l'induction des effets vaccinaux, via leur interaction avec les FcγRs exprimés à la surface des cellules immunitaires et notamment les DC; positionnant ainsi les FcγRs et les IC au centre des effets vaccinaux et de la potentialisation de la réponse immune endogène. Cependant les DC ne sont pas les seules cellules du système immunitaire à pouvoir interagir avec les IC (formés d'un antigène viral et de l'AcM thérapeutique) *via* les FcγRs. L'expression de ces derniers varie en fonction du type cellulaire et sont donc présents sur d'autres cellules du système immunitaire, autre que les DC, telles que les macrophages, les monocytes ou bien encore les neutrophiles.

Dans ce contexte, il est important de déterminer quels sont les principaux FcγRs et les principales cellules les exprimant, impliquées dans l'induction d'une réponse immune protectrice. Parmi ces cellules, l'équipe s'est particulièrement intéressée aux neutrophiles. Il est vrai qu'ils constituent la première ligne de défense lors d'une infection. Ils ont d'ailleurs longtemps été considérés comme de simples cellules phagocytaires destinées à éliminer rapidement les pathogènes extracellulaires de l'organisme. Plus récemment, de nouvelles études ont également démontré le rôle clé des neutrophiles dans l'orchestration de la réponse immunitaire aussi bien au niveau de l'immunité innée que de l'immunité adaptative via la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines. Néanmoins, les propriétés immunomodulatrices des neutrophiles n'ont été à ce jour que très peu étudiées dans un contexte d'infection virale et totalement inexplorées dans le cadre d'une infection virale traitée par immunothérapie par AcM.

Basés sur ces observations, les travaux de ma thèse se sont focalisés sur l'étude du rôle potentiel des neutrophiles et des FcγRs dans la modulation de la réponse immune dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

Cette étude s'est structurée autour de deux objectifs :

-Etudier et caractériser le rôle immunomodulateur des neutrophiles dans un contexte d'immunothérapie antivirale. Pour cela j'ai utilisé différentes approches : *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*. En effet les expérimentations *in vivo* constituent un réel contexte pathologique, mais la multitude d'acteurs impliqués empêchent de distinguer le rôle de chacun.

Pour déterminer de façon plus précise les mécanismes à l'origine du rôle des neutrophiles dans ce contexte d'immunothérapie j'ai réalisé des expérimentations *in vitro* à partir de neutrophiles purifiés. J'ai notamment étudié leur activation par des IC en présence ou en absence de facteurs

solubles proinflammatoires/immunomodulateurs. En effet ce type d'approche permet d'identifier le rôle des différentes composantes du système immunitaire ayant un pouvoir immunomodulateur (IC, cytokines, ...) dans l'activation fonctionnelle des neutrophiles. Bien qu'éloigné du contexte *in vivo*, cette approche permet d'apporter des informations complémentaires dans un contexte maîtrisé. De plus, afin de caractériser de façon plus fine le rôle des neutrophiles dans le cadre d'une immunothérapie antivirale j'ai utilisé deux approches *in vivo*. La première a été basée sur la déplétion des neutrophiles chez des animaux infectés et traités par AcM, afin d'établir leur rôle dans la protection induite par l'immunothérapie. La deuxième approche a consisté à trier spécifiquement différentes populations dont les neutrophiles, issues d'animaux des différents groupes de l'étude, à savoir contrôle, infectés et infectés et traités par une immunothérapie antivirale par AcM. L'activité fonctionnelle des cellules triées a ensuite été étudiée *ex vivo*.

-Etudier l'impact d'une immunothérapie antivirale par AcM sur la modulation de l'expression des FcγRs, et en particulier sur le FcγRIV, récepteur ayant la plus haute affinité pour l'isotype IgG2a, qui est l'isotype de l'AcM utilisé dans notre modèle d'étude. Comme déjà mentionné, la protection à long terme induite par l'immunothérapie par AcM repose sur la combinaison de deux acteurs clé, les IC et les cellules immunitaires. Sachant que les IC interagissent avec les cellules par le biais des FcγRs, il était donc indispensable de les étudier de façon plus approfondie dans ce contexte d'immunothérapie antivirale par AcM. Pour cela j'ai réalisé un répertoire de l'expression des différents FcγRs dans les différentes conditions de notre étude. Enfin je me suis attardée plus en détails sur le principal FcγR exprimé sur les neutrophiles et sur son rôle dans les fonctions immunomodulatrices des neutrophiles *in vivo* dans le contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

RESULTATS

RESULTATS

I. Rôle clé des polynucléaires neutrophiles dans l'immunité induite par les immunothérapies antivirales.

Comme précédemment cité, les neutrophiles étaient jusqu'il y a peu, considérés comme des cellules principalement effectrices, dont le rôle était d'éliminer rapidement les pathogènes de l'organisme. Depuis, il y a eu un réel changement de paradigme et désormais les neutrophiles apparaissent comme des cellules orchestratrices de la réponse immunitaire, notamment dans le domaine du cancer et de l'auto-immunité. Néanmoins ce rôle immunomodulateur n'a jusqu'ici que peu été étudié dans un contexte d'infection virale et pas été du tout considéré dans le le cadre d'immunothérapie antivirale par AcM.

Dans cet optique, en collaboration avec Mar Naranjo-Gomez, post doctorante dans l'équipe, nous avons évalué le rôle des neutrophiles dans l'induction des effets vaccinaux par les AcM dans le modèle d'infection rétrovirale par FrCas^E. Pour ce faire, les neutrophiles ont été éliminés à l'aide d'un anticorps spécifique, le 1A8 (anti-Ly6G) administré tous les deux jours (en raison du renouvellement rapide des neutrophiles dans l'organisme) pendant 21 jours (**Figure 18**).

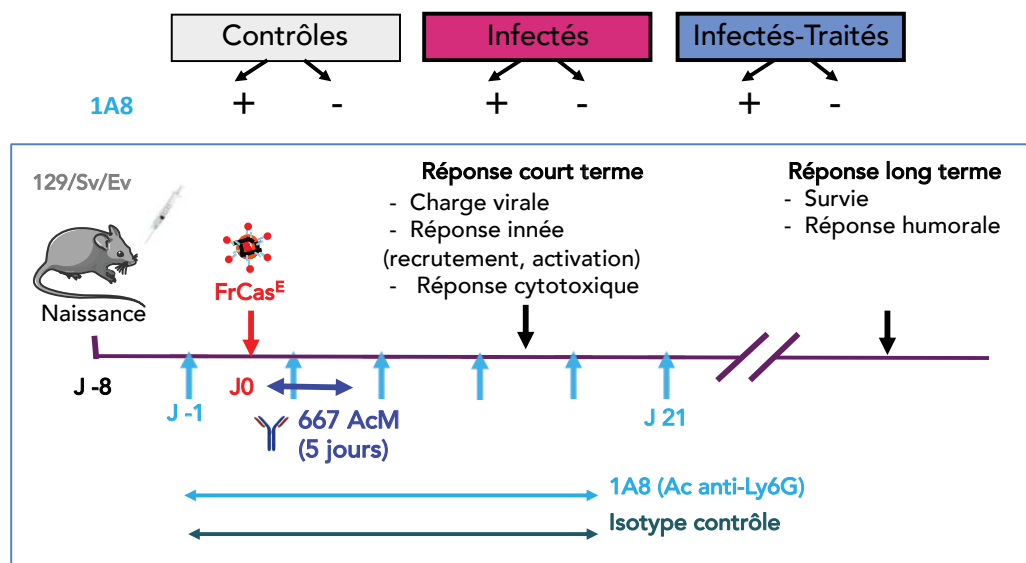


Figure 18 : Schéma expérimental de la déplétion des neutrophiles dans le model d'infection rétrovirale par FrCas^E, traité par l'AcM 667.

Des souris de 8 jours ont été infectées par le virus FrCas^E et traitées ou non par l'AcM 667. En parallèle afin d'induire la déplétion des neutrophiles l'anticorps 1A8 (anti-Ly6G) ou un anticorps contrôle du même isotype (AcM 2A3) ont été administrés aux souris. Six différents groupes d'animaux sont présents dans cette étude, les animaux contrôles, non infectés non traités (2A3 et 1A8), les animaux infectés, non traités (2A3 et 1A8) et les animaux infectés-traités (2A3 et 1A8). Les conséquences de la déplétion des neutrophiles sur le développement de la pathologie et les réponses immunitaires innée et acquise ont été évaluées à court et long terme.

Nous avons ensuite étudié les effets de la déplétion des neutrophiles sur l'apparition de la pathologie et sur les réponses immunes innée et acquise. A courte échéance nous avons analysé l'effet de la déplétion sur la propagation de la charge virale, ainsi qu'un immunophénotypage des différentes cellules du système immunitaire. Une étude de la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ (CTL) a également été réalisée. A plus long terme nous avons évalué l'impact de la déplétion sur la survie des animaux et nous avons quantifié leur réponse humorale spécifique du virus FrCas^E.

De façon originale, nous avons établi que les neutrophiles ont un rôle central dans la protection induite par l'AcM thérapeutique contre la leucémie. En effet leur déplétion entraîne la mort des animaux infectés malgré l'administration de l'AcM thérapeutique, qui a perdu son bénéfice protecteur.

De façon surprenante, nous avons montré que les neutrophiles ne sont pas impliqués dans la limitation de la propagation virale. Cette limitation étant assurée par d'autres cellules effectrices du système immunitaire, en particulier les cellules tueuses naturelles ("natural Killer" NK). Néanmoins malgré le faible effet sur la charge virale, l'absence de protection observée en cas de déplétion des neutrophiles, suggérait un éventuel rôle des neutrophiles dans la modulation de la réponse immune antivirale. Nous avons donc ensuite étudié l'effet de la déplétion des neutrophiles sur le développement de la réponse immune adaptative. Mes travaux de thèse ont notamment contribué à élucider le rôle des neutrophiles dans l'établissement de la réponse humorale. Pour cela des prélèvements sanguins réguliers ont été effectués tous les 15 jours à partir de J30 p.i. Ceci a permis, d'une part, de contrôler l'hématocrite (qui est le paramètre clinique qui nous permet de suivre l'évolution de la pathologie chez les animaux infectés) et, d'autre part, de doser la quantité d'anticorps anti-virus FrCas^E endogènes à partir du sérum de chaque animal, à chaque jour de prélèvement. J'ai pu ainsi établir une cinétique de la production d'anticorps endogènes spécifique du virus FrCas^E par animal à différents temps post-infection. De plus, en parallèle de cette analyse quantitative j'ai également effectué une analyse qualitative en évaluant la sécrétion d'anticorps de façon isotype spécifique. J'ai déterminé la quantité d'IgG1 et d'IgG2a produite sur l'étude long terme et également la production d'IgM à J15 p.i.

Cette étude a montré qu'en absence d'AcM thérapeutique, les animaux infectés, déplétés ou non déplétés en neutrophiles, ne présentent qu'une faible production d'IgG spécifiques du virus FrCas^E. A noter que ces animaux développent l'érythroleucémie et ne sont pas protégés. En revanche, de façon cohérente avec les travaux précédents de l'équipe, les animaux infectés-traités présentent une forte réponse humorale qui les protège sur le long-terme. De manière intéressante, les animaux infectés-traités déplétés en neutrophiles produisent une quantité beaucoup plus faible d'IgG et ne sont pas protégés. Ils ont donc perdu le bénéfice thérapeutique de l'immunothérapie par AcM. Ces travaux nous ont montré le rôle crucial des neutrophiles dans l'induction d'une forte et durable réponse humorale endogène et ont permis d'établir une forte corrélation entre le taux d'anticorps anti-FrCas^E endogènes et la protection des animaux infectés-traités.

Des études complémentaires ont quant à elles, montré que lors de l'immunothérapie par AcM, les neutrophiles acquièrent des fonctions « B-Helper », qui vont leur permettre de potentialiser la réponse humorale grâce à la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse B (BAFF, Lymphotoxine α), démontrant ainsi l'importance des fonctions immunomodulatrices des neutrophiles dans ce contexte d'immunothérapie antivirale par AcM. Enfin nous avons établi que c'est l'association des actions des NK (contrôle de la charge virale) et des neutrophiles

(immunomodulation) qui est responsable de la mise en place d'une immunité antivirale protectrice, permettant ainsi, la protection des animaux sur le long terme. (**Figure 19**).

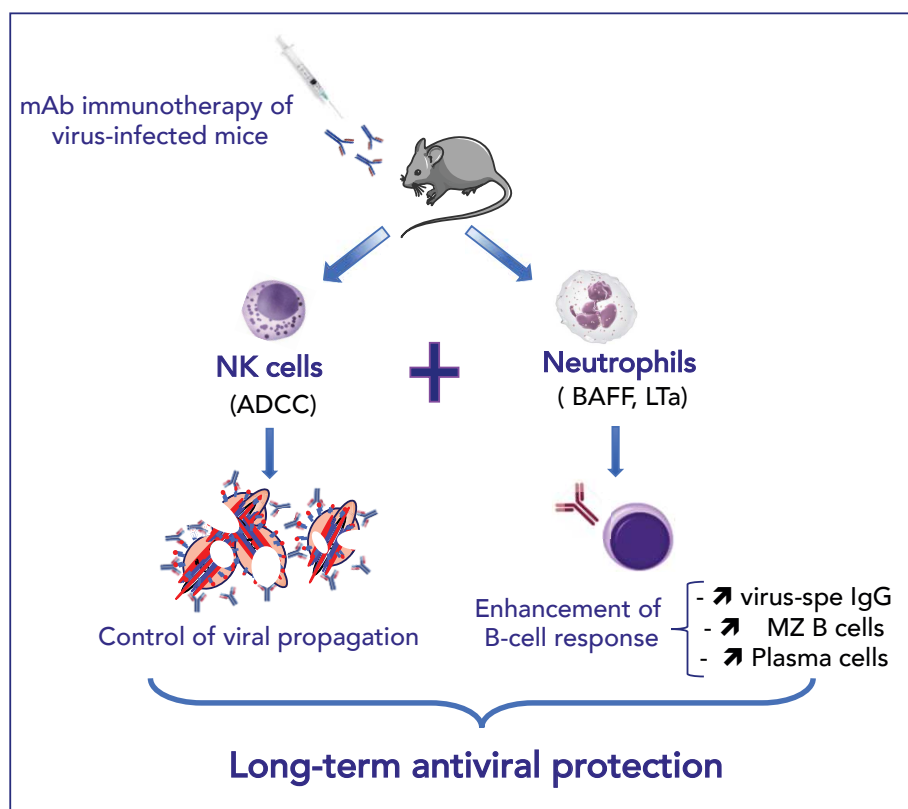


Figure 19 : Rôle clé des neutrophiles dans l'établissement de l'immunité protectrice induite par les AcM antiviraux.

La survie des souris infectées et traitées par l'AcM antiviral est dû au contrôle de la propagation virale par les NK via un mécanisme d'ADCC, ainsi qu'à un rôle des neutrophiles qui par leur fonction B-helper vont contribuer à l'augmentation de la réponse humorale endogène. La combinaison de ces effets sur la réponse immune induite par l'immunothérapie par AcM, aboutit à une immunité protectrice sur le long terme.

L'ensemble des résultats montre que les neutrophiles ont un rôle clé dans l'établissement des effets vaccinaux des AcM antiviraux, par le biais de l'induction d'une forte réponse humorale endogène. Ces travaux apportent un nouvel éclairage dans la compréhension de l'efficacité des immunothérapies antivirales. Ils suggèrent notamment que la préservation des fonctions et de la quantité de neutrophiles circulants pourrait être nécessaire pour obtenir l'immunité protectrice induite par les AcM antiviraux. Il serait donc intéressant de prendre en compte ces constatations afin d'améliorer les immunothérapies antivirales futures.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans laquelle je suis associée en tant que deuxième auteur et ont également fait l'objet d'une communication nationale par l'INSB (<http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2018/m-pelegrin.html>).

Naranjo-Gomez, M., Lambour, J., Piechaczyk, M. and Pelegrin, M. Neutrophils are essential for key induction of vaccine-like effects by antiviral monoclonal antibody immunotherapies (2018) JCI Insight, May 3;3(9). pii: 97339.

Neutrophils are essential for induction of vaccine-like effects by antiviral monoclonal antibody immunotherapies

Mar Naranjo-Gomez, ... , Marc Piechaczyk, Mireia Pelegrin

JCI Insight. 2018;3(9):e97339. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97339>.

Research Article

Infectious disease

Therapeutics

Using a mouse retroviral model, we have shown that mAb-based immunotherapy can induce life-long endogenous protective immunity (vaccine-like effects). This observation has potentially important consequences for treating life-threatening human viral infections. Here, we investigated the role of neutrophils in this effect. Neutrophils are innate immunity effector cells with well-established microbe-killing activities that are rapidly mobilized upon infection. They are also emerging as orchestrators of innate and adaptive immunities. However, their immunomodulatory activity during antiviral mAb immunotherapies has never been studied. Our data reveal that neutrophils have an essential role in immunotherapy-induced immune protection of infected mice. Unexpectedly, neutrophils have a limited effect in controlling viral propagation upon passive immunotherapy administration, which is mostly mediated by NK cells. Instead, neutrophils operate as essential inducers of a potent host humoral antiviral response. Thus, neutrophils play an unexpected key role in protective immunity induction by antiviral mAbs. Our work opens approaches to improve antiviral immunotherapies, as it suggests that preserving neutrophil functions and counts might be required for achieving mAb-induced protective immunity.

Find the latest version:

<http://jci.me/97339-pdf>



Neutrophils are essential for induction of vaccine-like effects by antiviral monoclonal antibody immunotherapies

Mar Naranjo-Gomez, Jennifer Lambour, Marc Piechaczyk, and Mireia Pelegrin

"Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer," Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

Using a mouse retroviral model, we have shown that mAb-based immunotherapy can induce life-long endogenous protective immunity (vaccine-like effects). This observation has potentially important consequences for treating life-threatening human viral infections. Here, we investigated the role of neutrophils in this effect. Neutrophils are innate immunity effector cells with well-established microbe-killing activities that are rapidly mobilized upon infection. They are also emerging as orchestrators of innate and adaptive immunities. However, their immunomodulatory activity during antiviral mAb immunotherapies has never been studied. Our data reveal that neutrophils have an essential role in immunotherapy-induced immune protection of infected mice. Unexpectedly, neutrophils have a limited effect in controlling viral propagation upon passive immunotherapy administration, which is mostly mediated by NK cells. Instead, neutrophils operate as essential inducers of a potent host humoral antiviral response. Thus, neutrophils play an unexpected key role in protective immunity induction by antiviral mAbs. Our work opens approaches to improve antiviral immunotherapies, as it suggests that preserving neutrophil functions and counts might be required for achieving mAb-induced protective immunity.

Introduction

Neutralizing mAbs are now considered as a potential therapeutic approach for the prevention and treatment of chronic and acute viral infections, including newly emerging viral infections (1). In recent years, there has been a dramatic increase in the development of new mAbs with improved neutralizing activity (1–14). Notably, in addition to antirespiratory syncytial virus (RSV) mAb used to treat infant respiratory disease, several mAbs directed against human cytomegalovirus, HIV, influenza, Ebola, and rabies virus are currently engaged in promising clinical trials (1, 3, 9, 14). While the direct effects of antiviral mAbs on viral propagation have been studied extensively, little attention has been paid to their potential immunomodulatory effects until recently (10, 15, 16).

Using a mouse model of persistent retroviral infection, i.e., the erythroleukemia induced by the murine leukemia virus, FrCasE, we have shown that treatment of infected mice with a highly neutralizing mAb can induce life-long protective immunity (vaccine-like effects) (see ref. 10). This observation may have major therapeutic implications for humans. Indeed, increased antiviral immune responses after mAb treatments were recently observed in preclinical models of HIV, RSV, and henipavirus infections (see ref. 10). Moreover, passive immunotherapy with broadly neutralizing mAbs stimulated antiviral antibody responses in HIV-1-infected patients (14). Similarly, vaccine-like effects have also been documented in preclinical models of cancer immunotherapies (17–19) as well as in clinical trials using anti-CD20, anti-EGFR, or anti-HER2 mAbs (20–23). Yet, neither the mechanisms at play nor the possible long-term protective consequences have been addressed in such clinical trials.

In humans, technical, ethical, and cost limitations strongly limit investigations. Instead, immunocompetent animals offer the possibility of identifying the cellular and molecular actors involved in the induction of vaccine-like effects by antiviral mAbs. The FrCasE-induced erythroleukemia is a model system permitting extensive analysis of the endogenous immune response after passive mAb-based immunotherapy under conditions of both chronic infection and pathological development. We found that a 5-day treatment of FrCasE-infected mice with the neutralizing mAb 667 (an IgG2a recognizing the retroviral envelope

Authorship note: M. Piechaczyk and M. Pelegrin are co-senior authors.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: September 6, 2017

Accepted: April 5, 2018

Published: May 3, 2018

Reference information:

JCI Insight. 2018;3(9):e97339. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97339>.

glycoprotein; Env) shortly after infection provides long-lasting (>1-year) protective antiviral immunity of the Th1 type with enhanced IgG2a humoral and cytotoxic T cell (CTL) responses and reduced regulatory T cell activity (24–29). The immunomodulatory action of mAb 667 depends on its ability to interact with receptors for IgGs (FcγR). Notably, immune complexes (ICs) formed between the administered mAb and viral determinants enhance antiviral CTL responses through FcγR-mediated binding to DCs (27).

Importantly, IC-FcγR interactions concern several FcγR-bearing innate effector cells other than DCs, including neutrophils that are rapidly recruited at sites of infections. While they have long been viewed as simple and direct scavengers of extracellular pathogens, there is recent evidence that neutrophils can be key cells in the orchestration of innate and adaptive immunity via the interaction with different myeloid and lymphoid cells and the modulation of their functions (30, 31). However, their role in antiviral immunity is still largely unknown. Indeed, most investigations have studied neutrophil functions in viral pathogenesis or in the control of viral propagation through their effector functions, i.e., phagocytosis, reactive oxygen species production, neutrophil extracellular traps formation, etc. (32, 33). In contrast, the immunomodulatory properties of neutrophils have been poorly studied in viral infections and not addressed in the context of antiviral immunotherapies.

Here, we used the FrCasE model to address the general question of neutrophil participation in the induction of protective immunity by antiviral mAbs. We found that they are essential for the protection of infected, 667 mAb-treated mice. Unexpectedly, and unlike NK cells, neutrophils had a limited effect on viral propagation control. Instead, their protective effect relied on their capacity to induce potent humoral responses due to the acquisition of B cell helper activity upon mAb treatment. Our findings should facilitate improved design of mAb-based antiviral therapies, as they suggest that preserving neutrophil functions and counts might be required for achieving optimal protection by mAb.

Results

Neutrophils are necessary for protection of mice infected by antiviral mAbs without any effect on viral propagation. We first addressed neutrophil mobilization in FrCasE-infected mice with, or without, 667 mAb treatment (infected/treated vs. infected/nontreated). Passive immunotherapy was administered on the same day after establishment of viral infection (27) (Figure 1A) and at days 2 and 5 postinfection (p.i.). Age-matched naive mice were used as controls. Neutrophil recruitment was assessed in the spleen, one of the most viremic organs, at day 8 p.i., when viral replication is maximal in infected/nontreated mice (27). Neutrophil abundance in infected/treated mice was comparable to that observed in naive mice, whereas it was significantly higher in infected/nontreated animals (Figure 1B). Interestingly, this increased neutrophil frequency was associated with a higher percentage of infected spleen cells (Figure 1C), as assessed by flow cytometry using the H34 antibody (recognizing a Gag protein epitope expressed on the surface of FrCasE-infected cells) (34–36).

Next, we assessed the role of neutrophils in the control of viral propagation as well as in the protection against leukemia in infected mice with or without 667 mAb treatment. To this end, neutrophils were depleted by administering a mAb (1A8) directed to their specific Ly6G cell surface marker (37, 38) or an isotype control mAb (2A3). Depletion started 1 day before infection (Figure 1A), was efficient and specific (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97339DS1>), and was maintained for 21 days, i.e., the time necessary to eliminate the therapeutic 667 mAb (27). Neutrophil elimination accelerated disease development in infected/nontreated mice and drastically reduced protection provided by 667 mAb to infected mice (Figure 1D). We next assessed viral propagation in the different groups of mice. In infected/nontreated animals, neutrophil depletion (Figure 2A) was associated with a significant increase in the percentage of infected spleen cells at days 8 (Figure 1E) and 14 p.i. (Supplemental Figure 2A) as well as with a higher viremia (Supplemental Figure 2B). In contrast, in infected/treated mice, viral propagation was not significantly affected at days 8 (Figure 1E) and 14 p.i. (Figure 2B and Supplemental Figure 2) upon neutrophil depletion and remained lower than in infected/nontreated mice. This suggested that viral control by 667 mAb involved other innate immunity effector cells.

Thus, neutrophils exert different antiviral effects on FrCasE-infected mice depending on immunotherapy. In animals undergoing simple infection, neutrophils participate in the control of viral propagation. Instead, in infected/treated mice, they are crucial during the immunotherapy period for generation of long-term protection against leukemia, despite their limited effect on viral propagation.

NK cells control viral propagation in infected/treated mice. As NK cells can exert antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity against infected cells exposing determinants such as the retroviral Env protein

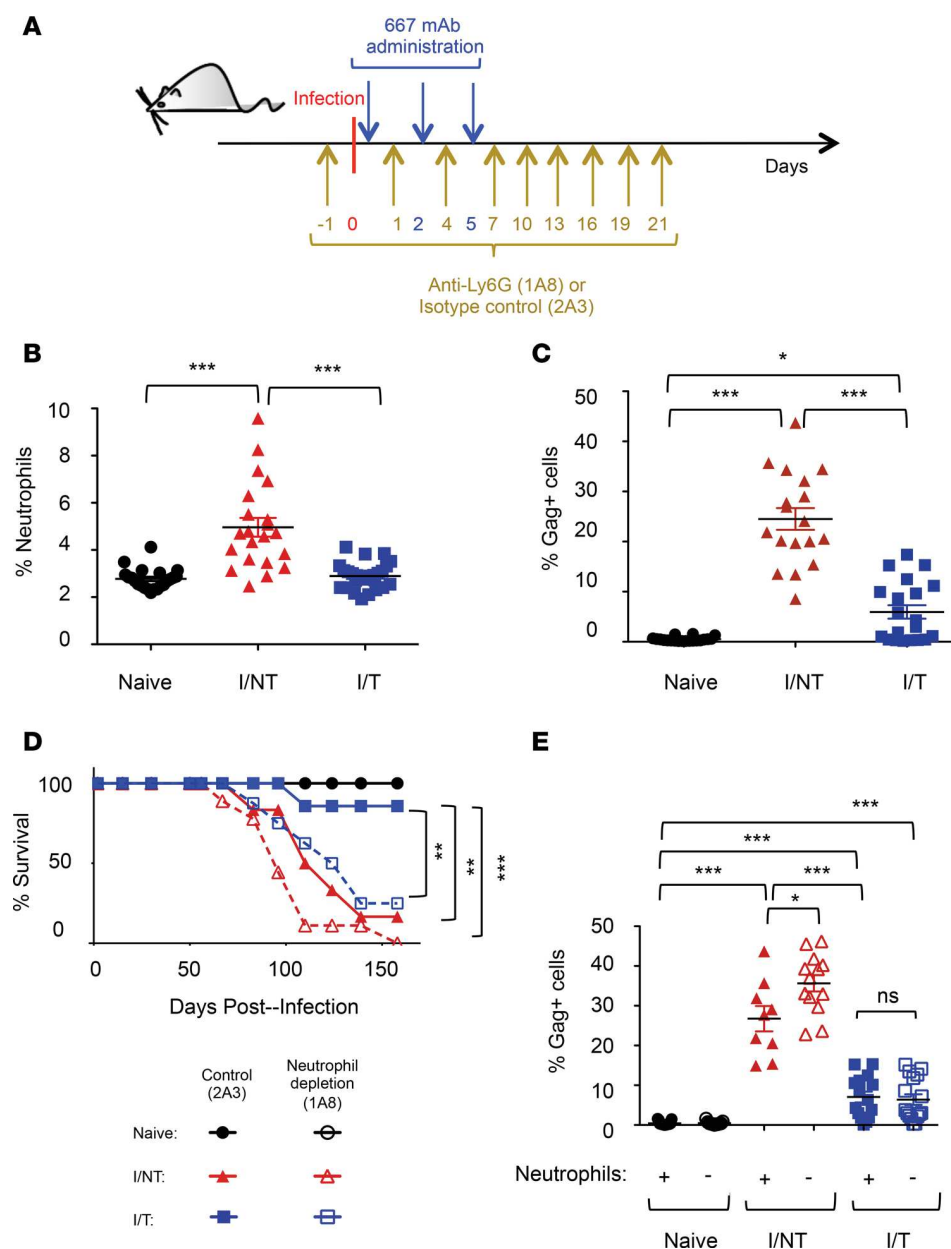


Figure 1. Antiviral effects of neutrophils. (A) Experimental scheme. Eight-day-old pups were infected and treated with the 667 mAb as indicated. Mice were treated as indicated with the anti-Ly6G 1A8 mAb or the isotype control 2A3 mAb in neutrophil depletion experiments. (B and C) Neutrophil recruitment and infected cell rate in spleen. Splenocytes from naive, infected/nontreated (I/NT), and infected/treated (I/T) mice were analyzed by flow cytometry on day 8 p.i. for (a) neutrophil recruitment (percentage of Ly6G⁺ cells) and (b) retroviral positivity of splenocytes (percentage of Gag⁺ cells) gated in the CD45.2⁺ population. The data presented correspond to 5 independent experiments, with at least 15 mice per group. (D) Mouse survival. Naive, I/NT, and I/T mice were treated with either the antineutrophil (1A8) or the control (2A3) mAb as indicated in A and followed up for leukemic death. The data represent 2 independent experiments, with 6–9 mice per group. (E) Infected cells rate upon neutrophil depletion. Neutrophils of naive, I/NT, and I/T mice were depleted, or not, as indicated in A and infected splenocytes were assayed as in C on day 8 p.i. The data represent 4 independent experiments, with 9–15 mice per group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

(27, 39, 40), we asked whether NK cells were involved in the control of viral propagation in infected/treated mice. To this end, NK cells were depleted using an anti-asialo-GM1 antibody (41–44) (Figure 2A). In contrast to neutrophil depletion, the absence of NK cells in infected/treated mice led to a significantly increased viral propagation at day 14 p.i. (Figure 2B). Next, we compared 667 mAb-mediated ADCC activity of NK cells and neutrophils with infected cells using an in vivo antibody-mediated killing assay, relying on the administration of 667 mAb-opsonized FrCasE-infected splenocytes in naive mice (27) (Figure 2C). Depletion of NK cells, but not neutrophils, led to reduced mAb-mediated infected cell lysis (Figure 2D). Finally, as NK cells are crucial for viral propagation control during the immunotherapy period, we assessed their role in the protection against leukemia in infected/treated mice. Importantly, NK cell depletion drastically reduced survival of immunotreated mice (Figure 2E), indicating that antibody-mediated control of viral propagation by NK cells is necessary for long-term antiviral protection.

Thus, NK cells are crucial for protection of infected/treated mice via efficient control of viral propagation by 667 mAb-mediated ADCC.

Neutrophils differentially alter innate lymphoid cell biology in infected/treated and infected/nontreated mice. Innate lymphoid cells (ILCs) are a heterogeneous population of immune cells that includes NK cells and

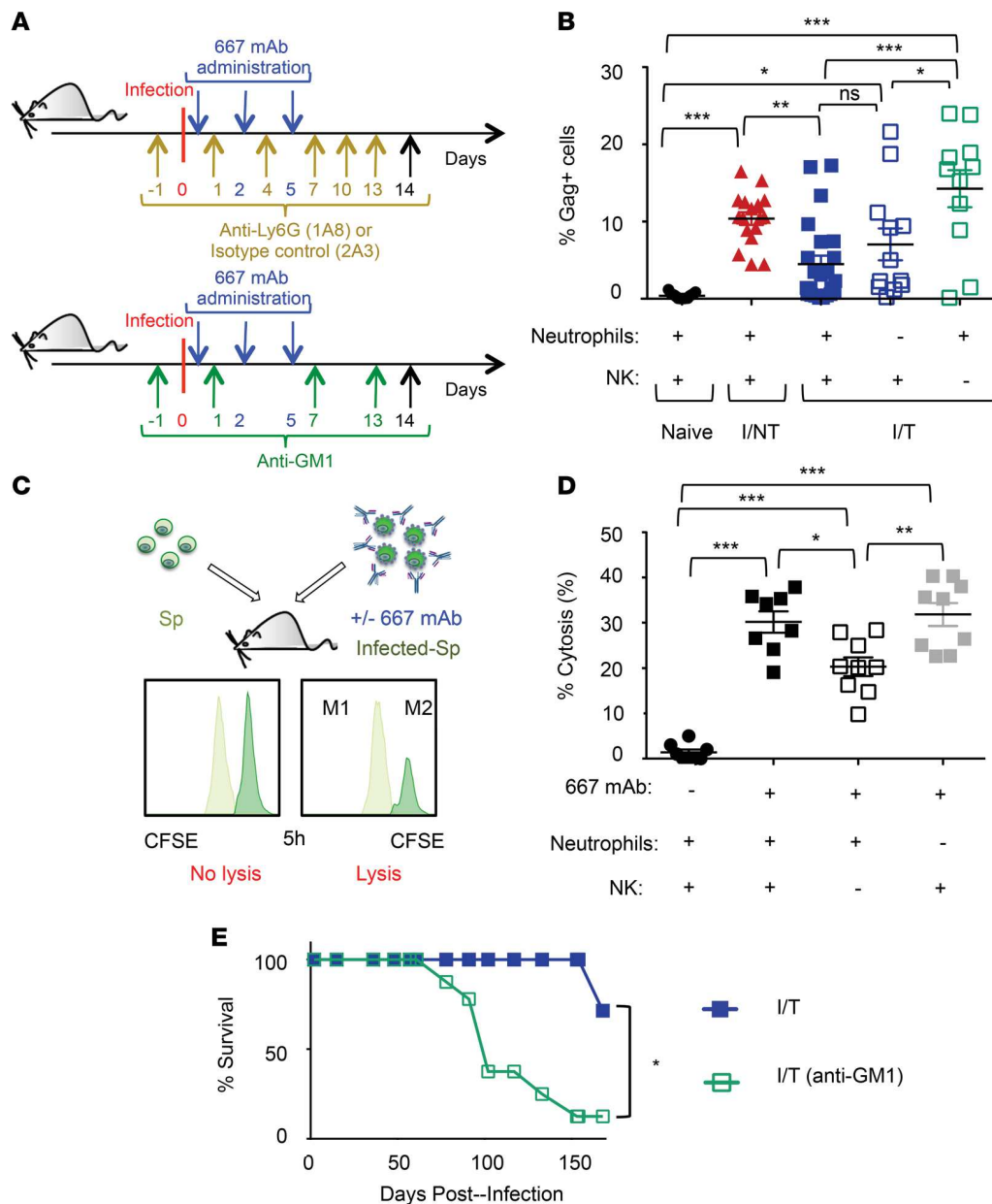


Figure 2. Antibody-mediated control of viral propagation by NK cells. (A) Experimental scheme. Mice were infected and mAb-treated as in Figure 1A. Infected/treated mice were treated as indicated with the anti-Ly6G 1A8 mAb or the isotype control 2A3 mAb to deplete neutrophils and infected/treated mice were treated as indicated with the anti-asialo-GM1 antibody to deplete NK cells. (B) Effect of neutrophils or NK cell depletion in viral spread in infected/treated mice. Percentage of infected cells at day 14 p.i. in the spleens of naive, I/NT, and I/T mice, depleted or not of neutrophils or NK cells assessed as in Figure 1C. The data represent 3 independent experiments, with at least 8 mice per group. (C and D) In vivo cytotoxicity activity of 667 mAb in naive mice after depletion of neutrophils or NK cells. Splenocytes from noninfected mice (Sp) were labeled using 0.5 μ M of the vital dye CFSE (CFSE^{lo} cells; M1) and mixed at a 1:1 ratio with splenocytes from infected mice (Infected-Sp) labeled using 5 μ M CFSE (CFSE^{hi} cells; M2) and preincubated, or not, with 667 mAb. Mixed cell populations were administered to naive mice 1 day after depletion of either neutrophils or NK cells with the 1A8 mAb or the anti-asialo-GM1 antibody, respectively. Cytotoxicity was quantified 5 hours later, as described in Methods section. The data are presented as mean $\pm$ SEM of 2 independent experiments, with at least 8 mice per group. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (B and D). (E) Effect of NK cell depletion in the survival of infected/treated mice. I/T, NK cells, depleted or not as indicated in A, were followed up for leukemic death. The data represent 2 independent experiments, with 7 mice per group. Statistical significance was established using an unpaired Student's *t* test. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

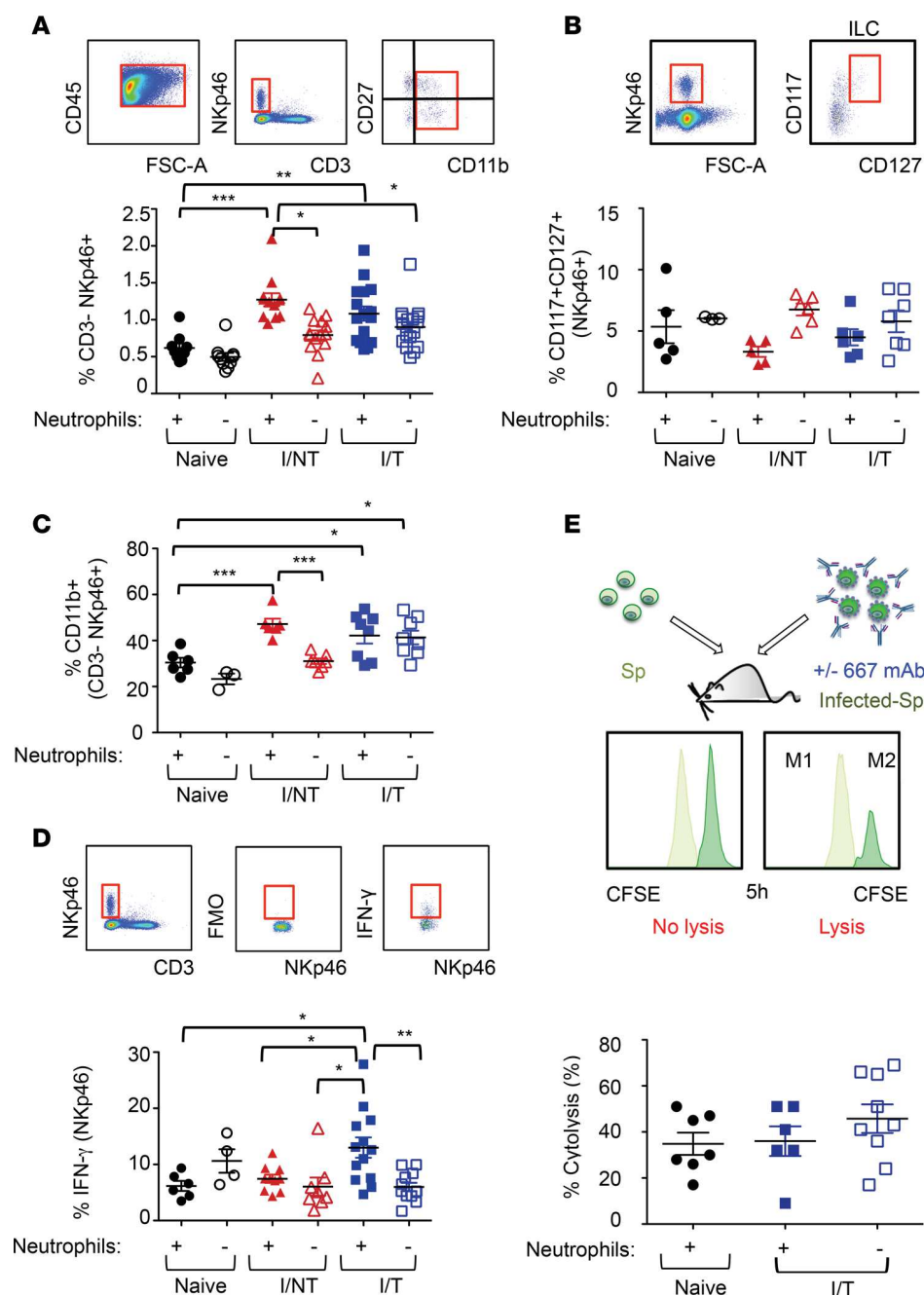


Figure 3. Effects of neutrophil depletion on innate lymphoid cell recruitment and biology. (A–D) Neutrophils of naive, I/NT, and I/T mice were depleted, or not, as indicated in Figure 1A, and ILC in the spleen were assayed 14 days p.i. by flow cytometry. (A) Frequency of CD3⁺ NKp46⁺ cells in the CD45.2⁺ leukocytic population. (B) Frequency of CD117⁺ CD127⁺ cells in the Lin⁺ NKp46⁺ population. (C) Maturation (CD11b⁺ cells) and (D) expression of IFN- γ in the CD3⁺ NKp46⁺ population. (E) In vivo cytotoxicity activity of 667 mAb in infected/treated mice after depletion of neutrophils. The 1A8, or the 2A3 isotype control mAb, was administered to I/T mice, and 667 ADCC activity was quantified at 30 days p.i., as in Figure 2, C and D. The data represent at least 2 independent experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

ILC1, ILC2, and ILC3. As NK biology can be affected by neutrophils (45), we first assessed the effect of neutrophil depletion on NK cells. To this end, we measured the frequency of CD3⁺ NKp46⁺ cells in the spleens of mice from the different groups. The CD3⁺ NKp46⁺ population contains mostly NK cells but may also include ILC1 and a subpopulation of ILC3 cells. NK cells can be distinguished from such ILCs using the cell surface marker CD49b (46). Notably, over 95% of CD3⁺ NKp46⁺ cells were CD49b⁺ (Supplemental Figure 3), indicating that the vast majority of CD3⁺ NKp46⁺ cells in the spleen displayed a NK phenotype. As shown in Figure 3A, CD3⁺ NKp46⁺ cell recruitment in spleens of both infected/nontreated and infected/treated mice at day 14 p.i. was similar and stronger than in naive mice. We also observed that neutrophils were involved in CD3⁺ NKp46⁺ cell mobilization in infected/nontreated mice but not in infected/treated or in naive mice (Figure 3A). We next assessed the frequency of splenic ILCs other than NK cells by quantifying CD117 and CD127 expression in the NKp46⁺ spleen cell population lacking the common lymphoid and myeloid lineage-associated (Lin-associated) markers (Lin[−]) (47). The recruitment of those ILCs in spleens

of both infected/nontreated and infected/treated mice at day 14 p.i. was not significantly different from that observed in naive mice (Figure 3B). In addition, neutrophil depletion did not significantly alter the frequency of such ILCs (Figure 3B) in any group of mice.

These results show an enhanced recruitment of CD3⁺NKp46⁺ cells, which are mostly NK cells, in both infected/treated and infected/nontreated mice, but these effects are neutrophil dependent only in the latter. They also show that neutrophil depletion does not affect the frequency of splenic Lin⁺CD117⁺CD127⁺ ILCs, in agreement with the lack of effect of anti-Ly6G-mediated neutrophil depletion on splenic ILCs reported in other experimental settings (47).

To better characterize the effect of neutrophils on splenic CD3⁺NKp46⁺ cells, we assessed their maturation by monitoring CD11b and CD27 expression at day 14 p.i. These markers identify different stages of NK maturation in mice (45). Relative to naive mice, both infected/nontreated and infected/treated mice showed similar higher frequencies of CD11b⁺CD3⁺NKp46⁺ cells (including fully mature CD11b⁺CD27⁺ and semimature CD11b⁺CD27⁺ cells) (Figure 3C) at the expense of immature ones (CD11b⁺) (data not shown). Moreover, depletion of neutrophils entailed a strong reduction of the frequency of CD11b⁺CD3⁺NKp46⁺ cells only in infected/nontreated mice. Further characterization of CD3⁺NKp46⁺ cells indicated higher neutrophil-dependent IFN- γ production in infected/treated mice but low and similar IFN- γ levels in naive and infected/nontreated animals, whether the latter were neutrophil proficient or deficient (Figure 3D). Finally, we assessed whether neutrophils affected the ADCC activity of NK cells in infected/treated mice. Notably, ablation of neutrophils did not alter 667 mAb-mediated ADCC activity of NK cells (Figure 3E), consistent with the lack of effect on viral propagation (Figure 1E and Figure 2B).

Thus, CD3⁺NKp46⁺ maturation is similarly enhanced in both infected/treated and infected/nontreated mice, but these effects are neutrophil dependent only in the latter. Nevertheless, neutrophils might participate in functional activation of CD3⁺NKp46⁺ cells in infected/treated animals, as our results show that neutrophils modulate their IFN- γ secretion capacity in infected/treated mice.

Neutrophils are crucial for inducing the humoral, but not the CD8⁺ T cell, antiviral response in immunotherapy-treated mice. Since neutrophils exert no control over viral propagation during the immunotherapy period (Figure 1E and Figure 2B) but are necessary for long-term protection of mice (Figure 1D), we asked whether they could be key for the induction of vaccine-like effects.

We first addressed cellular adaptive immunity by assaying the primary virus-specific CD8⁺ T cell response in infected/nontreated and infected/treated mice at its peak (i.e., 14 days p.i.) (27) with or without neutrophil depletion. Consistent with our previous work, infected/treated mice showed an increased virus-specific CD8⁺ T cell response relative to infected/nontreated mice (27). In neither case was the frequency of virus-specific CD8⁺ T cells altered by neutrophil depletion (Figure 4A). Similarly, neither case showed any difference in the frequency of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ (Figure 4B). These data ruled out a major role for neutrophils in the 667 mAb-induced antiviral CD8⁺ T cell response.

Next, we addressed humoral immunity in infected/nontreated and infected/treated mice depleted or not of neutrophils. To achieve this, anti-FrCasE serum Igs from mice of the different groups were assayed by ELISA. Virus-specific IgM titers were assayed at 14 days p.i. (i.e., at the peak of the IgM response upon FrCasE infection and 667 mAb treatment; Supplemental Figure 4) and were not significantly different between infected/nontreated and infected/treated mice (Figure 5A). Interestingly, neutrophil depletion did not alter virus-specific IgM titers in either infected/nontreated or infected/treated mice (Figure 5A). In agreement with published studies in other experimental settings, the absence of neutrophils did not affect the levels of IgM (48). On the contrary, and consistent with our previous work (27), infected/treated mice displayed a much higher level of anti-FrCasE IgGs than infected/nontreated animals (Figure 5B), with a peak (700 μ g/ml) by day 68 p.i. and a still high level (100 μ g/ml) at the end of the experiment. Interestingly, in the absence of neutrophils, serum concentration of antiviral IgGs dramatically decreased in infected/treated mice (Figure 5B and Supplemental Figure 5). In contrast, neutrophils showed no role in the regulation of the poor nonprotective antibody response elicited in infected/nontreated mice (Figure 5B). Importantly, high anti-FrCasE IgG seric levels correlated with longer survival times, supporting a role for the high humoral antiviral response in protection against disease (Figure 5C). To further characterize the long-term virus-specific humoral response, we tested whether infected/treated mice, depleted or not of neutrophils, could respond to a virus challenge performed 3 months after the first infection (i.e., a time point at which the primary humoral response has strongly declined). Infected/treated mice, depleted or not of neutrophils, were inoculated with FrCasE, and serum samples were collected 1 week later to assay the generation of

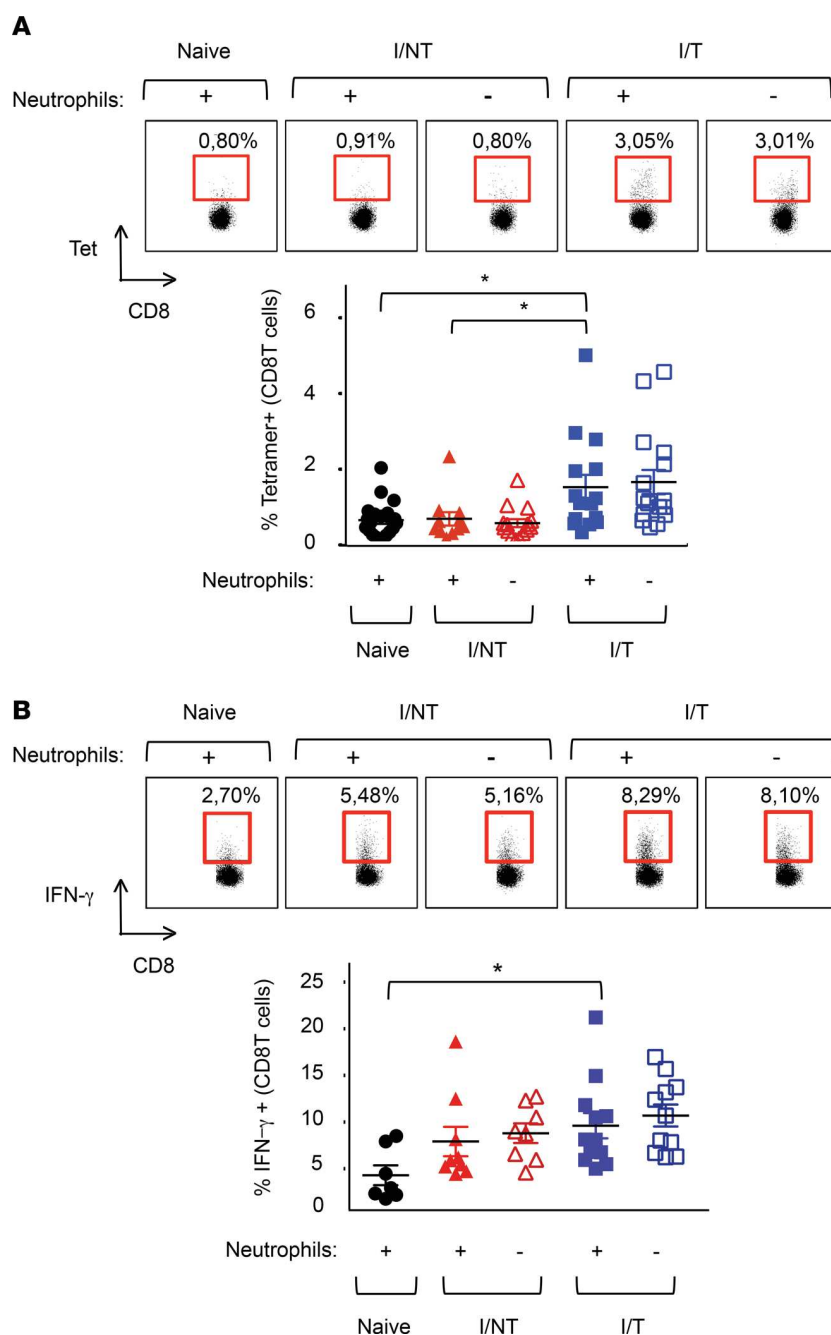


Figure 4. Assay of FrCasE-specific CD8⁺ T cells in the presence and absence of neutrophils. (A) Neutrophils of naive, I/NT, and I/T mice were depleted, or not, as indicated in Figure 1A. Frequency of FrCasE-specific CD8⁺ T cells. Spleen cells were isolated at day 14 p.i., and the frequency of virus-specific CD8⁺ T cells in the total CD8⁺ T cells population was assayed by flow cytometry using the H2D^b-GagL MHC tetramer. The data represent 4 independent experiments, with at least 11 mice per group. **(B)** Expression of IFN- γ by CD8⁺ T cells. Splenic CD8⁺ T cells were analyzed by flow cytometry for the expression of IFN- γ . The data presented represent 3 independent experiments, with at least 7 mice per group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (* $P < 0.05$).

endogenous anti-FrCasE antibodies. In the presence of neutrophils, 3 of 5 infected/treated mice showed an increase in the virus-specific humoral response (Figure 5D), while, in the absence of neutrophils, none of the infected/treated mice responded to the viral challenge. Altogether, these results show that neutrophil depletion at early time points after infection and treatment affects humoral immunity with an effect on both primary and memory virus-specific B cell responses.

As marginal zone (MZ) B cells are known to contribute to the mounting of antibody responses (49, 50) and their function might be modulated by neutrophils (51), we next addressed the frequencies of splenic MZ (CD21^{hi}IgM^{hi} CD19⁺ cells) and follicular (FO) (CD23⁺IgM^{lo} CD19⁺ cells) B cells. MZ B cell frequency was enhanced in a neutrophil-dependent manner in infected/treated mice but unchanged in infected/nontreated animals relative to naive mice (Figure 6A). In contrast, the frequency of FO B cells was significantly enhanced in infected/treated mice relative to that in naive mice; however, there was no role for neutrophils (Figure 6B). Interestingly, consistent with a role of MZ

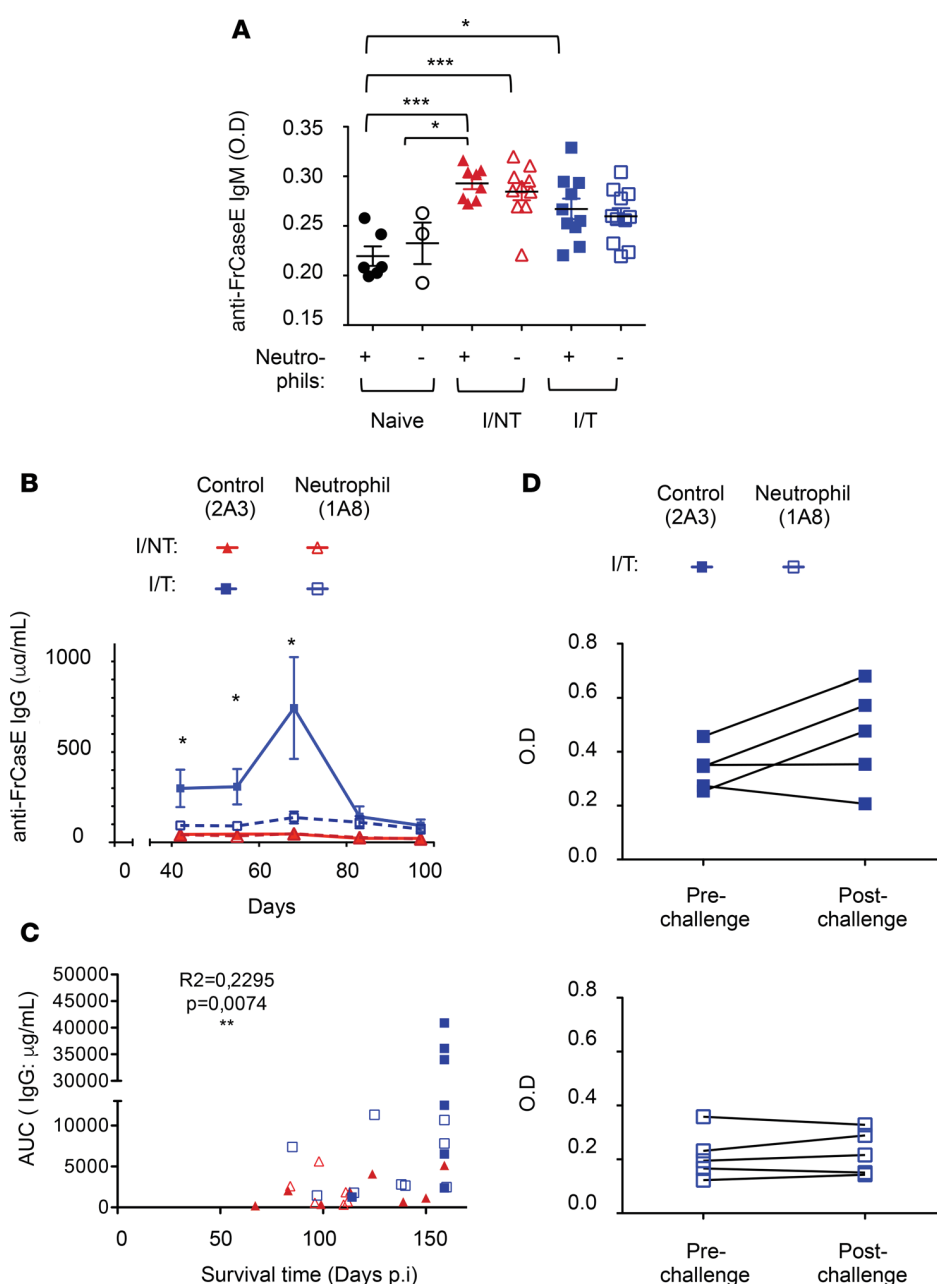


Figure 5. Enhancement of the humoral antiviral response by neutrophils.

Neutrophils of naive, I/NT, and I/T mice were depleted, or not, as indicated in Figure 1A. **(A and B)** Serum concentration of FrCasE-specific IgG. **(A)** Seric FrCasE-specific IgM levels were assayed by ELISA at 14 days p.i. The data represent 2 independent experiments, with 8–11 mice per group (for I/NT and I/T mice) and 3–6 mice per group (for naive mice). **(B)** Seric FrCasE-specific IgG concentration was assayed by ELISA at the indicated times. The data represent 2 independent experiments, with 7–9 mice per group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test, with a Bonferroni correction. **(C)** Correlation between serum anti-FrCasE IgG levels (evaluated as AUC) and survival times, analyzed using the Pearson correlation test. AUC was evaluated until the last time point at which all mice were still alive (day 68 p.i.). All infected/nontreated ($n = 8$) and infected/treated ($n = 9$) mice, depleted or not of neutrophils ($n = 9$ and $n = 7$, respectively), showed in Figure 1D were evaluated for such a correlation. **(D)** FrCasE-specific secondary humoral response. Seric FrCasE-specific IgG levels in I/T mice (depleted or not of neutrophils) were assayed by ELISA before and 1 week after a viral challenge performed at day 93 p.i. The data represent 2 independent experiments, with 5 mice per group. Statistical significance was established using a paired Student's t test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

B cells in the generation of plasma cells (49), the higher frequency of splenic MZ B cells at day 14 p.i. in infected/treated mice was associated with a higher frequency of CD138⁺ plasma cells in bone marrow (BM), as compared with infected/nontreated animals. This effect was neutrophil dependent (Figure 6C). Finally, histological analyses of spleens of infected mice at 14 days p.i. revealed larger germinal centers (GCs; defined by staining of MZ CD169⁺ macrophages and B220⁺ cells) in infected/treated versus infected/nontreated mice (Figure 6D). In agreement with a role of neutrophils in the enhancement of the humoral response, neutrophil depletion in infected/treated mice led to smaller GCs (Figure 6D).

Thus, neutrophils are essential for the vaccine-like effects induced by the 667 mAb immunotherapy through the stimulation of the humoral, but not the CD8⁺ T cell, antiviral response. This effect is associated with a neutrophil-dependent increase in both splenic MZ B cells and BM plasma cells.

Neutrophils are differently activated in infected/treated and nontreated mice. Finally, we addressed the functional activation of splenic neutrophils in infected mice with or without 667 mAb immunotherapy at day

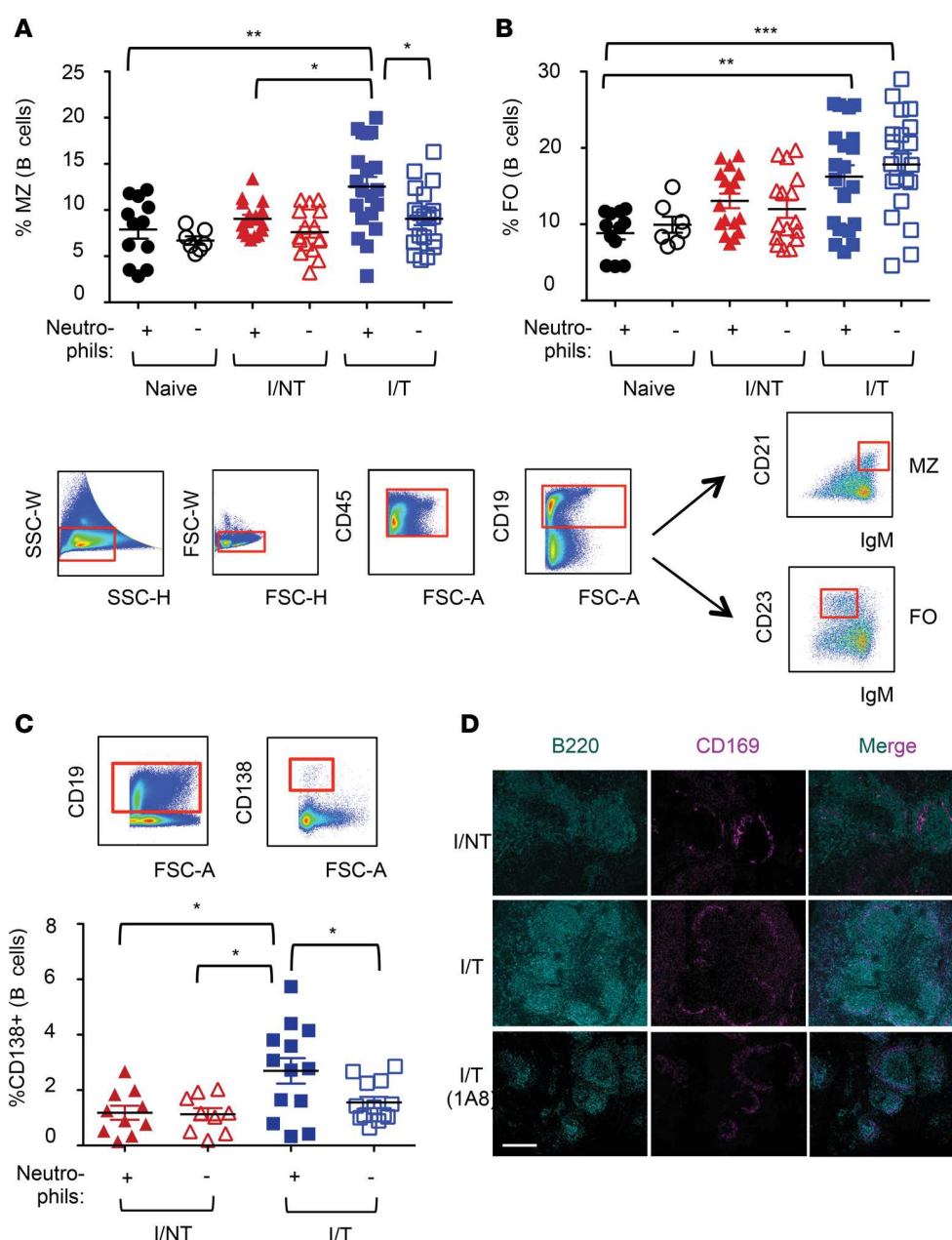


Figure 6. Effects of neutrophil depletion on B cell responses. Neutrophils of naive, I/NT, and I/T mice were depleted, or not, as indicated in Figure 1A. **(A and B)** Frequency of MZ and follicular (FO) B cells. Spleen cells were isolated at day 14 p.i. and were analyzed by flow cytometry for the frequency of MZ (CD21^{hi}IgM^{hi}) **(A)** and FO (CD23^{hi}IgM^{hi}) **(B)** CD19⁺ B cells, as depicted in the gating strategy. **(C)** Frequency of plasma cells. BM cells were isolated at day 14 p.i. and were analyzed by flow cytometry for the frequency of CD138⁺ (CD19⁺) B cells. The data represent 5 independent experiments, with 7–12 mice per group for naive mice and 17–21 per group for I/NT and I/T mice. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001). **(D)** Histological analyses of spleen sections. Immunolabeling of B cells (B220⁺) and macrophages of the MZ (CD169⁺) was performed in sections from spleens of infected/nontreated and infected/treated mice (depleted or not of neutrophils) recovered at 14 days p.i. to visualize germinal centers. The images are representative of 4 separate mice for each experimental condition. Scale bar: 200 μ m.

8 p.i. by monitoring cell surface activation markers and quantifying various cytokine mRNA and protein levels. In infected/treated and infected/nontreated mice, splenic neutrophils were similarly activated, as deduced from CD62L shedding and increased expression of CD11b (Figure 7A). However, neutrophils from infected/treated mice showed a significantly stronger expression of two cytokines involved in B cell activation, B cell-activating factor (BAFF) and lymphotoxin α (LT α), compared with infected/nontreated animals (Figure 7B), suggesting a role for the therapeutic mAb in the functional activation of neutrophils. Splenic neutrophils sorted from infected/treated mice also showed a trend for higher secretion capacity of BAFF and LT α , as compared with infected/nontreated mice neutrophils, even though such a trend did not reach statistical significance. To further assess whether mAb triggering (through Fc γ R cross-linking) could enhance BAFF and LT α release by neutrophils, we isolated BM neutrophils from naive mice and stimulated them for 24 hours in plates coated with the 667 mAb. Experiments were conducted in the presence or the absence of the proinflammatory cytokine IFN- γ to assess the extent to which inflammatory conditions could synergize with 667 mAb triggering. Interestingly, in the presence of IFN- γ , 667 mAb triggering led to a significantly increased release of BAFF and LT α by neutrophils (Figure 7C).

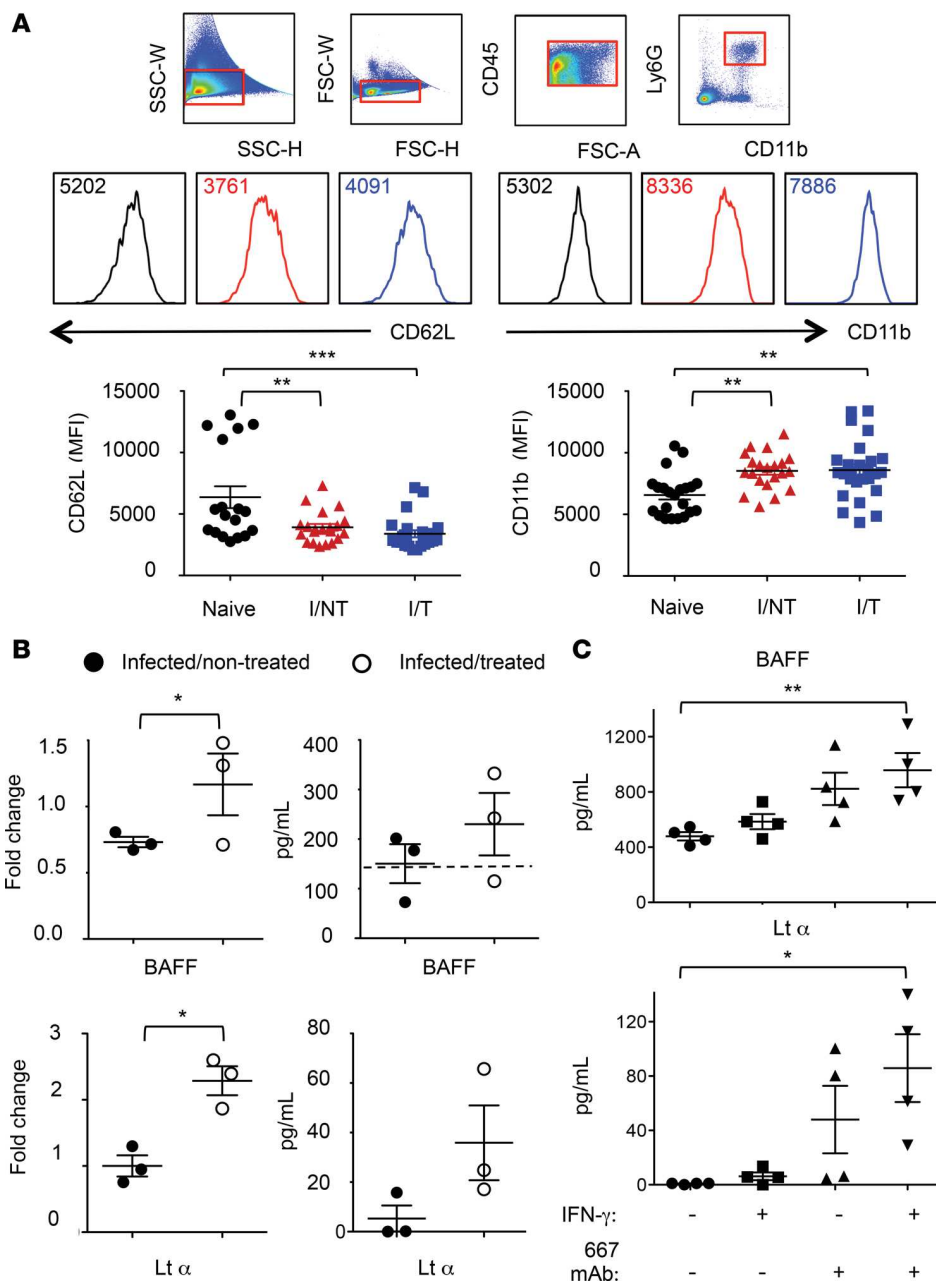


Figure 7. Activation of splenic and BM-isolated neutrophils. (A) Expression of CD11b and CD62L. Spleen cells from naive, I/NT, and I/T mice were isolated at day 8 p.i. and were analyzed by flow cytometry for assaying cell surface expression of CD11b and CD62L. The data represent 5 independent experiments, with at least 18 mice per group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. **(B)** Expression and protein release of BAFF and LT α by neutrophils. Neutrophils from naive, I/NT, and I/T mice were sorted from spleens at day 8 p.i. and assessed for cytokine expression or protein release. Cytokine expression (left) was assessed by RT-qPCR normalized to β -actin. The data show fold changes in cytokine expression by neutrophils from I/NT and I/T mice as compared with naive mice and are representative of 3 independent experiments, with 8–10 mice per group. Protein release (right) was assessed by ELISA in supernatants of sorted neutrophils cultured at a density of 2×10^5 cells/well for 24 hours. The data show BAFF and LT α release by neutrophils from I/NT and I/T and are representative of 3 independent experiments, with 8–10 mice per group. The dashed line represents the level of BAFF released by neutrophils sorted from naive mice. No LT α release was detected from neutrophils sorted from naive mice. **(C)** BAFF and LT α release by BM-isolated neutrophils. BAFF and LT α release was assessed by ELISA in supernatants of neutrophils isolated from BM of naive mice (>95% purity) and cultured for 24 hours in 667 mAb-coated 24-well plates at a density of 2×10^6 cells in 500 μ l medium. Experiments were done in the presence and in the absence of the proinflammatory cytokine IFN- γ (100 ng/ml). 667 mAb-noncoated plates were used as control. The data represent 4 independent experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction (**A** and **C**) or a paired Student's *t* test (**B**) (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

In summary, FrCasE infection activates neutrophils independently of immunotherapy. However, the activation state substantially differs between the two groups of animals, notably with a significantly stronger expression of LT α and BAFF in immunotherapy-treated mice. In addition, inflammatory conditions synergize with mAb-mediated activation of neutrophils leading to an enhanced release of BAFF and LT α .

Discussion

We have previously shown that antiviral mAb-based therapies can induce life-long protective immunity. This finding potentially has important therapeutic implications, as evidence suggests that it may also apply to diverse severe human viral diseases (10, 14). A paramount task is now to identify the mechanisms at the origin of the mAb-induced vaccine-like effects and exploit them for more efficient mAb-based treatment of patients.

Here, we report that neutrophils are essential during the immunotherapy period for long-term survival of FrCasE-infected mice, not because they control viral propagation but because they are crucial for inducing a

protective humoral response without an effect on the CD8⁺ T cell response. In contrast, we show that, upon 667 mAb treatment, NK cells are crucial for the elimination of infected cells by 667 mAb-mediated ADCC activity and are necessary for long-term survival of infected/treated mice. Thus, our work indicates that both innate effector cells have distinct but complementary roles in the protection of infected mice by mAb; NK cells have an early and predominant role in the control of viral spread, while neutrophils are essential for the emergence of a potent host antiviral humoral response. Our findings contrast with the current view of neutrophils — they are usually considered as simple frontline agents against invading pathogens — and highlight the hitherto unreported role of neutrophils as key cells in the modulation of adaptive antiviral immunity upon mAb treatment.

Our data indicate that survival of infected/treated mice depends on an efficient anti-FrCasE humoral response. Infected/treated mice show neutrophil-dependent (a) increased frequency of MZ B cells, (b) enhanced formation of GCs, (c) increased plasma cell generation, and (d) enhanced production of antiviral IgGs. Interestingly, the absence of neutrophils during the immunotherapy period in infected mice also leads to impaired development of secondary humoral responses upon viral challenge. Overall, our data suggest that neutrophils are essential for antiviral protection due to their B cell helper activity. Similarly, such a helper function has already been documented under homeostatic conditions (51), in autoimmunity disease-prone mice (52), during emergency granulopoiesis (53), and in bacterial infection (54). Importantly, our findings show that the acquisition of B cell helper functions in infected mice is dependent on immunotherapy, as no modulation of the anti-FrCasE humoral response was detected in infected/nontreated mice upon neutrophil depletion.

Though not excluding the role of other factors, our study suggests potential roles for BAFF and LT α in this B cell helper function. As concerns BAFF, it is interesting to note that its secretion by splenic neutrophils can contribute to the activation of splenic MZ B cells and the acceleration of plasma cell generation (51, 55). Moreover, BAFF administration to mice increases both the frequency of MZ B cells and antibody production (56, 57) and constitutes a signal for both MZ B cell survival and differentiation into plasmablasts (47, 58–61). Together with the fact that MZ B cells can favor the generation of plasma cells upon microbial infection (49), it is reasonable to speculate that BAFF induction in neutrophils of infected/treated mice may also favor the MZ B cell response and the subsequent generation of plasma cells. Interestingly, in agreement with our *in vitro* results showing enhanced BAFF release by neutrophils after a combination of IFN- γ stimulation and Fc γ R cross-linking (Figure 7C), different proinflammatory stimuli, including ICs, have been shown to act as secretagogues and to synergize with IFN- γ to enhance BAFF secretion by human neutrophils (62). Moreover, neutrophil depletion in autoimmunity-prone mice led to a reduction of autoantibodies titers that correlated with decreased serum levels of IFN- γ and BAFF (52). Thus, it can reasonably be hypothesized that inflammatory conditions synergize with ICs formed after 667 mAb treatment of FrCasE-infected mice to enhance BAFF release by neutrophils.

Although not formally shown, our data suggest that LT α release by neutrophils might play a role in the enhancement of the antiviral humoral response in infected/treated mice. LT α is involved in the formation of secondary lymphoid organs, is expressed by lymphocytes, and mediates a large variety of inflammatory and antiviral responses. It has also been reported to play a role in the development of GC formation and to be required for IgG responses (63–65). Here, we show that this cytokine is expressed and released by neutrophils upon mAb treatment of infected mice. Interestingly, although LT α is not known to be expressed by neutrophils, it has been proposed that nonlymphocytic murine splenic cells are able to produce it (66). We also report that Fc γ R cross-linking by immobilized 667 mAb synergizes with IFN- γ to enhance LT α release by neutrophils. This suggests that, similarly to BAFF, inflammatory conditions and mAb triggering might lead to increased LT α secretion by neutrophils. Further studies will be required to address whether BAFF and LT α combine their actions to stimulate the antiviral humoral response upon mAb immunotherapy. Finally, as IFN- γ potentiates BAFF and LT α release, it will also be important to assess whether and how neutrophil-dependent IFN- γ production by NK cells in infected/treated mice contributes to the stimulation of antibody responses, as this cytokine affects class-switching and long-term maintenance of neutralizing antibody titers in retrovirally infected mice (34) and humoral autoimmunity in humans (67).

Identifying neutrophils as key players in the induction of protective immunity by antiviral mAbs has important therapeutic implications for several reasons. First, if combination therapies are considered, it will be of utmost importance that the agent(s) coadministered with the passive immunotherapy do not alter neutrophil functions and counts to avoid inhibiting efficient antiviral humoral immune

responses. Second, in pathological situations leading to neutropenia and/or impaired neutrophil functions, such as certain viral infections (68, 69) and/or drug-induced neutropenia (70), it will be essential to restore them. This could, for example, be achieved through administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), a cytokine already used in the clinic to treat neutropenic patients. Interestingly, this cytokine might also be used in combination with treatments aiming at enhancing the generation of functional neutrophils (70). Furthermore, beyond stimulating neutrophil activation and/or mobilization, G-CSF enhances neutrophil BAFF secretion capacity and, thereby, the ability of neutrophils to stimulate B cells (71). Similarly, reduction of viral load by antiretroviral therapies also permits partial restoration of the impaired functions of neutrophils observed in HIV-infected patients (68). Interestingly, neutrophils have been shown to mediate immunosuppression via the PD-L1/PD-1 pathway in HIV-infected patients (72). Antiviral passive immunotherapies might therefore benefit from combination with the administration of mAbs targeting this immune checkpoint. Finally, alternative approaches, such as engineering the Fc fragment of antiviral mAbs, merit consideration. Increasing their affinity for the FcγRs expressed by neutrophils might, at first, allow superior antibody-mediated phagocytosis, as recently reported in the case the Fc-modified VR01 anti-HIV mAb (73). This could then alter cell signaling and cytokine/chemokines production to ultimately lead to more effective adaptive immune responses. Thus, stimulating neutrophil activity, restoring their impaired functions, and/or counteracting their immunosuppressive actions should improve the vaccine-like effects of antiviral mAb-based immunotherapies. This might also apply to cancer treatment as enhancement of antitumoral immune responses has also been observed in mAb-based anticancer immunotherapies. This is all the more important to take into consideration, as neutrophils have been shown to play a role in the therapeutic activity of anticancer mAb (74–78).

Methods

Mice. Mice were bred and maintained under conventional, pathogen-free facilities at the Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier.

Viral stocks. FrCasE viral stocks were produced, assayed, and stored as described previously (27).

Viral infection, immunotherapy, and mouse follow-up. Eight-day-old 129/Sv/Ev mice were infected i.p. with 50 µl of a virus suspension containing 50,000 focus-forming units (FFU) and treated, or not, with 30 µg 667 mAb 1 hour p.i. and on days 2 and 5 p.i. by i.p. administration. Mice were examined at regular intervals for clinical signs of erythroleukemia (reduction of hematocrits). They were euthanized when their hematocrits reached 35% (experimental endpoint).

Flow cytometry. Spleen single-cell suspensions were obtained by mechanical dissociation of the organs in PBS. BM cell suspensions were obtained by dissection and PBS flushing of tibias and femurs. Cells were stained at 4°C using fluorochrome-conjugated antibodies against CD3e (145-2C11, BD Biosciences), CD4 (RM4-5, eBioscience), CD8 (Ly2, 53-6.7, eBioscience), CD11b (M1/70, eBioscience), CD11c (HL3, BD Biosciences), CD19 (1D3, eBioscience), CD21/35 (eBio8d9, eBioscience), CD23 (B3B4, eBioscience), CD27 (LG3A10, BioLegend), CD45.2 (104, BD Biosciences), CD45R/B220 (RA3-6B2, BD Biosciences), CD49b (DX5, BD Biosciences), CD62L (Ly22, MEL-14, BD Biosciences), CD117 (2B8, BD Biosciences), CD127 (SB/199, BD Biosciences), CD138 (281-2, BioLegend), F4/80 (BM8, BioLegend), Gr1 (RB6-8C5, BD Biosciences), IFN-γ (XMG1.2, BD Biosciences), IgM (eB121-15F9, eBioscience), Ly6G (1A8, BD Biosciences), lineage (Ter119; Gr1; CD45R/B220; CD11c; F4/80; CD3e, BioLegend), and NKp46 (29A1.4, BD Biosciences). FrCasE-infected cells were assayed using an anti-Gag mAb (H34) (35) labeled with Alexa Fluor 647. Forward scatter area and forward scatter time-of-flight, as well as side scatter, were used to remove doublets from flow cytometry analyses. Cells were analyzed on FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience), and the data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

ELISA of anti-FrCasE antibodies. Plasma anti-FrCasE Igs were assayed by ELISA as previously described (26, 27). Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or IgM rabbit antisera (Serotec) were used as secondary antibodies.

Virus challenge experiments. Infected/treated mice, depleted or not of neutrophils, were injected i.v. with 300 µl of a 5×10^4 FFU/ml FrCasE suspension mixed to 2×10^6 FrCasE-infected splenocytes 3 months after the first infection. Blood samples were collected 1 week after challenge to assay endogenous anti-FrCasE IgG concentrations by ELISA.

In vivo depletion of Ly6G⁺ and NK cells. Neutrophils were depleted by administering a rat anti-Ly6G antibody (1A8; BioXcell), (37, 38) injected i.p. at different time points (150 µg/injection), or isotype control rat

IgG (2A3; BioXcell). Neutrophil depletion was monitored by flow cytometry analysis of Gr1^{hi} and CD11b⁺ cells. NK cells were depleted using the anti-asialo GM1 antibody (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), injected i.p. at different time points (50 µl/injection). This antibody has been used to study the *in vivo* functions of NK cells in mouse strains lacking the NK1.1 allotype, which is a feature of 129 Sv/Ev mice (42).

In vivo cytotoxicity activity. Experiments were conducted as described previously (27, 79). Briefly, red blood cell-free splenocytes were recovered from 10-day-old FrCasE-infected, or noninfected, pups. Splenocytes from noninfected mice were labeled with the vital dye carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes) at a concentration of 0.5 µM (CFSE^{lo} cells). Splenocytes from infected mice were labeled with 5 µM CFSE (CFSE^{hi} cells) and preincubated, or not, with the 667 mAb (the absence of 667 mAb allowed quantification of spontaneous cell death). Both cell populations were mixed at a 1:1 ratio before retro-orbital administration to recipient mice. Cytotoxicity activity against infected splenocytes was calculated from the ratio of CFSE^{lo}/CFSE^{hi} cells in spleen assayed by flow cytometry 5 hours later. To assess the contribution of NK cells and neutrophils to antibody-mediated cytotoxicity, 50 µl of the anti-asialo GM1 or 200 µg of the anti-Ly6G 1A8 mAb were administered 1 day prior to the assay.

Flow cytometry assay of CD8⁺ T cells specific for FrCasE-infected cells. Splenocytes were labeled with both an APC-conjugated anti-CD8⁺ T cell antibody and a PE-conjugated MHC class I H-2D^b tetramer (Beckman Coulter) displaying the immunodominant Friend virus GagL epitope (27, 80) (I^{D^b}-GagL tetramers) as previously described (27).

Assay of IFN-γ production. 10⁶ splenocytes were incubated at 37°C for 5 hours in 12-well plates in 500 µl RPMI culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of brefeldin A (10 µg/ml; MilliporeSigma). IFN-γ production was assayed by flow cytometry using the intracellular Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization staining kit (Becton Dickinson).

Histological analyses. Spleens from infected/nontreated and infected/treated mice (depleted or not of neutrophils) were recovered at day 14 p.i. and prepared as previously described (81). Briefly, spleens were initially fixed at 4°C overnight with a paraformaldehyde-lysine-periodate (PLP) solution and then embedded in 4% low-temperature-gelling agarose (type VII-1; MilliporeSigma) prepared in PBS. 300-µm slices were cut with a vibratome (VT 1000S; Leica) in a bath of ice-cold PBS. Sections of tissues were submerged in PBS and transferred to 0.4-µm organotypic culture inserts (Millicell; Millipore) for staining with an anti-B220 (RA3-6B2, Becton Dickinson) and an anti-CD169 antibody (MOMA-1, Bio-Rad) at 37°C for 20 minutes. The images were captured using a Leica SP8-UV confocal scanning microscope.

RT-qPCR quantification of gene expression. Single-cell suspensions of splenocytes were prepared from naive, infected/nontreated, and infected/treated mice 8 days p.i. and immunotherapy. Neutrophils (CD11b⁺Ly6G^{hi} expression) were sorted (>98% pure) using a BD Biosciences FACSARIA device. RNA was extracted from 1 × 10⁶ to 2 × 10⁶ sorted neutrophils using the RNeasy micro kit (Qiagen). RNA quality and integrity were verified using the Agilent 2100 bioanalyzer. cDNAs were synthesized using the RT2 First-Strand Kit (Qiagen). All quantitative PCRs were performed following protocols optimized for the RT2 quantitative Profiler PCR array using SYBR Green mix (Qiagen) and LightCycler 480 II machine (Roche). All data were normalized to β-actin. Results were expressed as fold increases with respect to naive cells using the ΔΔCt method.

BAFF and LTα protein release quantification. Soluble BAFF and LTα from cell-free supernatants of cultured neutrophils were assayed using BAFF (R&D Systems) and LTα ELISA (NeoBiotec), respectively. Supernatants were collected from sorted splenic neutrophils (from naive, infected/nontreated, and infected/treated mice at 8 days p.i. and immunotherapy) cultured in 96-well plates at a density of 2 × 10⁵ cells/well for 24 hours. Alternatively, neutrophils were isolated from naive mice BM using a magnetic-based cell sorting (MACS) neutrophil isolation kit (>95% purity; Miltenyi Biotec) and cultured for 24 hours in 667 mAb-coated 24-well plates at a density of 2 × 10⁶ cells in 500 µl medium, in the presence or in the absence of IFN-γ (100 ng/ml). 667 mAb-noncoated plates were used as controls. G-CSF (R&D Systems) was added at a concentration of 10 ng/ml to neutrophil cultures to maintain cell viability.

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Data were expressed as mean ± SEM, and statistical significance was established using a parametric 1-way ANOVA test with a Bonferroni correction for multiple comparisons or unpaired Student's 2-tailed *t* tests when two groups were compared. *P* values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

Study approval. All experimental procedures were performed in accordance with the French national animal care guidelines (CEEALR-12146 approval, Ethics committee of the Languedoc-Roussillon Region, Montpellier).

Author contributions

M. Pelegrin, MNG, and M. Piechaczyk defined the research program. MNG, JL, and M. Pelegrin performed the experiments and carried out the data analyses, with a contribution by M. Piechaczyk. M. Pelegrin, MNG, and M. Piechaczyk wrote the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (EL2015.LNCC/MaP), the Fondation ARC (SFI20121205665, contract 089287), Sidaction (BI25-1-02278 and A014-2-AEQ-08-01), and the Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20120523949). MNG, JL, M. Piechaczyk, and M. Pelegrin are members of the “MabImprove Labex,” a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the “Investments for the future” program (reference ANR-10-LABX-53-01) that also supported this work. We thank the imaging facility MRI, which is part of the UMS BioCampus Montpellier and a member of the national infrastructure France-BioImaging, supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investments for the future”). We are grateful to the animal facility of the Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, which is part of the “Réseau des Animaleries Montpelliéraines” RAMIBiSA Facility for animal experiments, and to the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” RHEM facility for expert assistance with histology. We are grateful to E. Donnadiou (Institut Cochin, Paris) for expert assistance with histology, to M. Boyer and S. Gailhac from MRI for support in cytometry experiments, to Thierry Gostan (SERENAD Complex Biological Data Analysis Service) for support in statistical analyses, to Helen Phillips Bevis (Traductions Stratégiques) for English editing services, and to V. Dardalhon, M. Hahne, and B. Hipskind for critical reading of the manuscript.

Address correspondence to: Mireia Pelegrin, Institute of Molecular Genetics of Montpellier, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France. Phone: 33.4.34.35.96.68; Email: mireia.pelegrin@igmm.cnrs.fr.

- Salazar G, Zhang N, Fu TM, An Z. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. *NPJ Vaccines*. 2017;2:19.
- Both L, Banyard AC, van Dolleweerd C, Wright E, Ma JK, Fooks AR. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections. *Vaccine*. 2013;31(12):1553–1559.
- Caskey M, et al. Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nat Med*. 2017;23(2):185–191.
- Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:705–742.
- Corti D, et al. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(33):10473–10478.
- Corti D, et al. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. *Science*. 2016;351(6279):1339–1342.
- De Benedictis P, et al. Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis. *EMBO Mol Med*. 2016;8(4):407–421.
- Fibriansah G, et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol Med*. 2014;6(3):358–371.
- Lynch RM, et al. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci Transl Med*. 2015;7(319):319ra206.
- Pelegrin M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. Antiviral monoclonal antibodies: Can they be more than simple neutralizing agents? *Trends Microbiol*. 2015;23(10):653–665.
- Bangaru S, et al. Recognition of influenza H3N2 variant virus by human neutralizing antibodies. *JCI Insight*. 2016;1(10):e86673.
- Bailey JR, et al. Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI Insight*. 2017;2(9):92872.
- Kam YW, et al. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. *JCI Insight*. 2017;2(8):92428.
- Schoofs T, et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science*. 2016;352(6288):997–1001.
- Lambour J, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M, Pelegrin M. Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(8):e92.
- Wen YM, Mu L, Shi Y. Immunoregulatory functions of immune complexes in vaccine and therapy. *EMBO Mol Med*. 2016;8(10):1120–1133.
- Abès R, Gélizé E, Fridman WH, Teillaud JL. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*. 2010;116(6):926–934.
- Deligne C, Metidji A, Fridman WH, Teillaud JL. Anti-CD20 therapy induces a memory Th1 response through the IFN- γ /IL-12 axis and prevents protumor regulatory T-cell expansion in mice. *Leukemia*. 2015;29(4):947–957.
- DiLillo DJ, Ravetch JV. Differential Fc-receptor engagement drives an anti-tumor vaccinal effect. *Cell*. 2015;161(5):1035–1045.
- Hilchey SP, et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients

- with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood*. 2009;113(16):3809–3812.
21. Srivastava RM, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1858–1872.
 22. Taylor C, et al. Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):5133–5143.
 23. Trivedi S, et al. Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21):5229–5237.
 24. Gros L, Dreja H, Fiser AL, Plays M, Pelegrin M, Piechaczyk M. Induction of long-term protective antiviral endogenous immune response by short neutralizing monoclonal antibody treatment. *J Virol*. 2005;79(10):6272–6280.
 25. Gros L, Pelegrin M, Plays M, Piechaczyk M. Efficient mother-to-child transfer of antiretroviral immunity in the context of pre-clinical monoclonal antibody-based immunotherapy. *J Virol*. 2006;80(20):10191–10200.
 26. Gros L, et al. Endogenous cytotoxic T-cell response contributes to the long-term antiretroviral protection induced by a short period of antibody-based immunotherapy of neonatally infected mice. *J Virol*. 2008;82(3):1339–1349.
 27. Michaud HA, et al. A crucial role for infected-cell/antibody immune complexes in the enhancement of endogenous antiviral immunity by short passive immunotherapy. *PLoS Pathog*. 2010;6(6):e1000948.
 28. Nasser R, Pelegrin M, Michaud HA, Plays M, Piechaczyk M, Gros L. Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J Virol*. 2010;84(19):10169–10181.
 29. Nasser R, Pelegrin M, Plays M, Gros L, Piechaczyk M. Control of regulatory T cells is necessary for vaccine-like effects of antiviral immunotherapy by monoclonal antibodies. *Blood*. 2013;121(7):1102–1111.
 30. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013;210(7):1283–1299.
 31. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710–719.
 32. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol*. 2015;98(4):557–564.
 33. Saitoh T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012;12(1):109–116.
 34. Stromnes IM, et al. Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *J Virol*. 2002;76(5):2225–2232.
 35. Chesebro B, et al. Characterization of mouse monoclonal antibodies specific for Friend murine leukemia virus-induced erythro-leukemia cells: friend-specific and FMR-specific antigens. *Virology*. 1981;112(1):131–144.
 36. Dittmer U, Race B, Peterson KE, Stromnes IM, Messer RJ, Hasenkrug KJ. Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol*. 2002;76(1):450–454.
 37. Carr KD, Sieve AN, Indramohan M, Break TJ, Lee S, Berg RE. Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2666–2676.
 38. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 2008;83(1):64–70.
 39. Bruel T, et al. Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat Commun*. 2016;7:10844.
 40. Smalls-Mantey A, Connors M, Sattentau QJ. Comparative efficiency of HIV-1-infected T cell killing by NK cells, monocytes and neutrophils. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74858.
 41. Bodhankar S, Woolard MD, Sun X, Simecka JW. NK cells interfere with the generation of resistance against mycoplasma respiratory infection following nasal-pulmonary immunization. *J Immunol*. 2009;183(4):2622–2631.
 42. Carlyle JR, et al. Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol*. 2006;176(12):7511–7524.
 43. Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol*. 1980;10(3):175–180.
 44. Ong S, et al. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. *Am J Pathol*. 2015;185(3):847–861.
 45. Jaeger BN, et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*. 2012;209(3):565–580.
 46. Cortez VS, Robinette ML, Colonna M. Innate lymphoid cells: new insights into function and development. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:71–77.
 47. Magri G, et al. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*. 2014;15(4):354–364.
 48. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118–132.
 49. Song H, Cerny J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med*. 2003;198(12):1923–1935.
 50. Zouali M, Richard Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol*. 2011;2:63.
 51. Puga I, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 2011;13(2):170–180.
 52. Coquery CM, et al. Neutrophils contribute to excess serum BAFF levels and promote CD4+ T cell and B cell responses in lupus-prone mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e102284.
 53. Parsa R, et al. BAFF-secreting neutrophils drive plasma cell responses during emergency granulopoiesis. *J Exp Med*. 2016;213(8):1537–1553.
 54. Chorny A, et al. The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. *J Exp Med*. 2016;213(10):2167–2185.
 55. Cerutti A, Puga I, Magri G. The B cell helper side of neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):677–682.
 56. Dosenovic P, et al. BlyS-mediated modulation of naive B cell subsets impacts HIV Env-induced antibody responses. *J Immunol*.

- 2012;188(12):6018–6026.
57. Enoksson SL, et al. The inflammatory cytokine IL-18 induces self-reactive innate antibody responses regulated by natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(51):E1399–E1407.
58. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):244–250.
59. McCulloch L, Smith CJ, McColl BW. Adrenergic-mediated loss of splenic marginal zone B cells contributes to infection susceptibility after stroke. *Nat Commun*. 2017;8:15051.
60. Srivastava B, Quinn WJ, Hazard K, Erikson J, Allman D. Characterization of marginal zone B cell precursors. *J Exp Med*. 2005;202(9):1225–1234.
61. Schweighoffer E, et al. The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity*. 2013;38(3):475–488.
62. Scapini P, et al. Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood*. 2005;105(2):830–837.
63. Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Chaplin DD. Lymphotoxin- α -deficient and TNF receptor-I-deficient mice define developmental and functional characteristics of germinal centers. *Immunol Rev*. 1997;156:137–144.
64. Banks TA, et al. Lymphotoxin- α -deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol*. 1995;155(4):1685–1693.
65. Fu YX, Molina H, Matsumoto M, Huang G, Min J, Chaplin DD. Lymphotoxin- α (LT α) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J Exp Med*. 1997;185(12):2111–2120.
66. Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD. Lymphotoxin- α -dependent spleen microenvironment supports the generation of memory B cells and is required for their subsequent antigen-induced activation. *J Immunol*. 2000;164(5):2508–2514.
67. Jackson SW, et al. B cell IFN- γ receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *J Exp Med*. 2016;213(5):733–750.
68. Casulli S, Elbim C. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun*. 2014;6(1):13–20.
69. Shi X, et al. Neutropenia during HIV infection: adverse consequences and remedies. *Int Rev Immunol*. 2014;33(6):511–536.
70. Li L, et al. Am80-GCSF synergizes myeloid expansion and differentiation to generate functional neutrophils that reduce neutropenia-associated infection and mortality. *EMBO Mol Med*. 2016;8(11):1340–1359.
71. Scapini P, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *J Exp Med*. 2003;197(3):297–302.
72. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RP, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003993.
73. Sips M, et al. Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1584–1595.
74. Albanesi M, et al. Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood*. 2013;122(18):3160–3164.
75. Cittera E, et al. The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. *J Immunol*. 2007;178(10):6616–6623.
76. Golay J, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood*. 2013;122(20):3482–3491.
77. Hernandez-Ilizaliturri FJ, et al. Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin Cancer Res*. 2003;9(16 Pt 1):5866–5873.
78. Valgardsdottir R, Cattaneo I, Klein C, Introna M, Figliuzzi M, Golay J. Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies. *Blood*. 2017;129(19):2636–2644.
79. Guyre CA, Gomes D, Smith KA, Kaplan JM, Perricone MA. Development of an in vivo antibody-mediated killing (IVAK) model, a flow cytometric method to rapidly evaluate therapeutic antibodies. *J Immunol Methods*. 2008;333(1-2):51–60.
80. Chen W, Qin H, Chesebro B, Cheever MA. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J Virol*. 1996;70(11):7773–7782.
81. Peranzoni E, et al. Ex vivo imaging of resident CD8 T lymphocytes in human lung tumor slices using confocal microscopy. *J Vis Exp*. 2017;(130).

II. Potentialisation de l'activation des polynucléaires neutrophiles *in vitro* par les IC

Nous avons démontré que les neutrophiles étaient indispensables aux effets vaccinaux induits par les AcM antiviraux. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce rôle prépondérant des neutrophiles dans l'efficacité de l'immunothérapie antivirale par AcM, j'ai réalisé des expérimentations *in vitro*. Le but de ces expérimentations était d'établir de façon plus précise, si et comment, les IC présents lors de l'immunothérapie, activaient les neutrophiles.

Pour cela, j'ai d'abord étudié l'activation des neutrophiles dans un contexte infectieux en comparant un stimulus d'origine bactérienne, fréquemment retrouvé dans la littérature, le LPS et un stimulus d'origine virale, ce qui est très peu décrit dans la littérature. Dans un second temps j'ai comparé l'activation des neutrophiles par les différents composants de notre modèle à savoir le virus FrCas^E, et les IC formés du virus FrCas^E et de l'AcM 667. (**Figure 20**)

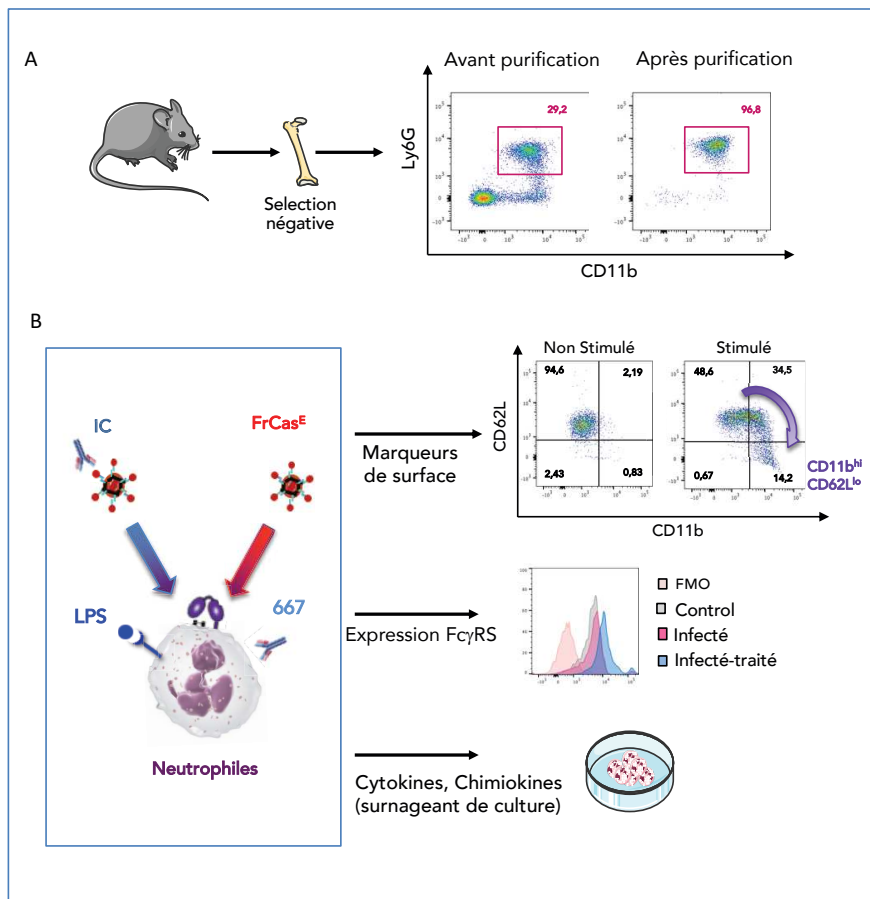


Figure 20 : Protocole de purification et d'activation des neutrophiles issus de la moelle osseuse.

(A) Purification des neutrophiles à partir de la moelle osseuse de souris naïves par sélection négative et vérification de la pureté par des marqueurs spécifiques de la population des neutrophiles (CD11b+ Ly6G+). (B) Les neutrophiles ont été placés à une concentration de 1 million cellules/ ml dans des plaques 96 puits à fond rond et activés par différents stimuli (LPS, virus FrCas^E, IC) pendant 20h à 37°C. Leur activation phénotypique a ensuite été déterminée par analyse des marqueurs de surface (CD11b, CD62L), de l'expression des FcγRs, et l'activation fonctionnelle a été évaluée par le dosage de la sécrétion de cytokines et de chimiokines dans le surnageant de culture.

Afin de réaliser ces expérimentations, j'ai mis au point les conditions optimales de purification des neutrophiles avec un pourcentage de pureté très élevé (>95%). Pour cela, j'ai extrait les cellules à partir de la moelle osseuse de souris naïves âgées de 8 à 11 semaines, âge déterminé expérimentalement pour obtenir le plus grand nombre de cellules possible. Les neutrophiles ont été ensuite isolés à l'aide d'un kit commercial de sélection négative (protocole de purification décrit dans Matériels et Méthodes), qui m'a permis d'obtenir une population exempte de tout anticorps de sélection et d'éviter ainsi une activation artefactuelle des neutrophiles. En effet, les neutrophiles sont des cellules extrêmement labiles et fragiles, qui peuvent s'activer très facilement. Il était donc nécessaire d'optimiser la technique de purification afin de minimiser l'activation due à la purification. La pureté et la viabilité des cellules ont été contrôlées par cytométrie en flux, en mesurant la MFI (Mean Fluorescence Intensity) des marqueurs de surface spécifiques de la population des neutrophiles (CD11b⁺ Ly6G^{hi}). (**Figure 20A**)

Une fois l'efficacité de la purification établie les cellules ont été placées en culture et ont été activées par différents stimuli. L'activation a été mesurée à différents niveaux. Dans un premier temps au niveau cellulaire, par cytométrie en flux, en mesurant la modulation de l'expression de marqueurs d'activation de surface couramment utilisés, tel que l'augmentation de l'intégrine CD11b et la diminution de la L-sélectine CD62L. Ainsi les neutrophiles qui sont CD11b^{hi} CD62L^{lo} sont les plus activés. J'ai également évalué si l'activation des neutrophiles par le virus seul ou sous forme d'IC modulait l'expression des récepteurs aux IgG, les FcγRs en surface des cellules. Dans un second temps, à partir du surnageant de culture de chaque condition prélevée 20 h post stimulation, un profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique a été établi par une approche multiparamétrique de type CBA (cytometric bead array). (**Figure 20B**)

II.1. Activation phénotypique des neutrophiles *in vitro*.

En premier lieu, j'ai vérifié l'activation des neutrophiles en utilisant un stimulus couramment retrouvé dans la littérature, le LPS et je l'ai comparé aux conditions sans stimulations (NS, non stimulés), à savoir les neutrophiles avec uniquement du milieu de culture (M).

J'ai observé lors de la stimulation par le LPS une forte augmentation du marqueur CD11b (d'un facteur 3) comparé au NS, ainsi qu'une augmentation de la proportion de neutrophiles CD11b^{hi}CD62L^{lo}, passant de 5 % pour les NS à 28% pour le LPS. (**Figure 21A**). Le LPS, comme décrit dans la littérature, (Gomes et al., 2010; Soler-Rodriguez et al., 2000) induit bien une activation des neutrophiles *in vitro*.

J'ai également évalué l'expression des différents FcγRs exprimés à la surface des neutrophiles dans les différentes conditions de stimulations. (**Figure 21B**) J'ai constaté que la stimulation par le LPS induisait une augmentation significative de l'expression du FcγRIV (d'un facteur 2), comme décrit dans la littérature, mais pas des autres FcγRs. L'évaluation a été faite grâce aux anticorps dont nous disposons au laboratoire, généreusement fournis par Dr. Pierre Bruhns. A noter que si un anticorps spécifique a été utilisé pour le FcγRIV et le FcγRI, un anticorps à double spécificité a été utilisé pour la reconnaissance du FcγRIII et du FcγRIIB. Il s'agit de l'anticorps 2.4G2, qui a déjà été utilisé pour l'étude du FcγRIII (Jakus et al., 2008). Il est important de mentionner que l'unique récepteur inhibiteur, le FcγRIIB, possède plusieurs polymorphismes en fonction de la souche de souris et aucun anticorps commercial détectant le polymorphisme exprimé par la souche de souris 129/Sv/Ev que nous utilisons, n'est disponible. En ce qui concerne l'autre récepteur activateur exprimé sur les neutrophiles, le FcγRIII, j'ai utilisé un anticorps spécifique (clone AT154), (Tutt et al., 2015), que j'ai testé mais dont le

marquage s'est révélé inexploitable, probablement dû à une spécificité de notre souche de souris 129/Sv/Ev.

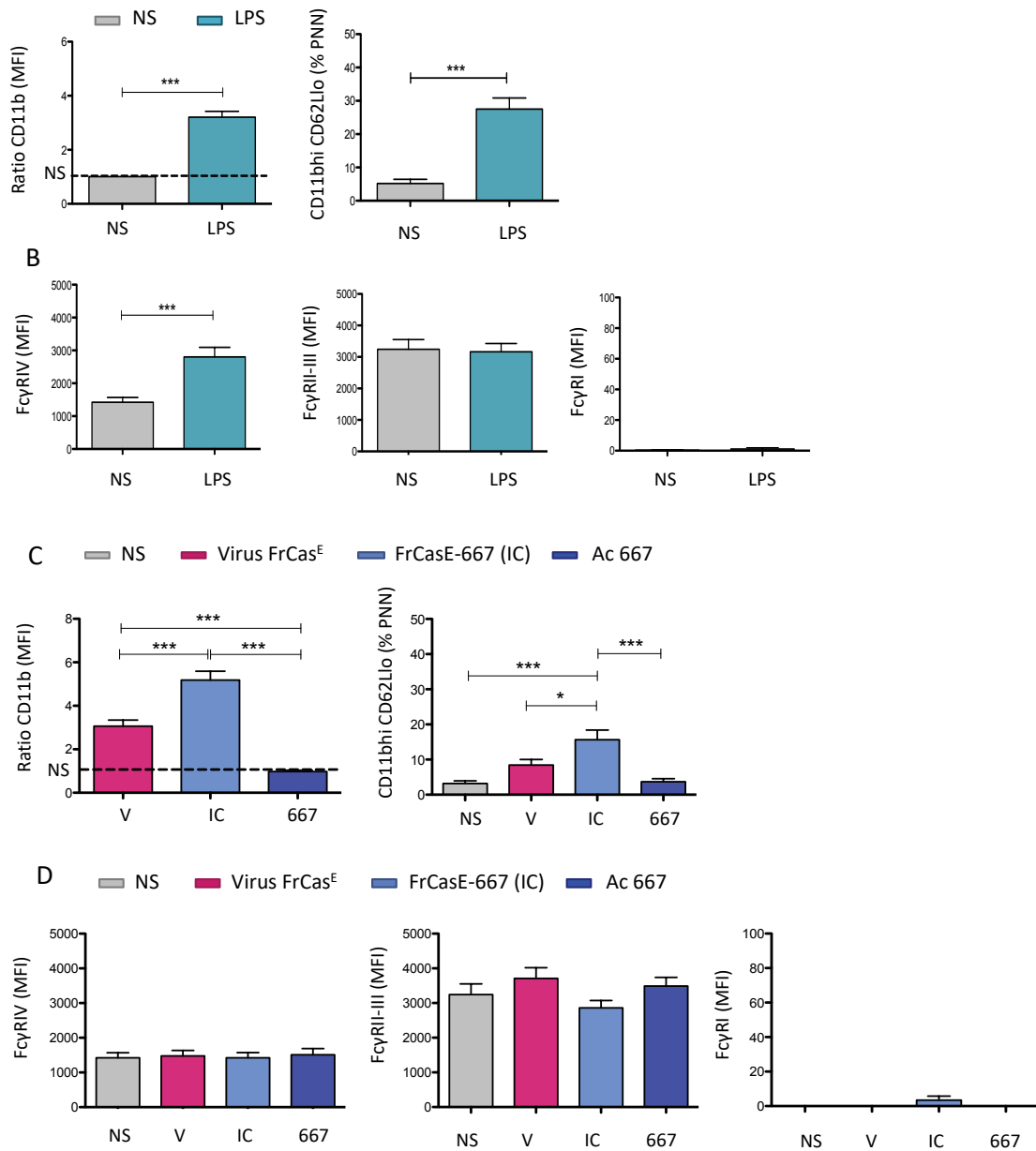


Figure 21 : Étude de l'activation phénotypique des neutrophiles (PNN) par l'analyse des marqueurs de surface

Effet d'un stimulus bactérien (LPS) sur l'expression des marqueurs d'activation des neutrophiles (A) et sur l'expression des FcγRs (B). De la même façon effet de stimuli viraux, virus FrCas^E seul (V) ou associé à l'AcM 667 (IC) et l'AcM 667 seul, sur les marqueurs d'activation (C) et de l'expression des FcγRs (D). Les résultats représentent 19 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un t test apparié (A et B) et un test paramétrique Anova avec correction de Bonferroni (C et D). (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001).

Enfin, l'expression du récepteur FcRn n'a pas été étudiée en raison de l'absence d'un anticorps efficace pour la cytométrie en flux lors de la réalisation de ces expériences.

D'autre part, dans le but de mieux comprendre le rôle des neutrophiles observé *in vivo* et de se rapprocher du contexte pathologique, j'ai stimulé les neutrophiles *in vitro* avec les différentes composantes de notre modèle pré-clinique décrit précédemment. A savoir le virus FrCas^E seul (V), et le virus sous forme d'IC (FrCas^E + AcM 667) et enfin l'AcM 667 seul. **(Figure 21C)** J'ai observé que l'AcM 667 seul, n'induit pas d'activation et reste à un niveau comparable à celui des neutrophiles NS.

Le virus seul, induit une activation comparable à celle du LPS, pour l'expression du CD11b, mais inférieure en ce qui concerne le pourcentage de neutrophiles CD11b^{hi} CD62L^{lo}. En revanche les IC induisent une activation significativement supérieure à celle observée avec le virus seul, au niveau de l'expression du marqueur CD11b, et du pourcentage de neutrophiles CD11b^{hi}CD62L^{lo}. Ces résultats montrent que l'activation des neutrophiles par les IC est encore plus efficace que la stimulation induite par le virus.

En ce qui concerne l'expression des FcγRs, je n'ai pas observé de différences significatives dans la modulation de leur expression suivant la stimulation par le virus, les IC ou le 667 **(Figure 21D)**. On observe ici une première différence entre une stimulation par un antigène d'origine bactérienne et un antigène d'origine virale, ce qui indique une modulation d'expression des FcγRs en fonction des stimuli.

II.2. L'activation phénotypique des neutrophiles par les IC *in vitro* est dépendante du fragment Fc.

J'ai pu établir que les neutrophiles sont plus efficacement activés par les IC comparé au virus seul. De plus les travaux précédents de l'équipe ont montré que le potentiel thérapeutique de l'AcM 667 était Fc et isotype dépendant. De la même façon j'ai donc évalué si l'activation des neutrophiles induite par les IC *in vitro*, était dépendante du fragment Fc de l'AcM 667.

Pour cela les mêmes expériences mentionnées ci-dessus ont été réalisées en présence d'anticorps bloquant les principaux FcγRs exprimés à la surface des neutrophiles. L'AcM 9E9 permettant le blocage du FcγRIV et l'AcM 2.4G2 pour bloquer le FcγRIII et le FcγRIIB (cf Matériels et Méthodes).

Tout d'abord j'ai vérifié l'efficacité du blocage en mesurant l'expression des FcγRs par cytométrie en flux. Le 9E9 bloque efficacement le FcγRIV, le 2.4G2 bloque efficacement les FcγRII/FcγRIII. On note que le blocage des principaux FcγRs, n'a pas entraîné de modulation significative dans l'expression du FcγRI, seul récepteur non bloqué, mais dont l'expression n'est pas constitutive, mais inductible. **(Annexe 2)**.

On constate aussi que le blocage des principaux FcγRs des neutrophiles, diminue de façon significative l'activation induite par les IC, tant sur l'expression de CD11b que sur le pourcentage de cellules CD11b^{hi} CD62L^{lo}. En ce qui concerne l'activation des neutrophiles par le virus, même si une diminution de l'activation en présence des AcM 9E9 et 2.4G2 est aussi observée, celle-ci n'est pas significative. L'efficacité de l'activation phénotypique des neutrophiles par les IC est donc dépendante du fragment Fc. **(Figure 22)**.

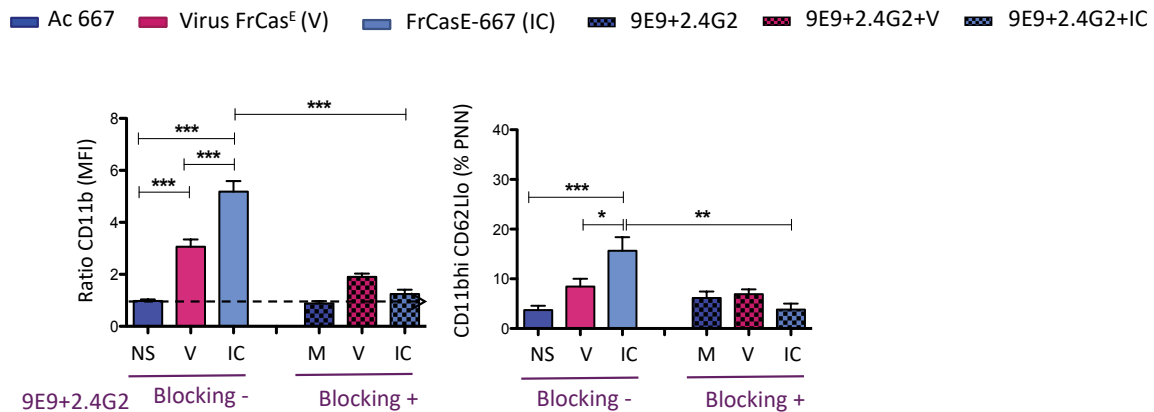


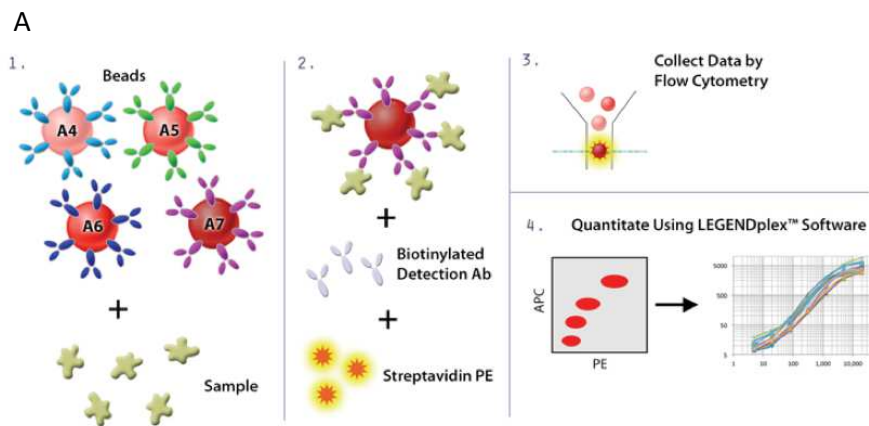
Figure 22 : Effet du blocage des FcγRs sur l'activation des neutrophiles les exprimant.

Effet du blocage des FcγRIV (9E9), FcγRIII et FcγRIIB (2.4G2) sur l'activation des neutrophiles, par l'évaluation des marqueurs d'activation de surface (CD11b, CD62L) sur les neutrophiles non stimulés, dans du milieu de culture (M), ou suite à une stimulation des neutrophiles par le virus FrCas^E seul (V) et le virus associé à l'AcM 667 (IC). Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

II.3. Activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC *in vitro*.

Les IC potentialisent l'activation des neutrophiles, comparé au virus seul, au niveau des marqueurs de surface. Ces paramètres sont importants pour mesurer l'intensité de l'activation, ils nous apportent une information quantitative mais ne nous apportent aucune information d'un point de vue qualitatif. Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension du rôle immunomodulateur des neutrophiles activés par les IC *in vitro*, j'ai également établi un profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique à partir du surnageant de culture des neutrophiles dans les différentes conditions de stimulations. En effet, les chimiokines sont principalement décrites pour leur rôle chimiotactique, c'est à dire leur capacité à attirer les cellules du système immunitaire ainsi qu'à moduler leur état d'activation. Les cytokines quant à elles, sont impliquées dans la communication cellulaire, et peuvent avoir un rôle dans la signalisation et l'activation des cellules immunitaires. De plus ce type d'analyse qui vise à établir un large profil de sécrétion dans un contexte d'infection virale n'est que peu, voire pas représenté dans la littérature et ne l'est pas du tout en ce qui concerne un contexte d'immunothérapie antivirale. Pour ce faire, j'ai utilisé une approche multiparamétrique de type CBA (cytometric bead array), avec des kits commerciaux pouvant quantifier jusqu'à 13 entités différentes (références et procédures décrites dans matériels et méthodes et **Figure 23**) à partir d'un faible volume de surnageant, ce qui dans notre cas était indispensable, car les neutrophiles ont été cultivés en plaques de 96 puits et donc dans un faible volume. L'utilisation de deux kits m'a permis de quantifier la production de 13 chimiokines et 12 cytokines différentes.

Brièvement, le principe consiste à incuber le surnageant de culture avec des billes auxquelles sont pré-fixés des anticorps spécifiques pour chaque cytokine ou chimiokine. Le mélange est ensuite incubé avec un premier anticorps biotinyllé puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Grâce à la différence de taille des billes et à la différence d'intensité de fluorescence, les 13 entités peuvent être discernées par cytométrie en flux. Un programme informatique traduit ensuite la MFI en concentration en pg/ml. (**Figure 23**)



LegendPlex-BioLegend (<https://www.biolegend.com/legendplex>)

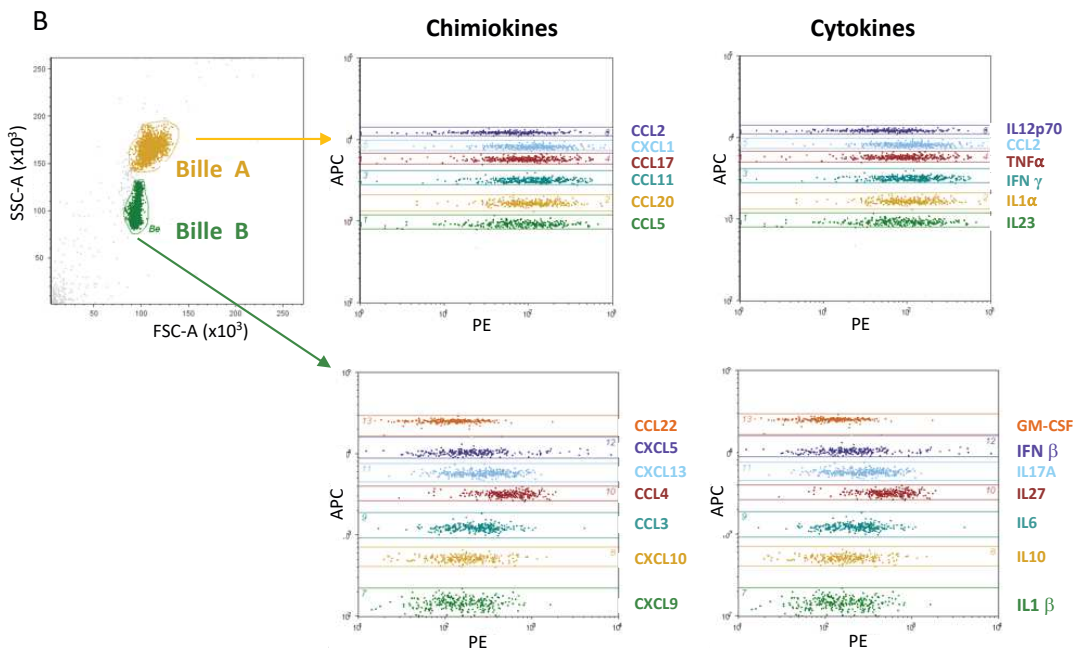


Figure 23 : Méthode de quantification du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique par l'utilisation du Kit LegendPlex™

(A1). Les surnageants de culture sont incubés avec des billes de tailles et d'intensités de fluorescence différentes, conjuguées à des anticorps spécifiques de chaque entités (cytokines ou chimiokines) des panels testés. (A2) Puis ce complexe est incubé avec des anticorps spécifique de chaque entité, couplé à de la biotine, réalisant un sandwich. Le sandwich est révélé par l'ajout de stréptavidine couplée au fluorochrome PE (A3) par cytométrie en flux (A4). (B) La différence de taille des billes et l'intensité de fluorescence permettent de discriminer les 13 entités du panel de chimiokines et du panel de cytokines testés dans cette étude.

Comme pour les marqueurs de surface j'ai d'abord établi le profil de sécrétion basal des neutrophiles, avec la condition NS (contrôle négatif) et je l'ai comparé à celui des neutrophiles stimulés avec le LPS, qui est notre témoin d'activation (antigène bactérien) (Naegelen et al., 2015) (Figure 24A).

On observe que les neutrophiles NS ne produisent pas de chimiokines à des niveaux détectables. En revanche le LPS induit une augmentation significative de la sécrétion de chimiokines appartenant à la même famille CCL3 (18 pg/ml en moyenne) et CCL4 (30 pg/ml en moyenne), impliquées dans le recrutement de monocyte/macrophage et des cellules NK dans un contexte d'inflammation aiguë. On constate également une légère induction de CCL5, impliquée dans le recrutement de monocytes, des NK et des lymphocytes T mais celle-ci est non significative.

En parallèle j'ai établi le profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles stimulés par le virus FrCas^E ou les IC (FrCas^{E+} 667). (**Figure 24B**)

Tout d'abord, il est intéressant de constater que le profil est distinct de celui induit par le LPS, ce qui montre qu'il n'y a pas un profil d'activation type, mais bien une réponse précise à un stimulus spécifique. En effet, l'activation par le virus et les IC induit la sécrétion de CCL3 et de CCL4 à des niveaux comparables au LPS, mais également de nombreuses autres chimiokines, dont certaines à des niveaux bien supérieurs.

Certaines chimiokines sont en effet sécrétées à de fortes concentrations (supérieures à 150 pg/ml) après stimulation par le virus ou les IC. C'est le cas de (i) CCL2 (400 pg/ml en moyenne), impliquée dans le recrutement des monocytes (Deshmane et al., 2009), (ii) de CXCL1 (350 pg/ml en moyenne) et (iii) de CXCL5 (150 pg/ml en moyenne) reconnues par le même récepteur CXCR2 et impliquées dans le recrutement des neutrophiles eux-mêmes et dans leur activation par l'induction de la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS :Reactive oxygen species) (Mei et al., 2010; Sawant et al., 2016).

On trouve également CCL22 produite à une faible concentration (7pg/ml +/- en moyenne), qui a principalement un rôle dans le recrutement des lymphocytes T effecteurs mais peut aussi aider au recrutement des monocytes, des cellules dendritiques et des cellules NK.

De façon surprenante, peu de différences sont observées entre les stimulations par le virus et les IC. En effet aux vues des résultats des marqueurs de surface qui montraient clairement la supériorité de l'activation par les IC, on aurait pu s'attendre à observer également des différences tant en termes d'intensité que de nature des chimiokines sécrétées. Or on constate que la nature du profil est identique, à savoir que les chimiokines produites suite à une stimulation par le virus sont aussi celles produites suite une stimulation par les IC. La seule différence observée est au niveau de CCL4 où on observe comme pour les marqueurs de surface, une sécrétion significativement plus importante par les IC comparé au virus.

Un profil cytokinique a également été établi (**Figure 24C**). Tout comme pour les chimiokines les neutrophiles NS ne produisent pas de cytokines, au contraire de ceux stimulés par le LPS, qui sécrètent des cytokines inflammatoires telles que TNF α (90 pg/ml en moyenne) et IL6 (80 pg/ml en moyenne), ainsi que IL1 β (5 pg/ml en moyenne) médiateur de la réponse inflammatoire (Rider et al., 2011). Plus surprenant on constate aussi une faible sécrétion d'IL10 (10 pg/ml en moyenne), cytokine anti-inflammatoire par excellence, qui peut être aussi impliquée dans la réponse humorale (Ng et al., 2013b).

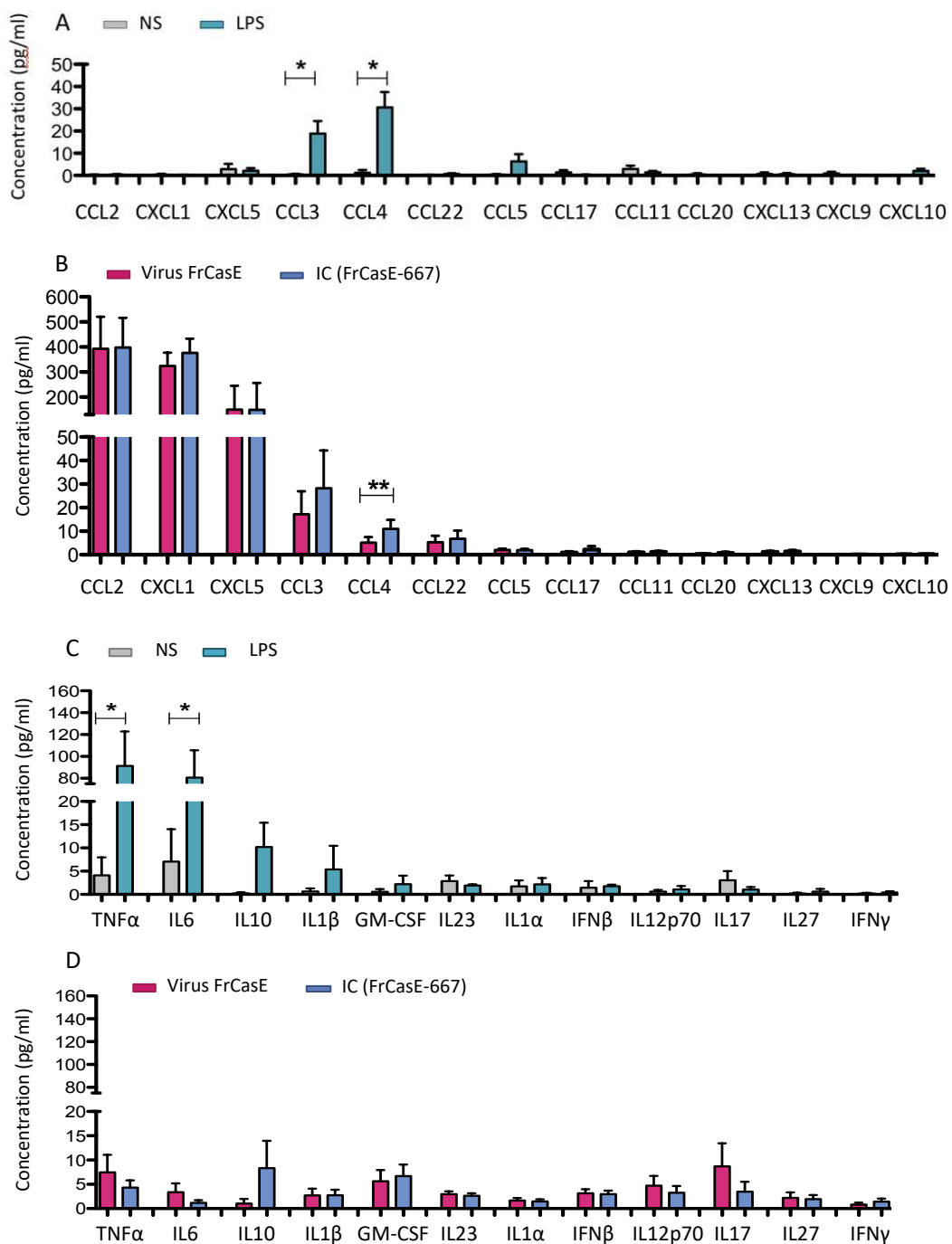


Figure 24 : Profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles stimulés *in vitro*

(A). Profil de sécrétion chimiokinique (A) et cytokinique (C) induit par les neutrophiles stimulés par un stimulus bactérien (LPS en vert), comparé au profil contrôle où les neutrophiles n'ont pas été stimulés. (NS en gris). (B) Profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique (D) induit par les neutrophiles stimulés par des stimuli viraux, virus FrCas^E (rouge) et IC (bleu). Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ESM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un t test apparié. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Comme pour les chimiokines, le profil de sécrétion cytokinique induit par la stimulation par le LPS est différent de celui induit par les déterminants viraux (**Figure 24D**). En effet la stimulation par le virus et les IC induit une faible sécrétion de cytokines, comparable à celle produite par les neutrophiles non stimulés ou à la limite du seuil de détection, y compris pour les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (en moyenne 6 pg/ml pour le virus et 4 pg/ml pour les IC) et IL6, pourtant fortement sécrétées suite à la stimulation par le LPS. On détecte également d'autres cytokines, non sécrétées suite à la stimulation par le LPS, telles que l'IL17A principalement sécrétée suite à la stimulation par le virus (8 pg/ml) et sécrétée dans des contextes d'auto-immunité (Grund et al., 2017) et d'infections par *Candida albicans* ou des bactéries (Conti and Gaffen, 2010; Ye et al., 2001) ou le GM-CSF sécrété suite à la stimulation par le virus et les IC (6 pg/ml en moyenne). De plus, aucune différence significative n'est observée entre le profil cytokinique dû à la stimulation par le virus comparé à celui induit par la stimulation par les IC.

Tout comme il a été fait pour les marqueurs de surface, j'ai également examiné l'effet du blocage des Fc γ Rs exprimés par les neutrophiles sur leur activation fonctionnelle. J'ai constaté que le blocage des Fc γ Rs, entraînait une diminution significative de la sécrétion de CCL4, de façon cohérente avec la potentialisation de la sécrétion de cette cytokine par les IC (**Figure 25**).

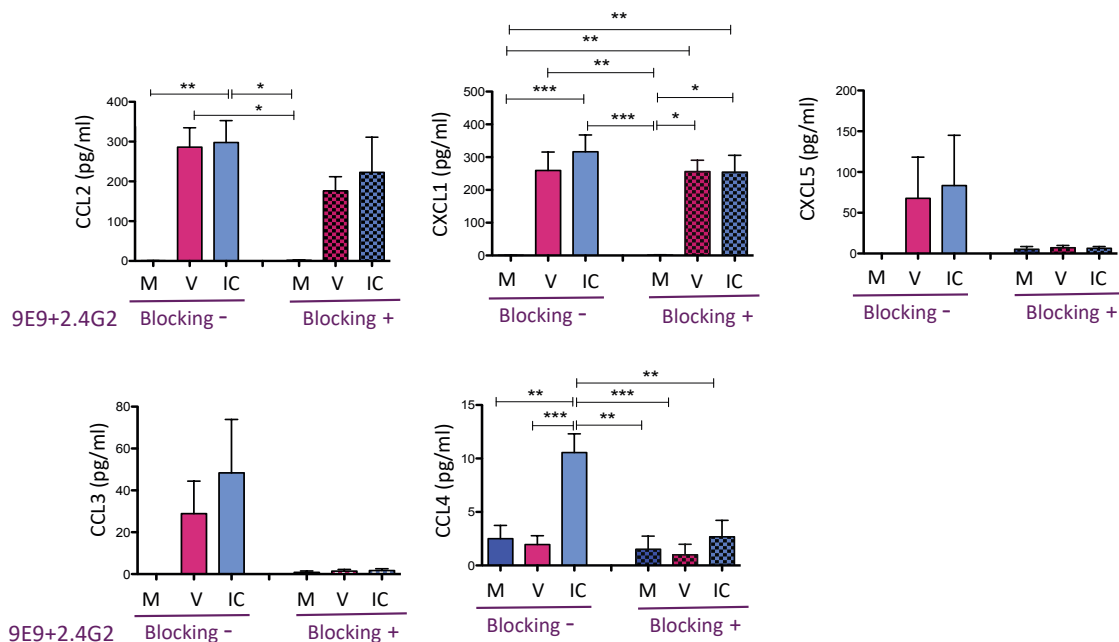


Figure 25 : Effet du blocage des Fc γ Rs sur le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles activés par des stimuli viraux.

Les neutrophiles ont été purifiés et stimulés par des déterminants viraux comme décrit précédemment (Figure 20). Les Fc γ Rs des neutrophiles ont été bloqués ou non avant la stimulation des neutrophiles par le virus FrCas^E (rouge) ou les IC (bleu). Puis la sécrétion de chimiokines et de cytokines a été quantifiée à partir du surnageant de culture prélevé 20h après la stimulation. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

J'ai aussi observé une diminution importante de la sécrétion de CCL3 et de CXCL5 stimulé par les IC, mais de façon non significative en raison de la variabilité expérimentale. Étonnamment, on remarque que le blocage des Fc γ Rs, affecte également la sécrétion de ces deux chimiokines,

suite à la stimulation par le virus, mais pour le moment les raisons de cet effet restent à être élucidées. En revanche les chimiokines fortement exprimées suite à la stimulation par le virus et les IC (CCL2 et CXCL1), ne sont pas diminuées significativement par le blocage des FcγRs ce qui est aussi le cas pour la sécrétion de cytokines, déjà faiblement sécrétées en absence du blocage.

En résumé, cette approche multiparamétrique m'a permis d'obtenir une vue d'ensemble de la sécrétion de chimiokines et de cytokines inflammatoires par les neutrophiles, ce qui n'est pas beaucoup représenté dans la littérature puisque les publications se concentrent souvent sur le rôle d'un type de chimiokines ou de cytokines. Ceci est d'autant plus vrai dans un contexte d'infection viral. En effet si l'activation des neutrophiles par une infection d'origine bactérienne ou parasitaire est bien documentée dans la littérature, que ce soit en termes de fonctions effectrices ou de sécrétions cytokinique et chimiokinique, elle est beaucoup moins en ce qui concerne le profil de sécrétion induit par un antigène viral.

D'autre part, les résultats montrent qu'il n'y a pas un profil type d'activation des neutrophiles. En effet on constate que les neutrophiles arborent deux profils totalement différents selon si les neutrophiles sont stimulés par un antigène bactérien ou antigène viral, seules quelques chimiokines (CCL3, CCL4) et cytokines (TNFα, IL10), sont communes aux deux types de stimulations. En réponse au LPS les neutrophiles ne produisent qu'une faible quantité de chimiokines, et une forte quantité de cytokines pro-inflammatoires, alors qu'à l'inverse, en réponse aux virus ou aux IC, les neutrophiles produisent une pléiade de chimiokines et quasiment peu ou pas de cytokines (**Figure 24**). Ceci démontre l'importance de la nature des stimuli, qui en fonction de leurs origines (virale *versus* bactérienne) peuvent activer différemment les neutrophiles.

De plus les profils de sécrétion observés nous permettent de formuler des hypothèses sur l'identité des premiers partenaires des neutrophiles lorsqu'ils sont confrontés à un agent infectieux (**Figure 26**).

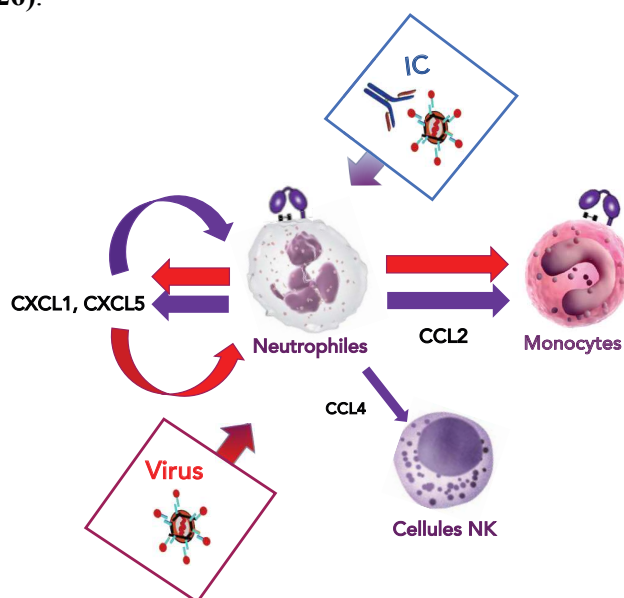


Figure 26 : Schéma bilan de la production de chimiokines par les neutrophiles stimulés *in vitro* par les IC (flèche violette) et les virus (flèche rouge) et impact sur le recrutement d'autres cellules immunitaires.

J'ai pu constater que certaines molécules (notamment CCL3, CCL4) ne sont pas spécifiques d'un type d'agent infectieux en particulier, mais sont produites en faible quantité. Ces molécules visent au recrutement de diverses cellules immunitaires dont les neutrophiles, monocytes, macrophages ou cellules NK. En revanche, ce qui est d'autant plus intéressant, c'est que les neutrophiles confrontés à un stimulus viral (seul ou sous forme d'IC) sécrètent de façon massive et spécifique des molécules chimio-attractantes pour les neutrophiles eux-mêmes et pour les monocytes (CCL2, CXCL1, CXCL5), suggérant un éventuel rôle de la coopération entre neutrophiles et monocytes dans la lutte contre une infection virale (**Figure 26**). Néanmoins contrairement à l'activation phénotypique, dominée par la stimulation par les IC, seule la chimiokine CCL4 est potentialisée par les IC, comparé à la stimulation par le virus, parmi le panel de chimiokines sécrétées. De plus cet effet potentialisateur des IC est, toute comme pour l'activation phénotypique, dépendante du fragment Fc de l'anticorps.

Ces résultats renforcent le concept que les neutrophiles sont des acteurs clés et complexes de la réponse immunitaire qui régulent finement leur réponse en fonction des différents contextes pathologiques. Ils montrent également que les IC formés lors de l'immunothérapie peuvent renforcer les propriétés immunomodulatrices des neutrophiles.

II.4. Potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC dans des conditions inflammatoires et/ou immunomodulatrice *in vitro*.

Les approches *in vitro* ci-dessus présentées, bien qu'utiles à une meilleure compréhension des mécanismes car elles nous permettent de mieux maîtriser les éléments testés (en l'occurrence le rôle spécifique des IC dans l'activation des neutrophiles), ne récapitulent pas les conditions inflammatoires propres au contexte pathologique *in vivo*. L'activation des neutrophiles *in vitro* par les IC, représentent davantage une vision des événements qui peuvent avoir lieu *in vivo* dans le cadre du premier contact de la cellule avec les IC (contexte d'immunothérapie par AcM) ou le virus (contexte infectieux). Cette approche illustre une réponse très précoce, privée de l'environnement inflammatoire extrêmement dense *in vivo*, tant en termes de facteurs solubles, que de cellules immunitaires présentes sur le site de l'inflammation.

Dans le but de se rapprocher des conditions inflammatoires *in vivo* et afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'activation des neutrophiles par les IC, j'ai réalisé des expériences *in vitro* similaires à celles présentées dans les résultats précédents en rajoutant aux différentes conditions de stimulations des facteurs solubles inflammatoires et/ou immunomodulateurs, à savoir le TNF α , l'IFN γ et l'IFN-I. (**Figure 27**).

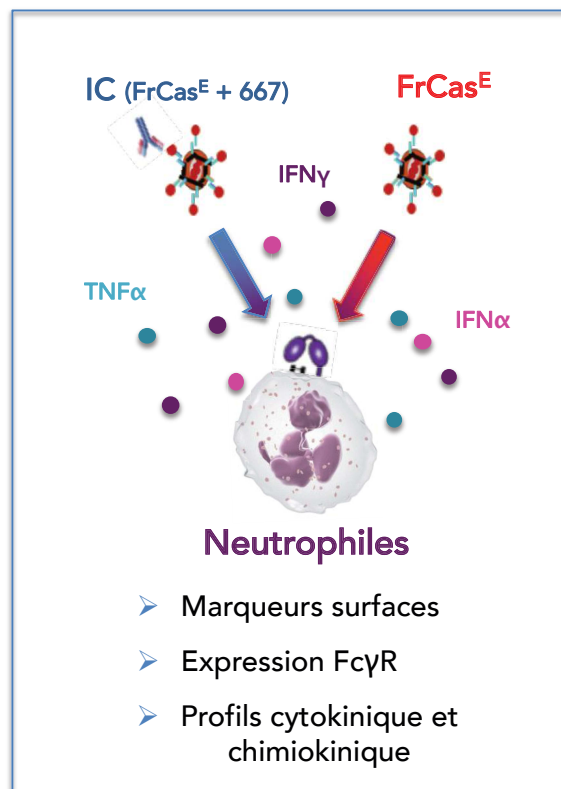


Figure 27 : Schéma expérimental de l'activation des neutrophiles *in vitro* par des stimuli viraux associés à des cytokines inflammatoires et/ou immunomodulatrices.

Les neutrophiles purifiés issus de la moelle osseuse ont été activés par des stimuli viraux seuls (FrCas^E ou IC) ou associés à des cytokines inflammatoires (IFN γ et TNF α) et/ou immunomodulatrice (IFN α). L'activation est mesurée par les marqueurs d'activation de surface (CD11b, CD62L), l'expression des Fc γ Rs ainsi que par le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique à partir du surnageant de culture de chaque condition de stimulation en utilisant une approche multiparamétrique LegendPlex.

II.4.1. Effet du TNF α sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par des IC *in vitro*

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire principalement rencontrée dans le cas d'une inflammation aussi bien aiguë que chronique. *In vivo* il peut être sécrété par des leucocytes mais également par d'autres types cellulaires (endothélium) suite à une infection ou à une lésion tissulaire. (Ranta et al, 1999)

Les résultats d'activation des neutrophiles *in vitro* ci-dessus présentés ont montré qu'une stimulation par le LPS induisait une forte production de TNF α , alors qu'une stimulation par le virus ou les IC n'induisait qu'une très faible sécrétion de cette cytokine. En revanche l'effet du TNF α sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC n'est pas connu. J'ai donc par la suite réalisé des expériences *in vitro* pour répondre à cette question.

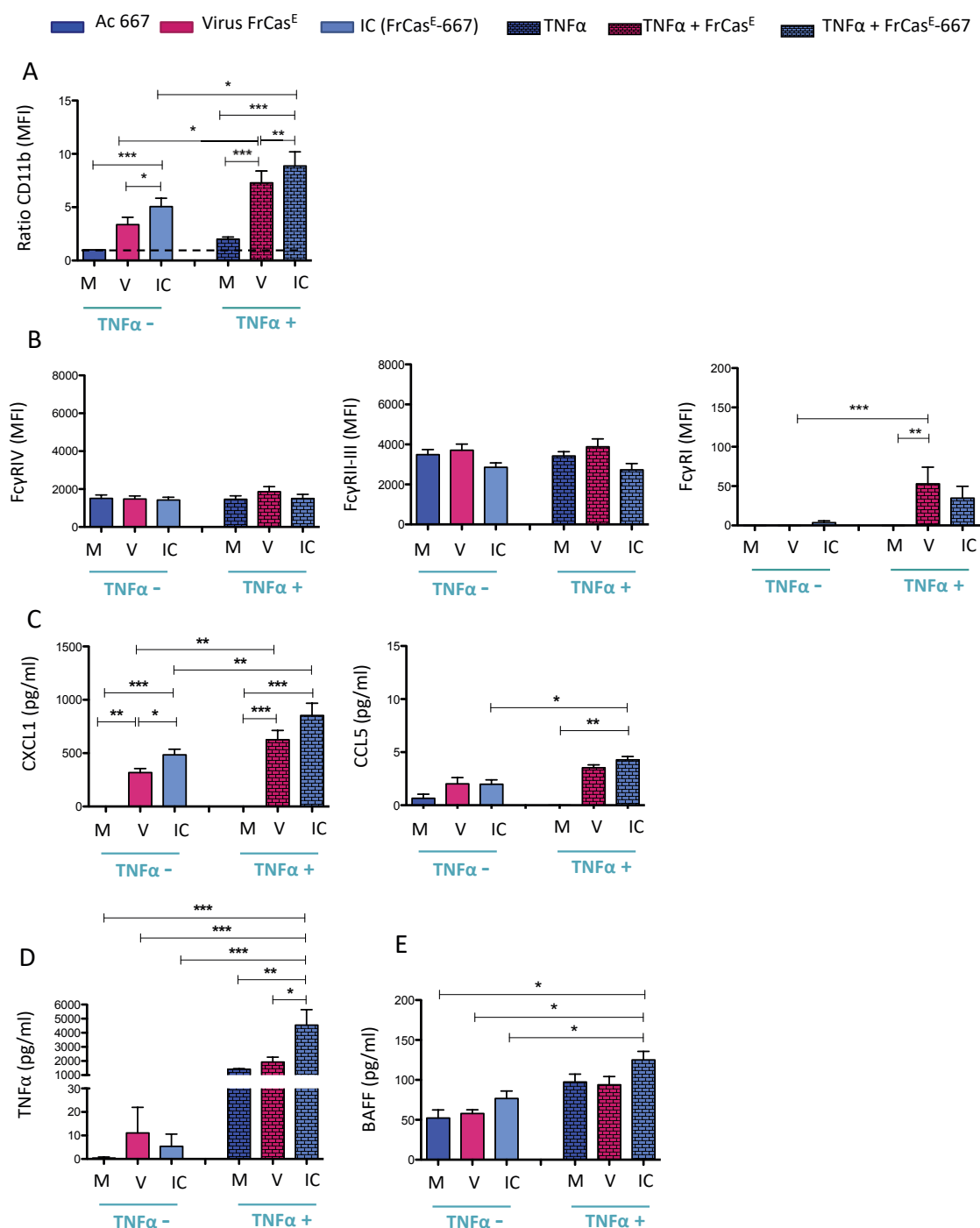
En ce qui concerne l'activation phénotypique des neutrophiles après co-stimulation par le TNF α et le virus ou les IC, j'ai analysé l'expression du marqueur de surface CD11b (**Figure 28A**). Les résultats montrent que le TNF α seul n'induit pas l'activation de neutrophiles, l'expression

de CD11b étant comparable à celle des conditions NS. A contrario, lorsqu'il est associé au virus ou aux IC, l'expression de CD11b est significativement augmentée comparée au TNF α seul. De plus, l'expression du CD11b induite par le TNF α associé au virus ou aux IC est significativement supérieure à celle induite par les virus ou les IC seuls, respectivement. Ceci montre donc que la co-stimulation avec le TNF α potentialise l'activation des neutrophiles par ces 2 types de stimuli. Cependant, il est intéressant de constater que la co-stimulation par le TNF α et les IC active les neutrophiles de façon significativement supérieure à la co-stimulation par le TNF α et le virus.

J'ai ensuite étudié l'influence du TNF α sur l'expression des Fc γ Rs, dans les conditions de stimulations par le virus et les IC, en me basant sur la littérature qui décrit que des cytokines pro-inflammatoires peuvent moduler l'expression des Fc γ Rs (Shen et al., 1987)(Shi et al., 2015) (Mantovani et al, 2011) (**Figure 28B**). Aucune modification de l'expression du Fc γ RIV ou des Fc γ RII-III n'est observée, les valeurs obtenues lors de la co-stimulation par le TNF α + Virus et par le TNF α +IC restant identiques à celles obtenues après stimulations par les virus et les IC, respectivement. Une légère induction du Fc γ RI est remarquée dans les conditions de co-stimulation TNF α +Virus mais même si cette induction est significative, elle reste discutable au vu des faibles valeurs de MFI.

L'autre objectif était d'observer l'effet du TNF α sur le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles *in vitro* en le comparant aux profils établis précédemment, dans les conditions de stimulations par le virus et IC seuls (**Figure 24B et 24D**).

J'ai constaté que l'ajout de TNF α permettait de renforcer l'action des IC en augmentant significativement la sécrétion de certaines chimiokines telles que CXCL1 et CCL5 (**Figure 28C**). Pour ce qui est des cytokines, seul le TNF α présente une différence significative (**Figure 28D**). En effet, de façon surprenante même si la même quantité de TNF α a été ajoutée dans chaque condition expérimentale, on détecte une concentration plus élevée de TNF α dans les conditions de co-stimulation TNF α et IC comparé aux autres conditions (TNF α seul ou en combinaison avec du virus). Ceci suggère que la double stimulation IC et TNF α entraîne un effet autocrine du TNF α par les neutrophiles.



En ce qui concerne les autres chimiokines et cytokines détectables, aucune différence significative de sécrétion associée à la présence de TNF α dans les différentes conditions d'activation n'a été détectée. Pour des raisons de clarté, les taux de sécrétions de ces cytokines et chimiokines ne sont pas discutés mais ils sont présentés en **Annexe 3**.

Enfin, ayant montré dans nos expériences *in vivo* que lors de l'immunothérapie par AcM les neutrophiles acquièrent des fonctions « B-helper » (Parsa et al., 2016; Puga et al., 2011), notamment la capacité de sécréter des cytokines impliquées dans la réponse B telle que BAFF (Naranjo-Gomez et al., 2018), j'ai aussi évalué si l'activation des neutrophiles par différents stimuli en présence de TNF α avait un impact sur la sécrétion de BAFF. Pour cela, j'ai réalisé un ELISA afin de quantifier BAFF dans le surnageant de neutrophiles activés *in vitro*. J'ai observé que le TNF α favorisait l'action des IC en augmentant significativement la sécrétion de BAFF. Ces résultats suggèrent un potentiel rôle du TNF α dans l'induction de la réponse humorale endogène suite à une immunothérapie antivirale par AcM et apportent des informations complémentaires pour la compréhension du rôle immunomodulateur des neutrophiles.

En sommes, le TNF α permet d'augmenter significativement l'activation induite par les IC tant au niveau phénotypique (sur-expression du marqueur de surface, CD11b) que fonctionnel avec la sécrétion de chimiokines (CXCL1, CCL5) et de cytokines (TNF α , BAFF). Ainsi le TNF α potentialise l'activation des neutrophiles induite par les IC.

II.4.2. Effet du IFN γ sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC *in vitro*

L'IFN γ , est le seul IFN de type II. C'est une cytokine clé dans la réponse immunitaire contre les infections. Il a notamment un puissant effet antiviral, car il peut limiter la réplication virale et moduler la réponse immune.

Au niveau de l'activation phénotypique, l'IFN γ seul ou ajouté au virus n'induit pas de changements significatifs d'activation comparé aux conditions non stimulé (M) et virus seul, respectivement. En revanche, il permet d'augmenter significativement l'expression de CD11b lorsqu'il est couplé à une stimulation par les IC, comparé aux IC seuls. (**Figure 29A**).

Comme pour le TNF α j'ai étudié l'effet de l'IFN γ sur la modulation des Fc γ Rs. J'ai pu constater que l'ajout d'IFN γ permettait d'augmenter significativement l'expression du Fc γ RIV, comme décrit dans la littérature (Chauhan et al., 2017), quelque soient les conditions de stimulations (667, V et IC). (**Figure 29B**). On constate également l'absence d'effet de la co-stimulation par l'IFN γ et le virus ou les IC sur l'expression du Fc γ RII-III, bien qu'une diminution significative de l'expression de ce Fc γ R soit observée en présence IFN γ par rapport au condition M. Aucune différence significative n'est observée pour l'expression du Fc γ RI, dont l'expression est quasi nulle. Ainsi la modulation de l'expression du Fc γ RIV est liée à la présence de l'IFN γ .

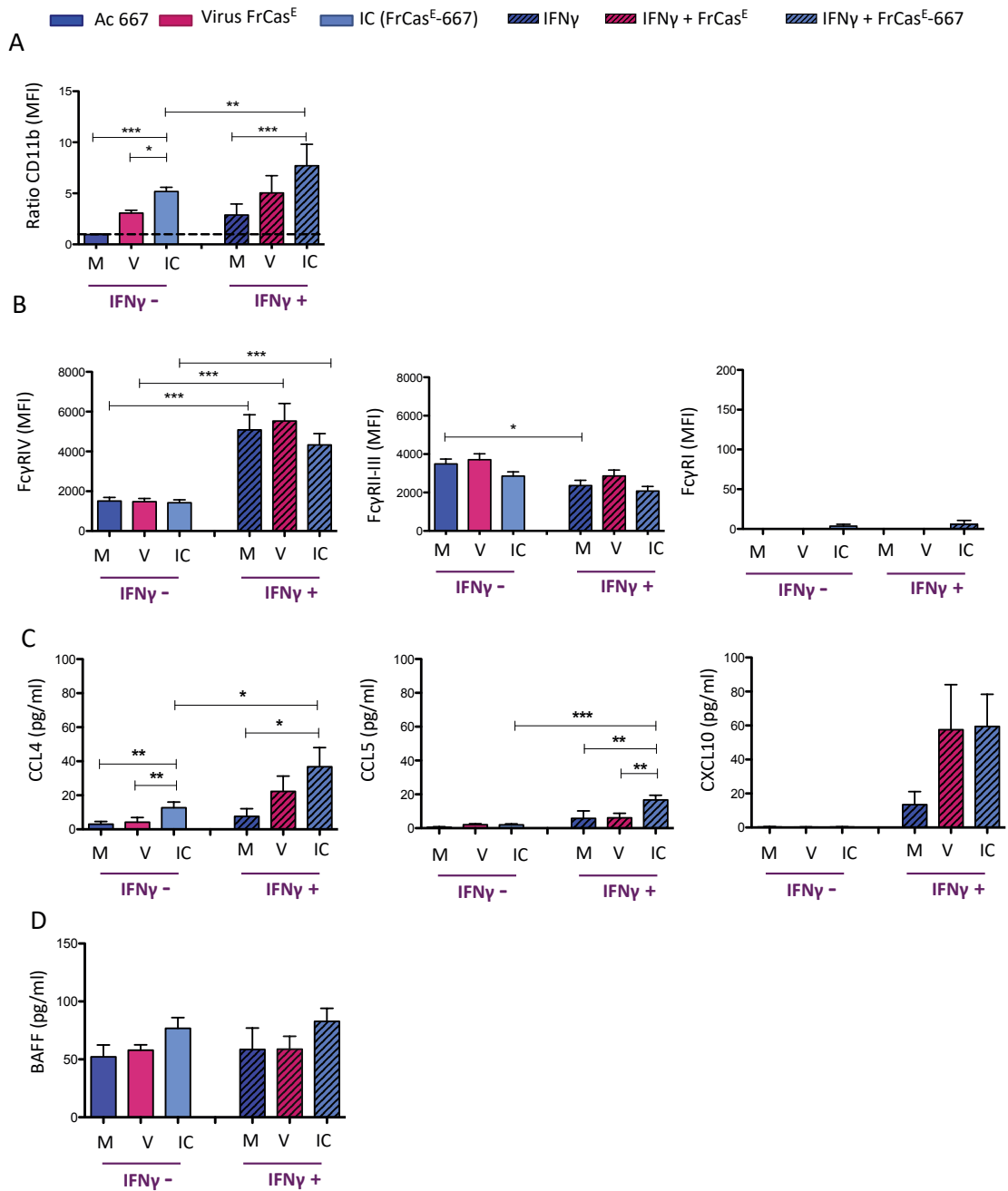


Figure 29: Effet de l'IFN γ sur l'activation des neutrophiles stimulés par des antigènes viraux.

L'activation des neutrophiles a été mesurée par le ratio de l'expression du marqueur d'activation de surface CD11b (A), par rapport aux conditions contrôles M (Milieu), par l'expression des Fc γ R (B) ainsi que par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique par l'approche LegendPlex (C) et l'évaluation de la production de la cytokine BAFF par ELISA (D). Les résultats représentent 14 expérimentations indépendantes (A et B) et 4 expérimentations indépendantes (C et D) et sont exprimés en Moyenne $\pm$ EtM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

J'ai ensuite examiné l'effet de l'IFN γ sur le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles, dans les différentes conditions de stimulations (**Figure 29C**). L'IFN γ potentialise la production de CCL4 et de CCL5 par les IC comparé aux IC seuls. Il induit également la sécrétion d'une chimiokine non produite dans les conditions de stimulations précédentes, CXCL10, (Soejima and Rollins, 2001), confirmant les données de la littérature qui la décrivent comme étant IFN-dépendante.

Pour des raisons de clarté, les autres cytokines et chimiokines produites mais ne présentant pas de différences de sécrétion entre les différentes conditions, en absence ou en présence d'IFN γ , ne sont pas discutées mais elles sont présentées en **Annexe 4**.

J'ai aussi évalué l'effet de l'IFN γ sur la capacité de sécrétion de BAFF par les neutrophiles. Malgré l'effet de cette cytokine sur leur activation, dans les conditions expérimentales utilisées, je n'ai pas observé d'effet de l'IFN γ sur la potentialisation de la production de BAFF par les neutrophiles, par rapport à la sécrétion déjà induite par les IC. (**Figure 29D**)

En résumé, l'IFN γ potentialise l'activation des neutrophiles induite par les IC, avec une augmentation significative de marqueurs de surface, tel que le CD11b et le Fc γ RIV, ainsi qu'une potentialisation de la sécrétion de CCL4, de CCL5 et l'induction de la sécrétion de CXCL10.

II.4.3. Effet du IFN-I sur la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC *in vitro*

La famille des IFN de type I, outre son effet sur la réplication antivirale, est aussi connue pour son action immunomodulatrice. De façon intéressante, des résultats non publiés de l'équipe réalisés dans notre modèle d'infection ont montré que des souris génétiquement invalidées pour le récepteur aux IFN-I (IFNARI-KO), ne sont pas protégées contre le développement de l'érythroleucémie par l'AcM thérapeutique. Cette absence de protection est associée au développement d'une réponse immune antivirale faible, suggérant l'effet immunomodulateur de l'IFN-I dans l'induction d'effets vaccinaux par l'immunothérapie. Au vu de ces résultats, j'ai donc étudié l'effet de l'IFN-I dans l'activation des neutrophiles. Pour cela, j'ai utilisé l'IFN α 11, sous-type d'IFN-I ayant une forte activité spécifique pour le récepteur commun aux différents IFN-I. Il est également capable de contrôler une infection rétrovirale par le virus de Friend (Gibbert et al., 2012)

Contrairement à la stimulation avec l'IFN γ , aucune modification significative de l'expression de CD11b n'a été observée suite à l'adjonction de l'IFN α 11, que ce soit pour la stimulation par le virus ou les IC. (**Figure 30A**).

En revanche, tout comme l'IFN γ , l'IFN α 11 module l'expression des Fc γ Rs. (**Figure 30B**). En particulier le Fc γ RIV, qui voit son expression augmenter significativement dans les conditions de co-stimulation entre l'IFN α 11 et le virus ou les IC. On constate également l'absence d'effet de la co-stimulation entre l'IFN α 11 et le virus ou les IC sur l'expression du Fc γ RII-III, bien qu'une diminution significative de l'expression de ce Fc γ R soit observée en présence IFN α 11+ IC par rapport à la condition non stimulé (M). L'expression du Fc γ RI est aussi affectée par la présence d'IFN α 11. En combinaison avec la stimulation par les IC, on observe une induction significative de l'induction du Fc γ RI. Néanmoins il est important de prendre en considération les faibles valeurs de MFI.

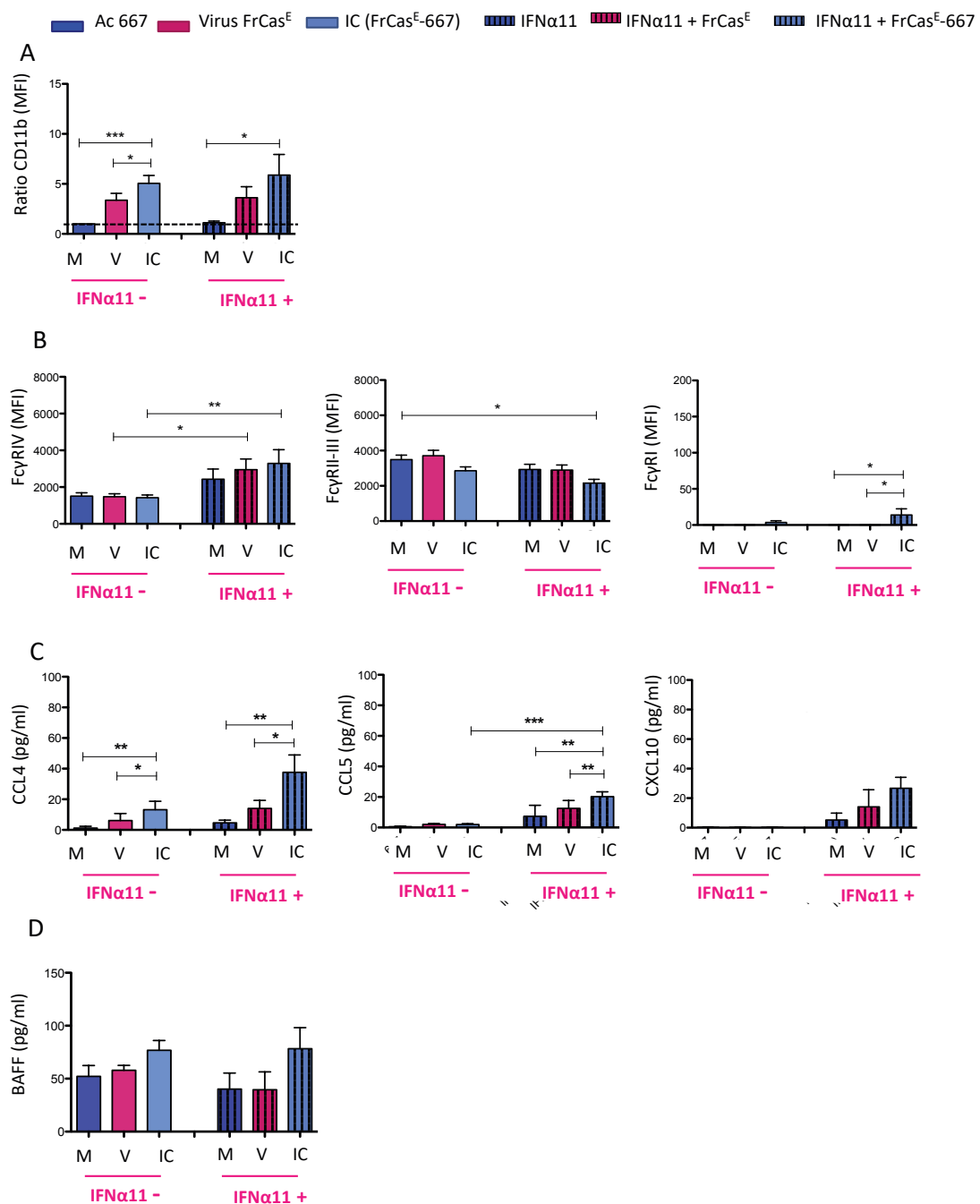


Figure 30 : Effet du IFNα11 sur l'activation des neutrophiles stimulés par des antigènes viraux. L'activation des neutrophiles a été mesurée par le ratio de l'expression du marqueur d'activation de surface CD11b, par rapport aux conditions contrôles M (Milieu) (A), par l'expression des FcγRs (B) ainsi que par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique par l'approche LegendPlex (C) et l'évaluation de la production de la cytokine BAFF par ELISA (D). Les résultats représentent 11 expérimentations indépendantes (A et B) et 4 expérimentations indépendantes (C et D) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

D'autre part l'IFN α 11 permet de renforcer significativement la sécrétion de CCL5, par les IC et d'induire significativement la sécrétion de CXCL10 comparé aux conditions de stimulations par le virus et les IC seuls. De plus cette sécrétion est significativement supérieure dans les conditions de co-stimulation entre l'IFN α 11 et les IC, comparé à l'IFN α 11 seul. (**Figure 30C**). Par ailleurs, la co-stimulation entre l'IFN α 11 et les IC induit une augmentation importante de la sécrétion de CCL4 (d'un facteur 2 en moyenne) comparé à l'activation par les IC seuls, bien que les différences ne soient pas significatives. Cependant, la co-stimulation IC+IFN α 11 induit une sécrétion de CCL4 significativement supérieure à la co-stimulation par le virus+l'IFN α 11.

Pour plus de clarté dans la lecture des résultats le reste du panel de cytokines et de chimiokines, dont l'ajout de l'IFN α 11 n'induisait pas de différences significatives de sécrétion, n'est pas discuté, mais leur taux de sécrétion est présenté en **Annexe 5**.

Enfin, l'étude de l'effet de l'IFN α 11 sur la capacité de sécrétion de BAFF par les neutrophiles a montré, de façon similaire à l'IFN γ , que dans les conditions expérimentales utilisées, cette cytokine ne permet pas de potentialiser significativement la production de BAFF par les neutrophiles stimulés par les IC ou le virus. (**Figure 30D**)

En résumé l'IFN α 11, induit une augmentation significative de l'expression du Fc γ RIV, ainsi qu'une potentialisation de l'activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC via l'augmentation de la sécrétion de CCL5 et de CXCL10. Les résultats suggèrent aussi un rôle potentiel de l'IFN α 11 sur la potentialisation de la sécrétion de CCL4 par les IC, bien que des expériences complémentaires devront être réalisées pour confirmer ou infirmer ces observations.

II.5. Bilan de la potentialisation de l'activation des neutrophiles par les IC *in vitro*.

L'ensemble des résultats ci-dessus présentés a montré que les neutrophiles sont des cellules pléiotropes, dont l'activation et notamment les profils de sécrétion chimiokinique et de cytokinique varient en fonction de l'origine des stimuli (bactérien versus viral).

D'autre part, en activant les neutrophiles avec les composantes de notre modèle expérimental, il est apparu que les neutrophiles étaient plus efficacement activés par les IC comparé au virus seul. Ceci est particulièrement marqué au niveau phénotypique, avec les marqueurs d'activation de surface, cependant au niveau fonctionnel les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique sont similaires entre stimulation par le virus ou les IC, excepté pour la chimiokine CCL4 qui est significativement plus sécrétée suite à la stimulation par les IC, et ceci de façon Fc-dépendante.

De plus l'adjonction de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IFN γ ou immunomodulatrice comme l'IFN α 11 permet une réelle potentialisation de l'activation induite par les IC sur les neutrophiles *in vitro*. Cette potentialisation est effective à plusieurs niveaux tant au niveau des marqueurs de surface, que du profil de sécrétion chimiokinique et varie en fonction du facteur inflammatoire ajouté.

Ainsi le TNF α potentialise l'activation induite par les IC via l'augmentation de la sécrétion de CXCL1 (favorisant le recrutement des neutrophiles) et de CCL5 (aidant au recrutement des NK, des monocytes ou des lymphocytes T). Il semble aussi agir de façon autocrine permettant une augmentation de sa propre production. Le TNF α permet également la potentialisation de la

sécrétion de BAFF par les IC, de façon cohérente avec nos résultats sur le rôle clé des neutrophiles dans la réponse humorale endogène suite à une immunothérapie par AcM (Naranjo-Gomez et al, 2018). Les deux types d'IFN quant à eux entraînent une augmentation significative de CCL5 (IFN γ , IFN α 11), de CCL4 (IFN γ), notamment impliqués dans le recrutement des monocytes, des NK et des DC. Ils permettent également l'induction de la sécrétion de CXCL10, elle aussi impliquée dans le recrutement de ces divers types cellulaires et y compris des lymphocytes T. (**Figure 31**)

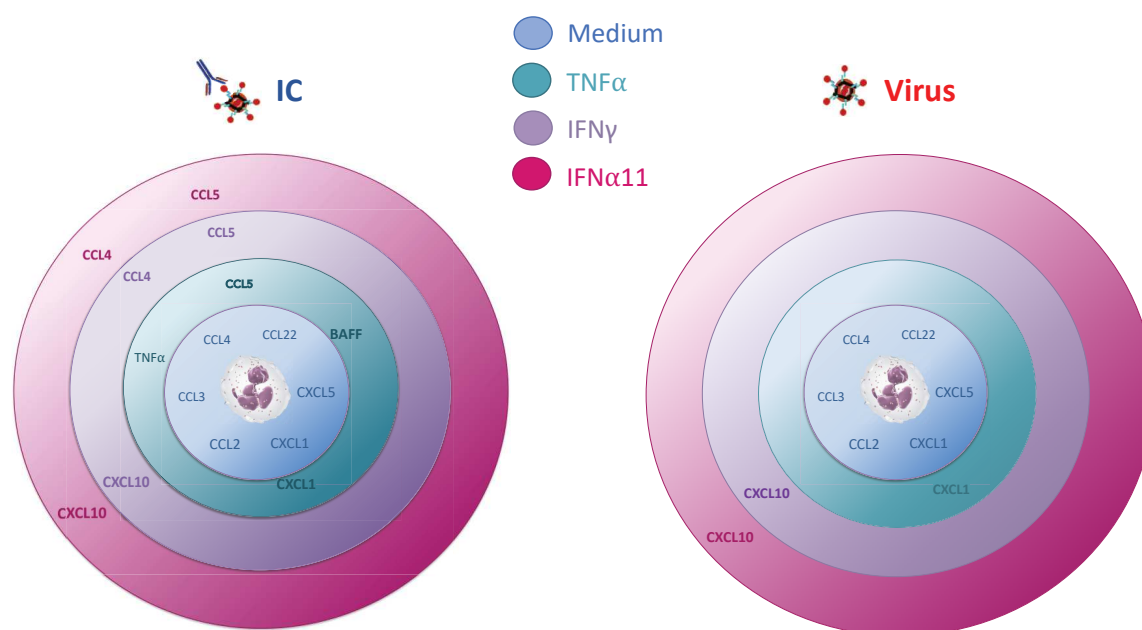


Figure 31 : Bilan de la potentialisation de l'activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC et le virus FrCas^E *in vitro*

Le cercle bleu représente la production de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles induites par la stimulation par les IC (gauche) et les virus (droite). La production de chimiokines et de cytokines par les IC et le virus est potentialisée ou induite par l'ajout de facteur inflammatoire le TNF α (cercle vert), l'IFN γ (cercle violet) et/ou immunomodulateur, IFN α 11 (cercle rose).

Ces résultats nous apportent des éléments dans la compréhension des mécanismes d'activation des neutrophiles *in vivo* par les IC mettant en évidence que des facteurs inflammatoires renforcent l'action des IC. Ils permettent notamment une meilleure activation des neutrophiles au niveau phénotypique, mais renforce également leur pouvoir immunomodulateur avec l'augmentation de la sécrétion de chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles eux-mêmes mais aussi d'autres cellules immunitaires comme les monocytes et les cellules NK, confirmant le rôle « orchestrateur » de la réponse immune des neutrophiles.

De plus, en ce qui concerne l'expression des Fc γ R, les résultats ont montré, que la présence de LPS et d'IFN pouvait moduler l'expression des Fc γ R, en particulier le Fc γ RIV. En effet, la stimulation par le virus ou les IC seuls n'a pas d'impact sur l'expression des différents Fc γ R, en revanche l'ajout d'IFN à ces conditions permet d'augmenter significativement l'expression du Fc γ RIV. Cette observation est particulièrement intéressante, car notre modèle expérimental constitue un contexte d'infection virale chronique, or il est connu que l'IFN est sécrété en réponse à une pathologie virale (Fensterl and Sen, 2009; Pichlmair and Reis e Sousa, 2007) et pourrait donc moduler l'expression des Fc γ R sur les neutrophiles *in vivo*. Dans ce contexte, il est important d'analyser l'expression des Fc γ R sur les neutrophiles dans les différentes

conditions de notre modèle expérimental d'infection rétrovirale traitée par immunothérapie par AcM. Il est aussi important d'étudier l'éventuelle modulation de l'expression des FcγRs sur différentes cellules du système immunitaire ainsi que les conséquences d'une telle modulation dans l'induction d'effets vaccinaux suite à une immunothérapie par AcM.

III. Modulation de l'expression des FcγRs dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM

Les résultats d'activation des neutrophiles par les IC *in vitro*, mentionnés ci-dessus, montrent qu'un contexte inflammatoire associé aux IC peut moduler l'expression des FcγRs. Néanmoins ces résultats restent restreints à un contexte *in vitro*, peu représentatif de la complexité du contexte pathologique *in vivo*. C'est pourquoi une étude de la modulation de l'expression des FcγRs dans ce contexte d'immunothérapie antivirale par AcM est nécessaire et constitue, un des objectifs de mes travaux de Thèse.

Les FcγRs ont déjà été répertoriés dans la littérature (Bournazos and Ravetch, 2017c; Bruhns and Jönsson, 2015; DiLillo and Ravetch, 2015a). Néanmoins ces répertoires ont été réalisés quasiment exclusivement sur des souches de souris conventionnelles de type C57BL/6 ou BALB/c. Or, notre modèle expérimental basé sur la souche 129/Sv/Ev, n'est que très peu, voire pas du tout représenté dans la littérature. A noter également que nous travaillons avec de jeunes animaux, et non pas des adultes comme c'est le cas des animaux présents dans ces répertoires, ce qui pourrait avoir une influence sur la maturité des cellules du système immunitaire et donc sur l'expression de certains marqueurs dont les FcγRs.

De surcroît ces répertoires de FcγR, bien qu'exhaustifs, ne tiennent pas compte de contextes pathologiques. En effet ils ont majoritairement été réalisés dans des conditions contrôles, négligeant ainsi l'impact d'une inflammation ou d'une infection sur l'expression des FcγRs. C'est pourquoi aux vues des résultats précédents (**Figures 28, 29, 30**) et du manque d'information dans la littérature, j'ai étudié la modulation de l'expression des différents FcγRs suivant l'infection et/ou l'immunothérapie (**Figure 32**).

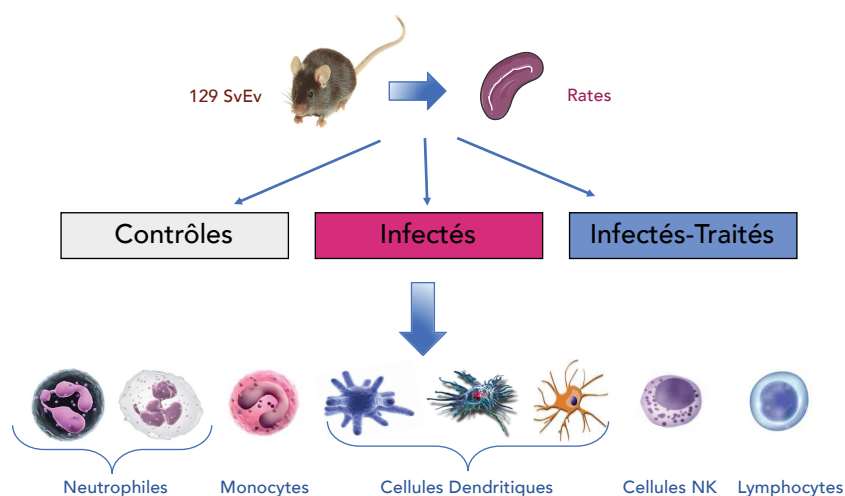


Figure 32 : Approche expérimentale permettant l'élaboration d'un répertoire d'expression des FcγRs présents à la surface des cellules du système immunitaire.

Pour cela, j'ai réalisé un répertoire d'expression des FcγRs, dans les 3 différents contextes de cette étude. A savoir, (i) absence d'infection (animaux « contrôle »), (ii) contexte infectieux, avec les animaux infectés par FrCas^E (« infectés ») et (iii) contexte d'immunothérapie antivirale, avec les animaux infectés par FrCas^E et traités par l'AcM thérapeutique 667 (« infectés-traités »). L'expression des FcγRs, a été établie par cytométrie en flux, à partir des cellules immunitaires issues de la rate, à deux différentes dates J8 et J14p.i., correspondant à deux étapes différentes de l'infection virale et de la réponse immunitaire.

III.1. Définition des populations étudiées : Une population inattendue

Avant d'étudier l'expression des FcγRs, il a fallu discriminer précisément les différents types cellulaires appartenant aux lignées myéloïde et lymphoïde par cytométrie en flux en utilisant des anticorps spécifiques de chaque type cellulaire. Pour cela les différentes populations ont été discriminées à partir des leucocytes totaux, positifs pour le marqueur CD45.2, puis par les marqueurs spécifiques des différentes populations, parmi lesquelles on retrouve les neutrophiles (CD11b⁺, Ly6G⁺), les monocytes (CD11b⁺ Ly6G^{neg}, Ly6C⁺), les cellules dendritiques (CD11c, CD11b, CD8, B220, MHCII), les NK (CD3^{neg} Nkp46⁺), ainsi que les lymphocytes B (CD19⁺, B220⁺).

Ainsi les différentes cellules immunitaires ont été étudiées non seulement dans des conditions contrôles mais également dans les autres contextes de notre étude (infecté, infecté-traité).

Durant cet immunophénotypage, j'ai remarqué qu'une population était plus présente dans des conditions d'inflammation, chez les animaux infectés à J14 p.i., comparé aux animaux contrôles où cette population est faiblement détectée. (**Figure 33A**). Plus précisément j'ai constaté, qu'il n'y avait non pas une, mais deux populations bien distinctes de neutrophiles. Les neutrophiles classiques, (CD11b⁺, Ly6G^{hi}) et une sous population de neutrophiles ayant pour marqueurs CD11b⁺, Ly6G^{int} et Ly6C^{lo}. Cette population se caractérisant par une taille inférieure aux neutrophiles « classiques » Ly6G^{hi} (**Figure 33B**), et une très forte expression du FcγRIV (**Figure 33C**).

Depuis ces constatations, d'autres travaux, publiés en fin 2017 ont aussi mis en évidence cette population CD11b⁺, Ly6G^{int} et Ly6C^{lo} dans un contexte d'infection bactérienne (Deniset et al., 2017). Cette publication, considère ces neutrophiles Ly6G^{int} comme immatures, et à caractériser en partie leurs fonctions effectrices et morphologiques. Cependant leurs fonctions immunomodulatrices restent encore à être déterminées, de même que le rôle qu'occupe ces cellules dans un contexte viral ou encore dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

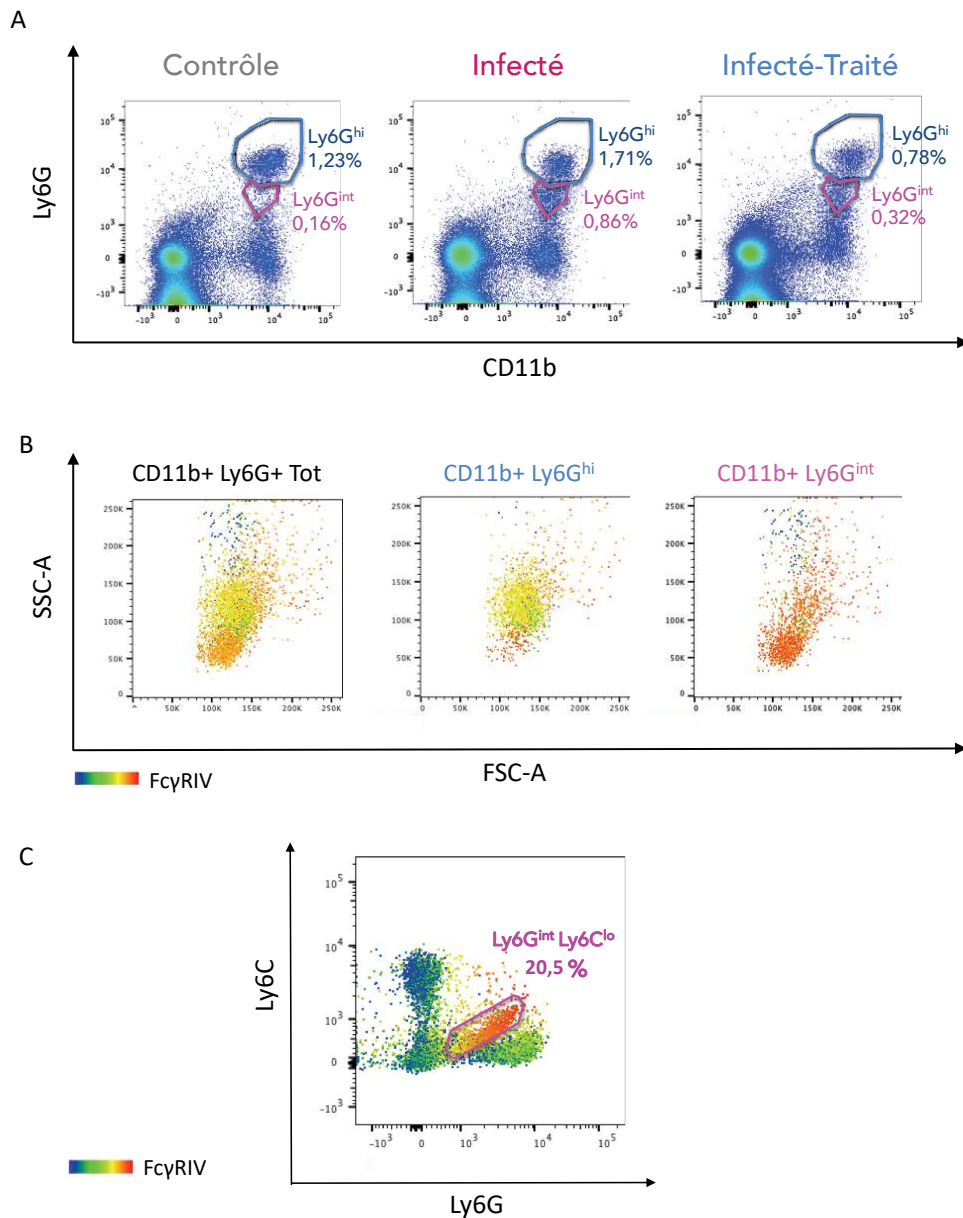


Figure 33 : Zoom sur la population de neutrophiles Ly6G^{int}.

(A) Fréquence des populations de neutrophiles Ly6G^{hi} et Ly6G^{int} issus des rates d'animaux contrôles, infectés, infectés-traités à partir des leucocytes totaux (CD45.2+) à J14 p.i. (B) Représentation des neutrophiles totaux (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}), des neutrophiles Ly6G^{hi} et des neutrophiles Ly6G^{int} en fonction de leur taille (FSC-A), de leur granulosité (SSC-A), et de l'expression du FcγRIV (heatmap). Le nuancier de couleurs illustre l'expression du FcγRIV, s'étalant du bleu (pas exprimé) au rouge (forte expression). (C) Fréquence des neutrophiles Ly6G^{int} Ly6C^{lo} issus des cellules CD11b+, et expression du FcγRIV, visualisable en heatmap. Le logiciel d'analyse de cytométrie FlowJo 10.4.1 a été utilisé pour réaliser ces représentations.

III.2. Expression des différents FcγRs sur les cellules immunitaires à J8 p.i.

Etablir le répertoire d'expression des FcγRs à J8 post infection, nous apporte une information à la fois d'un point de vue pathologique, où J8 correspond au pic d'infection (Michaud et al, 2010 ; Naranjo-Gomez et al, 2018) et d'un point de vue immunitaire où il se positionne au moment de la mise en place de la réponse innée.

III.2.1. Expression des FcγRs sur les neutrophiles et les monocytes à J8.

L'étude des FcγRs sur les cellules myéloïdes s'est centrée initialement sur les populations de neutrophiles et de monocytes (**Figure 34A**).

J'ai pu observer qu'il y avait un réel impact de l'infection sur l'expression des FcγRs, en particulier celle du FcγRIV, sur les différentes cellules myéloïdes étudiées (**Figure 34B**).

La première constatation est que le niveau basal d'expression de ce FcγR, visualisable dans les souris contrôles, n'est pas homogène entre les différentes cellules myéloïdes. En effet le FcγRIV est fortement exprimé sur les neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}), mais est absent de la surface des monocytes.

Ce qui est d'autant plus intéressant c'est que son expression augmente significativement chez les souris infectées, sur l'ensemble des populations myéloïdes et non chez les souris infectées-traitées. L'infection virale induit donc une modulation de l'expression du FcγRIV, soit en augmentant son expression sur les populations l'exprimant déjà à l'état basal (neutrophiles Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) soit en induisant son expression, comme pour les monocytes (Ly6C^{hi}, Ly6C^{lo}).

D'autre part, par rapport aux neutrophiles Ly6G^{hi}, les neutrophiles Ly6G^{int} expriment un niveau basal de FcγRIV inférieur. Cependant chez les animaux infectés, les neutrophiles Ly6G^{int} voient leur expression de FcγRIV grandement augmentée (d'un facteur 7 par rapport aux souris contrôles), celle-ci dépassant largement l'expression observée sur les neutrophiles Ly6G^{hi} (augmentation d'un facteur 1,5 par rapport aux souris contrôles). Cette sous population semble donc particulièrement sensible à l'infection virale et réagit avec beaucoup d'intensité notamment dans la modulation d'expression du FcγRIV.

En ce qui concerne l'expression du FcγRIII et du FcγRIIB, un seul anticorps a été utilisé, le 2.4G2, comme déjà décrit dans les résultats *in vitro*. Il est admis que certaines populations lymphoïdes n'expriment qu'un seul de ces deux récepteurs, ce qui nous permet de réaliser une évaluation spécifique, en revanche les populations myéloïdes étudiées expriment les deux FcγRs. Pour statuer définitivement sur l'expression de chacun de ces FcγRs, il faudrait reproduire ces expériences avec deux anticorps spécifiques de chaque FcγR.

De façon générale, les variations de l'expression des FcγRII-III sur les différentes populations ne sont pas aussi homogènes que celles rencontrées pour le FcγRIV. On peut noter une augmentation de ce couple de récepteurs sur les monocytes inflammatoires (Ly6C^{hi}) dans le groupe des animaux infectés traités. Les autres populations myéloïdes ne présentent pas de variations significatives de ces récepteurs.

Enfin, le cas du FcγRI, est controversé. En effet sur les neutrophiles, par exemple, une partie de la littérature le décrit comme ayant une expression inductible (Bruhns et al, 2015). Cependant d'autres travaux décrivent une expression constitutive de ce FcγR (DiLillo and Ravetch, 2015). Dans l'étude ici présentée, les résultats montrent une faible augmentation de

l'expression du FcγRI sur les cellules des souris infectées et infectées-traitées, mais pas de façon significative. De plus les faibles valeurs de MFI doivent être prises en considération.

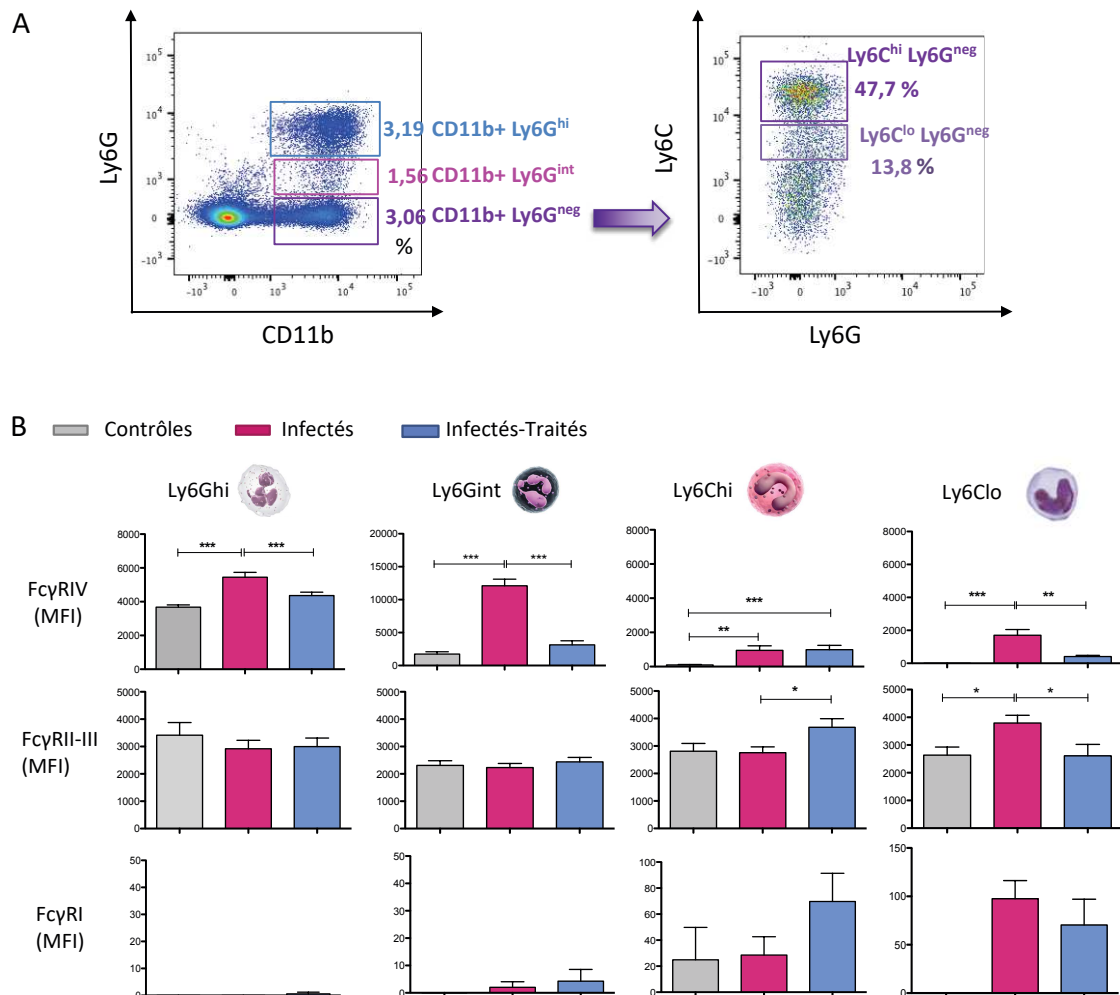


Figure 34 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés sur les neutrophiles et monocytes issus de la rate à J8 p.i.

(A). Stratégie de définition des populations de neutrophiles et de monocytes incluses dans la population de leucocytes (CD45.2+) issus de la rate et identifiées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques des populations, neutrophiles (CD11b+, Ly6G^{hi/int}) et monocytes, Ly6C^{hi} et Ly6C^{lo} à partir de la population CD11b+ et Ly6G^{neg}. (B) L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, 9E9 (anti-FcγRIV), CD16/32 (anti-FcγRII/III), CD64 (anti-FcγRI), à la surface des neutrophiles, monocytes issus des rates des animaux des différents groupes d'animaux contrôles, infectés, infecté-traités à J8 p.i. Le logiciel d'analyse de cytométrie FlowJo 10.4.1 a été utilisé pour réaliser cette représentation. Les résultats représentent 6 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe (B) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

En résumé, à J8 p.i. l'expression du FcγRIV est significativement augmentée chez les animaux infectés, dans ces 4 types cellulaires de la lignée myéloïde, mais pas chez des animaux infectés-traités qui ont des niveaux d'expressions comparables aux groupes contrôles. Seuls les monocytes Ly6C^{hi} voient également leur expression du FcγRIV augmentée chez les animaux infectés-traités. De plus, j'ai constaté que les neutrophiles possèdent la plus forte expression de FcγRIV, en particulier la population de neutrophiles Ly6G^{int} (**Figure 34B**), issue des animaux infectés.

Les FcγRII-III, ne montrent pas de différence d'expression significative entre les différents groupes d'animaux, excepté pour les monocytes Ly6C^{hi}, chez les animaux infectés-traités. Enfin aucune différence significative n'a été observée pour la modulation de l'expression du FcγRI. De plus, les faibles valeurs de MFI observées, posent la question de la relevance biologique de la modulation de ce récepteur.

III.2.2. Expression des FcγRs sur les cellules dendritiques à J8 p.i..

De la même façon que ce qui a été réalisé pour les neutrophiles et les monocytes, j'ai évalué l'expression des FcγRs à la surface des différents types de cellules dendritiques. Les cellules dendritiques conventionnelles (CD11c⁺ CD11b^{neg} et CD11c⁺ CD11b⁺) et les cellules dendritiques plasmacitoïdes ou pDC (CD11c⁺ CD11b^{neg} B220⁺) (**Figure 35A**). De plus, en référence aux travaux de Lehmann (Lehmann et al.2017) sur l'expression des FcγRs des cellules dendritiques de la rate et leur rôle dans l'initiation de la réponse T, la population de cDC ; CD11c⁺ CD8⁺, a elle aussi été répertoriée. Cette population appartient aux cDC, CD11c⁺ CD11b^{neg}, mais toutes les cellules CD11c⁺ CD11b^{neg} ne sont pas CD8⁺. (**Figure 35B**)

On observe à J8 p.i. que l'expression du FcγRIV est significativement augmentée sur les cellules dendritiques conventionnelles (CD11c⁺ CD11b⁺ et CD11c⁺ CD11b^{neg}), mais pas sur les pDC. (**Figure 35C**)

On peut noter une augmentation significative du couple de récepteurs FcγRII-III sur les cDC des animaux infectés traités. Tandis qu'aucune modulation significative n'a été observée pour l'expression du FcγRI. (**Figure 35C**)

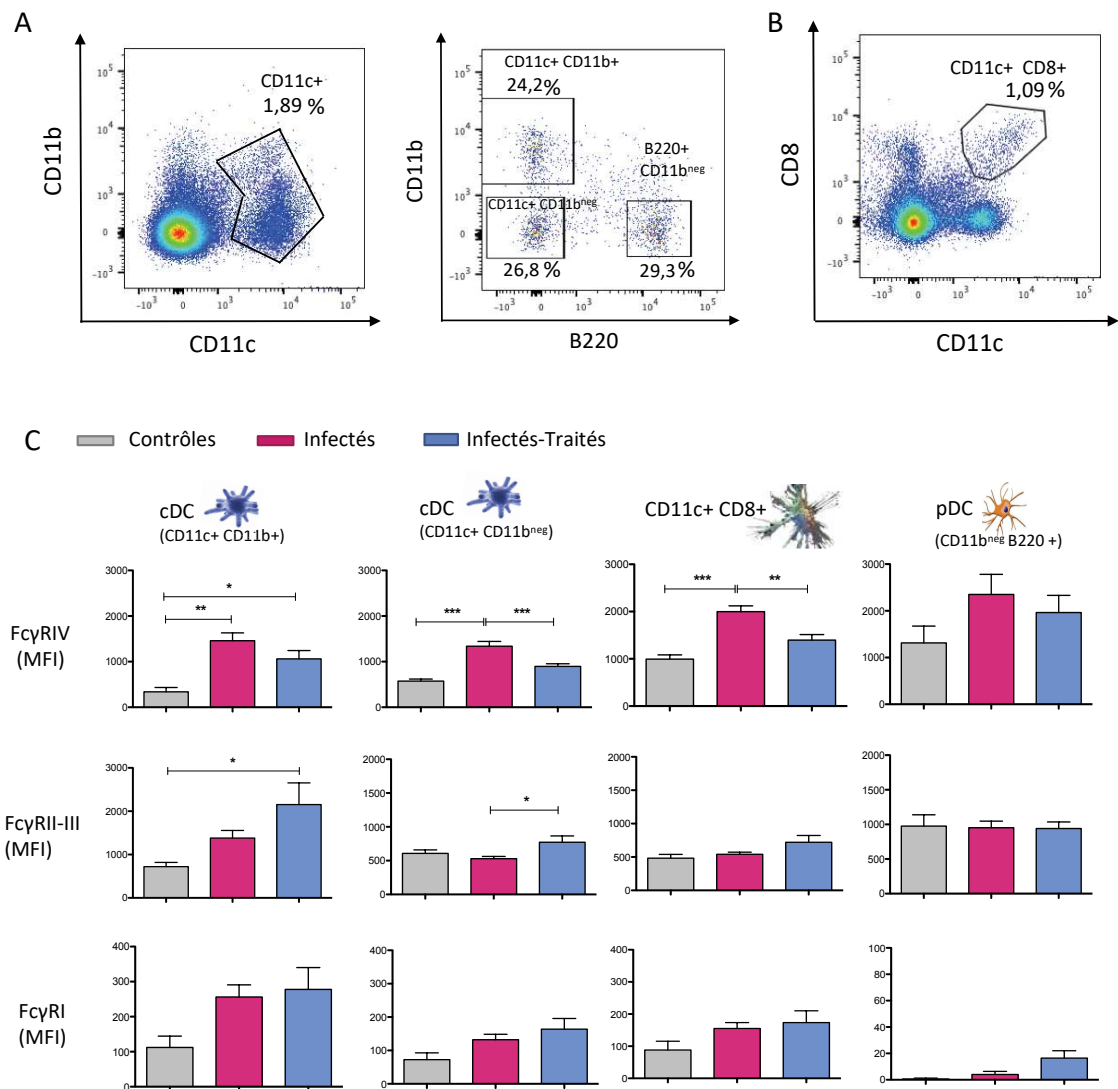


Figure 35 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés sur les cellules dendritiques issues de la rate à J8 p.i.

(A). Les populations des cellules dendritiques incluses dans la population de leucocytes (CD45.2⁺) de la rate et identifiées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques des populations. Les cellules dendritiques sont définies comme CD11c⁺, puis à partir de cette population les DC conventionnelles (CD11c⁺ CD11b⁺ et CD11c⁺ CD11b^{neg}) et les pDC (CD11b^{neg} B220⁺) sont discriminées. (B) A partir des leucocytes CD45.2⁺, une population de cDC est définie comme étant CD11c⁺ CD8⁺ (Lehmann et al.2017). (C) L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, 9E9 (anti-FcγRIV), CD16/32 (anti- FcγRII/III), CD64 (anti-FcγRI), à la surface des cellules dendritiques conventionnelles (CD11c⁺ CD11b⁺, CD11c⁺CD11b^{neg} ; CD11c⁺ CD8⁺) et des pDC issues des rates des animaux des différents groupes d'animaux contrôles, infectés, infecté-traités à J8 p.i. Les résultats représentent 6 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe (C) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

III.2.3. Expression des FcγRs sur les cellules de la lignée lymphoïde à J8 p.i.

En ce qui concerne la lignée lymphoïde, les cellules NK et les lymphocytes B n'expriment ni le FcγRIV, ni le FcγRI.

En revanche, d'après la littérature les cellules NK expriment uniquement le FcγRIII et les lymphocytes B, le FcγRIIB. Ainsi malgré l'utilisation d'un anticorps reconnaissant les 2 récepteurs (2.4G2) les résultats suggèrent une représentation spécifique pour ces deux populations cellulaires.

Lorsqu'on regarde les populations dans leur globalité, que ce soit les NK ou les lymphocytes B, on n'observe pas de variations entre les différents groupes d'animaux. Néanmoins ces populations ne sont pas homogènes et comportent des sous-groupes avec des fonctions bien distinctes. J'ai donc également évalué l'expression des FcγRs dans plusieurs sous-groupes de ces populations cellulaires.

Les NK peuvent être classifiés à l'aide de 2 marqueurs (CD11b et CD27) qui témoignent de l'avancée de leur état de maturation (**Figure 36A**). J'ai constaté qu'il n'y avait pas de différences d'expression du FcγRIII sur les NK quel que soit leur état de maturation (**Figure 36C**).

En ce qui concerne les lymphocytes B, j'ai étudié les deux populations majoritaires retrouvées dans la rate, les lymphocytes de la zone marginale (ZM) (CD21^{hi} IgM^{hi}) et les lymphocytes folliculaires (FO), (CD23⁺ IgM^{lo}). (**Figure 36B**).

Pour chaque type de population, j'ai remarqué qu'il n'y avait pas de différences significatives de l'expression du FcγRIIB entre les différents groupes d'animaux (**Figure 36C**). L'infection ou l'immunothérapie ne semblent donc pas avoir d'impact sur l'expression des FcγRs à la surface des NK et des lymphocytes B.

En revanche, j'ai pu observer une différence du niveau basal d'expression du FcγRIIB entre les différentes populations de lymphocytes B étudiées. En effet, les lymphocytes B de la zone marginale (ZM) expriment 3,5 fois plus de FcγRIIB comparé aux lymphocytes folliculaires (FO) ou aux lymphocytes B en général. Il serait intéressant d'étudier les conséquences biologiques d'une telle différence entre les sous-populations de lymphocytes B de la rate.

En résumé à J8 p.i. l'expression du FcγRIII sur les NK n'est pas modulée en fonction des différents contextes de notre étude. Il en va de même pour l'expression du FcγRIIB exprimé sur les différents sous-types de lymphocytes B.

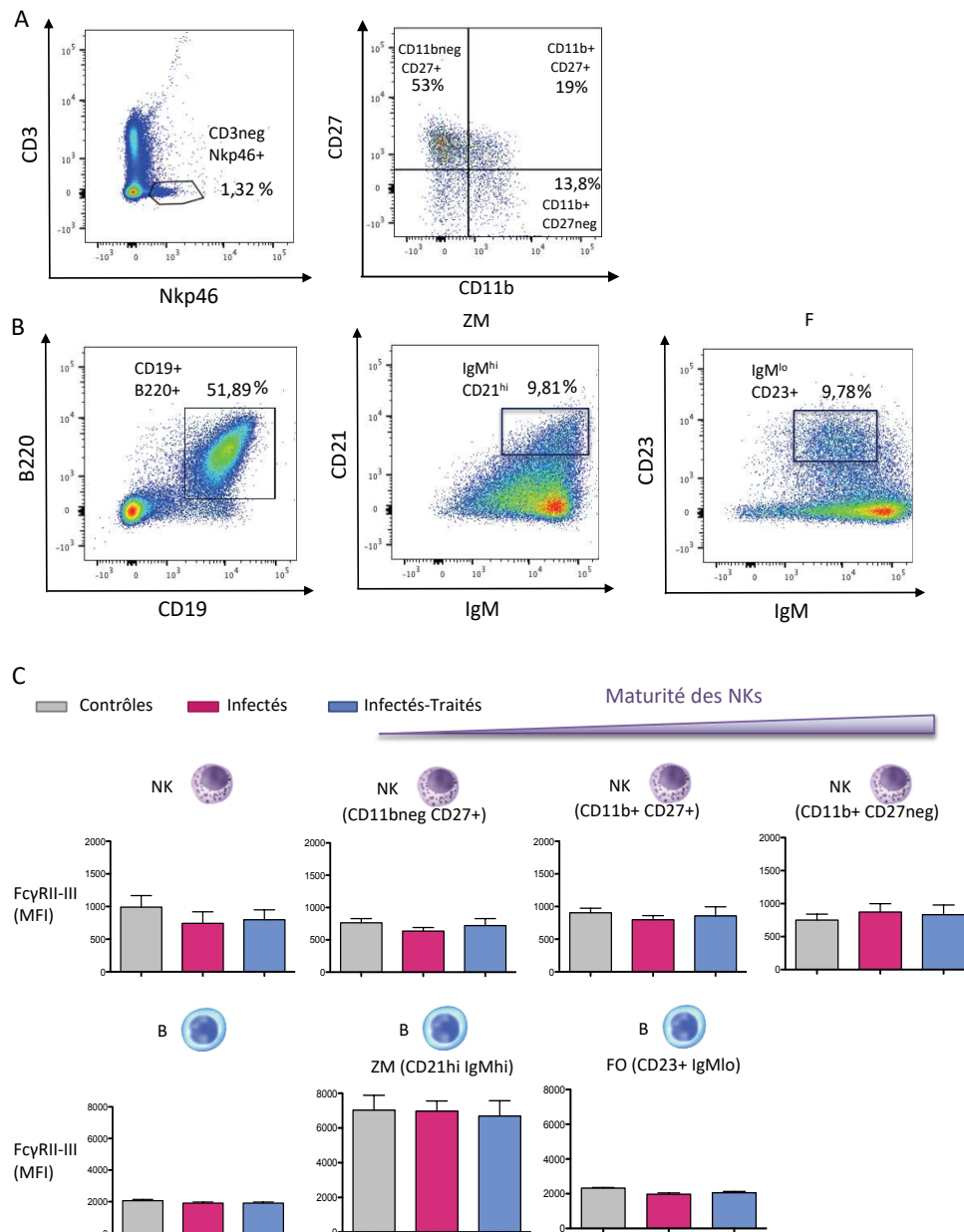


Figure 36 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés à la surface des cellules de la lignée lymphoïde issues de la rate, à J8 p.i.

(A). Les populations de la lignée lymphoïde sont incluses dans la population de leucocytes (CD45.2⁺) de la rate et identifiées par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques des populations. Les cellules NK ont été définies comme Nkp46⁺ CD3^{neg}, et leur maturation a été évaluée par les marqueurs CD11b et CD27. Les lymphocytes B ont été définis comme étant CD19⁺ B220⁺ (B). A partir de cette population deux sous types ont été définies, les lymphocytes de la zone marginale (ZM) CD21^{hi} IgM^{hi} et les lymphocytes folliculaires (FO) CD23⁺ IgM^{lo}. (C) L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, CD16/32 (anti- FcγRII/III), à la surface des cellules lymphoïdes, (cellules NK et lymphocytes B issues des rates des animaux des différents groupes contrôles, infectés, infecté-traités à J8 p.i.). Les résultats représentent 6 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe (C) et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

III.3. Expression des différents FcγRs sur les cellules immunitaires à J14 p.i.

Les résultats précédents montrent la modulation de l'expression des FcγRs, à un moment précoce, clé pour le contexte infectieux et la réponse innée. Je me suis également intéressée à la modulation de l'expression des FcγRs à un moment plus tardif, à J14 p.i., correspondant à la mise en place de l'immunité adaptative. En effet, à J14 p.i. on peut détecter une réponse T CD8 cytotoxique et le début de la réponse humorale avec la sécrétion d'IgM spécifiques du virus (Michaud et al, 2010; Naranjo-Gomez et al, 2018.)

III.3.1. Expression des FcγRs sur les neutrophiles et monocytes à J14 p.i.

L'expression du FcγRIV est augmentée significativement sur les 4 types cellulaires étudiés de la lignée myéloïde, à savoir les neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) et les monocytes (Ly6C^{hi} et Ly6C^{lo}) ; chez des souris infectées-traitées comparé aux souris infectées (neutrophiles) et/ou aux souris contrôles (neutrophiles et monocytes). Ces résultats montrent donc un effet prédominant de l'immunothérapie sur l'expression du FcγRIV, à J14 p.i. (**Figure 37**)

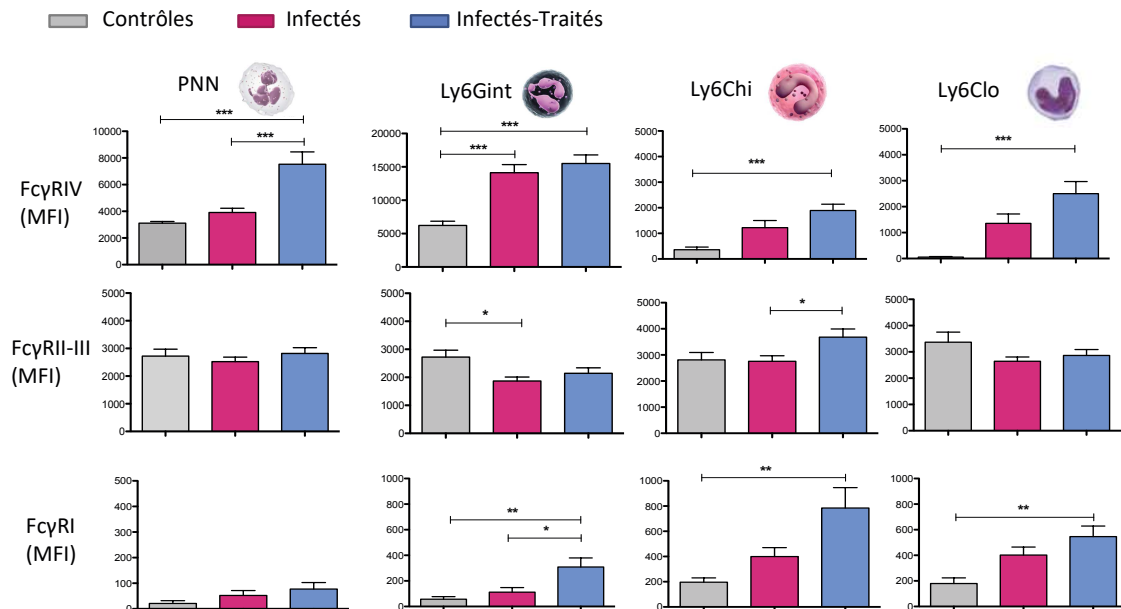


Figure 37 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés sur les neutrophiles et monocytes issus de la rate à J14 p.i.

L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, 9E9 (anti-FcγRIV), CD16/32 (anti- FcγRII/III), CD64 (anti-FcγRI), à la surface des cellules myéloïdes, neutrophiles, monocytes issus des animaux des rates des différents groupes d'animaux contrôles, infectés, infecté-traités à J14 p.i. Les résultats représentent 9 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

La modulation de l'expression des FcγRII-III n'est pas aussi généralisée. En effet, je n'ai pas observé de différences significatives de la modulation de l'expression des FcγRII-III sur les neutrophiles Ly6G^{hi} que ce soit suite à l'infection et/ou l'immunothérapie, alors que j'ai noté

une diminution significative de leur expression sur les neutrophiles Ly6G^{int} chez les animaux infectés versus les souris contrôles. A l'inverse pour les monocytes inflammatoires Ly6C^{hi}, j'ai observé une augmentation significative des FcγRII-III chez les animaux infectés-traités versus les souris infectées, alors qu'aucune variation n'est constatée sur les monocytes Ly6C^{lo}. (**Figure 37**)

Enfin, l'immunothérapie semble également avoir un impact sur l'induction du FcγRI. Que ce soit pour les neutrophiles Ly6G^{int}, ou les monocytes (Ly6C^{hi}, Ly6C^{lo}), j'ai constaté une induction significative du FcγRI, chez les animaux infectés traités comparé aux animaux infectés (neutrophiles Ly6G^{int}) et contrôles (neutrophiles Ly6G^{int} et monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{lo}), avec des valeurs bien plus importantes que celles observées à J8 p.i. (**Figure 37**)

En conclusion l'expression des FcγRs à la surface des cellules myéloïdes est de façon générale augmentée chez les souris infectées-traitées, en particulier le FcγRIV qui est significativement augmenté à la surface de toutes les cellules myéloïdes. Le FcγRI est également significativement augmenté chez les souris infectées-traitées dans la plupart des populations myéloïdes. Ceci est d'autant plus intéressant que ces deux récepteurs possèdent la plus forte affinité pour les IgG, en particulier les IgG2a, qui se trouve être l'isotype de l'AcM thérapeutique (667) utilisé lors de l'immunothérapie.

III.3.2. Expression des FcγRs sur les cellules dendritiques à J14 p.i.

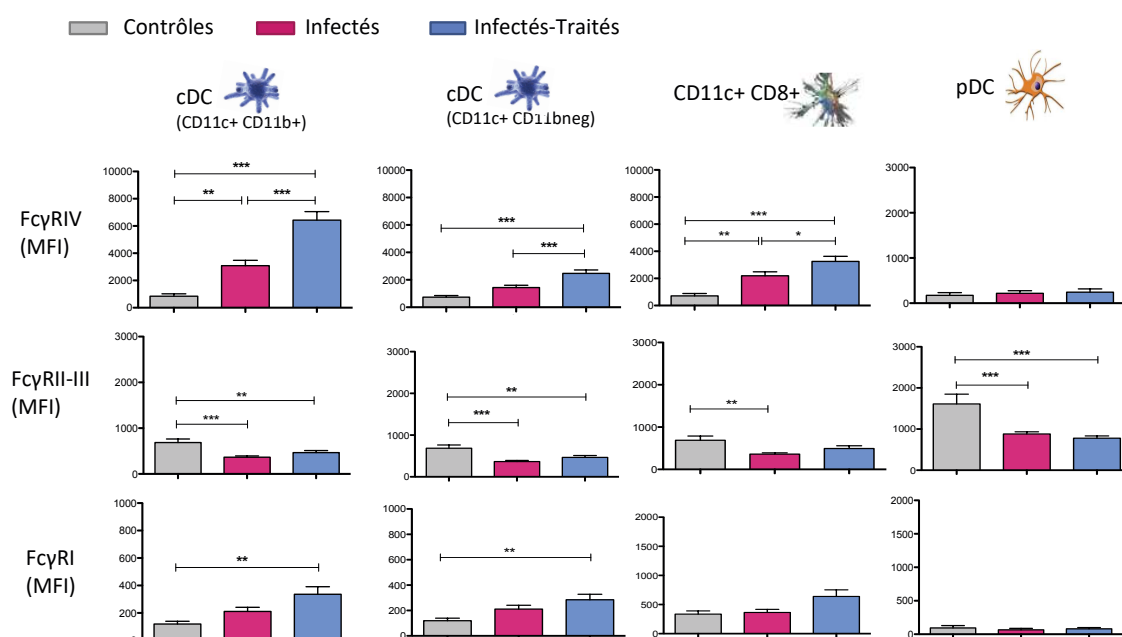


Figure 38 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés à la surface des cellules dendritiques issues de la rate à J14 p.i.

L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, 9E9 (anti-FcγRIV), CD16/32 (anti-FcγRII/III), CD64 (anti-FcγRI), à la surface des cellules dendritiques conventionnelles (CD11c⁺ CD11b⁺, CD11c⁺ CD11b^{neg}; CD11c⁺ CD8⁺) et des pDC (CD11c⁺, CD11b^{neg}, B220⁺) issues des rates des animaux des différents groupes d'animaux contrôles, infectés, infecté-traités à J14 p.i. Les résultats représentent 9 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

Les résultats relatifs aux DC sont plus homogènes, avec une augmentation significative du FcγRIV sur les cDC y compris les cDC CD11c⁺ CD8⁺, issues des animaux infectés traités et une diminution significative de l'expression des FcγRII-III de l'ensemble des cellules dendritiques chez les souris infectées et infectées-traitées par rapport aux souris contrôles. L'expression du FcγRI quant à elle, est significativement modulée sur les cDC provenant des souris infectées traités. (**Figure 38**)

III.3.3. Expression des FcγRs sur les cellules de la lignée lymphoïde à J14 p.i.

Pour ce qui est des cellules lymphoïdes, j'ai évalué l'expression du FcγRIII sur les NK, ainsi que l'expression du FcγRIIB sur les différentes populations de lymphocytes B à J14p.i.

En ce qui concerne l'expression du FcγRIII sur les NK, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes d'animaux, quel que soit le niveau de maturation des NK (**Figure 39A**).

En outre, l'expression du FcγRIIB sur les lymphocytes ne présente pas non plus de différence significative entre les différents groupes de souris et entre les différentes sous-populations de lymphocytes (**Figure 39B**). Cependant on peut noter, tout comme à J8, une forte expression basale de ce récepteur chez les lymphocytes B de la zone marginale (ZM).

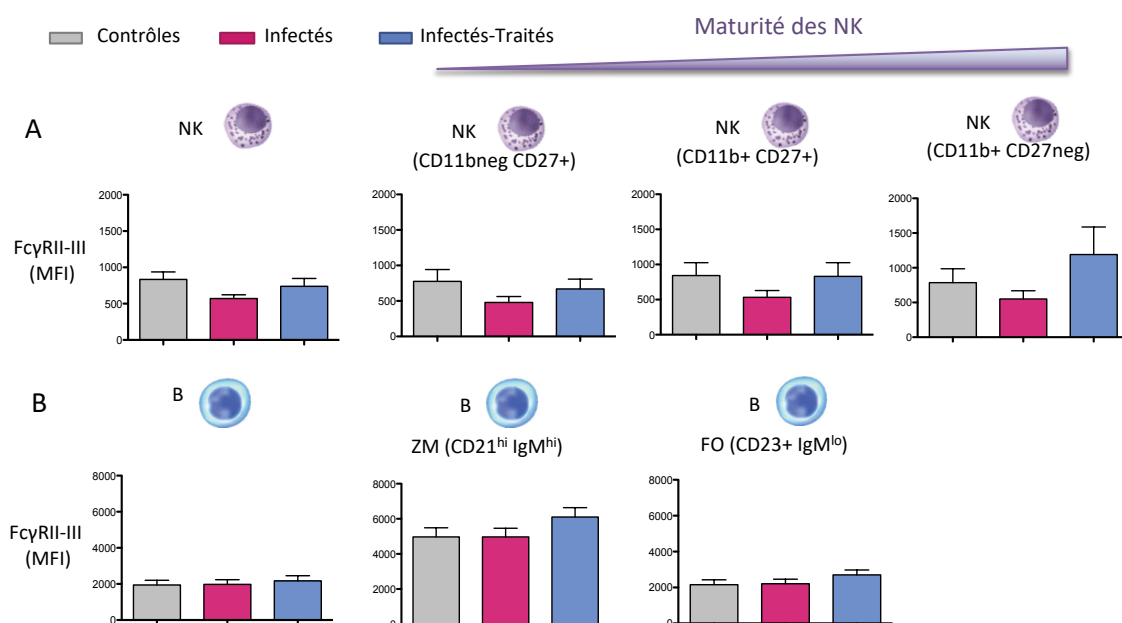


Figure 39 : Répertoire de l'expression des FcγRs exprimés à la surface des cellules de la lignée lymphoïde issues de la rate à J14 p.i.

L'expression des différents FcγRs est mesurée par des anticorps de cytométrie, CD16/32 (anti-FcγRII/III), à la surface des cellules lymphoïdes, telles que les cellules NK (**A**) et les lymphocytes B (**B**) issus des animaux des différents groupes d'animaux contrôles, infectés, infecté-traités à J14 p.i. Les résultats représentent 9 expérimentations indépendantes avec 4 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

III.4. Conclusions sur les modulations de l'expression des FcγRs sur les cellules immunitaires à J8 et J14 p.i.

En résumé, les différents contextes de notre modèle (contrôle, infectieux, et immunothérapie antivirale) entraînent des modulations dans l'expression des différents FcγRs, à la surface des cellules du système immunitaire.

Tout d'abord, il est essentiel de rappeler qu'il est nécessaire d'obtenir des anticorps spécifiques pour les récepteurs FcγRIII et FcγRIIB, dans le but de distinguer les modulations spécifiques de chacun de ces récepteurs. D'autant que leurs fonctions sont opposées, activateur pour le FcγRIII et inhibiteur pour le FcγRIIB.

D'autre part, j'ai constaté que le FcγRIIB était plus fortement exprimé à l'état basal sur les lymphocytes B de la zone marginale comparé aux autres lymphocytes B de la rate. Il serait intéressant d'approfondir ces observations par de nouvelles investigations, afin de comprendre l'impact de cette forte expression d'un FcγR inhibiteur sur cette population de lymphocyte B, en particulier dans ce contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

De plus, on constate, de façon générale que l'expression basale du FcγRI sur les neutrophiles et les monocytes est supérieure à J14 comparé à J8 p.i., ce qui peut être le résultat de la maturation du système immunitaire des animaux qui ne sont pas encore adultes ou de l'influence d'autres paramètres sur l'expression du FcγRI, comme le micro-environnement inflammatoire.

Cette dernière théorie semble être corroborée par les modulations de l'expression du FcγRIV, qui sont particulièrement influencées lors de l'infection et/ou l'immunothérapie. En effet son expression est significativement augmentée sur la quasi-totalité des cellules myéloïdes, à J8 p.i. (**Tableau 3**) chez les animaux infectés et à J14 p.i. (**Tableau 4**) chez les animaux infectés-traités. L'expression du FcγRIV est tout particulièrement élevée sur les populations de neutrophiles. Notamment sur la population Ly6G^{int} où son expression est fortement augmentée dans les conditions inflammatoires (infection et immunothérapie), ce qui n'a pas été décrit jusqu'à présent dans la littérature et permet d'apporter de nouvelles connaissances sur cette population.

Ces résultats suggèrent que le FcγRIV pourrait être un acteur clé dans l'activation des neutrophiles que ce soit dans un contexte infectieux ou dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM. Ils suggèrent aussi qu'un contexte inflammatoire peut considérablement moduler l'expression de ce récepteur.

Ces résultats sont cohérents avec la littérature et les résultats observés *in vitro*, où j'ai constaté que les IFN pouvaient induire une augmentation du FcγRIV. Or, lors d'une infection virale il y a production d'une pléiade de cytokines pro-inflammatoires incluant les IFN de type I et II, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du FcγRIV dans les contextes infectieux et d'immunothérapie antivirale par AcM.

Désormais, une question importante est de comprendre quelles sont les conséquences physiologiques de la modulation d'expression des FcγRs, en particulier celle de l'augmentation du FcγRIV *in vivo*, notamment d'un point de vue de la réponse immunitaire antivirale, et des fonctions immunomodulatrices des neutrophiles.

J8	PNN (Ly6G ^{hi})	PNN (Ly6G ^{int})	Mono (Ly6C ^{hi})	Mono (Ly6C ^{lo})	cDC (CD11b ⁺)	cDC (CD11b ⁻)	CD11c ⁺ CD8 ⁺	pDC	NK	B
										
FcγRIV	++ +++ ++	++ ++++ ++	- + +	- + -	+/- + +	+/- + +/-	+ ++ +	+ + +	- - -	- - -
FcγRII/III	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ +++	++ +++ ++	+ + ++	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
FcγRI	- - -	- - -	- - +/-	- +/- +/-	+/- +/- +/-	+/- +/- +/-	+/- +/- +/-	+/- +/- +/-	- - -	- - -

Tableau 3 : Bilan de l'expression des différents FcγRs exprimés sur les cellules immunitaires issues de la rate à J8 p.i. dans les différentes conditions expérimentales.

Les expressions des FcγRs ont été déterminées par cytométrie en flux, par utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes (références des anticorps en matériels et méthodes). L'expression du FcγRIV a été déterminé par l'anticorps 9E9-APC, celle du FcγRII-III par CD16/32-PECy7, et celle du FcγRI par CD64-PE. L'intensité de l'expression est illustrée par - (< 100 MFI), +/- (100 à 500 MFI), + (500 à 2000 MFI) ; ++ (2000 à 4000) ; +++ (4000 à 10 000 MFI) ; ++++ (> 10 000 MFI) pour les animaux contrôles (Gris), Infectés (Rouge), Infectés-traités (Bleu).

J14	PNN (Ly6G ^{hi})	PNN (Ly6G ^{int})	Mono (Ly6C ^{hi})	Mono (Ly6C ^{lo})	cDC (CD11b ⁺)	cDC (CD11b ⁻)	CD11c ⁺ CD8 ⁺	pDC	NK	B
										
FcγRIV	++ ++ +++	++ ++++ ++++	+/- + +	+/- + +	+ ++ +++	+ + ++	+ ++ ++	- - -	- - -	- - -
FcγRII/III	++ ++ ++	++ + ++	++ ++ ++	++ ++ ++	+ +/- +/-	+ +/- +/-	+ +/- +/-	+ + +	+ + +	+ + +
FcγRI	- - -	- - +/-	+/- +/- +	+/- +/- +	- +/- +/-	- +/- +/-	+/- +/- +/-	- - -	- - -	- - -

Tableau 4 : Bilan de l'expression des différents FcγRs exprimés sur les cellules immunitaires issues de la rate à J14 p.i. dans les différentes conditions expérimentales.

Les expressions des FcγRs ont été déterminées par cytométrie en flux, par utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes (références des anticorps en matériels et méthodes). L'expression du FcγRIV a été déterminé par l'anticorps 9E9-APC, celle du FcγRII-III par CD16/32-PECy7, et celle du FcγRI par CD64-PE. L'intensité de l'expression est illustrée par - (< 100 MFI), +/- (100 à 500 MFI), + (500 à 2000 MFI) ; ++ (2000 à 4000) ; +++ (4000 à 10 000 MFI) ; ++++ (> 10 000 MFI) pour les animaux contrôles (Gris), Infectés (Rouge), Infectés-traités (Bleu).

IV. Rôle du FcγRIV dans l'effet thérapeutique de l'immunothérapie antivirale par AcM

Les résultats précédents montrent une augmentation importante de l'expression du FcγRIV sur différentes cellules myéloïdes (et notamment sur les neutrophiles) dans un contexte d'infection et d'immunothérapie par AcM. Ceci est d'autant plus intéressant que le FcγRIV est un récepteur de très haute affinité pour les IgG2a, qui est l'isotype de l'AcM 667, utilisé dans notre modèle pour traiter l'infection virale par FrCas^E. De plus, son rôle dans un contexte d'infection virale est peu connu et est totalement inconnu dans un contexte d'immunothérapie antivirale, en particulier son effet immunomodulateur.

Ainsi, afin d'étudier l'implication du FcγRIV dans l'effet thérapeutique d'une immunothérapie antiviral par AcM, j'ai réalisé des expérimentations *in vivo* où j'ai bloqué de façon spécifique le FcγRIV, dans notre modèle préclinique d'infection rétrovirale. J'ai ensuite étudié les conséquences de ce blocage à différents niveaux. Tout d'abord d'un point de vue clinique, en regardant l'impact du blocage du FcγRIV sur la protection des animaux et le développement de la pathologie. Ensuite d'un point de vue immunologique, en évaluant l'effet du blocage sur la propagation de la charge virale et la réponse immunitaire à la fois cellulaire et humorale.

IV.1. Mise au point du blocage du FcγRIV

Pour réaliser cette étude, j'ai dû mettre au point, dans un premier temps, les conditions optimales du blocage du FcγRIV à l'aide de l'anticorps spécifique 9E9, issu du hamster. Je me suis d'abord référée aux travaux de la littérature (Jakus et al., 2008)(Lehmann et al., 2017) ayant aussi utilisé le 9E9. Cependant les approches utilisées concernaient en majorité des études courtes qui consistaient à injecter une forte dose de 9E9 (200μg) et à sacrifier l'animal le lendemain ou à réaliser un blocage sur une courte période (moins d'une semaine). Aucune étude sur le long terme n'avait été réalisée avec cet anticorps et aucune information n'était disponible sur les conséquences d'une administration répétée sur les cellules exprimant le FcγRIV à long terme. J'ai donc au préalable, réalisé des expériences préliminaires afin d'établir la dose et la fréquence optimale d'administration.

Afin que la dose administrée reste constante le long de l'étude j'ai opté pour une administration tenant compte du poids des animaux. En effet, ce modèle nécessite de travailler avec des souriceaux, recevant des injections pouvant s'étendre parfois sur 3 semaines, la variation de poids peut être alors importante entre le début et la fin du protocole d'injection.

J'ai ensuite vérifié que le blocage du FcγRIV n'avait pas d'impact sur la viabilité des cellules l'exprimant à J8 p.i et j'ai vérifié l'efficacité du blocage par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-hamster couplé à un fluorochrome (**Figure 40A**). J'ai pu vérifier que les animaux ayant reçu le 9E9 ont un marquage positif pour l'anticorps anti-hamster (histogrammes Violet et orange), indiquant ainsi la présence de l'Anticorps 9E9 alors que ceux qui ont reçu un anticorps contrôle du même isotype (CIso) ont un marquage négatif (histogramme rouge et bleu), notant l'absence de l'Anticorps 9E9. (**Figure 40B**)

L'autre paramètre crucial était la spécificité du blocage par le 9E9. Malgré les données de la littérature sur la spécificité de cet anticorps, j'avais observé durant mes expériences préliminaires que le 9E9 bloquait efficacement le FcγRIV (**Figure 40C et 40D**), mais entraînait aussi une diminution de l'expression du FcγRII-III (**Figure 40E**). A ce moment, aucune donnée n'existait dans la littérature puis en décembre 2015, une publication a démontré que le 9E9 était

bel et bien spécifique du FcγRIV par son Fab mais que l'anticorps pouvait lier les autres FcγRs à proximité via son fragment Fc (Tipton.2015) (**Figure 40F**)

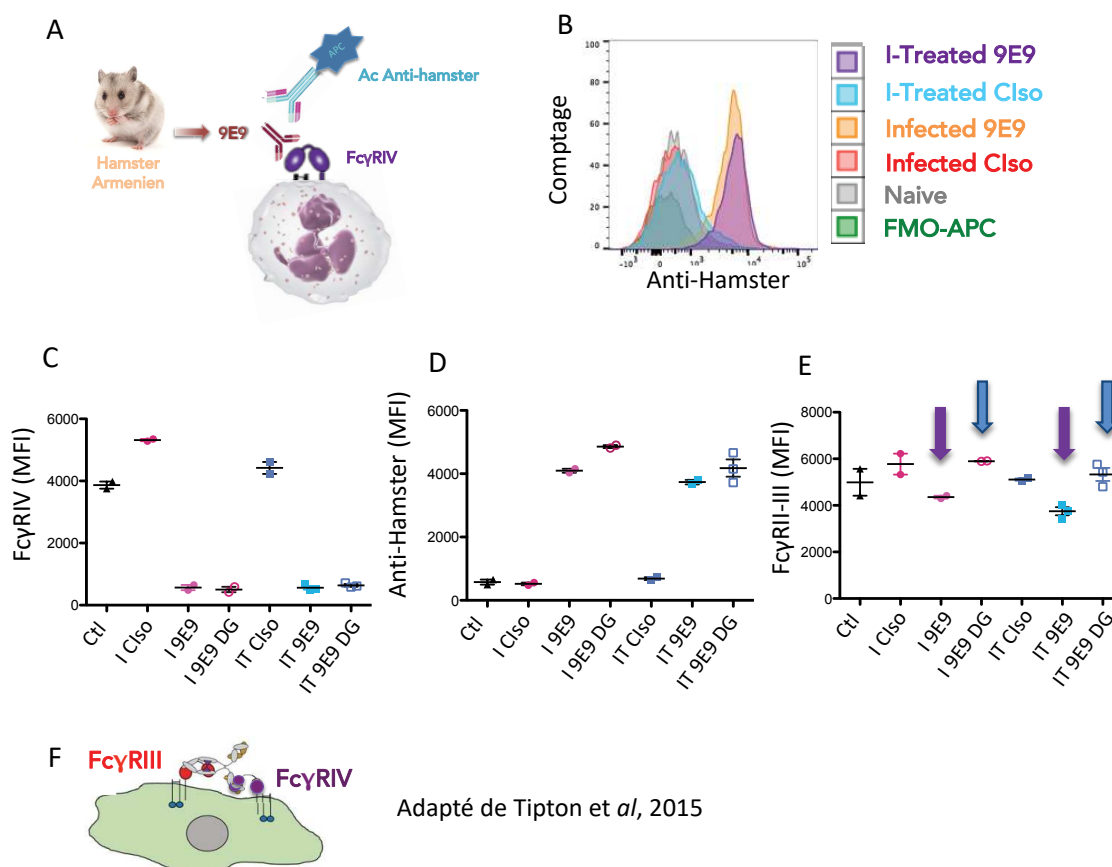


Figure 40 : Évaluation de l'efficacité du blocage du FcγRIV.

(A). Stratégie de vérification du blocage, par un anticorps anti-hamster couplé à un fluorochrome permettant de visualiser la présence de l'Ac 9E9 (anti-FcγRIV), produit chez le hamster. (B). Histogramme de l'intensité de fluorescence de l'Ac anti-hamster à la surface des neutrophiles issus d'un animal représentatif de chaque groupe expérimental, contrôle (gris), Infecté Clso (rouge), Infecté 9E9 (orange), Infecté-traité Clso (bleu clair), Infecté traité 9E9 (violet). Le FMO est un control négatif comprenant tous les anticorps de cytométrie utilisés excepté l'anticorps anti-hamster. (C-D) Expression du FcγRIV mesurée par l'anticorps 9E9 (MFI) (C), et de l'Ac anti-hamster (MFI) (D), sur les neutrophiles issus des animaux des différents groupes Contrôle (Ctl) (Clso, 9E9, 9E9 DG), Infecté (I) (Clso, 9E9, 9E9 DG) infectés traités (IT) (Clso, 9E9, 9E9 DG) (E) Expression du FcγRII-III mesurée par l'anticorps (2.4G2) sur les neutrophiles issus des animaux des différents groupes Contrôle (Ctl), Infecté (I)(Clso, 9E9, 9E9 DG), et Infectés traités (IT) (Clso, 9E9, 9E9 DG), par cytométrie en flux. Les flèches violettes et bleues attestent de l'effet du 9E9 et du 9E9 DG respectivement sur l'expression de FcγRII-III. (F) Schéma du blocage du FcγRIV par le fragment Fab de l'AcM 9E9, et du FcγRIII par le fragment Fc de l'AcM 9E9, adapté de la publication de Tipton et al (Tipton et al., 2015). Les résultats (C, D, E) correspondent à 2 expérimentations indépendantes avec 2 à 3 animaux par groupe, dont une seule, représentative des deux, est présentée dans les résultats ci-dessus.

Pour éviter cette liaison aspécifique, comme le préconise la publication de Tipton et al (Tipton et al, 2015), il a donc fallu déglycosyler le fragment Fc de l'anticorps 9E9, avant de l'injecter aux animaux afin d'éviter l'interaction avec d'autres FcγRs et garantir la spécificité contre le

Fc γ RIV. La spécificité a été ensuite vérifiée par évaluation de l'expression du Fc γ RIV, par cytométrie en flux, en utilisant un anticorps anti-hamster (**Figure 40D**), signifiant la présence de l'anticorps bloquant 9E9 (anti-Fc γ RIV) sur le récepteur et par l'utilisation de l'anticorps 9E9 couplé à un fluorochrome (**Figure 40C**), pour cibler le Fc γ RIV. L'expression du Fc γ RII-III a été également évaluée pour s'assurer que la déglycosylation du 9E9 annihile la liaison au Fc γ RII-III (**Figure 40E**).

Après avoir testé plusieurs doses et plusieurs fréquences d'administration, j'ai opté pour une administration de 5 μ g/g tous les 3 jours, car des doses plus importantes impactaient la viabilité des cellules, en particulier les neutrophiles. Pour la fréquence, j'ai choisi de faire une injection tous les 3 jours afin d'obtenir un blocage efficace. De plus, pour les animaux infectés-traités qui recevaient également l'AcM 667 le même jour que l'injection du 9E9, un délai de 8 h était systématiquement observé entre les 2 injections, l'anticorps 9E9 étant administré avant l'AcM 667 afin d'assurer au préalable, le blocage du récepteur.

Une fois les conditions optimales établies, j'ai réalisé des expérimentations à court et à long terme afin de mettre en évidence le rôle du Fc γ RIV *in vivo*.

IV.2. Approche expérimentale

J'ai réalisé des expériences *in vivo* en utilisant le même modèle expérimental précédemment décrit (Chapitre I). Brièvement, 8 jours après la naissance des souris 129/Sv/Ev immunocompétentes ont reçu une injection de virus FrCas^E (5 x 10⁴ FFU/ 50 μ l), et ont été ensuite traitées ou non, par l'injection de 30 μ g d'AcM 667 à 1h, 2 jours et 5 jours après l'inoculation du virus. (**Figure 18**)

En parallèle, j'ai réalisé le blocage du Fc γ RIV par l'injection de l'AcM 9E9, en commençant les injections un jour avant la première injection du 667 puis, tous les 3 jours jusqu'à jour J21 p.i. correspondant au moment où l'AcM 667 n'est plus présent dans l'organisme des souris. Parallèlement un autre groupe de souris a reçu un anticorps contrôle du même isotype que le 9E9, formant le groupe « isotype contrôle » (CIso). Ainsi chaque groupe de cette étude, Contrôle, Infecté (FrCas^E), Infecté-Traité (FrCas^E + 667), a lui-même été divisé en deux sous-groupes, l'un recevant l'anticorps bloquant 9E9, l'autre recevant l'anticorps servant de contrôle isotypique (CIso). (**Figure 41**)

L'évaluation de l'impact du blocage du Fc γ RIV a été réalisée un deux temps. J'ai d'abord évalué les conséquences à long terme d'un point de vue clinique en étudiant la protection des animaux par le pourcentage de survie et le développement de la pathologie, en surveillant l'hématocrite, principale manifestation symptomatique de l'érythroleucémie. J'ai également réalisé une étude cinétique de la réponse humorale endogène spécifique du virus sur le long terme.

Dans un second temps, j'ai examiné les conséquences du blocage du Fc γ RIV à plus courtes échéances, sur la propagation de la charge virale et de la réponse cellulaire. Pour cela, j'ai étudié le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire, par immunophénotypage par cytométrie en flux. J'ai aussi réalisé un tri des principales cellules exprimant ce récepteur et j'ai établi leurs profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique, par une approche multiparamétrique, utilisant également la cytométrie en flux.

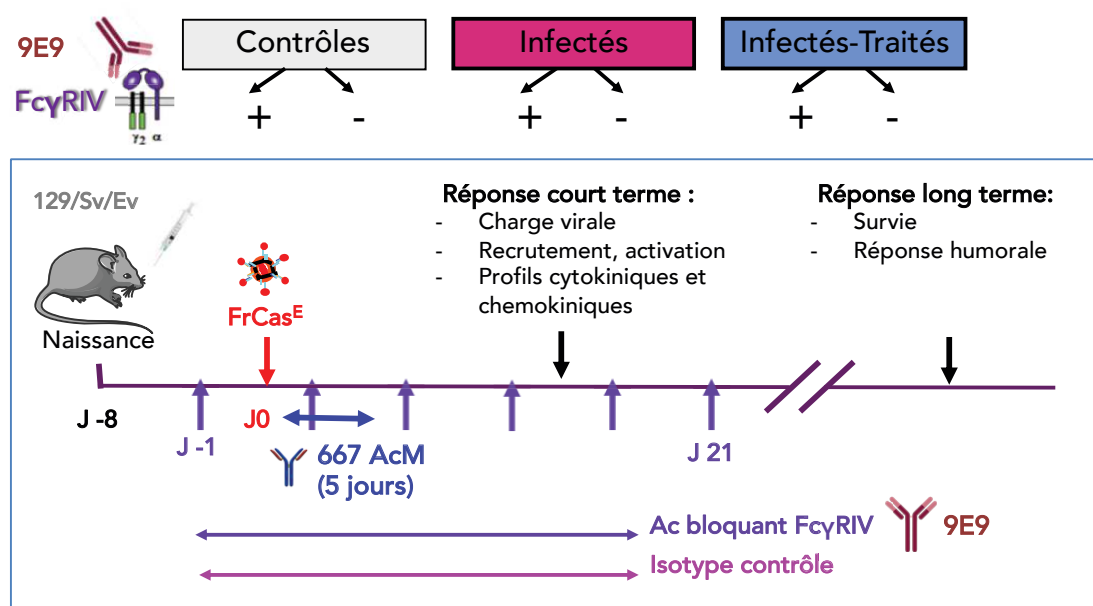


Figure 41 : Schéma expérimental du blocage du FcγRIV dans le modèle d'infection rétrovirale par FrCas^E, traité par l'AcM 667.

Des souris 129/Sv/Ev de 8 jours ont été infectées par le virus FrCas^E et traitées ou non par l'AcM 667 à 1h, 2j et 5j p.i.. En parallèle afin d'induire le blocage du FcγRIV, l'Ac 9E9 (anti-FcγRIV) ou son isotype contrôle (CIso) a été administré tous les 3 jours aux souris, des différentes conditions contrôles, infectées, infectées traitées. Les conséquences du blocage du FcγRIV sur le développement de la pathologie et les réponses immunitaires innée et acquise ont été évaluées à court et long terme.

IV.3 Rôle du FcγRIV sur la protection des animaux traités par immunothérapie antivirale par AcM

IV.3.1. Rôle du FcγRIV sur le développement de la pathologie et la survie des animaux

Dans un premier temps j'ai évalué l'impact du blocage du FcγRIV sur la survie des animaux dans les différents groupes. Le suivi a été réalisé par une surveillance du comportement animal, mais surtout par des prélèvements sanguins réguliers (tous les quinze jours), qui m'ont permis de déterminer l'hématocrite, signe clinique principal du développement de la pathologie. Lorsque que le point limite de 35% était atteint, les animaux ont été sacrifiés pour éviter toutes souffrances.

Aucune différence du taux de survie n'a été observée dans les deux groupes d'animaux contrôles (9E9 et CIso), qui sont tous deux restés à un taux de 100% de survie. (**Figure 42A**) Ils n'ont pas été infectés et n'ont pas développé de pathologie. Donc l'administration de l'anticorps 9E9 bloquant le FcγRIV, n'affecte pas en lui-même, la survie des animaux.

Je n'ai pas non plus, observé de différences au sein des deux groupes de souris infectées (9E9 et CIso). Leurs hématocrites ont chuté de façon comparable et les souris ont développé l'érythroleucémie à la même vitesse et aucune n'a survécu à la pathologie. Le blocage du FcγRIV n'a pas eu de conséquences sur le développement de la pathologie sur les animaux infectés, tant en termes de pourcentage de survie que de cinétique de développement de l'érythroleucémie.

En revanche j'ai montré une différence très marquée entre les deux groupes de souris infectées-traitées. Le taux de survie du groupe CISO est de 93 % (1 animal/14 est décédé), les animaux étaient asymptomatiques et ont été protégés contre la maladie par l'immunothérapie. Ce n'est pas le cas des animaux infectés-traités ayant reçus l'AcM 9E9, où au contraire le taux de survie a chuté à 40 % (**Figure 42A**). Plus de la moitié des animaux ont vu leur hématokrite s'effondrer et ont développé la pathologie. Ces animaux ont totalement perdu le bénéfice apporté par l'immunothérapie par AcM et n'ont pas été protégés.

Ces résultats montrent donc que le FcγRIV joue un rôle crucial dans l'action protectrice de l'AcM 667 et par conséquent sur la survie des animaux infectés traités.

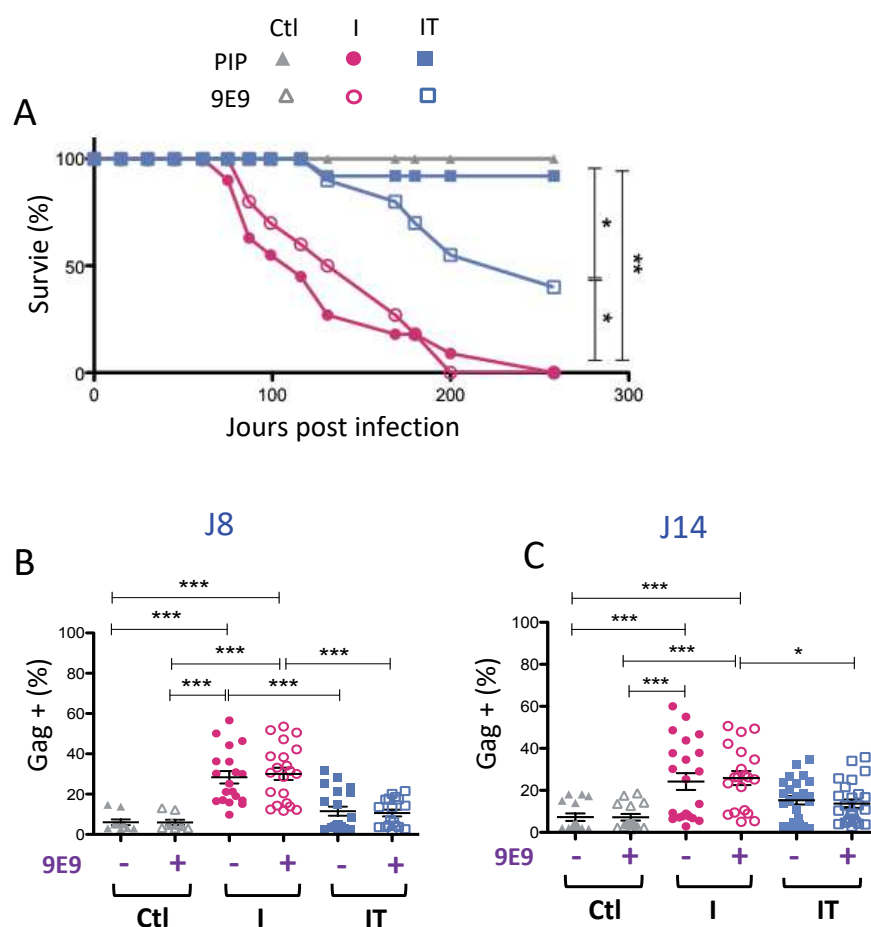


Figure 42 : Impact du blocage du FcγRIV sur la survie et la propagation virale.

(A). Impact du blocage du FcγRIV, sur la survie des animaux des groupes contrôles CISO (triangle plein gris) et 9E9 (triangle vide gris), infectés CISO (rond plein rouge) et 9E9 (rond vide rouge) et infectés traités CISO (carré plein bleu) et 9E9 (carré vide bleu). Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes avec 4 à 11 animaux par groupe. (B, C). Impact du blocage du FcγRIV sur la fréquence des cellules infectées (Gag+) dans les leucocytes (CD45.2) des différents groupes d'animaux contrôles (Gris), infectés (Rouge), infectés traités (Bleu) ayant reçu l'Ac anti-FcγRIV (9E9+) ou ayant reçu le contrôle isotypique (9E9 -) à J8 p.i. (B) et J14 p.i. (C). Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes avec 3 à 8 animaux par groupe (B) et 4 expérimentations indépendantes avec 3 à 7 animaux par groupe (C) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001

IV.3.2. Rôle du FcγRIV sur la propagation virale

Après avoir démontré un impact important du blocage du FcγRIV sur la survie des animaux infectés-traités par une immunothérapie par AcM, le but a ensuite été d'identifier les mécanismes responsables de ce rôle du FcγRIV dans la protection induite par l'immunothérapie par AcM.

Je me suis tout d'abord questionnée sur les conséquences du blocage du FcγRIV sur le contrôle de la propagation virale. Pour ce faire, j'ai évalué la charge virale à différents temps p.i., par cytométrie de flux, en mesurant le pourcentage de cellules infectées dans la rate, qui est l'un des principaux foyers de réplication du virus FrCas^E. Pour cela, j'ai produit un anticorps (AcM H34), dirigé contre une protéine de la capsid virale, la protéine Gag, exprimée à la surface de cellules infectées. (Chesebro et al., 1981)

Les résultats ont montré à J8 p.i. comme à J14 p.i., une augmentation du pourcentage de cellules Gag⁺ dans les 2 groupes de souris infectées, comparé aux 2 groupes contrôles et 2 groupes infectées-traitées. (**Figure 42B et 42C**). Cependant, je n'ai constaté aucune différence significative de propagation virale entre les deux groupes d'animaux infectés (9E9 et Clso), montrant l'absence d'effet du blocage sur la propagation virale. Ces résultats sont cohérents avec le pourcentage de survie observé, où je n'avais pas non plus constaté de différences dans le développement de la pathologie suite au blocage du FcγRIV.

Aucune différence significative n'est également observée ni entre les deux groupes de souris infectées-traitées (9E9 et Clso), ni par rapport aux groupes contrôles. Ces résultats montrent que le FcγRIV n'est pas impliqué dans le contrôle de la charge virale suite à l'infection par FrCas^E, ni suite à l'immunothérapie par AcM. Ils sont cohérents avec nos travaux précédents décrits ci-dessus (Naranjo-Gomez et al, 2018) qui montrent que le contrôle de la propagation virale chez les souris infectées-traitées est due à l'AcM, notamment par son action neutralisante et son activité ADCC médiée par les cellules NK, qui quant à eux n'expriment pas le FcγRIV.

IV.3.3. Rôle du FcγRIV sur le développement de la réponse cellulaire CD8⁺

Ne pouvant expliquer le rôle du FcγRIV sur la survie des animaux infectés-traités par son implication dans le contrôle de la propagation virale, j'ai analysé l'impact du blocage de ce récepteur sur la réponse immunitaire. Dans un premier temps j'ai commencé par évaluer s'il y avait un rôle dans la réponse cellulaire cytotoxique à J14 p.i. (**Figure 43**). Pour cela, j'ai utilisé des tétramères spécifiques du peptide Gag L, peptide immuno-dominant du virus FrCas^E (Chen et al, 1996). Brièvement, les peptides sont associés à de la biotine par le biais d'un complexe MHCII. La biotine est ensuite reconnue par la streptavidine qui est, elle même couplée à un fluorochrome ce qui nous permet de visualiser l'ensemble par cytométrie en flux. *Ex vivo* ce tétramère est reconnu par le récepteur des lymphocyte T CD8 spécifiquement dirigé contre le peptide viral, ce qui permet de quantifier le pourcentage des lymphocytes T CD8 ciblant le virus FrCas^E. (**Figure 43A**)

En accord avec nos travaux précédents (Naranjo-Gomez et al, 2018), le pourcentage de cellules CD8⁺/tétramère positives observé chez les animaux infectés-traités est supérieur en moyenne à celui des animaux infectés, cependant la différence n'est pas significative, vraisemblablement en raison de la grande variabilité des réponses individuelles des animaux au sein d'un même groupe expérimental. (**Figure 43B et 43C**)

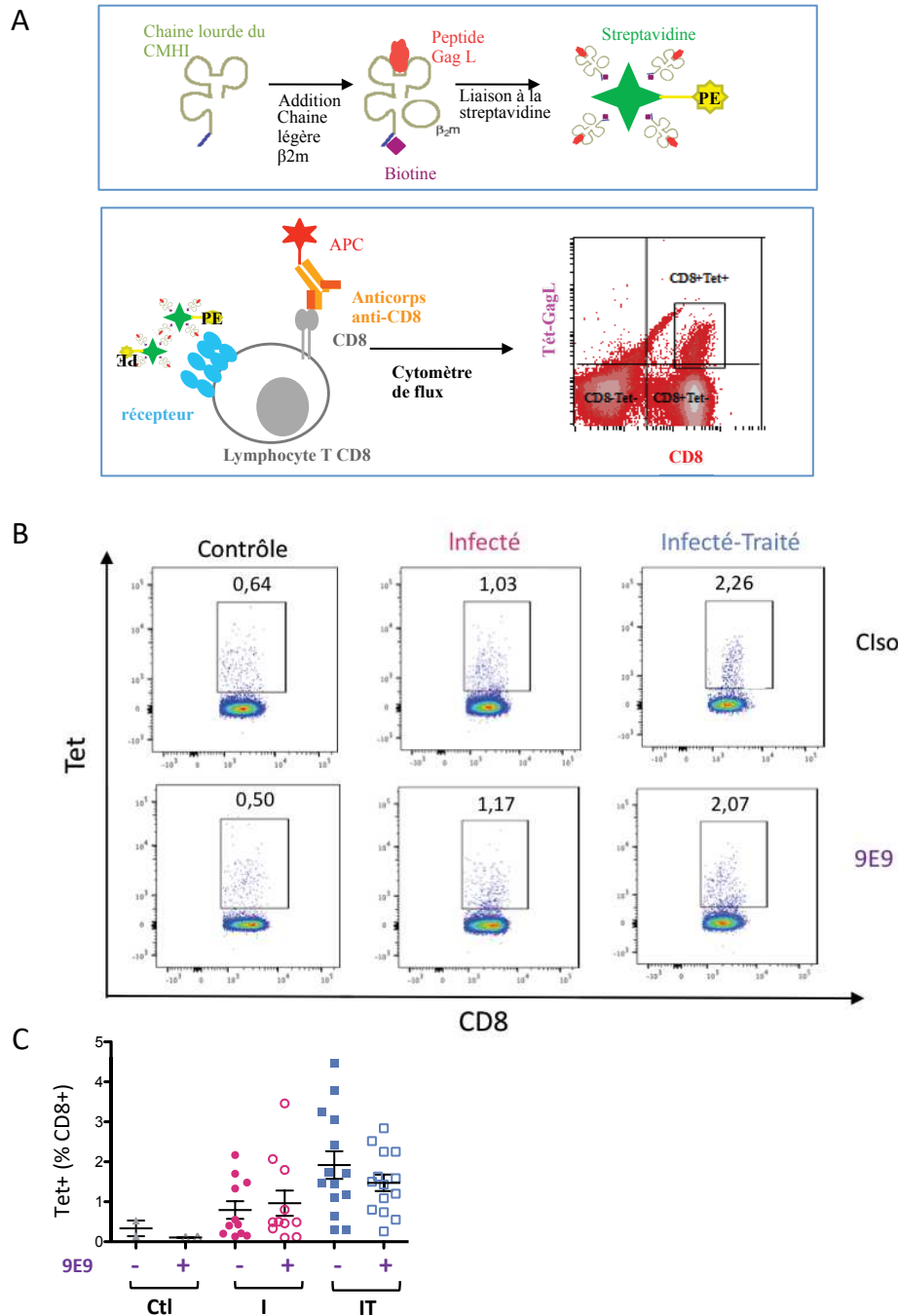


Figure 43 : Impact du blocage du Fc γ RIV sur le pourcentage de lymphocytes T CD8 spécifiques du virus FrCas^E.

(A). Formation des tétramères spécifiques du peptide immuno-dominant Gag L du virus FrCas^E.
 (B). Illustration représentative de la fréquence des cellules Tet⁺ /CD8⁺ parmi les animaux de chaque condition contrôle (Clso et 9E9), infectée (Clso et 9E9), infectée-traitée (Clso et 9E9). (C). Fréquence des cellules CD8⁺ spécifique du virus FrCas^E issues des rates des différents groupes d'animaux contrôles (Clso et 9E9), infectés (Clso et 9E9), infecté-traités (Clso et 9E9). Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes avec 3 à 5 animaux par groupe (C) et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

Par ailleurs, la fréquence de cellules CD8⁺ spécifiques du virus, observée chez les deux groupes de souris infectées (9E9 et CIso) est comparable, comme c'est le cas aussi pour les 2 groupes d'animaux infectés-traités. Ces résultats suggèrent donc que le blocage du FcγRIV n'affecte pas la réponse cellulaire cytotoxique.

IV.3.4. Rôle du FcγRIV sur le développement de la réponse humorale

L'effet du blocage du FcγRIV sur la survie des animaux infectés-traités ne pouvant être le résultat d'une différence au niveau de la charge virale, et n'ayant pas non plus d'impact sur la réponse cellulaire, j'ai évalué dans un second temps la réponse humorale.

J'ai alors réalisé une étude cinétique de la production d'anticorps endogènes dirigés spécifiquement contre le virus FrCas^E, à l'aide d'un ELISA mis au point par le laboratoire. Pour cela, le sérum de chaque animal a été collecté par prélèvement sanguin dans le sinus rétro-orbital, tous les 15 jours. Les travaux précédents de l'équipe ont démontré que l'AcM thérapeutique 667 est encore présent dans les animaux infectés-traités jusqu'à environ J21 p.i., donc afin d'être sûr de quantifier les anticorps endogènes spécifiques du virus, les prélèvements ont été effectués à partir de J30 p.i.

Pour plus de clarté, les courbes correspondant aux groupes d'animaux contrôles ne sont pas représentées, ces animaux n'étant pas infectés, aucune production d'IgG anti-FrCas^E n'a été détectée.

Confirmant les travaux précédents de l'équipe (Michaud et al., 2010) chez les souris infectées-traitées (bleu), l'immunothérapie par AcM potentialise la production d'IgG spécifiquement dirigée contre le virus FrCas^E, contrairement aux groupes d'animaux infectés (rouge). Cependant, aucune différence significative dans le taux sérique d'IgG anti-FrCas^E n'est observée entre les groupes d'animaux où le FcγRIV a été bloqué (9E9) comparé aux groupes CIso, que ce soit au sein des groupes d'animaux infectés ou infectés-traités. (**Figure 44A**)

A la vue de ces résultats j'ai réalisé un tableau de contingence afin de vérifier si un lien pouvait être établi entre une forte production d'IgG et la protection des animaux. (**Figure 44B**)

Pour cela, je me suis basée sur deux paramètres, la survie des animaux (protection *versus* non protection) et la réponse humorale (production d'IgG sérique anti-FrCas^E au cours du temps). En ce qui concerne la protection j'ai classé les animaux tous groupes confondus, infectés (9E9 et CIso) et infecté-traités (9E9 et CIso) en deux catégories, animaux protégés ou non protégés. Pour le taux de production d'IgG endogène anti-FrCas^E j'ai calculé l'aire sous la courbe (ASC) de la production d'IgG au cours du temps, pour chaque animal jusqu'à J131 p.i.

Les résultats montrent que 97 % des animaux non protégés ont une ASC inférieure à 35, c'est à dire une très faible production d'anticorps et qu'à l'inverse 85 % des animaux protégés ont une ASC supérieure à 35, donc une forte production d'anticorps.

Ces résultats démontrent clairement une corrélation entre la production d'IgG dirigée contre le virus et la protection des animaux ; confirmant ainsi les résultats précédents de l'équipe (Naranjo-Gomez et al, 2018).

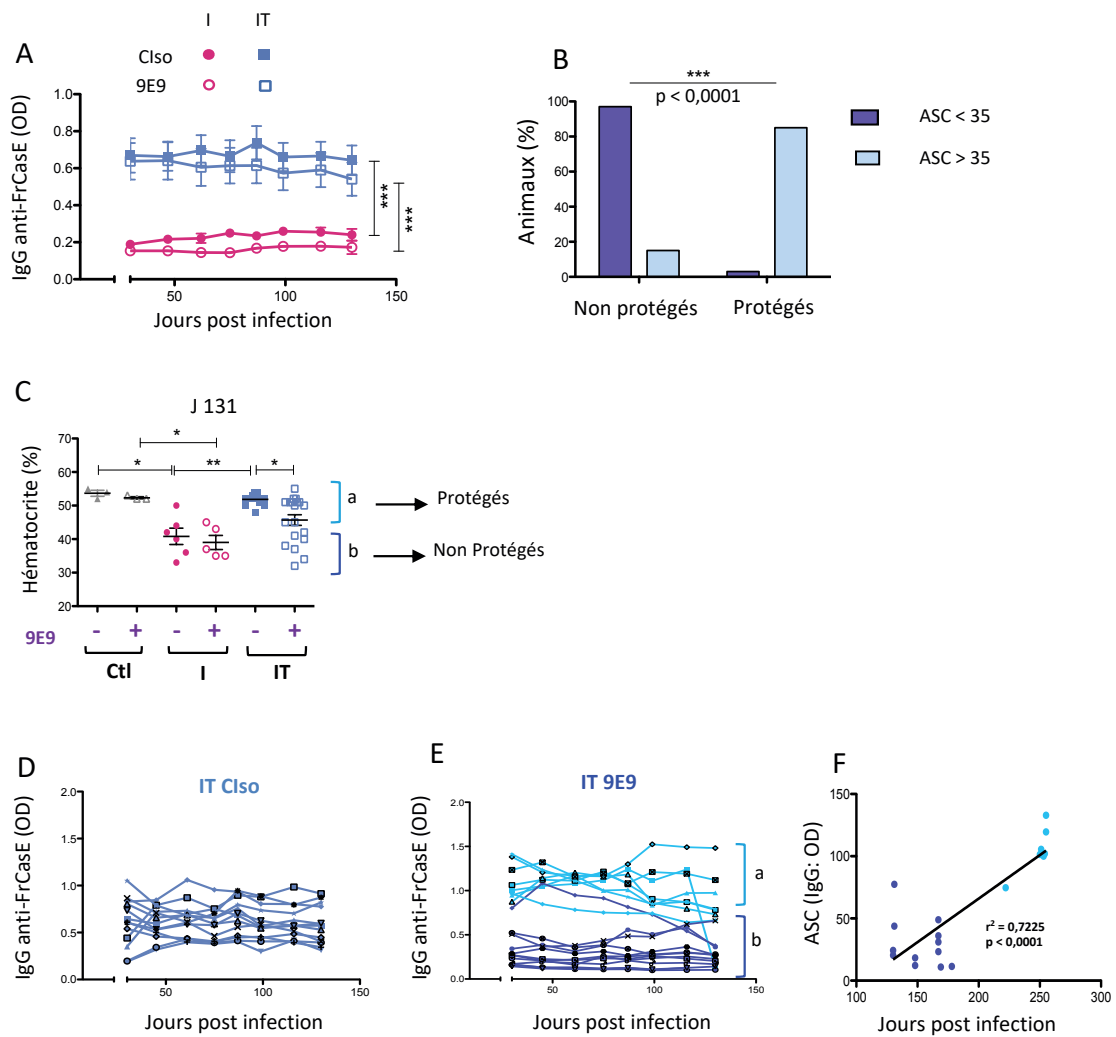


Figure 44 : Impact du blocage du FcγRIV sur la réponse humorale et le développement de l'érythroleucémie.

(A). Impact du blocage du FcγRIV sur la cinétique de production des anticorps endogènes spécifiques du virus FrCas^E (IgG anti-FrCas^E), des animaux infectés (rouge) et infectés-traités (bleu) où le FcγRIV a été bloqué (forme plein) ou non (forme vide). (B). Tableau de contingence établie entre la survie des animaux et la production d'IgGs endogènes spécifiques du virus FrCas^E, définie par l'aire sous la courbe (ASC) de la cinétique de production des IgG anti-FrCas^E de la totalité des animaux infectés et infectés-traités, bloqué ou non pour le récepteur FcγRIV. (C). Mesure de l'hématocrite des animaux contrôles, infectés et infectés-traités, où le FcγRIV a été bloqué ou non à J131p.i. Les animaux infectés traités où le FcγRIV a été bloqué (9E9+), présentent deux phénotypes (a) avec des animaux sont protégés (50%) et (b) où ils ne le sont pas (<50%). (D-E). Cinétique de production des anticorps endogènes spécifiques du virus FrCas^E des animaux infectés traités où le FcγRIV n'a pas été bloqué (D) et où le FcγRIV a été bloqué (E). Les courbes bleues claires (a) et bleues foncées (b) font références aux phénotypes (a) et (b) du pourcentage d'hématocrite (C). (F). Corrélation entre la production d'IgG anti-FrCas^E, évaluée par l'aire sous la courbe et la durée de survie des animaux infectés traités où le FcγRIV a été bloqué. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes avec 4 à 11 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni (A, C), le test du χ^2 (B) et la corrélation de Pearson (F) (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

Ayant montré, d'une part, un réel impact du blocage du Fc γ RIV sur la survie des animaux infectés-traités et, d'autre part, qu'une forte réponse humorale était associée à la protection des animaux contre la pathologie et donc à leur survie, j'ai évalué par la suite si l'absence de protection observée chez les animaux infectés-traités ayant reçu l'AcM 9E9 était associée à une plus faible réponse humorale.

D'un point de vue clinique, j'ai analysé le pourcentage d'hématocrite, qui je le rappelle est l'une des principales manifestations symptomatologiques de l'érythroleucémie, à J131 p.i. qui correspond au dernier jour où tous les animaux infectés-traités sont encore en vie. (**Figure 44C**) Les résultats montrent que les animaux contrôles ont un taux d'hématocrite normal autour de 50% (a), ils sont sains. Les groupes d'animaux infectés (9E9 et CIso) présentent un taux d'hématocrite en baisse proche de 35%, point limite établi à partir duquel les animaux doivent être euthanasiés pour éviter toutes souffrances. Ces animaux développent la pathologie et ne sont pas protégés (mort de 100% des animaux infectés) (b: hématocrite < 50%). A contrario, les animaux infectés-traités du groupe CIso, présentent un taux d'hématocrite autour de 50%, comparable aux groupes contrôles. Ces animaux sont sains, ils ont été protégés contre l'infection par l'immunothérapie par l'AcM 667 avec un pourcentage de survie de près de 95%. Enfin, en ce qui concerne les animaux infectés-traités ayant reçu l'AcM 9E9, il est intéressant de constater que deux profils se dégagent.

Une partie des animaux présente le phénotype des animaux infecté-traités CIso, avec un taux d'hématocrite normal autour de 50% tandis qu'une autre partie présente le phénotype des animaux infectés, c'est à dire un taux d'hématocrite en baisse signifiant le développement de l'érythroleucémie. Ces derniers, ont perdu le bénéfice de l'immunothérapie, ils ne sont pas protégés contre la pathologie, ce qui est cohérent avec la diminution de leur pourcentage de survie.

Afin de comprendre les raisons de ce phénotype dichotomique des animaux infectés-traités où le Fc γ RIV a été bloqué, j'ai réalisé une étude cinétique de la production d'IgG spécifique du virus FrCas^E de chacun des animaux infectés-traités (9E9 et CIso).

Les résultats montrent que les souris infectées-traitées CIso (**Figure 44D**) ont une production d'IgG anti-FrCas^E homogène avec des valeurs d'absorbances entre 0,5 et 1. Cette homogénéité se retrouve également dans leur taux d'hématocrite et dans le pourcentage de survie, où seul un animal sur 14 est décédé.

Ce n'est pas le cas des animaux infectés-traités 9E9 (**Figure 44E**). Comme pour le pourcentage d'hématocrite, les souris infectées-traitées 9E9 se scindent en deux groupes.

Un groupe avec des valeurs d'OD en dessous de 0,5, et présentant donc une faible production d'IgG, et un groupe avec des valeurs d'OD supérieures à 0,8, témoin d'une forte production d'IgG. Ce qui est d'autant plus intéressant c'est qu'il y a une réelle cohérence entre la production d'IgG endogènes spécifiques du virus et la survie des animaux. En effet les animaux ayant une faible réponse humorale (OD < à 0,5) (environ 65% du total des animaux infectés-traités 9E9) ne sont pas protégés, au contraire de ceux qui possèdent une forte production d'IgG (OD > 0,8) (environ 35%) dont la grande majorité sont protégés contre la leucémie. Ces proportions reflètent celles de la courbe de survie où seul 40% des animaux infectés-traités 9E9 survivent.

Afin d'établir une corrélation statistique entre réponse humorale et survie pour ces animaux, j'ai corrélé la cinétique de production d'IgG anti-FrCas^E de chaque animal (à partir de l'ASC), avec sa durée de vie, c'est à dire le jour où l'animal a dû être euthanasié soit en raison de la

diminution du pourcentage d'hématocrite si l'animal avait développé la pathologie, soit à la date de fin de l'étude si l'animal était protégé. (**Figure 44F**)

Les résultats montrent que les animaux avec une forte réponse humorale survivent le long de l'expérimentation alors que ceux qui ont une faible réponse humorale décèdent précocement. Ceci démontre à nouveau une corrélation entre l'intensité de la réponse humorale et la protection des animaux, confirmant ainsi nos travaux précédents. Ces résultats montrent aussi un rôle clé du FcγRIV dans l'induction de la réponse humorale chez les animaux infectés-traités. La mise en évidence de cet effet du FcγRIV dans la modulation de la réponse a été possible grâce l'étude individuel du comportement de chaque animal qui a permis d'identifier deux profils distincts. Désormais il est important d'identifier les mécanismes à l'origine de cette réponse dichotomique au sein des animaux infectés-traités où le FcγRIV a été bloqué. Pour cela, il serait intéressant d'analyser l'impact de ce blocage sur la charge virale et la réponse innée de ces mêmes animaux. Malheureusement de telles analyses nécessiteraient de sacrifier les animaux à des moments précoces et ne permettraient donc pas d'obtenir de données sur leur réponse humorale ou leur survie.

En conclusion j'ai montré que le FcγRIV a un rôle déterminant sur la survie des animaux infectés-traités. J'ai pu établir que cet effet sur la survie n'était pas dû à un rôle du FcγRIV sur le contrôle de la charge virale ou sur la réponse cellulaire, mais à un impact sur la réponse humorale spécifique du virus des animaux infectés-traités. Mes travaux montrent donc que le blocage du FcγRIV affecte la réponse adaptative. Désormais, il est important d'élucider les mécanismes précoces à l'origine de la mise en place de cette réponse adaptative, et notamment le rôle des différentes cellules du système immunitaire innée exprimant le FcγRIV.

V. Etude des fonctions immunomodulatrices des cellules exprimant le FcγRIV

Dans ce contexte, une question importante est de déterminer les conséquences du blocage du FcγRIV sur la réponse immune innée à des temps précoces.

Pour cette étude, je me suis centrée sur les principales cellules exprimant le FcγRIV, à savoir les deux types de neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) et les monocytes inflammatoires (Ly6C^{hi}). J'ai étudié à différents temps p.i. (à J8 et J14 p.i.) l'effet du blocage du FcγRIV sur la réponse immune précoce. J'ai notamment étudié le recrutement et l'activation de ces cellules de l'immunité innée, par cytométrie en flux. En parallèle j'ai également trié ces cellules à partir de la rate afin d'établir leur profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique par une approche multiparamétrique.

V.1. Approche expérimentale

Pour cela j'ai utilisé le même modèle expérimental que précédemment décrit (**Figure 41**). Les animaux se répartissent donc en 3 conditions : contrôle, infectée et infectée-traitée. Chacune de ces conditions étant elle-même sous-divisée en 2 groupes, 9E9 et CIso. J'ai ensuite étudié l'activation phénotypique et fonctionnelle des cellules exprimant le FcγRIV, à des moments précoces de la réponse immunitaire à J8 et J14 p.i.

Pour ce faire, les rates des différents animaux ont été collectées puis dissociées. 20 % de chaque rate a été séparé pour réaliser l'immunophénotypage individuel des animaux par cytométrie en flux, ce qui permet d'apporter des informations sur le pourcentage de chaque type cellulaire

ainsi que sur leur état d'activation. Les 80 % restant de la rate ont été utilisés pour trier les cellules exprimant le FcγRIV. (**Figure 45**)

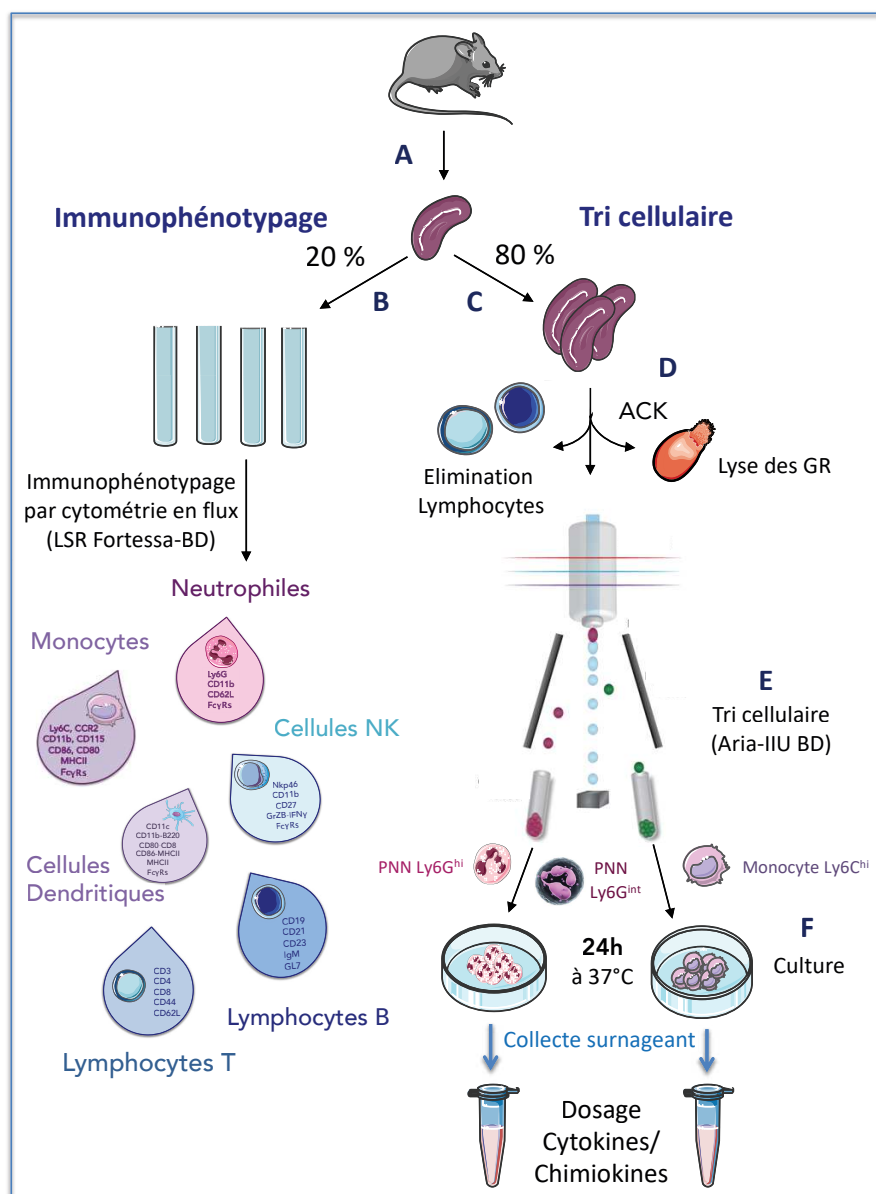


Figure 45 : Schéma expérimental de l'étude du blocage du FcγRIV sur la réponse immune innée, par immunophénotypage par cytométrie en flux et isolation des cellules immunitaires exprimant le FcγRIV, à J8 et J14 p.i.

(A). Récupération des rates des animaux des 6 différents groupes, contrôles (Ciso, 9E9), Infectés (Ciso, 9E9), Infectés-traités (Ciso, 9E9) à J8 et J14 p.i. (cf Fig 41) (B). Immunophénotypage individuel des différentes populations de cellules immunitaires par cytométrie en flux. (C) Rassemblement des rates issues des animaux d'une même condition, puis lyse des érythrocytes (GR) et élimination des lymphocytes B et T par une méthode de pré-enrichissement (D). (E) Tri de 3 populations de cellules exprimant le FcγRIV, neutrophiles (PNN) Ly6G^{hi}, PNN Ly6G^{int} et monocytes Ly6C^{hi}, par un analyseur et trieur cellulaire (Aria, BD). (F) Mise en culture des cellules (4 millions/ml) pendant 24h et collecte du surnageant pour évaluer le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique, par approche multiparamétrique.

Afin d'effectuer le tri, les rates des animaux appartenant à une même condition ont été rassemblées pour chacun des 6 groupes. Puis elles ont subi différents traitements, à savoir lyse des globules rouges suivi d'un enrichissement qui consiste à éliminer les populations cellulaires majoritaires et non désirées de la rate, tel que les lymphocytes B et T ainsi que les globules rouges, par le biais d'anticorps spécifiques de ces populations. Ceci est nécessaire pour trier un nombre suffisant de cellules d'intérêt (neutrophiles et monocytes), qui sont en faible proportion dans la rate. Cela est d'autant plus important que les rates sont de petites tailles en raison du jeune âge des animaux. Afin d'isoler les types cellulaires désirés, j'ai effectué un marquage par des anticorps de cytométrie spécifiques des populations de neutrophiles et de monocytes. **(Figure 46)**

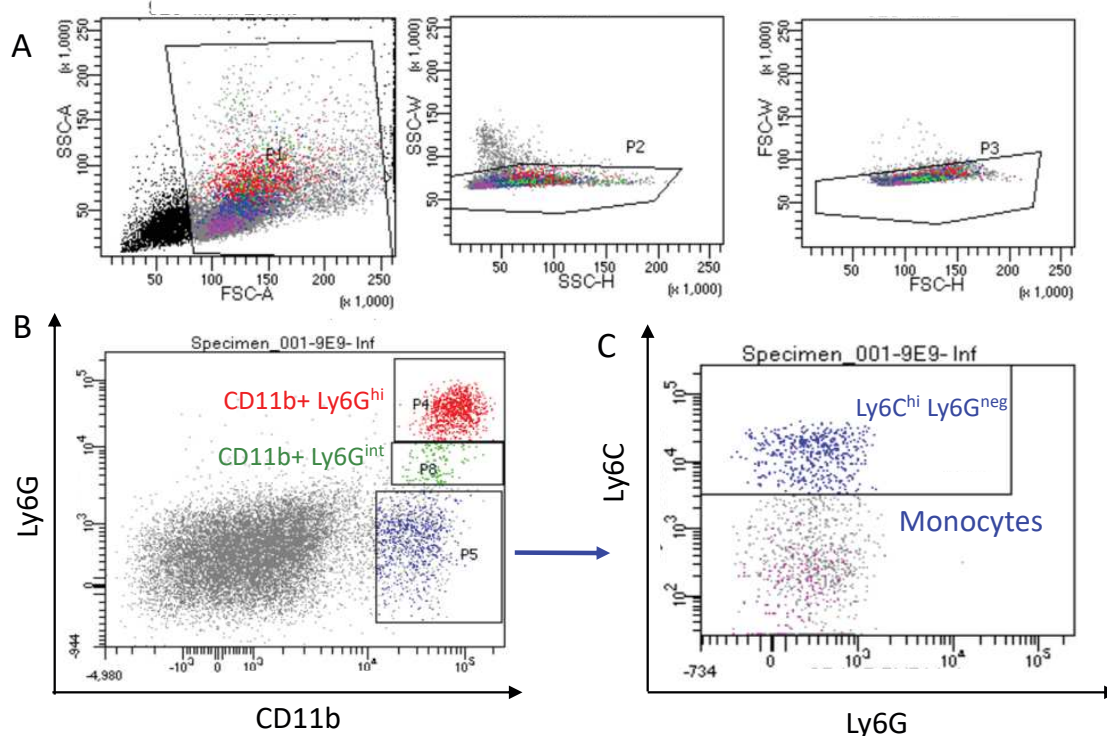


Figure 46 : Stratégie d'isolation des cellules exprimant le FcγRIV

(A). Délimitation des cellules vivantes et élimination des doublets de cellules. **(B).** Définitions des neutrophiles Ly6G^{hi} (CD11b+, Ly6G^{hi}) et des neutrophiles Ly6G^{int} (CD11b+, Ly6G^{int}).

(C). Définitions des monocytes Ly6C^{hi} à partir des cellules CD11b+ Ly6G^{neg}.

Une fois triées les cellules ont été placées en culture à une concentration de 4 millions/ml. Au bout de 24h, le surnageant de culture a été collecté et un dosage de la sécrétion de cytokines et de chimiokines a été effectué par approche multiparamétrique comme dans les expériences *in vitro* ci-dessus présentées.

Auparavant je dois signaler, que dans le but d'avoir un recul statistique, 3 expérimentations à J8 p.i. et 3 expérimentations à J14 p.i. avaient été initialement prévues, mais seulement 2 expérimentations à J8 p.i. et 3 expérimentations à J14 ont pu être réalisées en raison de la complexité que requiert ce type d'expérimentation. En effet, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules triées, un nombre minimum d'animaux est requis, d'autant que les expériences sont

réalisées sur de jeunes animaux (2 à 3 semaines). Il est donc nécessaire d'envisager des nombreux accouplements de travail pour avoir suffisamment de naissances synchronisées.

De plus, ceci doit être coordonné avec la disponibilité de l'appareillage nécessaire au tri, le jour où l'expérience doit être réalisée. Par ailleurs, lors de l'une de ces 2 expériences réalisées à J8 p.i., les cellules issues du groupe d'animaux infectés-traités (CIso) n'ont pas pu être triées suite à un problème technique du trieur lors du tri. En conséquence, un seul échantillon du groupe infecté-traité (CIso) a été pris en compte dans l'analyse des résultats, et donc, aucune analyse statistique n'a été faite sur les résultats des expériences réalisées à J8 p.i.

De plus, pour des raisons qui restent à identifier, le blocage du FcγRIV affecte fortement l'activité fonctionnelle des cellules issues des souris contrôles ainsi que des souris infectées. Ceci rend les résultats difficilement interprétables et empêche notamment de tirer des conclusions sur le rôle immunomodulateur du FcγRIV chez les animaux infectés-traités.

Ainsi, de façon extrêmement décevante et malgré un investissement important en temps et en nombre d'expériences réalisées, les résultats présentés ci-dessous ne feront l'objet que de constatations, mais aucune conclusion formelle ne pourra en être tirée.

V.2. Rôle immunomodulateur des neutrophiles *in vivo*

Le répertoire de l'expression des FcγRs réalisé à J8 p.i. et J14 p.i., nous a permis de montrer que les neutrophiles sont les cellules qui expriment le plus le FcγRIV, en particulier la population de neutrophiles Ly6G^{int}. J'ai mis également en évidence que cette expression est augmentée à J8 p.i. dans les animaux infectés et à J14 p.i. chez les animaux infecté-traités, mais nous ignorons les conséquences biologiques de cette modulation, sur la réponse immunitaire de ces animaux et en particulier sur les cellules subissant ces modulations d'expression du FcγRIV. D'autre part, les résultats précédemment mentionnés montrent que le blocage du FcγRIV impactait grandement la survie des animaux infectés-traités, par le biais d'une diminution de la réponse humorale d'une partie des animaux, mais nous ignorons les conséquences de ce blocage sur les cellules de l'immunité innée qui expriment ce récepteur et notamment les neutrophiles (qui selon nos travaux récemment publiés ont un rôle dans l'induction de la réponse humorale endogène des animaux traités par immunothérapie). Pour répondre à ces questions j'ai étudié l'activation des neutrophiles issus de souris contrôles, infectées et infectées-traitées en présence ou en absence de l'AcM 9E9, bloquant le FcγRIV.

V.2.1 Rôle du FcγRIV dans le recrutement et l'activation des neutrophiles Ly6G^{hi}

a) Étude du recrutement et de l'activation phénotypique des neutrophiles

A J8 et J14 p.i. on remarque qu'il y a une augmentation du recrutement des neutrophiles dans les groupes d'animaux infectés (9E9 et CIso) comparé aux animaux contrôles et infectés-traités (**Figure 47A et B**). De façon cohérente avec des travaux précédents (Naranjo-Gomez et al., 2018), l'augmentation du recrutement des neutrophiles observée chez les animaux infectés est liée à l'augmentation du pourcentage de cellules infectées. Cependant je n'ai pas observé de différences significatives de recrutement entre les deux groupes d'animaux infectés (9E9 et CIso), ni entre les deux groupes de souris infectées-traités (9E9 et CIso), montrant que le blocage du FcγRIV, n'influe pas sur le recrutement de ces cellules.

J'ai ensuite évalué l'activation des neutrophiles en me basant sur les marqueurs de surface CD11b et CD62L, comme pour l'étude des neutrophiles *in vitro*. J'ai noté que les neutrophiles des groupes d'animaux infectés et infectés-traités sont significativement plus activés que ceux des groupes contrôles. (**Figure 47C et D**). De plus, le niveau d'activation est similaire entre les animaux infectés et infectés-traités. Par ailleurs, le blocage du FcγRIV n'a pas eu d'effet sur l'activation des neutrophiles.

Ainsi les résultats montrent que l'infection par FrCas^E induit une augmentation du recrutement des neutrophiles ainsi qu'une augmentation de leur activation, qui est d'ailleurs comparable à celle de l'activation des neutrophiles des animaux infectés-traités. En revanche les paramètres évalués n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle du FcγRIV dans l'activation phénotypique des neutrophiles *in vivo*.

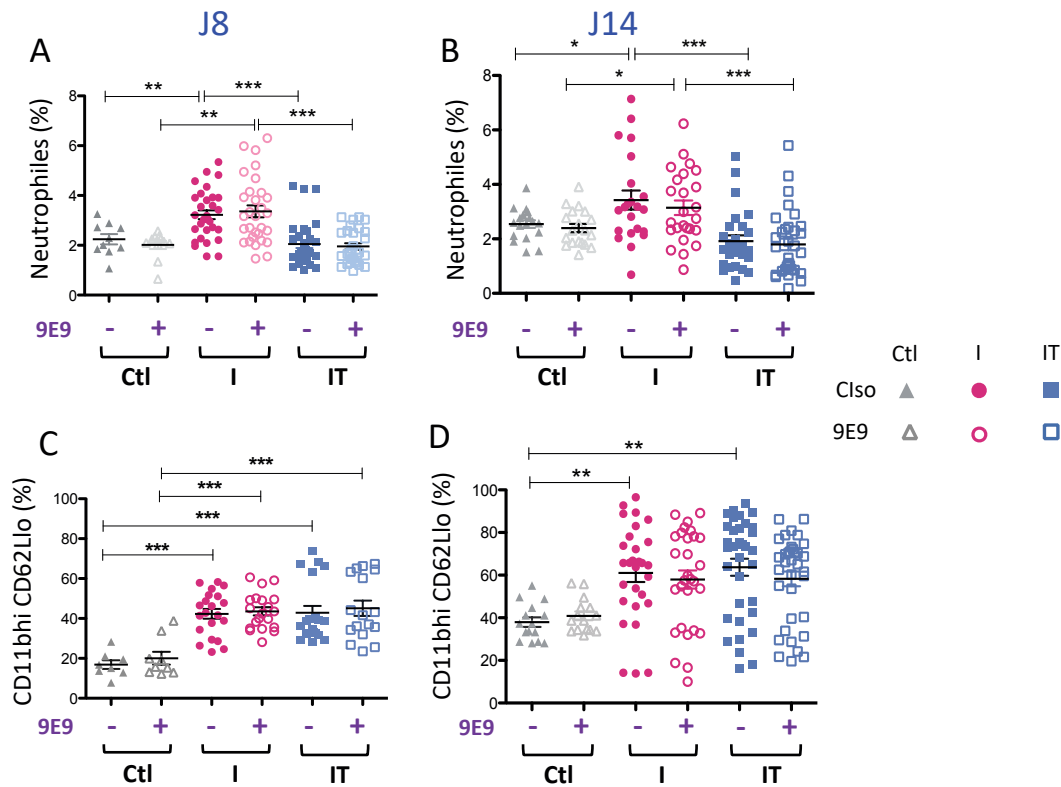


Figure 47 : Effet du blocage du FcγRIV sur la fréquence et activation des neutrophiles Ly6G^{hi} à J8 p.i. et J14 p.i., issus des différents groupes d'études.

(A-B). Fréquence de recrutement des neutrophiles définie par les marqueurs CD11b⁺ et Ly6G^{hi} à partir des leucocytes (CD45.2), issus des animaux contrôles CIs (triangle plein gris) et 9E9 (triangle vide gris) ; infectés CIs (rond plein rouge) et 9E9 (rond vide rouge) et infectés traités CIs (carré plein bleu) et 9E9 (carré vide bleu). CIs et 9E9 à J8 p.i. (A) et à J14 p.i. (B).

(C-D). Activation des neutrophiles Ly6G^{hi} évaluée par le pourcentage de neutrophiles CD11b^{hi} CD62L^{lo} issus des différents groupes d'animaux à J8 p.i. (C) et à J14 p.i. (D). Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. et 3 expériences indépendantes à J14 p.i. avec 3 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

Ces résultats sont cohérents avec les travaux précédents de l'équipe qui ont montré que l'activation phénotypique des neutrophiles *in vivo* était comparable entre les animaux infectés

et infectés-traités, en termes de marqueurs de surface mais que l'activation fonctionnelle présentait des différences (notamment la sécrétion de BAFF et de la lymphotoxine-alpha). Dans ce contexte, il est important d'identifier d'éventuelles différences d'activation fonctionnelle des neutrophiles qui pourraient moduler la réponse immunitaire. De plus il est tout aussi important d'élucider le rôle du FcγRIV dans cette activation en analysant notamment les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles issus des différents groupes d'animaux, à J8 et J14 p.i.

b) Étude de l'activation fonctionnelle des neutrophiles

Pour analyser l'activation fonctionnelle des neutrophiles, j'ai utilisé la même approche multiparamétrique LegendPlex que celle utilisée dans les expériences *in vitro* permettant la quantification de 13 chimiokines et 12 cytokines différentes (Cf **Figure 23**). Là encore cette technique était particulièrement adaptée en raison du faible volume de surnageant récolté, car les neutrophiles ont été cultivés en plaques de 96 puits et donc dans un faible volume.

En ce qui concerne le profil de sécrétion de chimiokines des neutrophiles Ly6G^{hi} analysé à J8 p.i., les résultats des trois différents groupes d'animaux (contrôles, infectés, infectés-traités) où l'anticorps anti-FcγRIV (9E9) a été administré, se sont révélés malheureusement difficilement interprétables, comme déjà mentionné.

En effet, pour des raisons restant à identifier, les résultats montrent des taux de sécrétion de l'ensemble des chimiokines plus importants dans le groupe contrôle 9E9 comparé au groupe contrôle CIs0 mais surtout comparé aux groupes d'animaux infectés et infectés-traités 9E9. De plus, on observe une forte diminution du taux de sécrétion de toutes les chimiokines étudiées chez les souris infectés 9E9 suggérant un effet du blocage du FcγRIV dans ce groupe d'animaux n'ayant pourtant pas reçu d'AcM thérapeutique. D'autre part, en ce qui concerne le profil cytokinique, on observe une augmentation du taux de sécrétion de différentes cytokines chez les souris infectées 9E9 suggérant à nouveau un effet du blocage du FcγRIV dans ce groupe d'animaux n'ayant pas reçu d'AcM thérapeutique. Ceci ne m'a malheureusement pas permis de statuer sur le rôle du FcγRIV dans la sécrétion de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles Ly6G^{hi}. D'autres expérimentations devront être réalisées pour faire la lumière sur ce point.

En revanche, l'analyse des trois groupes CIs0 (contrôles, infectés, infectés-traités) peut apporter des informations sur l'influence d'une infection virale ou d'une immunothérapie antivirale par AcM sur le profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles Ly6G^{hi}, ce qui n'a encore jamais été décrit. Ces résultats sont présentés dans les **Figures 48 et 49** et l'**Annexe 6**, et sont discutés ci-dessous.

Même si aucune conclusion ne peut être établie pour les raisons déjà mentionnées, j'ai pu constater, qu'à J8 p.i. l'ensemble des chimiokines testées ont toutes été retrouvées dans le profil de sécrétion des neutrophiles Ly6G^{hi} à des niveaux détectables (**Figure 48 et Annexe 6A**). Ce qui est d'autant plus intéressant c'est que sur les 13 chimiokines testées, 10 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL1, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL13) présentent une sécrétion plus importante chez les animaux infectés-traités (**Figure 48A**) comparé aux animaux contrôles et infectés, et 2 (CCL17, CCL22) présentent une sécrétion plus importante chez les animaux infectés (**Figure 48B**). Il est également important de noter que seulement 5 de ces chimiokines (CCL2, CXCL1, CXCL5, CCL3 et CCL4) étaient sécrétées par les neutrophiles activés *in vitro* par des virus ou des IC, suggérant l'influence de l'environnement inflammatoire

associé à l'infection virale et/ou à l'immunothérapie sur le conditionnement de l'activation fonctionnelle des neutrophiles Ly6G^{hi}.

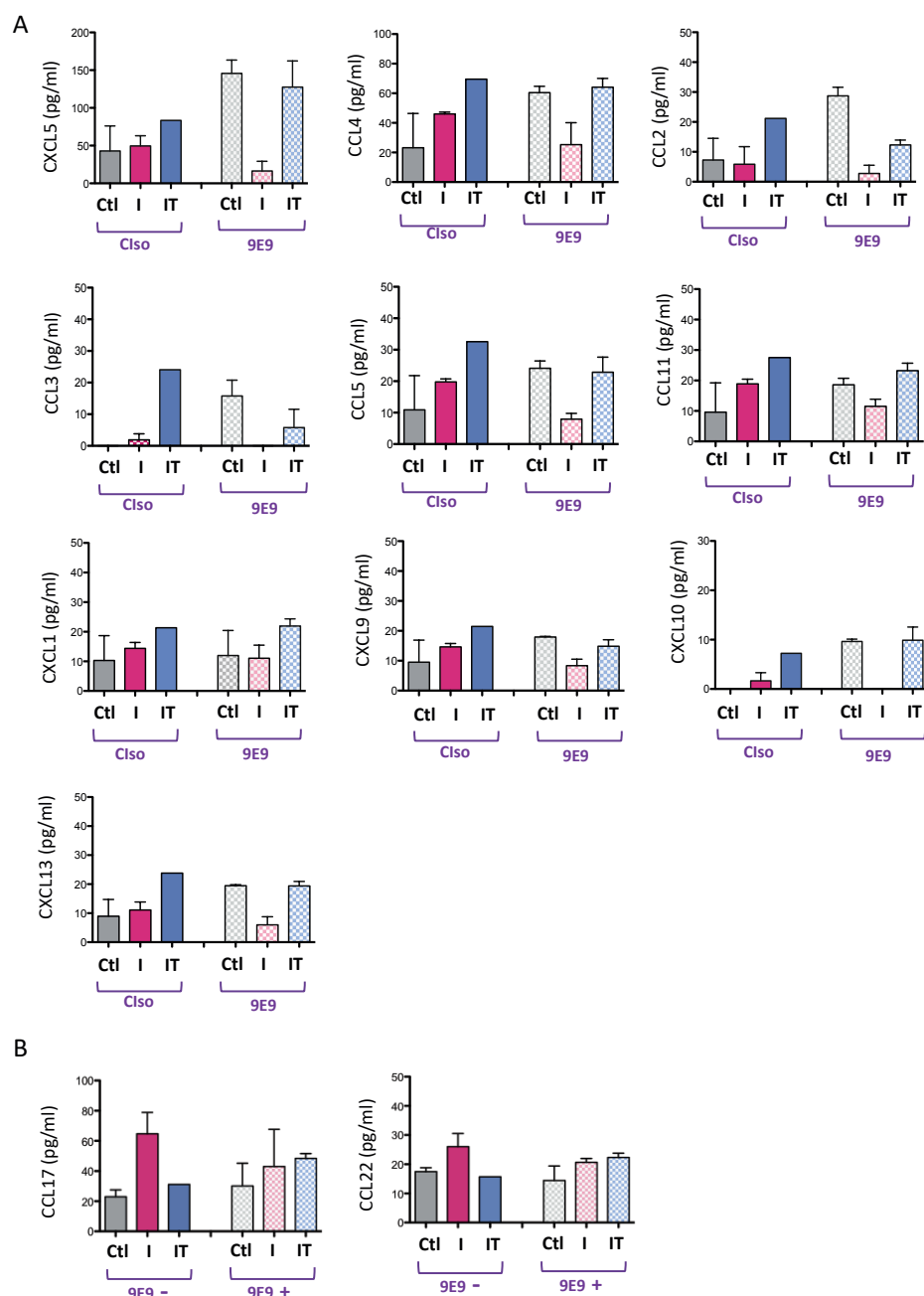


Figure 48 : Profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{hi} à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles Clso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés Clso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités Clso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair), avec 4 à 8 animaux par condition. Le dosage des chimiokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i., pour tous les groupes, à l'exception du groupe infecté-traité Clso où 1 seul échantillon a été analysé.

Il en va de même pour le profil de sécrétion cytokinique (**Figure 49 et Annexe 6B**), où l'ensemble des 12 cytokines testées ont pu être détectées, dont 11 cytokines (IL1 α , IL1 β , IL6, IL10, IL12p70, IL17A, IL23, IL27, IFN β , IFN γ , TNF α) sécrétées de façon plus importante chez les souris infectées-traitées, comparé au profil de sécrétion observé chez des souris infectées et/ou souris contrôles.

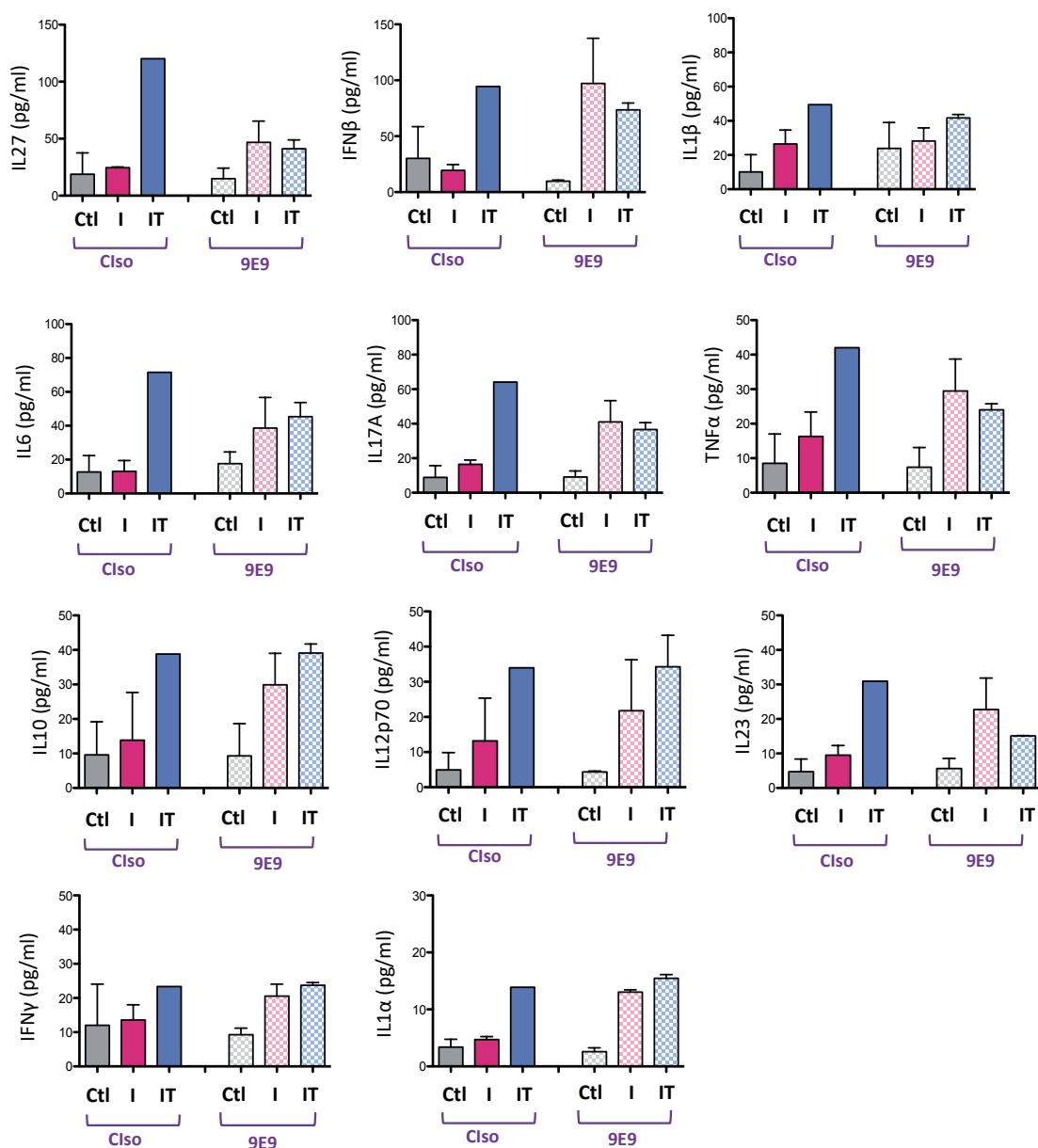


Figure 49 : Profil de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G^{hi} à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles Clso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés Clso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités Clso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair), avec 4 à 8 animaux par condition. Le dosage des chimiokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i., pour tous les groupes, à l'exception du groupe infecté-traité Clso où 1 seul échantillon a pu être analysé.

De façon intéressante, ces cytokines étaient très faiblement sécrétées par les neutrophiles activés *in vitro* par les virus et les IC (valeurs inférieures à 10 pg/ml), suggérant à nouveau la potentialisation de la sécrétion de cytokines par l'environnement inflammatoire.

Ainsi même si ces résultats doivent être confirmés en augmentant la taille de l'échantillon, ils suggèrent un conditionnement des neutrophiles Ly6G^{hi} par l'immunothérapie par AcM. En effet la pléiade de chimiokines et de cytokines sécrétées pourrait permettre aux neutrophiles, de moduler la réponse immune en recrutant les cellules immunitaires par le biais des chimiokines et en les activant par les cytokines. Ceci montre le potentiel immunomodulateur des neutrophiles à J8 p.i., et suggère un rôle central des cellules dans l'orchestration de la réponse immunitaire précoce dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

D'autre part de façon surprenante, à J14 p.i. les profils de sécrétion sont plus restreints qu'à J8 p.i. En effet seules 5 chimiokines sur 13 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL10) (**Annexe 7A**) et 2 cytokines sur 12 testées (IL23, TNF α) (**Annexe 7B**) ont été sécrétées à des niveaux détectables mais faibles. Parmi celles-ci aucune d'entre elles n'a présenté de différences notables entre les groupes d'animaux, la majorité étant sécrétées préférentiellement dans les animaux contrôles, suggérant donc l'absence d'effet de l'infection et/ou de l'immunothérapie.

En résumé, malgré le faible nombre d'échantillons testés, les résultats suggèrent que l'immunothérapie antivirale par AcM potentialise la sécrétion des cytokines et chimiokines par les neutrophiles Ly6G^{hi}. Les résultats suggèrent un potentiel effet immunomodulateur de cette population de neutrophiles par la sécrétion de nombreuses chimiokines et cytokines suite à l'immunothérapie par AcM.

De plus, il est intéressant de constater que si les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{hi}, sont abondants tant aux niveaux quantitatifs que qualitatifs à J8 p.i., ils sont négligeables à J14 p.i. En effet les quelques chimiokines et cytokines détectées présentent des valeurs faibles et ne montrent pas de différences entre les groupes. Cela nous donne une information sur la cinétique d'action des neutrophiles, qui semblent moduler très précocement la réponse immunitaire dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

V.2.2 Rôle immunomodulateur des neutrophiles Ly6G^{int}

a) Étude du recrutement et de l'activation phénotypique des neutrophiles Ly6G^{int}

A la différence de la population de neutrophiles Ly6G^{hi}, à J8 p.i. ni l'infection, ni l'immunothérapie n'entraîne d'augmentation significative de recrutement de la population de neutrophiles Ly6G^{int} (**Figure 50A**).

En revanche, on remarque à J14 p.i. une augmentation significative du recrutement de cette population de neutrophiles chez les animaux infectés CIso et infectés traités CIso, comparé aux animaux contrôles CIso (**Figure 50B**).

D'autre part et de façon surprenante, une diminution du pourcentage des neutrophiles Ly6G^{int} dans la rate est observée à J8 p.i. chez les animaux infectés ayant reçu l'anticorps 9E9. Cette diminution du pourcentage de cellules est également constatée à J14 p.i. pour les neutrophiles Ly6G^{int} issus des animaux infectés 9E9 et infectés-traités 9E9, comparé aux animaux infectés CIso et infectés traités CIso respectivement. Ces résultats montrent un effet du blocage du Fc γ RIV sur le recrutement des neutrophiles Ly6G^{int} suite à l'infection mais indépendamment

de l'immunothérapie, effet qui n'a pourtant pas été observé pour les neutrophiles Ly6G^{hi}, suggérant des fonctions et un rôle distinct de ces deux populations de neutrophiles.

Cependant lors de l'établissement du répertoire d'expression des FcγRs, j'avais constaté que la population de neutrophiles Ly6G^{int} exprimaient très fortement le FcγRIV en particulier dans le cadre de l'infection et de l'immunothérapie. Ainsi dans le but d'interpréter ces résultats il faudrait exclure la possibilité que la liaison massive du 9E9 sur cette population de neutrophiles due à la forte expression du FcγRIV, n'a pas de conséquences sur sa viabilité.

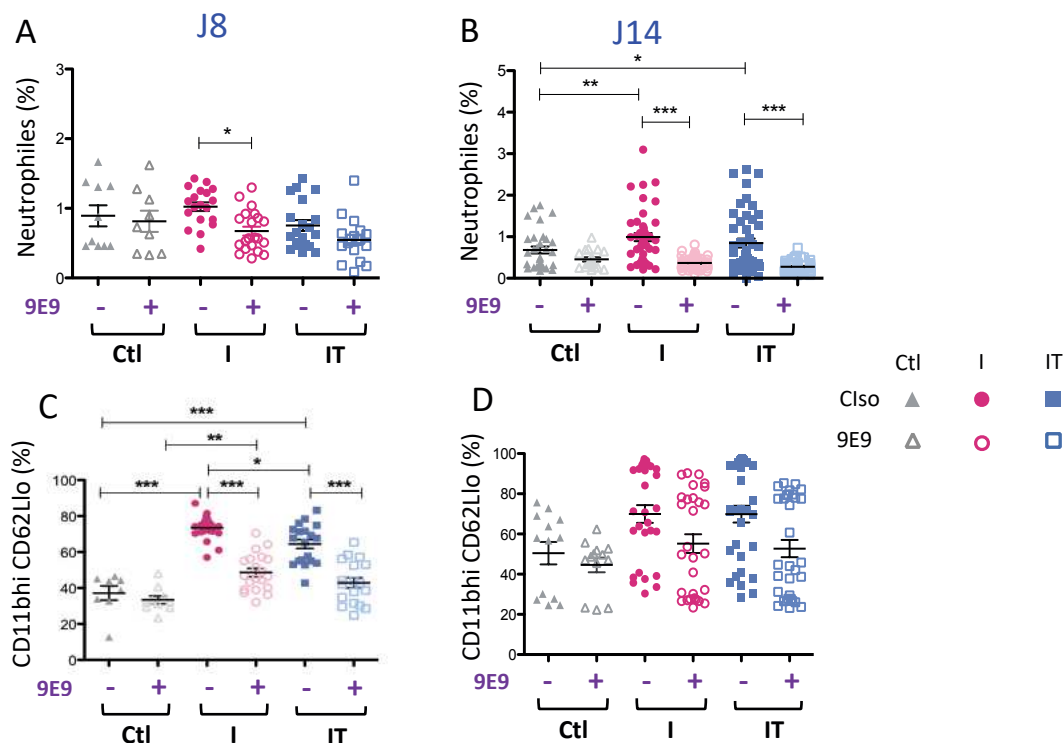


Figure 50 : Effet du blocage du FcγRIV sur la fréquence et activation des neutrophiles Ly6G^{int} à J8 p.i. et J14 p.i., issus des différents groupes d'études.

(A-B). Fréquence de recrutement des neutrophiles définie par les marqueurs CD11b+ et Ly6G^{int} à partir des leucocytes (CD45.2), issus des animaux contrôles Clso (triangle plein gris) et 9E9 (triangle vide gris) ; infectés Clso (rond plein rouge) et 9E9 (rond vide rouge) et infectés traités Clso (carré plein bleu) et 9E9 (carré vide bleu). Clso et 9E9 à J8 p.i. (A) et à J14 p.i. (B). (C-D). Activation des neutrophiles Ly6G^{int} évaluée par le pourcentage de neutrophiles CD11b^{hi} CD62L^{lo} issus des différents groupes d'animaux à J8 p.i. (C) et à J14 p.i. (D). Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. et 3 expériences indépendantes à J14 p.i. avec 3 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

J'ai ensuite évalué l'activation phénotypique des neutrophiles Ly6G^{int} en me basant sur les marqueurs de surface CD11b et CD62L (Figure 50C). L'activation des neutrophiles Ly6G^{int} à J8 est significativement plus importante chez les animaux infectés Clso par rapport aux animaux contrôles Clso et aux infectés-traités Clso. Ces derniers sont eux-mêmes significativement plus activés que les neutrophiles des animaux contrôles Clso. On constate également que le blocage du FcγRIV entraîne une diminution de l'état d'activation des neutrophiles issus des animaux infectés-traités, suggérant un rôle important de ce récepteur dans l'activation des neutrophiles Ly6G^{int}. Étonnamment, cette diminution d'activation suite

au blocage du Fc γ RIV est aussi effective sur les neutrophiles issus des animaux infectés, soulevant à nouveau l'hypothèse que la liaison massive du 9E9 sur cette population, exprimant fortement le Fc γ RIV, peut affecter leurs fonctions de façon indépendante du traitement par l'AcM.

Par contre à J14 p.i. même si le taux d'activation des neutrophiles Ly6G^{int} issus d'animaux infectés CIs et des animaux infectés-traités CIs est en moyenne supérieure à celui des neutrophiles Ly6G^{int} issus d'animaux contrôles, aucune différence significative n'a été mise en évidence. (**Figure 50D**). En effet, on observe une grande variabilité dans le taux d'activation de cette population de neutrophiles pour chacune des 3 expériences réalisées.

En sommes, les résultats montrent que cette population de neutrophiles est particulièrement sensible à un contexte inflammatoire. A J8 p.i., même s'il n'y a pas de différences significatives en termes de recrutement de ces cellules, on remarque qu'elles sont plus activées dans les contextes inflammatoires, à savoir chez les animaux infectés et infectés-traités CIs. A J14 p.i., c'est dans ces mêmes groupes d'animaux on observe un recrutement plus important, en revanche l'augmentation de leur activation n'est pas significative.

Par ailleurs le blocage du Fc γ RIV, affecte le recrutement et l'activation des neutrophiles issus d'animaux infectés traités, mais aussi curieusement le recrutement et l'activation des neutrophiles des animaux infectés. Si l'effet du blocage du Fc γ RIV sur les neutrophiles des animaux infectés-traités pouvait être attendu, ce n'est pas le cas de son effet sur les animaux infectés. En effet, le blocage du Fc γ RIV exprimé sur les neutrophiles Ly6G^{int}, peut potentiellement impacter l'action de l'immunothérapie en empêchant la liaison des IC à la surface des cellules, mais expliquer son rôle dans un contexte infectieux sans immunothérapie nécessite de nouvelles investigations.

b) Étude de l'activation fonctionnelle des neutrophiles Ly6G^{int}

De façon similaire à ce qui a été fait pour les neutrophiles Ly6G^{hi}, j'ai réalisé le profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles Ly6G^{int}, à J8 et J14 p.i., issus des 6 différents groupes d'animaux.

Comme pour les neutrophiles Ly6G^{hi}, les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des animaux ayant reçu l'anticorps anti-Fc γ RIV, sont difficilement interprétables. On observe à nouveau un effet du blocage sur la sécrétion de nombreuses chimiokines et cytokines par les neutrophiles issus d'animaux contrôles et animaux infectés, ce qui ne permet pas de statuer sur le rôle du Fc γ RIV dans le profil de sécrétion des neutrophiles Ly6G^{hi} suite à l'immunothérapie.

Par contre, en absence de blocage du Fc γ RIV, on peut constater quelques observations intéressantes sur l'effet de l'immunothérapie. A J8 p.i., 10 chimiokines sur 13 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL1 et CXCL5) sont sécrétées à des niveaux détectables et présentent des différences de sécrétion entre les différents groupes d'animaux. (**Figure 51**)

Certaines chimiokines semblent davantage sécrétées par les neutrophiles Ly6G^{int} issus des animaux infectés-traités, c'est le cas de CCL17 et de CCL22 (**Figure 51A**), contrairement aux neutrophiles Ly6G^{hi} où ces chimiokines étaient davantage produites par les neutrophiles provenant d'animaux infectés. (**Figure 48**)

De façon inattendue, les 8 autres chimiokines détectées sont quant à elles majoritairement sécrétées par les neutrophiles Ly6G^{int} issus animaux infectés notamment CXCL5, CCL5,

CCL20, CXCL1 et CCL3, (**Figure 51B**). On constate ici l'influence de l'immunothérapie sur le profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{int} à J8 p.i.

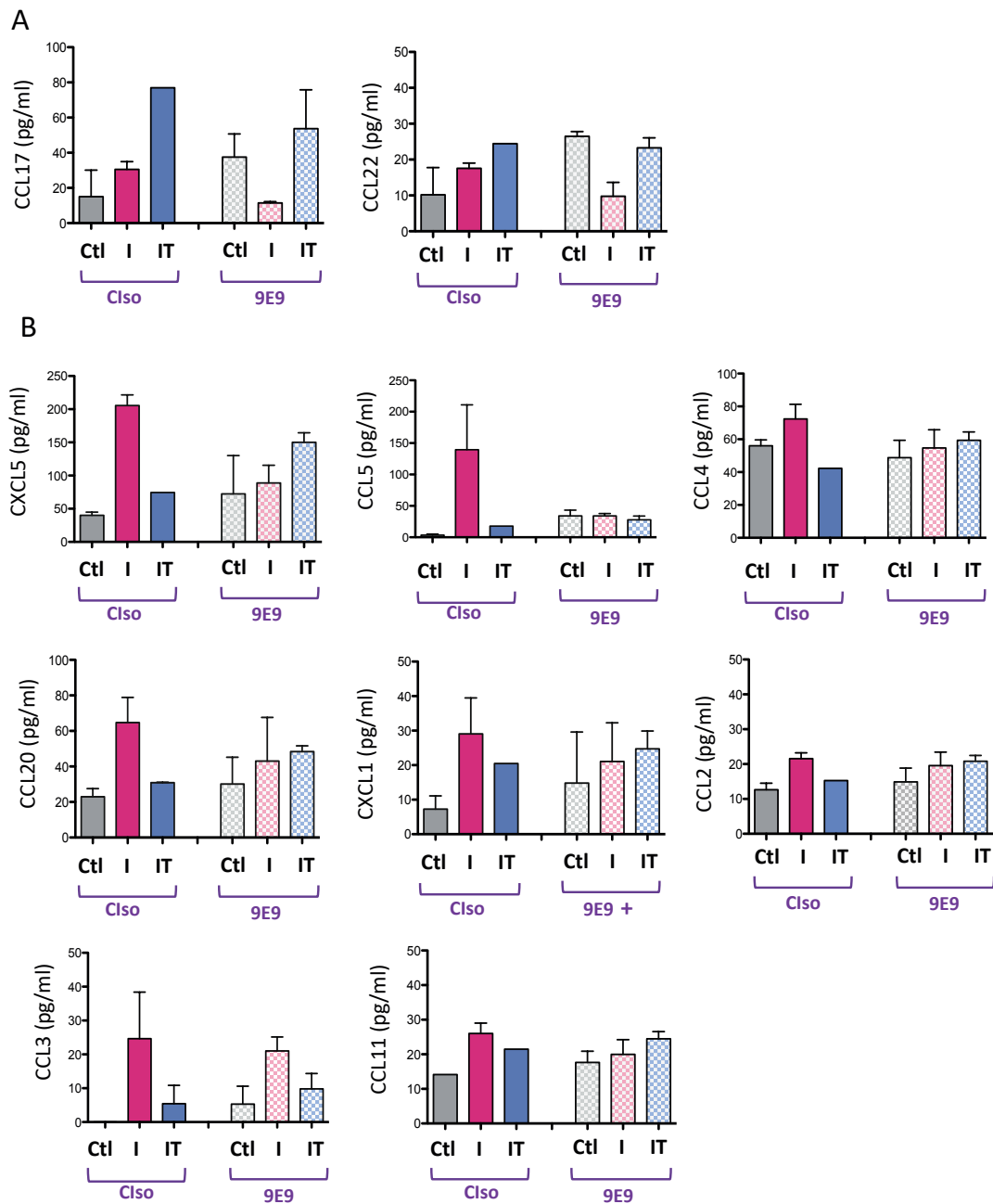


Figure 51 : Profil de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{int} à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles Clso (gris foncé) et 9E9 (gris clair); infectés Clso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités Clso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair), avec 4 à 8 animaux par condition. Le dosage des chimiokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i., pour tous les groupes, à l'exception du groupe infecté-traité Clso où 1 seul échantillon a été analysé.

En ce qui concerne la sécrétion cytokinique, on observe une faible augmentation du taux de sécrétion de 4 cytokines (IL1 β , IL10, IL23, IL27) sur les 12 analysées, par les neutrophiles issus des animaux infectés-traités CIsO (**Figure 52**) en comparaison avec ceux des souris contrôles CIsO et/ou souris infectées CIsO.

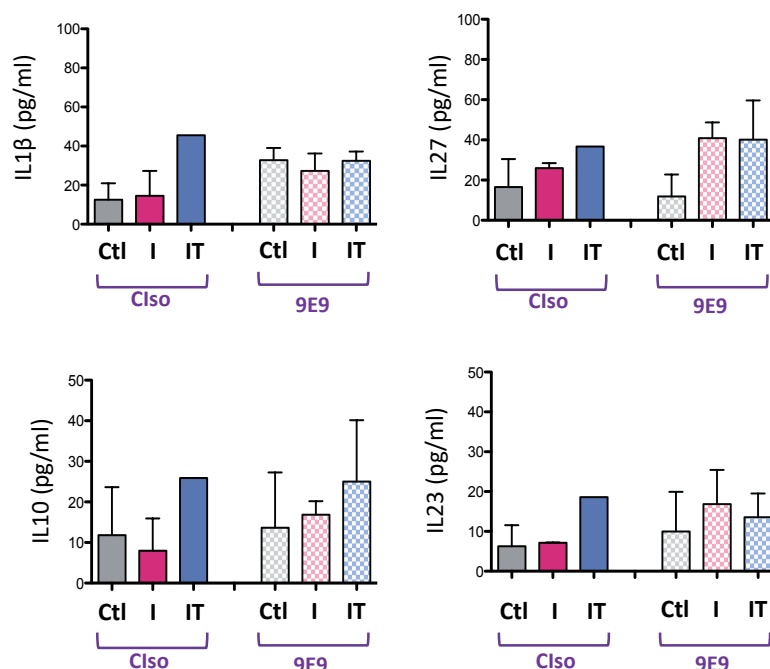


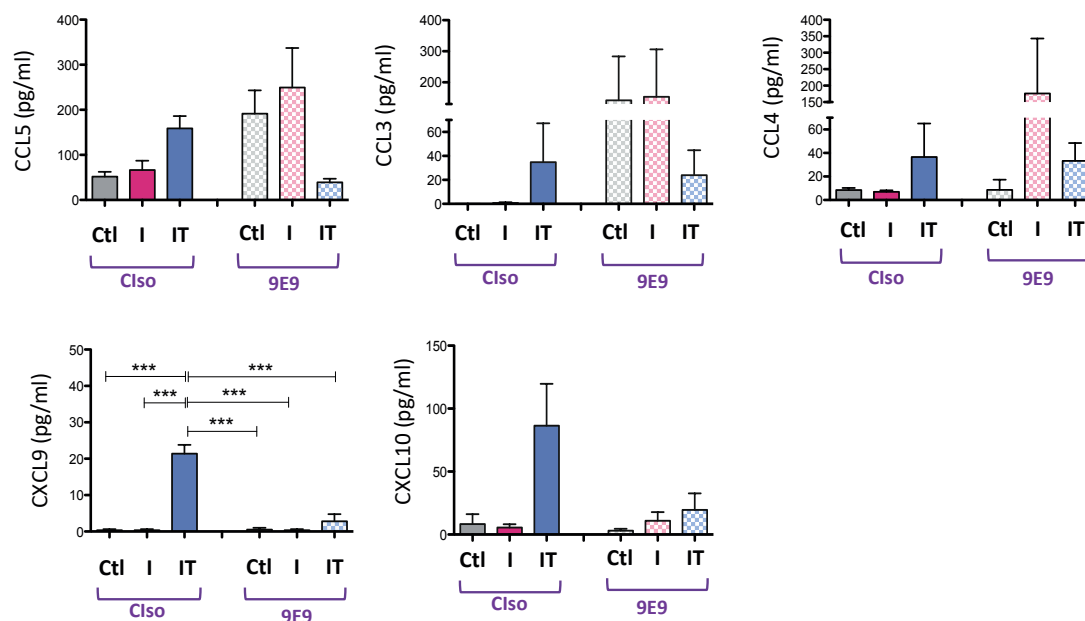
Figure 52: Profil de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G^{int} à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles CIsO (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés CIsO (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités CIsO (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair) avec 4 à 8 animaux par condition. Le dosage des chimiokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i., pour tous les groupes, à l'exception du groupe infecté-traité CIsO où 1 seul échantillon a été analysé.

Comme auparavant, pour des raisons de clarté, les autres cytokines, comme chimiokines sécrétées à des concentrations détectables mais ne présentant pas de variations liées à l'immunothérapie sont présentées en **Annexes 8A** et **8B** pour J8 p.i. et en **Annexes 9A** et **9B**, pour J14 p.i..

De façon intéressante, à J14 p.i., 5 chimiokines sur 13 sont détectables et plus fortement sécrétées par les neutrophiles Ly6G^{int} issus des animaux infectés-traités. Il a été notamment observé une augmentation importante de la sécrétion des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5, (dont la potentialisation de leur sécrétion par l'immunothérapie a aussi été observée sur des neutrophiles Ly6G^{hi}) ainsi que de deux chimiokines sécrétées en réponse à l'IFN, CXCL10 et CXCL9, dont la dernière de façon significative (**Figure 53A**). A noter que parmi les 12 cytokines analysées, on détecte une forte augmentation de la sécrétion de 3 cytokines inflammatoires (IFN γ , IL6, TNF α ,) par les neutrophiles Ly6G^{int} issus des souris infectées-traitées comparé à ceux des souris contrôles et des souris infectées (**Figure 53B**). La sécrétion de l'IFN γ est cohérente avec l'augmentation de la sécrétion de CXCL9 et CXCL10 observée suite à l'immunothérapie.

A



B

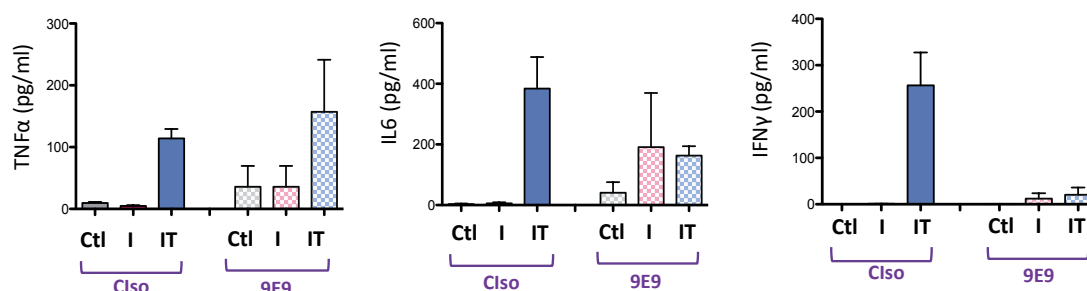


Figure 53 : Profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles Ly6G^{int} à J14 p.i.

Les neutrophiles ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles Clso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés Clso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités Clso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines et des cytokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes à J14 p.i. avec 3 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

En somme, il ne me m'est pas possible de statuer sur le rôle du blocage du FcγRIV sur l'activation fonctionnelle des Ly6G^{int} suite à l'immunothérapie, en raison de l'effet du 9E9 constaté sur les cellules issues d'animaux contrôles. En revanche, les résultats obtenus à partir des groupes d'animaux Clso, permettent de faire quelques constatations sur l'influence de l'infection ou de l'immunothérapie sur les profils de sécrétions des neutrophiles Ly6G^{int}. Tout d'abord, on remarque qu'à J8 p.i. certaines chimiokines semblent être majoritairement sécrétées dans les animaux infectés alors que d'autres, tout comme 4 cytokines détectées, sont davantage sécrétées chez les souris infectées-traitées, suggérant une modulation induite par l'infection et l'immunothérapie sur les neutrophiles Ly6G^{int}. Cependant en raison des faibles différences de sécrétion observées entre les différents groupes d'animaux et/ou du faible nombre

d'expérimentations, ces observations ne restent que des constations et aucune conclusion ferme ne peut pas être faite.

De façon encourageante, les résultats obtenus à J14 p.i. sont plus homogènes et plus convaincants. Notamment on peut observer une augmentation importante du taux de sécrétion de 5 chimiokines (CCL5, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10) et de 3 cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL6, TNF α) par les neutrophiles issus des animaux infectés-traités, comparé aux animaux contrôles et infectés CIso. Ces résultats suggèrent un effet de l'immunothérapie dans la potentialisation de sécrétion de ces chimiokines/cytokines. Cependant, en raison de la forte variabilité observée et de la taille réduite de l'échantillon, ces différences, malgré très importantes, n'atteignent pas des différences significatives, excepté pour CXCL9. Des expériences complémentaires devront donc être réalisées pour confirmer ou infirmer ces résultats.

De plus il est également intéressant de constater que les profils de sécrétion chimiokinique et surtout cytokinique diffèrent entre J8 et J14 p.i. Notamment les chimiokines CXCL9 et CXCL10 qui sont présentes à J14 mais pas à J8 dans les animaux infectés-traités, ce qui peut être expliqué par la présence d'IFN γ , à J14 p.i. et non à J8 p.i. Il ne faut pas non plus négliger l'importance de l'âge des animaux, qui pourrait influencer sur la maturation de ces cellules et donc sur leurs fonctions, dans le cas présent immunomodulatrice.

En ce qui concerne les cytokines, celles sécrétées à J8 (IL1 β , IL10, IL23, IL27) sont impliquées dans diverses réponses aussi bien pro, qu'anti-inflammatoire, alors qu'à J14 ces cytokines ne sont plus détectées. Par contre, 3 autres cytokines inflammatoires (IFN γ , IL6, TNF α) sont sécrétées de façon importante à J14 p.i. Ces résultats suggèrent que l'immunothérapie antivirale par AcM, potentialise l'activation fonctionnelle des neutrophiles Ly6G^{int}, en modulant la sécrétion de cytokines et de chimiokines, sécrétion qui évolue manifestement au cours du temps.

Enfin, de façon surprenante on remarque que le profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles Ly6G^{int} est clairement différent de celui des neutrophiles Ly6G^{hi} (**Tableaux 5 et 6**). En effet, à J8 p.i. la quasi-totalité des chimiokines sont sécrétées dans les deux cas, néanmoins elles sont majoritairement sécrétées chez les animaux infectés-traités pour les neutrophiles Ly6G^{hi}, à la différence des neutrophiles Ly6G^{int} où les nombreuses chimiokines sont sécrétées de façon plus importante chez les animaux infectés. De plus, la sécrétion de cytokines à J8 p.i. est riche (tant en diversité qu'en quantité) pour les neutrophiles Ly6G^{hi} alors qu'elle est plus restreinte pour les Ly6G^{int}. En revanche, à J14 p.i. les productions de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles Ly6G^{hi} sont très faibles alors qu'elles sont abondantes pour les neutrophiles Ly6G^{int} en particulier pour les animaux infectés-traités.

L'ensemble des résultats suggère que dans le cadre d'une immunothérapie antivirale les neutrophiles Ly6G^{hi} pourraient avoir un rôle immunomodulateur précoce à J8 p.i. alors que les neutrophiles Ly6G^{int} auraient un rôle prédominant à J14 p.i. Désormais il serait intéressant de caractériser les interactions entre ces cellules dans ce contexte d'immunothérapie antivirale par AcM, afin de déterminer notamment si l'activation des neutrophiles Ly6G^{int} à J14 p.i. est le résultat de la potentialisation de l'activation des neutrophiles Ly6G^{hi} par l'immunothérapie à J8 p.i.

V.3. Rôle immunomodulateur des monocytes *in vivo*

Les monocytes Ly6C^{hi} font également partie des cellules qui expriment le FcγRIV, et dont l'expression est influencée par un contexte infectieux ou d'immunothérapie antivirale par AcM. D'autre part les résultats *in vitro* ont montré que les neutrophiles activés par les virus et les IC sécrétaient de grandes quantités de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes, en particulier CCL2. Il était donc aussi pertinent d'étudier, d'une part, les conséquences biologiques de la modulation du FcγRIV à la surface des monocytes dans les différents contextes infectieux et immunothérapie antivirale et, d'autre part, d'étudier l'effet du blocage du FcγRIV sur l'activation des monocytes. Pour cela l'activation phénotypique et fonctionnelle des monocytes a été réalisée, de la même façon que ce qui a été fait pour les neutrophiles à J8 et J14 p.i.

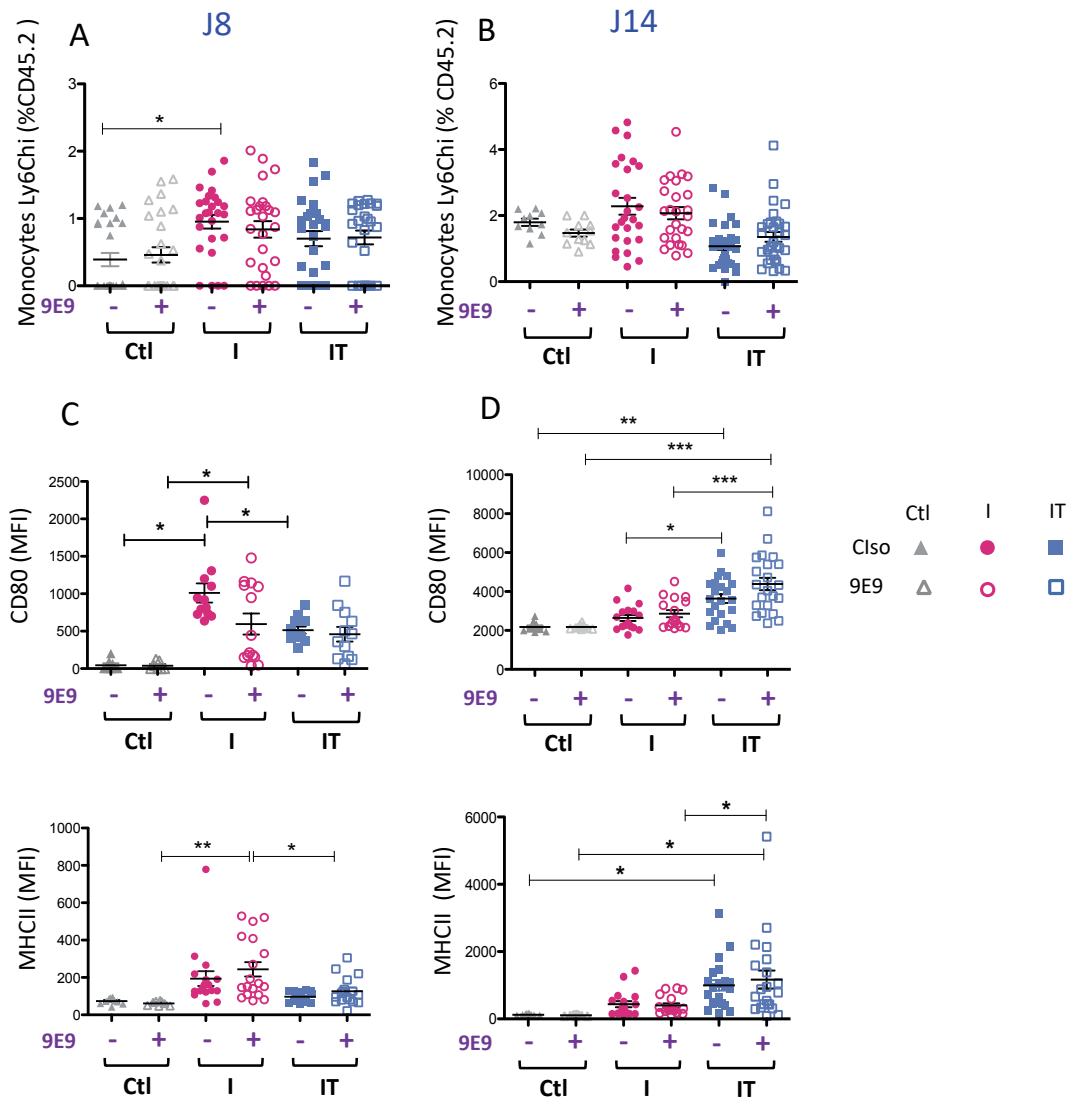
V.3.1. Étude du recrutement et de l'activation phénotypique des monocytes

A J8 p.i., on observe une augmentation du recrutement des monocytes chez les animaux infectés CIso par rapport aux animaux contrôles. (**Figure 54A**). En revanche, à J14 p.i. aucune différence significative de recrutement des monocytes n'est observée entre les différents groupes d'animaux. (**Figure 54B**). De plus, le blocage du FcγRIV n'impacte pas le recrutement des monocytes quel que soit le temps post infection analysé ou quelque soit les conditions expérimentales.

Pour mesurer l'activation, des marqueurs couramment utilisés dans la littérature pour quantifier l'activation des monocytes ont été utilisés, le CD80 et le MHCII.

De façon similaire au pourcentage de recrutement des monocytes à J8 p.i., l'activation des monocytes issus des animaux infectés CIso est significativement plus importante (constatée par la surexpression de CD80), à celle observée chez les animaux contrôles et infectés-traités CIso. (**Figure 54C**). A J14 p.i. cependant, l'activation des monocytes issus des animaux infectés-traités CIso est supérieure à celle des monocytes issus des groupes contrôles et/ou infectés CIso (constaté par la surexpression de CD80 et de MHCII). De plus, que ce soit à J8 ou à J14 p.i., le blocage du FcγRIV n'a pas d'effet significatif sur l'activation des monocytes Ly6C^{hi} (**Figure 54D**).

Pour conclure, les résultats montrent que les conditions d'infection virale entraînent une augmentation du recrutement des monocytes à J8 p.i. Cette augmentation du pourcentage du recrutement est associée à une augmentation de l'activation des monocytes des animaux infectés à J8 p.i comparé aux animaux contrôles et infectés-traités. A J14 p.i., si l'on ne note pas de différences de recrutement entre les différents groupes d'animaux, on remarque qu'il y a une augmentation de l'activation des monocytes des animaux infectés-traités, comparé aux animaux infectés et contrôles que le FcγRIV ait été bloqué ou non. L'immunothérapie par AcM semble donc particulièrement importante dans l'activation des monocytes à J14 p.i. mais elle n'est pas dépendante du FcγRIV, puisque le blocage de ce récepteur n'affecte ni le recrutement ni l'activation des monocytes à J8 et à J14 p.i



V.3.2. Étude de l'activation fonctionnelle des monocytes

Les résultats précédents ont montré que les contextes d'infection et d'immunothérapie par AcM peuvent moduler l'activation des monocytes d'un point de vue phénotypique, mais ne permettent pas de connaître leurs effets sur l'activation fonctionnelle des monocytes inflammatoires. D'autre part, si le blocage du FcγRIV n'a pas montré d'impact sur le recrutement et l'activation phénotypique des monocytes, aucune donnée n'existe sur les conséquences de ce blocage sur l'activation fonctionnelle des monocytes et notamment sur la sécrétion de cytokines et de chimiokines.

Tout d'abord, les profils de sécrétion des chimiokines et cytokines sécrétées par les animaux où le FcγRIV a été bloqué sont, comme déjà mentionné, difficilement interprétables de par la forte sécrétion cytokinique et chimiokinique retrouvée dans les animaux contrôles (comparés aux animaux infectés et infectés-traités pour certaines chimiokines) ainsi que pour la grande variabilité expérimentale. Pour ces raisons, ils ne seront pas discutés.

Mes interprétations seront donc focalisées sur les trois groupes d'animaux CIsO (contrôles, infectés, infectés-traités) où le FcγRIV n'a pas été bloqué.

A J8 p.i., sur les 13 chimiokines testées, seules deux chimiokines (CXCL1 et CCL22) (**Figure 55**), sont détectées avec une sécrétion plus importante pour les animaux infectés-traités. Les autres chimiokines et cytokines testées, qui ont toutes été détectées, sont soit plus fortement sécrétées par les monocytes issus des animaux contrôles, soit ne présentent pas de différences de sécrétion entre les groupes. Ces données sont présentées en **Annexes 10 et 11**.

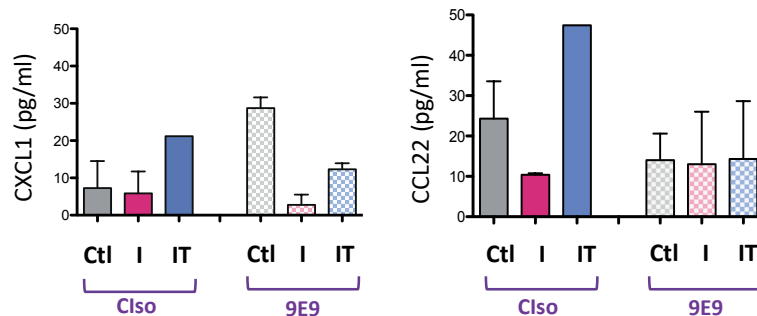


Figure 55 : Profil de sécrétion chimiokinique des monocytes Ly6C^{hi} à J8 p.i.

Les monocytes ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles CIsO (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés CIsO (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités CIsO (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair), avec 4 à 8 animaux par condition. Le dosage des chimiokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. pour tous les groupes d'animaux, à l'exception du groupe infecté-traité CIsO où 1 seul échantillon a pu être analysé.

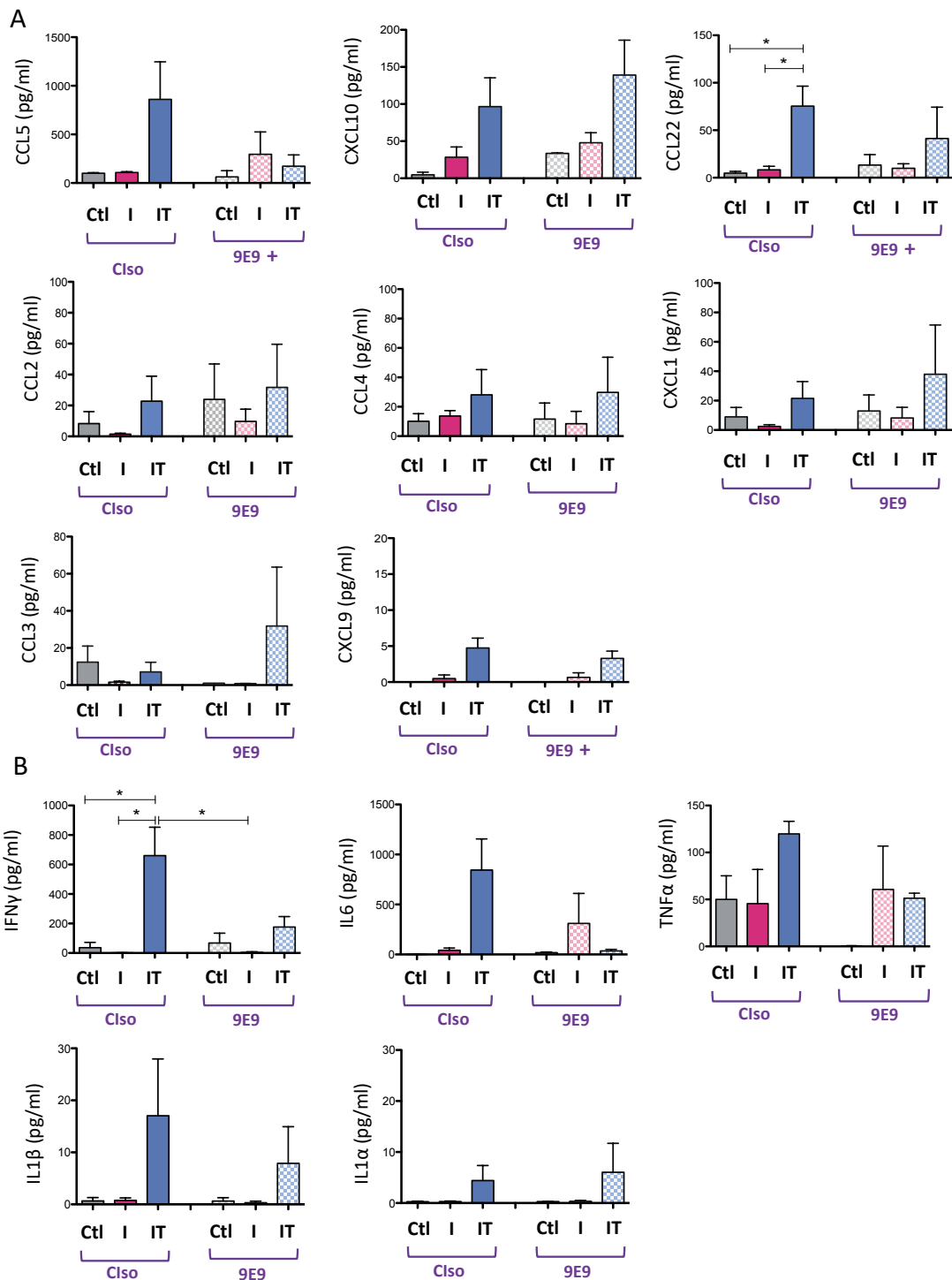


Figure 56 : Profil de sécrétion cytokinique des monocytes Ly6C^{hi} à J14 p.i.

Les monocytes ont été triés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles Clso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés Clso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités Clso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des cytokines sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes à J14 p.i. avec 3 à 8 animaux par groupe et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

En revanche, à J14 p.i., 7 chimiokines sur les 13 testées (CCL2, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL1, CXCL9, CXCL10) ont été détectées de façon plus importante chez les animaux infectés-traités comparé aux groupes d'animaux contrôles et/ou infectés, dont 2 de façon significative (CCL22 et CXCL9). (**Figure 56A**). Par ailleurs le profil cytokinique comporte 5 cytokines détectées sur les 12 testées dont 5 (IL1 α , IL1 β , IL6, IFN γ , TNF α) qui sont majoritairement sécrétées chez les animaux infectés-traités, dont l'IFN γ de façon significative (**Figure 56B**). Il est intéressant de noter que ces cytokines, sont toutes impliquées dans des processus inflammatoires. Par ailleurs, on observe aussi la sécrétion de la cytokine immunomodulatrice IFN β par des monocytes issus de souris infectés et infectées-traitées (non sécrétée par les monocytes issus des souris contrôles), bien que les niveaux observés soient proches du seuil de détection. De façon similaire aux résultats obtenus pour les neutrophiles Ly6G^{int}, en raison de la forte variabilité observée et de la taille réduite de l'échantillon, les différences de sécrétion observées, malgré leur importance, n'atteignent pas des différences significatives, excepté pour CCL22, CXCL9 et IFN γ . A nouveau, la sécrétion de l'IFN γ observée est cohérente avec l'augmentation de la sécrétion de CXCL9 et CXCL10, décrite comme IFN-dépendante. Bien qu'encourageantes, des expériences complémentaires devront être réalisées pour statuer sur ces résultats.

Néanmoins ces résultats suggèrent que l'activation des monocytes inflammatoires est potentialisée dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM et plus particulièrement à J14 p.i. En effet, à J8 p.i. les monocytes issus des animaux infectés-traités sont significativement moins activés que les monocytes issus des animaux infectés. Par ailleurs, l'immunothérapie semble avoir peu ou pas d'effet sur leur profil de sécrétion chimiokinique/cytokinique. En revanche, à J14 p.i. l'activation des monocytes issus des animaux infectés-traités est significativement supérieure à celle observée chez les animaux contrôles et les animaux infectés, tant au niveau de l'activation phénotypique que fonctionnelle avec une sécrétion importante de chimiokines et de cytokines chez les animaux infectés-traités. Cependant le faible nombre d'expérimentations est à prendre en considération et de nouvelles expérimentations devront être réalisées afin d'établir des conclusions définitives.

V.4. Bilan des profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique *ex vivo* des cellules exprimant le Fc γ RIV dans les différents contextes de notre modèle expérimental

Au travers de ces travaux je me suis intéressée à l'étude des mécanismes d'activation des neutrophiles par les IC dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM. Pour cela, j'ai utilisé des approches à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces deux contextes *in vitro* et *in vivo* ne sont bien sûr pas équivalents mais le croisement des résultats de ces deux études peut permettre de renforcer certains messages. En effet, les conditions *in vitro* peuvent représenter une situation simplifiée des conditions *in vivo*, avec l'activation par le virus représentant l'infection et la stimulation par les IC représentant le contexte d'immunothérapie.

Premièrement, bien que les résultats *in vivo* doivent être interprétés avec précaution en raison du faible nombre d'échantillons/expériences, j'ai observé une similarité dans les profils de sécrétion chimiokinique des neutrophiles *in vitro* et *ex vivo* (**Tableau 5**). En effet même si la source des cellules est différente, moelle osseuse pour l'étude *in vitro* et rate pour l'étude *ex vivo*, on note que les chimiokines sécrétées après stimulation par le virus ou l'IC *in vitro* (CCL2, CCL3, CCL4, CCL22, CXCL1 et CXCL5), sont également retrouvées dans le profil de

sécrétion *ex vivo* dans les animaux infectés mais surtout infectés-traités. Néanmoins les chimiokines ne sont pas sécrétées avec la même intensité. Plusieurs chimiokines issues du profil *ex vivo* ont une concentration plus élevée qu'*in vitro*, c'est le cas de CCL3, CCL4 et CCL22. Cependant, pour interpréter ces différences il faut prendre en compte un éventuel effet de l'environnement inflammatoire, mais aussi de la quantité de cellules utilisées, plus faible dans les expériences *in vitro* (**Figure 20**) par rapport aux expériences *ex-vivo* (**Figure 45**).

A l'inverse, certaines chimiokines très fortement sécrétées dans des conditions *in vitro* (CCL2, CXCL1 et CXCL5), (**Figure 24**) sont faiblement détectées dans les expériences *ex-vivo* (**Figure 48**). De plus, d'autres chimiokines absentes du profil *in vitro* sont présentes dans le profil *ex vivo*. Notamment, des chimiokines décrites comme étant dépendantes de la présence d'IFN, CXCL9 et CXCL10, ainsi que CCL5. Cette sécrétion IFN-dépendante a pu être confirmée par les expérimentations *in vitro* où des IFN de type I et II ajoutés aux conditions de stimulations composées par les virus ou les IC, ont permis la sécrétion de CXCL10. J'ai ainsi vérifié que l'activation des neutrophiles par l'IFN de type I ou II permettait la sécrétion de CXCL10. De façon intéressante, j'ai aussi mis en évidence dans les expériences *ex-vivo*, qu'une augmentation de CXCL9, CXCL10 et de CCL5 était associée à une augmentation de la sécrétion d'IFN γ (**Tableaux 5 et 6**)

							
<i>In vitro</i> Ly6G ^{hi} (IC)				<i>Ex vivo</i> Ly6G ^{hi} (IT)		<i>Ex vivo</i> Ly6G ^{int} (IT)	
Milieu	TNF α	IFN γ	IFN α 11	J8	J14	J8	J14
CCL2				CCL2			
CCL3				CCL3			CCL3
CCL4		CCL4	CCL4	CCL4			CCL4
	CCL5	CCL5	CCL5	CCL5			CCL5
				CCL11			
						CCL17	
CCL22						CCL22	
CXCL1	CXCL1			CXCL1			
CXCL5				CXCL5			
				CXCL9			CXCL9
		CXCL10	CXCL10	CXCL10			CXCL10
				CXCL13			

Tableau 5 : Profils de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{hi} (*in vitro* et *ex vivo*) et Ly6G^{int} (*ex vivo*) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM

Tableau récapitulatif des chimiokines produites : (i) *in vitro* suite à l'activation des neutrophiles Ly6G^{hi} par les IC seuls (Milieu), (ii) puis potentialisées par les cytokines inflammatoires (TNF α et IFN γ) ou immunomodulatrice (IFN α 11) et (iii) *ex vivo* à partir des neutrophiles Ly6G^{hi} triés à partir des rates des animaux infectés traités.

D'autre part, le profil de sécrétion cytokinique qui est quasi inexistant *in vitro* (**Figure 24**) est en revanche abondant et diversifié *ex vivo*, (**Figure 48**) en particulier chez les animaux infectés-traités (**Tableau 6**). Ces différences de concentrations de sécrétion de chimiokines et de cytokines entre les deux études peuvent s'expliquer par la complexité de l'environnement inflammatoire qui règne *in vivo*, ou dans le contexte d'une infection virale.

							
<i>In vitro</i> Ly6G ^{hi} (IC)				<i>Ex vivo</i> Ly6G ^{hi} (IT)		<i>Ex vivo</i> Ly6G ^{int} (IT)	
Milieu	TNFα	IFNγ	IFNα11	J8	J14	J8	J14
				IL1α			
				IL1β		IL1β	
				IL6			IL6
				IL10		IL10	
				IL12p70			
				IL17A			
				IL23		IL23	
				IL27		IL27	
				IFNβ			
				IFNγ			IFNγ
	TNFα			TNFα			TNFα
	BAFF			ND			

Tableau 6 : Profils de sécrétion cytokinique des neutrophiles Ly6G^{hi} (*in vitro* et *ex vivo*) et Ly6G^{int} (*ex vivo*) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM

Tableau récapitulatif des cytokines produites : (i) *in vitro* par l'activation des neutrophiles Ly6G^{hi} par les IC seuls (Milieu), (ii) potentialisées par les cytokines inflammatoires (TNFα et IFNγ) ou immunomodulatrice (IFNα11) et (iii) *ex vivo* par les neutrophiles Ly6G^{hi} triés à partir des rates des animaux infectés traités. (ND) : non déterminé.

Par ailleurs, *in vitro* (**Figure 24**) seule une chimiokine, CCL4 est plus significativement sécrétée par les neutrophiles suite à la stimulation par les IC comparé au virus seul, or *ex vivo* à J8 p.i. (**Figure 48**), quasiment l'ensemble des chimiokines et cytokines testées semblent être sécrétées de façon plus importante chez les animaux soumis à l'immunothérapie par AcM. C'est notamment le cas de CCL3, dont les expériences *in vitro* suggéraient une potentialisation de sa sécrétion par les IC mais la variabilité des résultats obtenus n'avait pas permis d'observer de différences significatives. Cela renforce donc le concept que l'immunothérapie, par le biais des IC, potentialise l'activation des neutrophiles. Ces résultats suggèrent également que la présence d'IC n'est donc pas seule responsable de la sécrétion de ces chimiokines et cytokines et que l'environnement inflammatoire joue aussi un rôle crucial.

Cette hypothèse a été renforcée par les expérimentations *in vitro*, où l'ajout de facteurs inflammatoires (IFN γ , TNF α) (**Figures 26 et 27**) et immunomodulateur (IFN α 11) (**Figure 28**), a permis de potentialiser l'activation des neutrophiles tant au niveau des marqueurs de surface que de la sécrétion de certaines chimiokines et cytokines. En effet, par rapport à la sécrétion induite par les IC, la sécrétion de CCL5 est potentialisée par l'ajout d'IFN γ , d'IFN α 11 et de TNF α . De la même façon, CCL4 et CXCL10 sont significativement potentialisées par l'ajout d'IFN γ et d'IFN α 11. Le TNF α , quant à lui permet d'augmenter la sécrétion de CXCL1, mais aussi du TNF α lui-même et de BAFF, impliqué dans la réponse humorale. Il est intéressant de constater que les chimiokines potentialisées sont presque communes aux différents facteurs solubles ajoutés, notamment CCL5 et CCL4, impliquées dans le recrutement d'autres cellules immunitaires, telles que les monocytes ou les NK. Ceci confirmant un rôle orchestrateur des neutrophiles, comme décrit dans l'introduction, dans des contextes de cancer ou de maladies auto-immunes, mais dans le cas présent, dans le cadre d'une immunothérapie antivirale. Ainsi l'ajout de cytokines inflammatoires ou immunomodulatrices permet de renforcer l'activation induite à l'origine par les IC et d'influencer les profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique des neutrophiles.

Ces résultats ont été confirmés par les profils de sécrétion *ex vivo* des neutrophiles Ly6G^{int} (**Tableaux 5 et 6**), où l'on constate chez les animaux sous immunothérapie par AcM, une plus forte sécrétion d'IFN γ , d'IL6 et de TNF α (notamment à J14 p.i.) accompagnée d'une plus grande sécrétion de CCL4, de CCL5, de CXCL9 et de CXCL10 comparé aux animaux contrôles et infectés. Ceci démontre, d'une part, l'impact de l'environnement inflammatoire sur les fonctions immunomodulatrices des neutrophiles et, d'autre part, l'effet synergique entre immunothérapie par AcM et environnement inflammatoire.

Cependant, comme déjà mentionné, j'ai également constaté de façon surprenante que certaines chimiokines (CCL2, CXCL1, CXCL5), impliquées dans le recrutement des monocytes et des neutrophiles étaient très fortement sécrétées *in vitro* (**Figure 24**) mais l'étais beaucoup moins *ex vivo* (**Figure 48**). Ceci pose la question de l'aspect cinétique de la sécrétion des chimiokines et cytokines, en fonction des stimuli et du type cellulaire. Ainsi, les conditions *in vitro* s'apparenteraient au temps t0, c'est-à-dire, au tout premier contact entre les neutrophiles et le virus ou les IC. Dans ces conditions l'environnement inflammatoire n'est pas encore mis en place et on peut supposer que les neutrophiles sécrètent alors de grandes quantités de chimiokines qui visent au recrutement de leurs premiers partenaires (monocytes et des neutrophiles) qui vont pouvoir induire la réaction inflammatoire. Alternativement, ces différences observées, pourraient s'expliquer par l'influence de l'environnement inflammatoire qui pourrait potentialiser la sécrétion de certaines chimiokines et au contraire en diminuer d'autres.



Infectés

 > 500 pg/ml
 500-100 pg/ml
 100-50 pg/ml
 50-10 pg/ml
 < 10 pg/ml

Tableau récapitulatif des concentrations chimiokines produites dans un contexte d'immunothérapie par AcM, *ex vivo* et par les neutrophiles et les monocytes Ly6C^{hi}, triés à partir des animaux infectés traités, à J8 et J14 p.i. Le dégradé de couleurs correspond à la quantité de cytokines produites allant du plus foncé pour les concentrations importantes, au plus clair pour les faibles concentrations.



A diagram of a virus particle. It consists of a central red sphere (nucleocapsid) surrounded by a black ring (capsid). Six blue lines (surface proteins) extend from the capsid to six red spheres (host cell receptors) arranged in a circle around it.

Infectés

 > 500 pg/ml
 500-100 pg/ml
 100-50 pg/ml
 50-10 pg/ml
 < 10 pg/ml

Tableau récapitulatif des concentrations de cytokines produites dans un contexte d'immunothérapie par AcM, *ex vivo* par les neutrophiles et monocytes Ly6C^{hi} triés à partir des animaux infectés traités, à J8 et J14. Le dégradé de couleurs correspond à la quantité de cytokines produites allant du plus foncé pour les concentrations importantes, au plus clair pour les faibles concentrations.

D'autre part, il est intéressant de noter que l'ensemble des populations cellulaires testées exprimant le FcγRIV ont vu leurs profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique potentialisés par l'immunothérapie par AcM, comparé aux conditions contrôle mais surtout à l'infection seule (**Tableaux 7 et 8**). Néanmoins la nature des profils varie en fonction du type cellulaire et du moment de la réponse immune. En effet les deux types de neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) possèdent non seulement des profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique distincts par la nature des profils mais aussi par la cinétique de leurs sécrétions. Les neutrophiles Ly6G^{hi} arborent un large profil de sécrétion à J8 p.i. chez les animaux infectés-traités, mais une sécrétion extrêmement restreinte à J14 p.i.; alors que les neutrophiles Ly6G^{int}, ont une sécrétion chimiokinique majoritaire chez les animaux infectés à J8 p.i ; et chez les animaux infectés-traités à J14 p.i. (**Figure 57**)

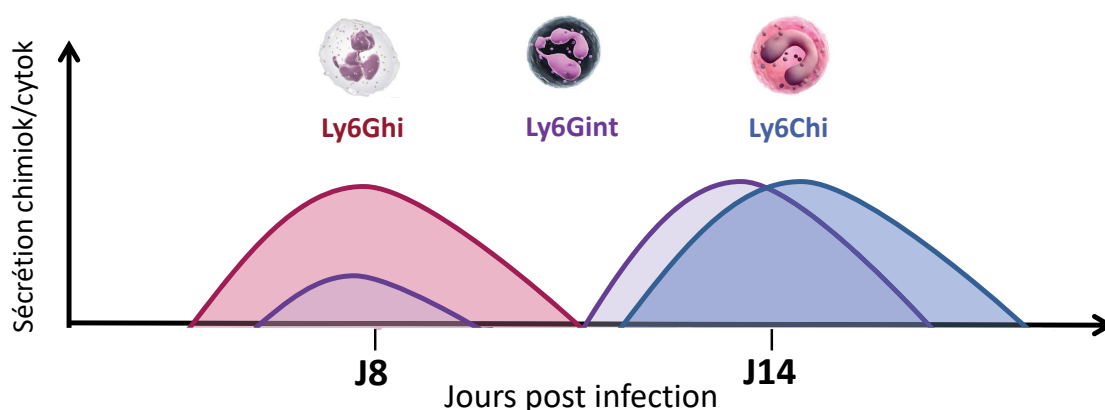


Figure 57 : Cinétique de production des chimiokines/cytokines par les cellules exprimant le FcγRIV issues des animaux infectés-traités à J8 et J14 p.i. Suite à l'immunothérapie les neutrophiles Ly6G^{hi} (courbe bordeaux) produisent une grande quantité de chimiokines et de cytokines exclusivement à J8 p.i. alors que les neutrophiles Ly6G^{int} (courbes violettes) les produisent majoritairement à J14 p.i. (seuls 2 chimiokines et 4 cytokines sont produites à J8 p.i.) et que les monocytes Ly6C^{hi} (courbe bleue) qui les produisent quasi totalement à J14 p.i.

Ainsi les deux populations de neutrophiles voient leur activation potentialisée par l'immunothérapie antivirale par AcM mais pas au même moment, de façon intéressante, cette immunomodulation évolue au cours du temps. En comparaison les monocytes adoptent encore un autre profil d'activation avec une sécrétion de chimiokines et de cytokines presque inexistante à J8 et des profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique abondants à J14 p.i. (**Figure 57**), démontrant tout le potentiel immunomodulateur d'une immunothérapie antivirale par AcM sur les différents acteurs de la réponse immunitaire précoce.

DONNEES COMPLEMENTAIRES

ROLE IMMUNOMODULATEUR DES MONOCYTES *IN VITRO*

Comme mentionné dans la partie « Résultats », les monocytes Ly6C^{hi} font également partie des cellules qui expriment le FcγRIV. D'autre part, les résultats *in vitro* et *in vivo* ont montré que les neutrophiles activés par les virus et les IC sécrétaient de grandes quantités de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes. Ceci a motivé l'étude de l'activation phénotypique et fonctionnelle des monocytes Ly6C^{hi} *in vivo* suite à une infection et à une immunothérapie par AcM. Les monocytes pouvant eux même être activés par les IC, j'ai étudié en fin de thèse comment les IC et les conditions inflammatoires pouvaient moduler l'activation phénotypique et fonctionnelle des monocytes, dans le but de compléter les résultats obtenus *in vivo*. Ceci a été réalisé en utilisant les mêmes approches expérimentales décrites pour l'étude de l'activation des neutrophiles *in vitro*.

I. Activation différentielle des monocytes *in vitro* par les IC

Des monocytes ont été isolées à partir de la moelle osseuse de souris naïves âgées de 8 à 11 semaines, en utilisant un kit commercial de sélection négative (cf partie « Matériels et méthodes ») pour éviter d'interagir avec cette population. La population isolée est composée de monocyte Ly6C^{hi}, car ils représentent plus de 95 % des monocytes de la moelle osseuse (Yang et al., 2014). (**Figure 58A**)

Une fois purifiés les monocytes ont été placés en culture et activés avec les mêmes stimuli utilisés pour l'étude *in vitro* des neutrophiles (LPS, V, IC, 667). J'ai ensuite évalué l'activation phénotypique de ces cellules par l'analyse des marqueurs classiques d'activation, tel que CD86, CD80 et les FcγRs, ainsi que l'activation fonctionnelle par le dosage de la production de cytokines et de chimiokines, dans le surnageant de culture. (**Figure 58B**).

J'ai d'abord vérifié que ces cellules étaient bien fonctionnelles et pouvaient être activées dans ces conditions de culture *in vitro*, en les stimulant par le LPS (**Figure 59A**). J'ai observé que le LPS augmentait le niveau d'expression de CD86 et de CD80 comparé aux monocytes non-stimulés (NS). J'ai également observé qu'il était responsable de l'augmentation du FcγRIV, (comme c'était le cas pour les neutrophiles) de façon significative, du FcγRI mais pas de façon statistiquement significative et qu'il ne modulait pas l'expression des FcγRIIB/III (**Figure 59B**).

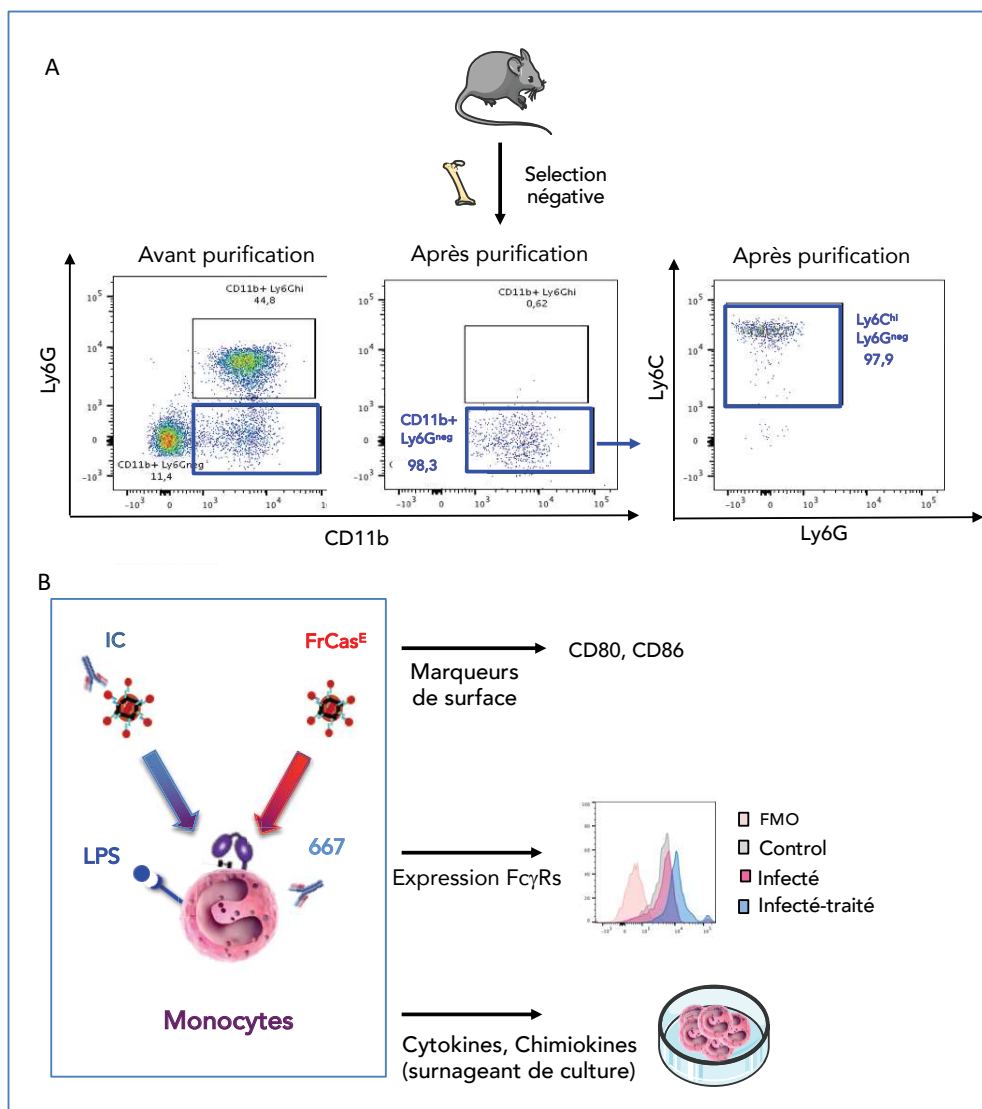


Figure 58 : Protocole de purification et d'activation des monocytes issus de la moelle osseuse. (A) Purification des monocytes à partir de la moelle osseuse de souris naïves par sélection négative et vérification de la purification par des marqueurs spécifiques de la population des monocytes (CD11b+ Ly6G^{neg} Ly6C^{hi}). (B) Les monocytes ont été placés à une concentration de 1 million cellules/ ml dans des plaques 96 puits à fond rond et activés par différents stimuli (LPS, virus FrCas^E, IC) pendant 20h à 37°C. Leur activation phénotypique a ensuite été déterminée par analyse des marqueurs de surface (CD80, CD86), de l'expression des FcγRs, et l'activation fonctionnelle a été évaluée par sécrétion de cytokines et de chimiokines dans le surnageant de culture.

J'ai ensuite stimulé les monocytes avec le virus FrCas^E seul (V) ou complexé avec l'AcM 667 (IC), qui sont les composants de notre modèle pré-clinique. J'ai observé une augmentation de l'expression de CD86 et de CD80 après stimulation par les virus et les IC, le 667 seul restant au niveau d'expression basale des monocytes NS. Cependant, dans les conditions expérimentales utilisées, aucune différence d'activation n'a été observée entre la stimulation par les virus et les IC. (Figure 59C).

La modulation de l'expression des FcγR, diverge de celle induite par le LPS. En effet aucune modification significative du FcγRIV n'est détectée, contrairement aux FcγRII-III qui voient leur expression augmenter suite à la stimulation par les virus ou les IC. L'expression du FcγRI est quant à elle aussi augmentée par les virus, les IC et l'AcM 667 mais il n'y a pas de différences significatives entre les conditions de stimulations (**Figure 59D**).

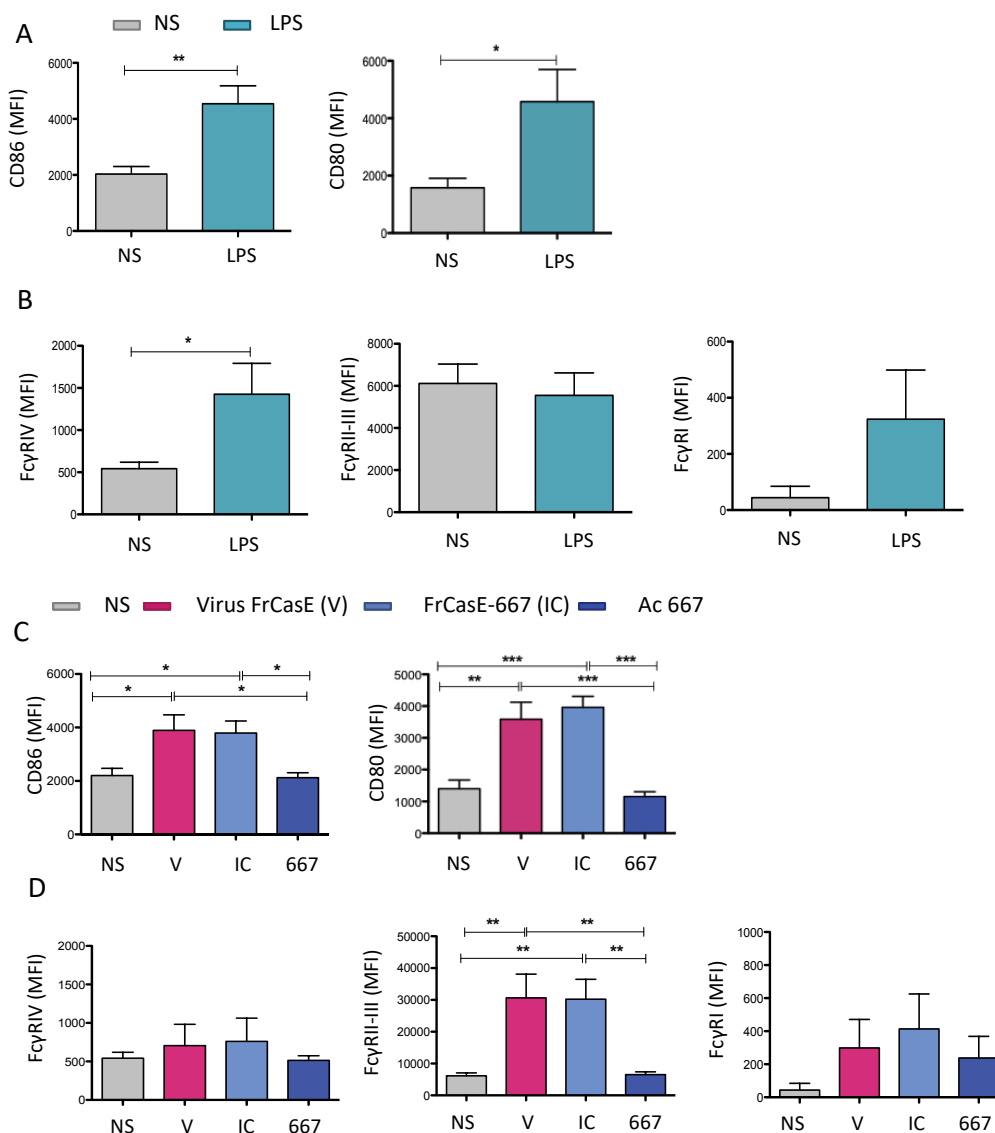


Figure 59: Étude de l'activation des monocytes par l'analyse des marqueurs de surface. (A-B) Effet d'un stimulus bactérien (LPS) sur l'expression des marqueurs d'activation des monocytes (CD86 et CD80) (A) et sur l'expression des FcγRs (B). De la même façon effet de stimuli viraux, virus FrCas^E seul (V) ou associé à l'AcM 667 (IC) et l'AcM 667 seul, sur les marqueurs d'activation (CD86 et CD80) (C) et l'expression des FcγRs (D). Les résultats représentent 9 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un t test apparié (A et B) et un test paramétrique Anova avec correction de Bonferroni (C et D). (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

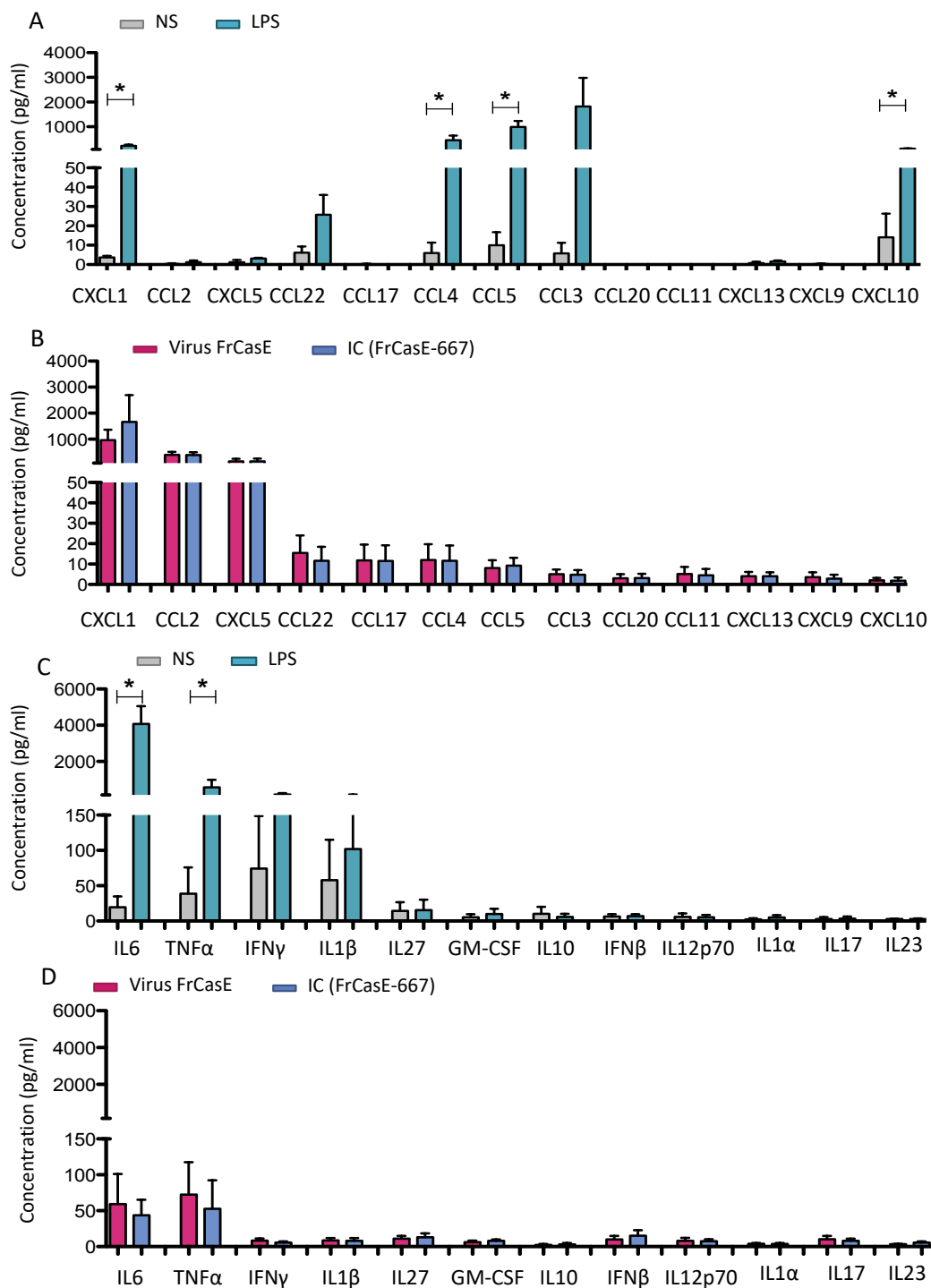


Figure 60 : Profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des monocytes stimulés *in vitro*

(A) Profil de sécrétion chimiokinique (A) et cytokinique (C) induit par les monocytes stimulés par un stimulus bactérien (LPS en vert), comparé au profil contrôle (NS en gris) où les monocytes n'ont pas été stimulés. (B) Profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique (D) induit par les monocytes stimulés par des stimuli viraux, virus FrCas^E (rouge) et IC (bleu). Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un t test apparié. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

Dans un deuxième temps, j'ai établi le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique des monocytes soumis aux différentes conditions de stimulations, à partir du surnageant de culture. Tout d'abord, le profil de sécrétion chimiokinique induit par la stimulation par le LPS, nous montre une sécrétion importante de CXCL1, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10, ainsi qu'une production plus modeste de CCL22 (**Figure 60A**). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement de diverses cellules immunitaires, dont les neutrophiles, les monocytes, les DC, les NK et également les lymphocytes T (CCL22) et la présence CXCL10 suggèrent également la sécrétion d'IFN, qui sera confirmée plus tard dans le profil cytokinique. De plus on remarque que les profils de sécrétions suite à la stimulation par le LPS, diffèrent entre les neutrophiles et les monocytes. En effet il était extrêmement modeste pour les neutrophiles alors qu'il est abondant et diversifié pour les monocytes.

Aucune différence n'est observée entre le profil de sécrétion induit par la stimulation par le virus comparé à celui induit suite à la stimulation par les IC. Ceci est cohérent avec les résultats des marqueurs de surface, qui ne montraient pas non plus de différences. La stimulation par les virus et l'IC induit également une faible sécrétion de CCL22, CCL17, CCL4, CCL5 (**Figure 60B**). Ces deux types de stimuli induisent aussi la sécrétion d'une très grande quantité de CXCL1, CCL2, et CXCL5. Il est intéressant de noter que c'est le même profil qui avait été sécrété par les neutrophiles, dans des conditions de stimulations similaires. Ces résultats suggèrent que la stimulation par l'antigène viral induit une stimulation relativement spécifique (en comparaison de la stimulation faite par un antigène bactérien) et commune à ces deux types de cellules myéloïdes, neutrophiles Ly6G^{hi} et monocytes Ly6C^{hi}. (**Figure 61**)

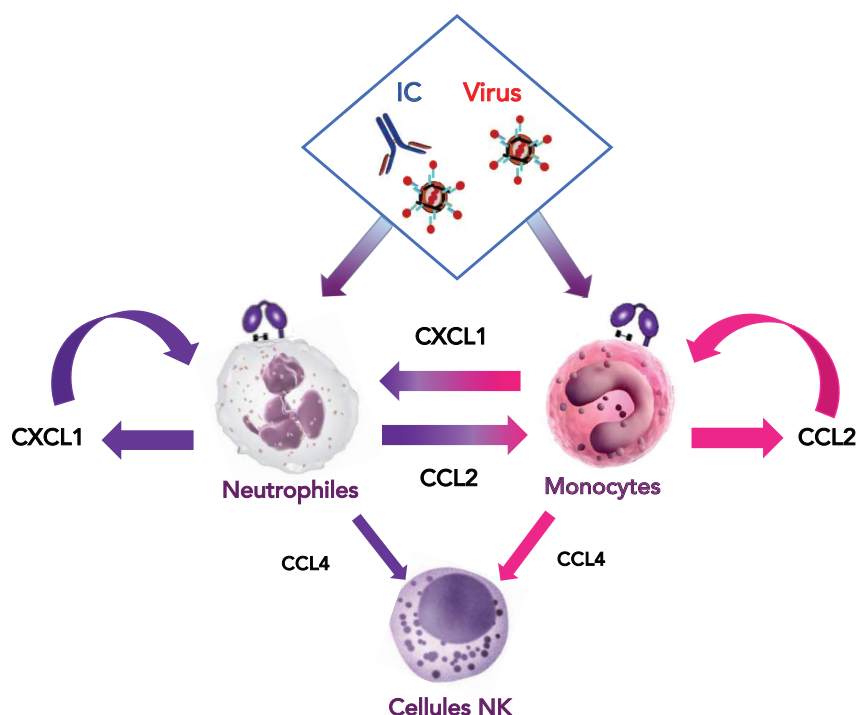


Figure 61 : Schéma bilan de la production de chimiokines par les neutrophiles Ly6G^{hi} et les monocytes Ly6C^{hi} stimulés *in vitro* par les IC ou les virus et impact sur le recrutement d'autres cellules immunitaires.

En parallèle, j'ai établi le profil de sécrétion cytokinique des monocytes. J'ai pu observer que la stimulation par le LPS induisait une sécrétion très importante, (de l'ordre du nanogramme/ml) d'IL6, de TNF α et d'IFN γ , cytokines inflammatoires par excellence (**Figure 60C**). Il y a également une production d'IL1 β (100 pg/ml), qui a un rôle proéminent dans la réponse inflammatoire en réponse aux infections (Dinarello et al, 1996) ainsi que dans le recrutement des macrophages (Lopez-Castejon and Brough, 2011), puis une faible production d'IL27, qui possède des propriétés pro-inflammatoires (Abdalla et al., 2015), avec la polarisation de réponse de type Th1 (Jones et al., 2012) (Takeda et al., 2003) et joue un rôle dans l'activation de cellules immunitaires, tel que les lymphocytes T cytotoxiques (Schneider et al., 2011) et des NK (Wei et al., 2013) dans un contexte tumorale ou sur les macrophages dans le cadre de l'infection par le VIH (Dai et al., 2013). Ce profil est plus intense que celui sécrété par les neutrophiles qui comportait également la sécrétion d'IL6 et de TNF α , mais à de plus faible quantité.

La stimulation par le virus ou les IC n'induit pas de sécrétion aussi élevée en quantité (**Figure 60D**), mais produit une cinquantaine de pg/ml d'IL6 et de TNF α , par les monocytes alors que leur production n'était qu'à la limite du seuil de détection pour les neutrophiles activés par ces 2 mêmes stimuli (**Figure 24**). La stimulation par les virus ou les IC déclenche des réponses différentes en fonction de la cellule stimulée et module les propriétés immunomodulatrices propres aux neutrophiles et aux monocytes.

II Modulation de l'activation des monocyte *in vitro* par des cytokines inflammatoires

D'autre part afin de me rapprocher des conditions inflammatoires du contexte pathologique *in vivo*, j'ai réalisé des expérimentations *in vitro*, où j'ai ajouté différents types de cytokines inflammatoires aux stimuli précédents. (**Figure 58**)

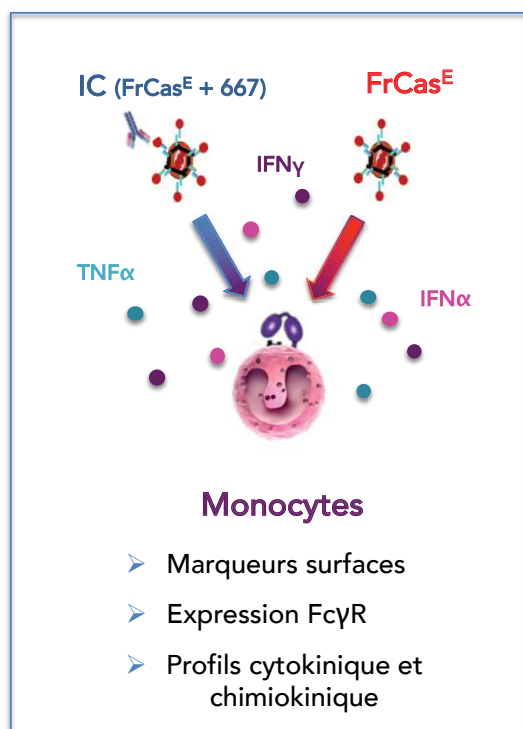


Figure 62 : Schéma expérimental de l'activation des monocytes *in vitro* par des stimuli viraux associés à des cytokines inflammatoires. Les monocytes purifiés issus de la moelle osseuse ont été activés par des stimuli viraux seuls (FrCas^E ou IC) ou associés avec des cytokines inflammatoires (IFN γ et TNF α) et immunomodulatrice (IFN α 11). L'activation est mesurée par le marqueur d'activation de surface (CD86), l'expression des Fc γ Rs ainsi que par le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique, réalisé à partir du surnageant de culture de chaque condition de stimulation en utilisant une approche multiparamétrique LegendPlex.

II.1. Modulation de l'activation des monocytes *in vitro* par le TNF α

J'ai observé que la stimulation des monocytes par le TNF α seul n'induisait pas d'augmentation du marqueur d'activation CD86 (**Figure 62A**). Lorsque celui-ci est ajouté à d'autres conditions de stimulations comme le virus ou les IC, il ne potentialise pas non plus l'activation des monocytes. Le même constat est réalisé pour l'expression des Fc γ Rs analysés, qui ne sont pas significativement modulées par l'addition du TNF α (**Figure 62B**).

J'ai également établi le profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique, suite à l'ajout de TNF α dans les différentes conditions de stimulations. J'ai constaté que le TNF α potentialisait de façon significative la production de CXCL1 lorsque celui-ci était utilisé en combinaison avec les IC (**Figure 62C**). Cette potentialisation est d'autant plus intéressante qu'elle n'est pas observée suite à la co-stimulation par le TNF α et les virus. En effet, si la sécrétion de CXCL1 est équivalente entre virus et IC seuls, elle devient significativement plus importante pour les IC combiné au TNF α , comparé au virus associé au TNF α .

Étonnement l'ajout de TNF α induit la sécrétion de CXCL10 (**Figure 62C**), qui est une chimiokine IFN dépendante, en particulier dans les conditions où les IC sont associés au TNF α . La sécrétion de cette chimiokine ne peut pas être expliquée par une éventuelle augmentation significative de la sécrétion d'IFN γ lors de la co-stimulation (**Annexe 13**).

J'ai également noté, comme je l'avais observé pour les neutrophiles, que le TNF α entraîne un effet autocrine, avec une auto-production de TNF α par les monocytes et ceci de façon significativement plus importante dans la condition IC+ TNF α comparé au TNF α seul ou à la co-stimulation entre le virus et le TNF α (**Figure 62D**).

Les chimiokines et cytokines produites en quantité détectable mais ne présentant pas de différences significatives ne font pas l'objet de commentaires mais sont néanmoins consultables en **Annexes 12 et 13**.

En résumé l'ajout de TNF α aux conditions de stimulations virus et IC ne permet pas de potentialiser l'activation des monocytes d'un point de vue des marqueurs de surface, vraisemblablement en raison d'une activation déjà très importante suite à la stimulation par ces 2 stimuli (effet plateau). Il permet en revanche d'augmenter significativement la sécrétion de chimiokines et cytokines induites par les IC, telles que CXCL1 et le TNF α lui-même et permet également d'induire la sécrétion de CXCL10.

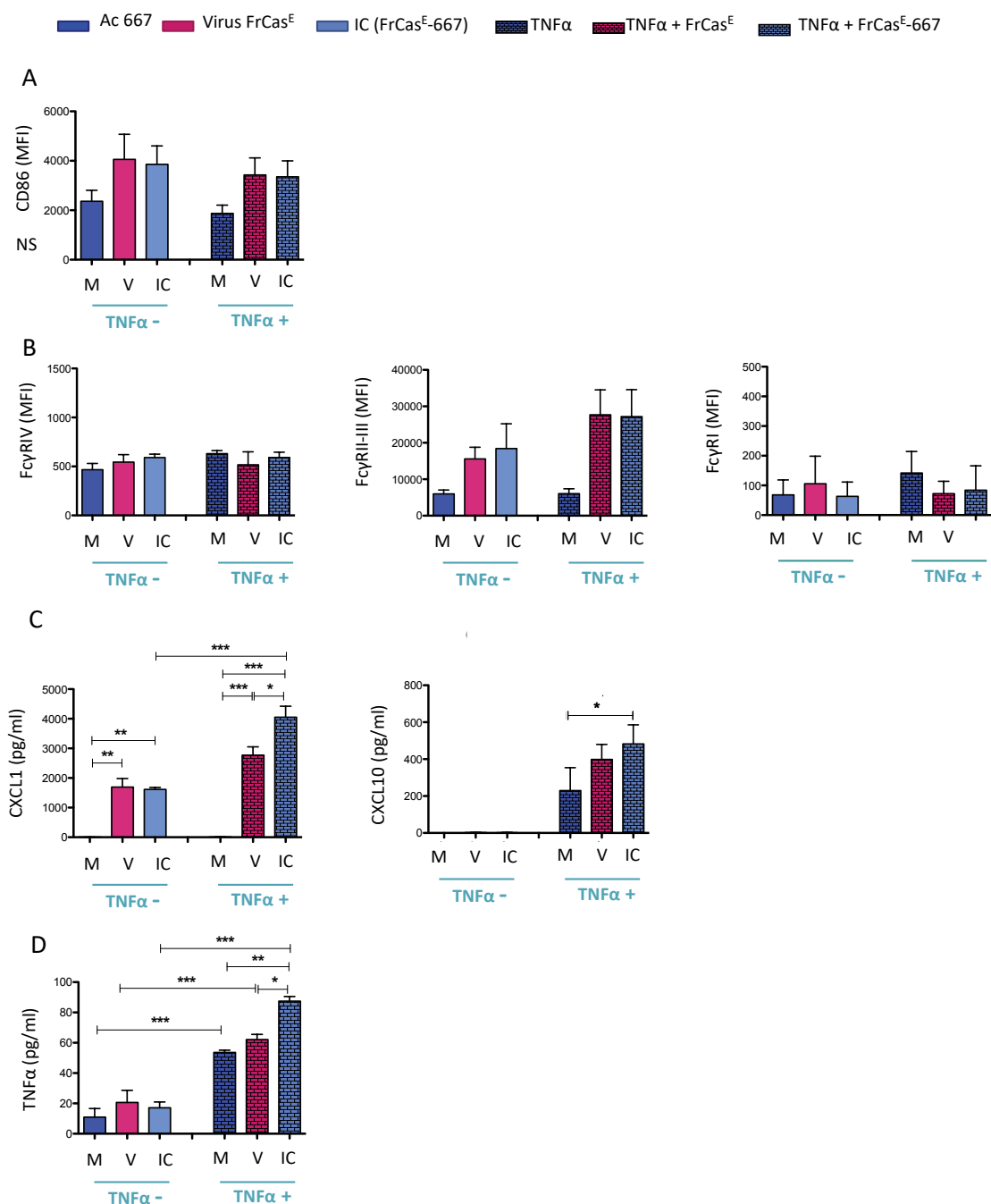


Figure 63 : Effet du TNFα sur l'activation des monocytes stimulés par des antigènes viraux.

L'activation des neutrophiles a été mesurée par l'expression du marqueur d'activation de surface CD86 (MFI). (A), par rapport aux conditions contrôles M (Milieu), par l'expression des FcγRs (B) ainsi que par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique quantifié par l'approche LegendPlex (C et D). Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes (A et B) et 3 expérimentations indépendantes (C et D) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

II.2. Modulation de l'activation des monocytes *in vitro* par l'IFN γ

L'IFN γ , en lui-même induit une augmentation de l'expression de CD86 équivalente à celle produite par le Virus ou les IC. En revanche, lorsqu'on combine la stimulation par l'IFN γ avec celle par le virus, on observe une augmentation de l'expression de CD86, mais de façon non significative. Cet effet est encore renforcé lorsqu'on associe IFN γ et IC, avec une augmentation significative (quasiment d'un facteur 2), par rapport à la stimulation induite par les IC ou l'IFN γ seul. (**Figure 63A**)

L'IFN γ a également un fort effet sur l'expression des Fc γ Rs, en particulier le Fc γ RIV, où sa présence suffit à augmenter significativement l'expression d'un facteur 6. (**Figure 63B**). L'expression du Fc γ RIV est encore plus potentialisée lorsqu'on ajoute à l'IFN γ , la stimulation par le virus ou les IC. Cette tendance est également présente pour le Fc γ RI, où l'IFN γ induit une augmentation importante de son expression, spécialement pour la condition où le virus est associé à l'IFN γ , mais les différences observées ne sont pas statistiquement significatives. Enfin l'expression des Fc γ RII-III ne présente pas de différence entre les conditions primaires de stimulation (V et IC) et celles où l'IFN γ a été ajouté. (**Figure 63B**).

La sécrétion de chimiokines est elle aussi impactée par l'ajout d'IFN γ . En effet j'ai constaté une augmentation significative de la sécrétion de CXCL1, CCL2 et une forte induction de la sécrétion de CXCL10 (**Figure 63C**). Pour ces 3 chimiokines j'ai observé une potentialisation de leur sécrétion induite par la stimulation par les IC lorsque l'IFN γ était ajouté. La co-stimulation par le virus et l'IFN γ , potentialise la sécrétion de CXCL1 et de CXCL10, mais pas celle de CCL2, suggérant que l'immunothérapie à elle seule suffirait à potentialiser la sécrétion de CCL2.

On détecte, bien sûr, la présence d'IFN γ , mais aucune différence significative n'est observée entre la stimulation par l'IFN γ seul ou combiné aux autres stimuli. (**Figure 63D**).

De plus les autres chimiokines et cytokines produites en quantité détectable mais ne présentant pas de différences significatives entre les différentes conditions de stimulations n'ont pas été commentées mais sont présentées en **Annexes 14** et **15**.

En résumé, l'ajout d'IFN γ contribue à augmenter l'activation des monocytes par les IC d'un point de vue des marqueurs de surface (CD86, Fc γ RIV), et participe également à une sécrétion plus intense de chimiokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles, de monocytes ainsi que des lymphocytes T et cellules NK.

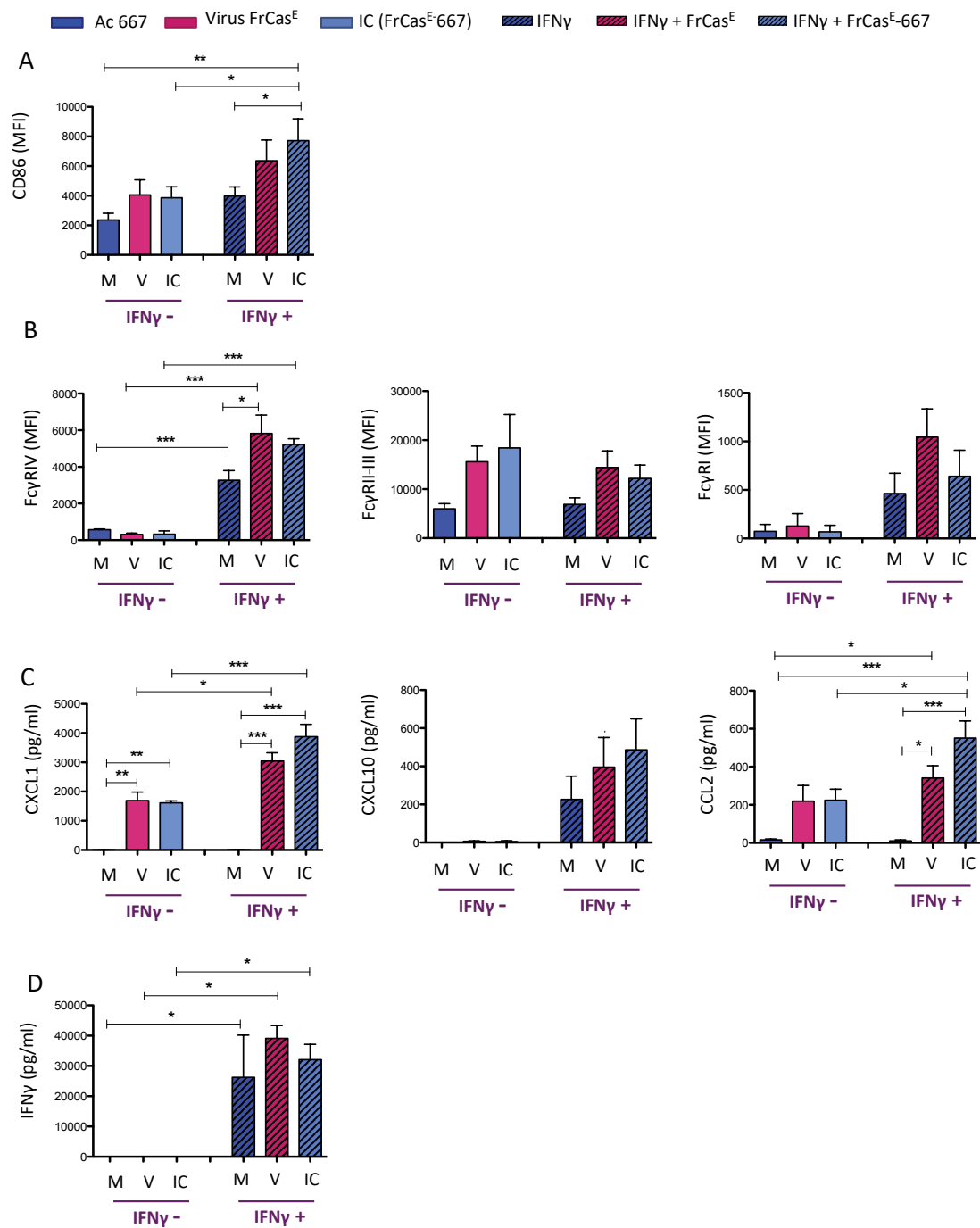


Figure 64 : Effet de l'IFN γ sur l'activation des monocytes stimulés par des antigènes viraux. L'activation des monocytes a été mesurée par l'expression du marqueur d'activation de surface CD86 (MFI) (A), par rapport aux conditions contrôles M (Milieu), par l'expression des Fc γ R (B) ainsi que par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique par l'approche LegendPlex (C et D). Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes (A et B) et 3 expérimentations indépendantes (C et D) et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

II.3. Modulation de l'activation des monocytes *in vitro* par l'IFN α 11

J'ai également stimulé les monocytes un interféron de type I, l'IFN α 11. J'ai observé une potentialisation de l'activation des monocytes lorsque la stimulation par les IC était combinée à l'ajout d'IFN α 11, comparé à une stimulation par les IC seuls ou au virus associé à l'IFN α 11, pour l'expression du CD86. (**Figure 64A**)

En ce qui concerne l'expression des Fc γ Rs, l'IFN α 11 seul, ou en combinaison avec les Virus ou les IC entraîne une augmentation importante du Fc γ RIV (d'un facteur 3 en moyenne lors de la co-stimulation IC+IFN α 11) et du Fc γ RI. Cependant les différences observées ne sont pas significativement statistiques (**Figure 64B**). Enfin, l'ajout de l'IFN α 11 seul, ne modifie pas l'expression des Fc γ RII-III, bien qu'on observe une légère diminution de son expression quand l'IFN α 11 est combiné aux virus ou aux IC.

L'IFN α 11 impact la sécrétion de chimiokines de façon assez similaire à l'IFN γ . Il permet de potentialiser la sécrétion de CXCL1 et de CCL2 induites par les IC (**Figure 64C**) et induit la sécrétion de CXCL10, mais sans différences significatives entre les différentes conditions supplémentées avec l'IFN α 11.

La sécrétion de TNF α et de GM-CSF sont elles aussi impactées, en particulier la sécrétion due à la stimulation par les IC qui est significativement augmentée par l'ajout d'IFN α 11 par rapport à la sécrétion générée par la stimulation par les IC seuls ou par la stimulation combinée de l'IFN α 11 et du virus (**Figure 64D**)

De plus les autres chimiokines et cytokines produites en quantités détectables mais ne présentant pas de différences significatives entre les différentes conditions de stimulations n'ont pas été commentées mais sont présentées en **Annexes 16** et **17**.

En conclusion en me basant sur le marqueur d'activation de surface CD86, j'ai démontré que l'ajout d'IFN (IFN γ et IFN α 11) potentialise l'activation phénotypique des monocytes induite par des IC. Les résultats montrent aussi clairement une augmentation significative de l'expression du Fc γ RIV induite par l'IFN γ et suggèrent un effet de cette cytokine sur l'expression du Fc γ RI, comme c'est le cas pour la modulation du Fc γ RI et Fc γ RIV par l'IFN α 11, bien que les différences remarquées ne se soient pas significatives. Des nouvelles expériences permettant d'augmenter la taille de l'échantillon devront être réalisées pour confirmer ou infirmer ces observations.

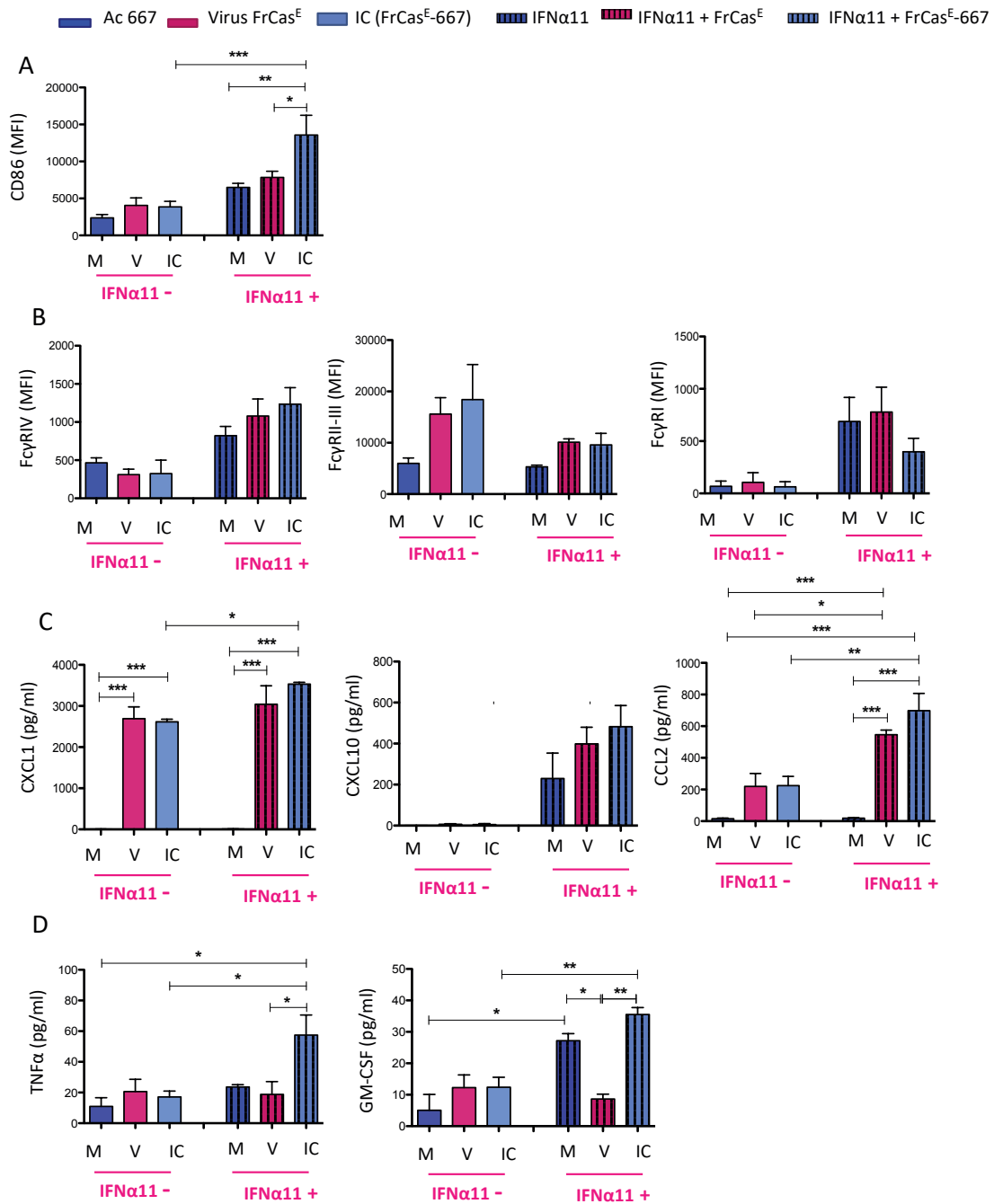


Figure 65 : Effet de l'IFNα11 sur l'activation des monocytes stimulés par des antigènes viraux. L'activation des monocytes a été mesurée par l'expression du marqueur d'activation de surface CD86 (MFI) (A), par rapport aux conditions contrôles M (Milieu), par l'expression des FcγRs (B) ainsi que par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique par l'approche LegendPlex (C et D). Les résultats représentent 3 expérimentations indépendantes (A et B) et 3 expérimentations indépendantes (C et D) et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

The diagram illustrates the chemokine and cytokine environment of an Interferon-producing Cell (IC) versus a Virus-infected cell. The environment is represented by concentric circles, with the innermost circle being the cell itself and the outermost circle being the surrounding medium.

Legend:

- Medium (Blue circle)
- TNF α (Teal circle)
- IFN γ (Purple circle)
- IFN $\alpha 11$ (Red circle)

IC Environment (Left):

- Cell (Innermost):** Contains a central cell with a nucleus and a red dot, surrounded by a layer of cells.
- Layer 1 (Inner):** Contains CCL4, CCL17, CXCL5, CXCL1, CCL2, CCL22, CXCL10, and CXCL1.
- Layer 2 (Middle):** Contains TNF α , IL6, and CXCL10.
- Layer 3 (Outer):** Contains GM-CSF and TNF α .

Virus Environment (Right):

- Cell (Innermost):** Contains a central cell with a nucleus and a red dot, surrounded by a layer of cells.
- Layer 1 (Inner):** Contains CCL4, CCL17, CXCL5, CXCL1, CCL2, CCL22, CXCL10, and CXCL1.
- Layer 2 (Middle):** Contains TNF α , IL6, and CXCL10.
- Layer 3 (Outer):** Contains CXCL10 and CXCL1.

Le cercle bleu représente la production de chimiokines et cytokines par les monocytes induite par la stimulation par les IC (à gauche) ou les virus (à droite). La production de chimiokines et de cytokines par les IC ou les virus est potentialisée ou induite par l'ajout de facteur inflammatoire le $\text{TNF}\alpha$ (cercle vert), l' $\text{IFN}\gamma$ (cercle violet) et/ou immunomodulateur, $\text{IFN}\alpha 11$ (cercle rose).

173

 <i>In vitro</i> (IC)				<i>Ex vivo</i> (IT)	
Milieu	TNF α	IFN γ	IFN α 11	J8	J14
CCL2		CCL2	CCL2		CCL2
					CCL3
CCL4					CCL4
CCL5					CCL5
CCL17					
CCL22				CCL22	CCL22
CXCL1	CXCL1	CXCL1	CXCL1	CXCL1	CXCL1
CXCL5					
					CXCL9
	CXCL10	CXCL10	CXCL10		CXCL10
					IL1 α
					IL1 β
IL6					IL6
					IFN γ
			GM-CSF		
TNF α	TNF α		TNF α		TNF α

Tableau 9 : Profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique des monocytes Ly6C^{hi} (*in vitro* et *ex vivo*) à J8 et J14 p.i dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM

Tableau récapitulatif des chimiokines et des cytokines produites par les monocytes : (i) *in vitro* par l'activation des monocytes Ly6C^{hi} par les IC seuls (Milieu), (ii) potentialisées par les cytokines inflammatoires (TNF α et IFN γ) ou immunomodulatrice (IFN α 11) et (iii) *ex vivo* par les monocytes Ly6C^{hi} triés à partir des animaux infectés traités.

De plus, il est d'autant plus intéressant de noter que les sécrétions les plus abondantes *in vitro* ont été constatées suite à une combinaison de stimulations par les IC et des cytokines inflammatoires. Ceci tend à confirmer les résultats *in vivo* qui montrent également une plus forte sécrétion de cytokines et de chimiokines dans le groupe d'animaux ayant reçu l'immunothérapie par AcM et bénéficiant des conditions inflammatoires due à l'infection et à l'immunothérapie. Ces résultats suggèrent que les monocytes, tout comme les neutrophiles, qui sont toutes les deux des cellules exprimant le Fc γ RIV, pourraient jouer un rôle immunomodulateur suite à une infection virale, rôle qui serait renforcé par une immunothérapie antivirale par AcM.

DISCUSSION

DISCUSSION

Ces dernières années ont été le témoin de l'avènement des AcM antiviraux qui apparaissent désormais comme une alternative crédible dans le traitement de nombreuses infections, notamment des infections chroniques comme l'infection par le VIH. Élucider les nombreux mécanismes responsables des propriétés antivirales des AcM constitue donc un enjeu majeur dans l'amélioration des perspectives thérapeutiques des immunothérapies antivirales par AcM.

Jusqu'à présent les fonctions effectrices des AcM antiviraux ont fait l'objet de nombreuses études mais ce n'est pas le cas de leurs fonctions immunomodulatrices qui n'ont pas été investiguées de façon approfondie.

Dans l'optique de mieux caractériser l'action des AcM antiviraux sur la modulation de la réponse immunitaire, les travaux précédents de l'équipe ont montré dans un modèle murin d'infection rétrovirale qu'une immunothérapie antivirale par AcM pouvait induire des effets de type vaccinaux permettant la protection des animaux sur le long terme. Nos efforts se concentrent à présent sur l'identification des mécanismes à l'origine de l'induction de cette immunité protectrice mise en place par l'immunothérapie par AcM.

Nos travaux récemment publiés ont démontré, de façon originale, le rôle essentiel des neutrophiles dans l'induction des effets vaccinaux dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM (Naranjo-Gomez et al, 2018). Les résultats obtenus pourraient indiquer des voies potentielles dans l'amélioration des immunothérapies par AcM. «

Cependant la plupart des immunothérapies par AcM, employées dans le cadre d'un traitement contre le cancer, sont souvent associées à des chimiothérapies, qui induisent de fortes neutropénies. De même dans un contexte infectieux, il a été décrit que même si l'infection par le VIH ne diminuait pas le recrutement des neutrophiles, elle impactait grandement leurs fonctions, entre autre par l'inhibition de la formation de NET (Saitoh et al., 2012). Or nos travaux suggèrent que les neutrophiles sont cruciaux dans le succès thérapeutique des immunothérapies antivirales par AcM. Il serait donc important de prendre en considération le maintien de leur nombre et de leur fonction. Par conséquent il serait judicieux de les associer à des agents pharmacologiques ou biologiques qui permettrait la potentialisation de leur mobilisation et de leur activation, tel que le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) (Semerad et al., 2002), en vue de thérapie combinée avec des AcM thérapeutiques, afin d'améliorer l'efficacité des immunothérapies futures par AcM.

Dans le but d'exploiter pleinement le potentiel thérapeutique des neutrophiles dans le cadre d'une immunothérapie par AcM, il est désormais essentiel d'élucider les mécanismes responsables du rôle clé des neutrophiles et notamment leur pouvoir immunomodulateur dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM. Dans cette perspective, les expérimentations, réalisées lors de ma thèse ont permis d'apporter des indices supplémentaires sur la compréhension de ces mécanismes.

I Potentialisation de l'activation et des fonctions immunomodulatrices des neutrophiles par les IC et les conditions inflammatoires

Pour cela j'ai réalisé, des expérimentations *in vitro*, où les neutrophiles ont été activés par différents types de stimuli. Ces expérimentations ont montré, de manière intéressante, que les neutrophiles pouvaient moduler leur activation en fonction des stimuli rencontrés, notamment en comparant un stimulus d'origine bactérienne, le LPS et un stimulus d'origine virale le rétrovirus FrCas^E. En effet les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique présentent de nombreuses différences entre ces deux types de stimuli. Les profils dû à la stimulation par le LPS montrent une production faible en quantité et en qualité de chimiokines et une sécrétion plus importante de cytokines, alors que la stimulation virale montre une sécrétion abondante et variée en chimiokines et une sécrétion presque inexistante en cytokines. J'ai ensuite comparé de façon inédite l'activation des neutrophiles par les stimuli qui sont retrouvés dans notre modèle pré-clinique, à savoir le virus FrCas^E rencontré dans les animaux infectés, et les IC, formés par le virus FrCas^E et l'AcM neutralisant 667, qui sont tous deux présents dans les animaux infectés traités par l'immunothérapie.

D'une part, jusqu'à présent peu de données existaient sur l'activation des neutrophiles par des IC formés à partir de déterminants viraux. Une grande partie de la littérature, se focalisant sur l'activation induite par des IC par leur biais des fonctions effectrices des AcM, peu de données relatent l'effet de leur fonctions immunomodulatrices sur les cellules du système immunitaire, en particulier sur les neutrophiles.

Les résultats précédents du laboratoire ont permis d'apporter des éléments sur les fonctions immunomodulatrices des AcM antiviraux. Ces travaux ont démontré que les IC formés avec des virions ou des cellules infectées activaient les cellules dendritiques qui potentialisaient à leur tour la réponse T (Michaud et al., 2010). Ce phénomène d'activation des DC par des IC viraux a aussi été décrit dans d'autres modèles, soit avec des protéines virales dans un modèle d'hépatite B (VHB) (Celis and Chang, 1984) ou avec des virions dans un modèle d'infection par le SIV (Yamamoto et al., 2009) attestant des fonctions immunomodulatrices des AcM antiviraux dans différentes infections.

D'autre part les études portant sur l'activation des neutrophiles, notamment leur fonctions immunomodulatrices, par des IC sont majoritairement décrites dans un contexte d'auto-immunité (Fossati et al., 2002; Mayadas et al., 2009; Vermeren et al., 2018). Les quelques publications relatant de l'activation des neutrophiles par des IC viraux se sont centrées sur l'étude des fonctions effectrices des neutrophiles telle que la production de ROS ou de NET (Babu et al., 2011; Fujiwara et al., 1994; Hung et al., 2012; Kimura et al., 1997; Leon et al., 2016). Les données sur l'impact de l'activation des IC viraux sur les fonctions immunomodulatrices des neutrophiles sont quasiment inexistantes.

C'est pourquoi mes travaux de Thèse ont permis de montrer de façon novatrice, que les IC formés à partir de déterminants viraux permettait de potentialiser les fonctions immunomodulatrices des neutrophiles en particulier dans un contexte inflammatoire.

Dans un premier temps j'ai démontré que l'activation phénotypique (expression CD11b, CD62L) des neutrophiles par des IC, était significativement supérieure à celle induit par le virus seul. Curieusement peu de différences ont été observées d'un point de vue fonctionnel. En effet les profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique induit par le virus et les IC sont similaires en nature et en quantité, excepté pour CCL4, impliqué dans le recrutement de divers types cellulaires (monocytes, NK), où l'activation par les IC est supérieure à celle du virus. De plus le blocage des FcγRs exprimés constitutivement à la surface des neutrophiles a permis de

diminuer significativement l'activation induite par les IC aussi bien phénotypiquement par le niveau d'expression des marqueurs de surface, que fonctionnellement avec la diminution de la sécrétion de CCL4 *in vitro*, montrant le caractère Fc-dépendant de la potentialisation de l'activation des neutrophiles induite par les IC.

Cependant les résultats de notre récente publication montrent que l'activation fonctionnelle des neutrophiles *in vivo* est plus importante pour les neutrophiles issus d'animaux infectés et traités par immunothérapie comparée à celle des animaux infectés, or *in vitro* peu de différences sont observées entre la stimulation par le virus et les IC, pour le profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique. Le fait de ne pas trouver de différences fonctionnelles aussi marquées qu'au niveau phénotypique, pourrait s'expliquer par le fait que l'engagement des FcγRs n'est pas suffisant pour potentialiser la production de chimiokines et de cytokines par les neutrophiles, d'autres facteurs étant probablement nécessaires. En effet les expérimentations *in vitro* ne bénéficient pas d'un environnement inflammatoire aussi riche que celui présent *in vivo*.

C'est pourquoi dans le but de se rapprocher des conditions *in vivo*, où règne un contexte inflammatoire dû à l'infection et /ou l'immunothérapie, que de nouvelles expérimentations *in vitro* ont été réalisées en rajoutant des facteurs inflammatoires, (l'IFNγ, et le TNFα) et/ou immunomodulateur (l'IFN de type I). En effet différentes publications décrivent une augmentation de l'activation des neutrophiles *in vitro* par des cytokines inflammatoires et notamment les IFN. Zimmermann et al (Zimmermann et al., 2016) montre que l'IFNα renforce la production d'IL6 par les neutrophiles humain stimulés par un analogue du TLR8 (R848), qui mime une infection par un virus à ARN simple brin. En parallèle les travaux de Marchi et al, (Marchi et al., 2014) ont montré que l'IFNγ augmentait les fonctions effectrices (phagocytose, production de ROS) et immunomodulatrices (sécrétion d'IL6 et de TNFα) des neutrophiles de souris *in vitro*. Dans mes conditions expérimentales je n'ai pas observé de modulations de la sécrétion de cytokines par les neutrophiles en présence de cytokines inflammatoires, cependant j'ai observé une potentialisation de la sécrétion de certaines chimiokines.

Les travaux de ma thèse sont dans la continuité de ces études et ont également montré que l'ajout de ces cytokines aux précédents stimuli (IC et virus), permettait de potentialiser l'activation des neutrophiles par les IC au niveau phénotypique et fonctionnel. Ce qui est d'autant plus intéressant c'est que si la potentialisation de l'activation phénotypique des neutrophiles est homogène entre les 3 différentes cytokines testées, ce n'est pas le cas de l'activation fonctionnelle et en particulier la sécrétion de cytokines et de chimiokines, qui est spécifique d'un type de cytokines pro-inflammatoires et/ou immunomodulatrice. J'ai pu observer qu'en présence d'IC, les IFN de type I et II favorisaient la sécrétion de CCL4 et de CCL5, toutes deux impliquées dans le recrutement de monocytes et de NK et induisait celle de CXCL10, impliquée dans le recrutement de nombreuses cellules immunitaires (Loetscher et al., 1998) en particulier les lymphocytes T (Sallusto et al., 1998), confirmant le caractère IFN-dépendant de cette chimiokine en accord avec la littérature (Oslund et al., 2014; Takaku et al., 2016). L'ajout de TNFα a potentialisé la sécrétion de CXCL1, impliquée dans le recrutement de neutrophiles et la production autocrine de TNFα lui-même, créant une boucle d'auto-activation.

La potentialisation de l'activation fonctionnelle des neutrophiles par les IC associés à des facteurs inflammatoires *in vitro* est en accord avec les travaux de Scapini, (Scapini et al., 2005), qui montre que la stimulation des neutrophiles humains, *in vitro* par des IC (non viraux) associés à l'IFNγ et au G-CSF permet une potentialisation de la sécrétion de la protéine BAFF, impliquée dans la réponse humorale.

Ces résultats corroborent également nos derniers travaux publiés (Naranjo-Gomez et al, 2018),

où nous avons montré que l'IFN γ et l'engagement des Fc γ Rs renforçaient significativement la production de BAFF et de Lymphotoxine α par les neutrophiles *in vitro*, attestant d'un phénotype B-Helper des neutrophiles dans notre contexte d'immunothérapie antivirale par AcM. Cette fonction B-Helper des neutrophiles a aussi été décrite dans des conditions homéostatiques (Puga et al., 2011), dans un contexte de « granulopoïèse d'urgence » (Parsa et al., 2016) ou dans le cadre d'une infection bactérienne (Chorny et al., 2016) mais jamais dans un contexte d'immunothérapie antivirale.

Étonnement contrairement à ce qui a été montré dans notre publication, les expérimentations *in vitro* ne montrent pas une potentialisation de la sécrétion de BAFF par les neutrophiles stimulés par les IC, suite à l'ajout d'IFN γ . Ceci peut s'expliquer par la différence d'approche expérimentale, en effet dans la publication, les neutrophiles ont été stimulés par l'AcM 667 déposé préalablement sur le fond des puits, alors que dans les autres expérimentations les neutrophiles ont été stimulés par des IC formés en solution à partir de l'AcM 667 et du virus FrCas^E. De plus la quantité de 667 utilisée pour tapisser le fond des puits est supérieure (10 μ g/ml) à celle utilisée pour constituer les IC (6 μ g/ml), ayant pour conséquence un engagement des Fc γ Rs, plus important pour les travaux présentés dans la publication et suggérant qu'une quantité minimale d'AcM, associée à l'IFN γ est nécessaire pour potentialiser la production de BAFF.

De plus, outre l'effet de l'environnement inflammatoire sur les fonctions des cellules immunitaires, les cytokines inflammatoires peuvent aussi influencer sur l'affinité des Fc γ Rs aux IC. Les travaux de Brandsma et al (Brandsma et al., 2018), ont montré que des analogues d'IL5, d'IFN γ et de TNF α , pouvaient renforcer la liaison des anticorps aux Fc γ Rs, des leucocytes primaires humains. La stimulation par les cytokines induit une augmentation de la liaison du Fc γ RI au IC, sans pour autant augmenter l'expression de ce dernier. Les mécanismes responsables de l'augmentation de l'affinité suite à la stimulation par des cytokines reste cependant encore méconnue.

Mes résultats montrent l'importance de l'environnement inflammatoire dans la potentialisation de l'activation des neutrophiles par des IC. Ils soulignent également tout le potentiel immunomodulateur des neutrophiles qui adaptent finement leur réponse en fonction de la nature de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Ces travaux permettent d'apporter des éléments dans la compréhension du rôle clé des neutrophiles *in vivo*, dans l'efficacité de l'immunothérapie antivirale par l'AcM 667.

II. Les Fc γ Rs : acteurs clés de l'efficacité des immunothérapies par AcM

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que la protection à long terme induite par l'immunothérapie antivirale par AcM était le résultat de l'activation, dépendante du fragment Fc, des cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques et plus récemment les neutrophiles, par le biais de l'interaction des IC avec les Fc γ Rs. L'identification des Fc γ Rs impliqués s'avère donc capitale pour une meilleure compréhension de l'établissement des effets vaccinaux, dans le but d'améliorer les immunothérapies antivirales par AcM.

Il est ainsi essentiel de considérer avec attention les Fc γ Rs, en particulier ceux exprimés à la surface des neutrophiles, tant au niveau de la variation de leur expression que des conséquences biologiques de ces variations particulièrement sur les fonctions des neutrophiles. D'autant que les Fc γ Rs peuvent grandement impacter la réponse immunitaire et notamment la réponse antivirale à plusieurs niveaux.

Les FcγRs sont soumis à un certain nombre de polymorphismes qui peuvent avoir un impact sur la réponse antivirale de l'hôte. Par exemple un simple SNP (single nucleotide polymorphism), peut influencer sur l'efficacité thérapeutique d'un AcM. Le polymorphisme V158 du FcγRIIIA présente une meilleure affinité que le F158, ce qui conduit à une meilleure interaction avec les IgG. Si le rôle de ce polymorphisme s'est montré bénéfique dans un contexte d'immunothérapie anti-cancéreuse, par l'administration du Rituximab à des patients atteints de lymphome (Cartron et al., 2002), son rôle est controversé dans le cadre de l'infection par le VIH. Une étude n'a montré aucun effet de ce polymorphisme (Forthal et al., 2007) sur la propagation de la maladie et une autre a associé un génotype VV, à un facteur de risque dans la progression de l'infection par le VIH. (Poonia et al., 2010) Cette corrélation a également été observée lors de l'essai clinique Vax004, où les patients de génotype VV avaient un plus mauvais pronostic que les patients VF ou FF. (Forthal et al., 2012). Il en va de même pour le FcγRIIA, où le polymorphisme H131 présente une plus forte affinité pour les IgG2 que le R131, qui est lui associé, à un déclin plus rapide des lymphocytes T CD4, chez des patients infectés par le VIH. (Forthal et al., 2007) Ainsi le polymorphisme des FcγRs peut influencer l'effet thérapeutique d'une immunothérapie par AcM, notamment par l'amélioration des fonctions effectrices des anticorps.

Mais le succès thérapeutique d'une immunothérapie par AcM, n'est pas uniquement dépendante du polymorphisme des FcγRs. Il résulte en réalité de l'association de deux composantes, les FcγRs et l'AcM, interagissant par le biais du fragment Fc, qui de par sa nature (isotype, glycosylation, mutation) peut lui aussi, moduler la réponse immunitaire. Les travaux de Sips et al (Sips et al., 2016) portant, sur l'infection par le VIH, ont montré que la mutation du fragment Fc de l'AcM VRC01 anti-VIH, permettait d'augmenter les fonctions effectrices, en particulier la phagocytose des neutrophiles et des macrophages localisés dans les muqueuses.

Le choix de l'isotype est aussi important car il favorise l'interaction avec un type déterminé de FcγR, en raison des différences d'affinité de liaison des FcγRs présentées en Introduction. Ensuite le format du fragment Fc de l'anticorps peut également avoir un rôle déterminant dans les fonctions des AcM, y compris sur la pharmacocinétique de l'AcM en jouant sur la demi-vie de ce dernier (Boesch et al., 2015). L'un des moyens d'influer sur la demi-vie d'un anticorps est d'augmenter sa liaison au FcRn, ce qui peut permettre de prolonger l'effet protecteur induit par l'immunothérapie comme démontré avec le mutant VRC01-LS, dans un modèle d'infection intra-rectal par le SHIV (Simian-human immunodeficiency virus), chez des primates non humains (Ko et al., 2014). Pour cette propriété particulièrement intéressante pour la pharmacocinétique des AcM, le FcRn est de plus en plus considéré dans le design de nouvelles approches thérapeutiques par des AcM ou ses dérivés. Des études ont montré un intérêt particulier pour le FcRn que ce soit pour une stratégie vaccinale contre le VIH, de par sa localisation privilégiée au niveau des muqueuses (Lu et al., 2011) ou pour la conception de nanobodies bispécifiques ciblant un épitope neutralisant du VIH (gp 41 MPER) et le FcRn (Gong et al., 2012).

De plus il a été montré que la nature de la glycosylation du fragment Fc pouvait impacter la réponse immune et améliorer les propriétés antivirales de l'anticorps. (Alter et al., 2018b; Bournazos and Ravetch, 2017b). Par exemple on trouve davantage d'anticorps agalactosylés chez les personnes souffrant d'infections virales chroniques comme celle induite par le VIH ou bactérienne telle que *Mycobacterium tuberculosis*, tandis qu'un anticorps hypersialylé est lui associé à un phénotype anti-inflammatoire. D'autres publications ont également montré qu'un anticorps afucosylé est associé à une meilleure affinité pour le FcγRIIIA et à un renforcement des fonctions effectrices comme l'ADCC (Jennwein and Alter, 2017; Liu et al., 2015; Shields et al., 2002). De récents travaux sur des patients infectés par le VIH, produisant naturellement

des anticorps anti-VIH hautement neutralisants, ont également montré un impact de la glycosylation des anticorps sur la réponse humorale, via l'interaction entre les IC, formés par ces anticorps endogènes et le complément.(Lofano et al., 2018). Aux vues de ces résultats et sachant que nos travaux ont montré que l'immunothérapie antivirale par l'AcM 667, induisait une forte réponse humorale endogène, responsable en partie des effets vaccinaux, il serait intéressant d'établir le profil de glycosylation de notre AcM thérapeutique, ainsi que de la réponse humorale induite.

Ainsi une meilleure compréhension des FcγRs et des interactions IC-FcγR apparaît indispensable dans l'amélioration des immunothérapies antivirales par AcM. En effet le choix de l'isotype de l'AcM implique que certains FcγRs seront ciblés de façon privilégiée, pour les raisons citées précédemment (affinité isotype, profil de glycosylation, polymorphismes.).

Par extension favoriser un ou plusieurs FcγRs revient à cibler la ou les cellules immunitaires qui les expriment, et par conséquent les fonctions effectrices et immunomodulatrices qui leurs sont associées. Il est alors d'autant plus important de tenir compte des cellules immunitaires que l'on souhaite atteindre lors de l'immunothérapie par AcM. Ainsi les FcγRs ont un rôle central dans les immunothérapies par AcM car ils sont un pont reliant l'effet thérapeutique et la réponse immunitaire.

Il est donc essentiel de déterminer quels sont les FcγRs et par conséquent qu'elles cellules les exprimant, sont à même d'apporter la réponse antivirale la plus efficace.

Dans ce but l'un de mes objectifs de Thèse a été de déterminer l'influence de l'infection et de l'immunothérapie antivirale par AcM, sur l'expression des différents FcγRs *in vivo*, ce qui pour le moment n'a été que très peu, voire pas décrit dans la littérature.

Des études *in vitro* ont montré par qRT-PCR qu'une réponse inflammatoire (auto-immunité, cytokine pro-inflammatoire (Nakatani et al., 1999), pouvait augmenter l'expression des FcγRs activateurs et diminuer l'expression du FcγR inhibiteur (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Schiff et al, 2008). J'ai confirmé ces résultats lors de mes expérimentations *in vitro* par une modulation de l'expression des FcγRs à la surface des neutrophiles suite à une stimulation par le LPS et l'IFNγ. De plus j'ai montré de manière intéressante que l'IFN de type I, IFNα11 pouvait aussi moduler l'expression des FcγRs.

En revanche la modulation de l'expression des FcγRs sur les neutrophiles *in vitro*, n'a pas été observée après stimulation par le virus seul (V) ou complexé à l'AcM (IC). Ceci peut s'expliquer par le fait que les conditions de culture *in vitro* ne bénéficient pas de l'environnement inflammatoire que l'on peut trouver *in vivo* lors d'une infection. En effet d'autres études, notamment chez l'Homme ont montré une modulation de l'expression des FcγRs lors d'une infection virale, y compris lors de l'infection par le VIH. Descours et al, ont montré en 2017, (Descours et al., 2017) dans un modèle *in vitro* d'infection par le VIH que des lymphocytes T-CD4 quiescentes pouvaient exprimer le FcγRIIA, qui n'est classiquement pas exprimé sur les lymphocytes T dans ces conditions ou lors de l'infection productive des lymphocytes T CD4. Les cellules FcγRIIA+ ont alors été désignées comme potentiel réservoir du VIH, représentant un immense espoir pour le traitement définitif de l'infection par le VIH. Néanmoins si la littérature s'accorde sur l'expression du FcγRIIA sur les lymphocytes T, des controverses subsistent sur son implication dans le ciblage des réservoirs du VIH (Abdel-Mohsen et al., 2018).

Il a également été observé une augmentation du FcγRI sur les neutrophiles et les monocytes de patients atteints par le VIH (Capsoni et al., 1992; Morquin et al., 2017) et dans un modèle murin d'infection par le CMV (Chauhan et al., 2017) une augmentation du FcγRIV sur les cellules de la microglie (appartenant à la lignée des monocytes/macrophages).

Une littérature restreinte a montré qu'un contexte infectieux pouvait induire l'augmentation de l'expression de certains FcγRs mais il n'a pas été établie de façon claire qu'elles sont les conséquences biologiques de ces modulations, notamment sur la réponse immunitaire antivirale. Au début de ma thèse, nous ignorons également les conséquences de l'administration d'AcM antiviraux sur l'expression des FcγRs, ni si les modulations de l'expression des FcγRs observées dans les contextes d'infections virales pouvaient influencer sur le pronostic thérapeutique des immunothérapies antivirales par AcM, (de par l'interaction des IC avec les FcγRs).

Pour tenter de répondre à ces questions j'ai établi de façon originale, un répertoire d'expression des différents FcγRs, dans les différentes conditions de notre étude (infection et immunothérapie par AcM) à différentes étapes de la réponse immunitaire. Les conditions de notre modèle constituant un environnement inflammatoire, pouvant potentiellement moduler l'expression des FcγRs.

Le contexte inflammatoire particulier créé par l'infection et l'immunothérapie par AcM a permis l'induction de l'expression du FcγRI à J14 p.i. chez les animaux infectés traités ainsi que l'augmentation de celle du FcγRIV, sur laquelle je reviendrai plus tard. Ces résultats suggèrent que l'immunothérapie par le 667 entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs pour lesquels il a la plus forte affinité, le FcγRIV et le FcγRI, maximisant ainsi sa fixation aux cellules immunitaires. Désormais il est important de comprendre les conséquences de la modulation de l'expression de ces FcγRs sur la réponse immunitaire.

Le rôle du FcγRI dans les réponses immunes et en particulier les réponses antivirales n'a pas été complètement résolu. Plusieurs études ont montré un rôle important du FcγRI dans des cas de maladies auto-immunes (Ioan-Facsinay et al., 2002), de réponses inflammatoires (Barnes et al., 2002) ou d'immunothérapies anti-tumorales par AcM (Bevaart et al., 2006).

Dans notre modèle expérimental, les modulations de l'expression des FcγRIII et FcγRIIB n'ont pas pu être démontrées de façon claire car elles n'ont pas pu être analysées séparément lors de cette étude, en raison de l'indisponibilité d'un anticorps anti-FcγRIIB et du manque d'efficacité de l'anticorps anti-FcγRIII (clone AT154-2) commercialement disponible. Ceci m'a empêché d'établir s'il y avait des modulations de l'expression de ces deux récepteurs et de pouvoir établir un ratio entre récepteur activateur et récepteur inhibiteur présent à la surface des cellules en fonction des conditions de stimulations. Néanmoins pour les neutrophiles, la littérature décrit que la proportion du FcγRIIB à la surface des cellules est minime par rapport à celle du FcγRIII (Daëron, Nimmerjhan. 2014), on pourrait donc considérer que l'expression des FcγRII-III visualisée, reflète davantage les variations du FcγRIII. Néanmoins seules de faibles variations ont été observées sur l'expression des FcγRII-III à la surface des neutrophiles quelque soit les conditions.

En revanche, lors de la réalisation du répertoire de l'expression des FcγRs à J14 p.i., une diminution des FcγRII-III a été observée sur les Ly6G^{int} et les cellules dendritiques, chez les animaux infectés. Cette diminution pourrait être expliquée par un phénomène de diminution de l'expression ou de clivage « shedding » de ce récepteur suite à son clivage par l'enzyme ADAM17 (A disintegrin and metalloproteinase). En effet selon les données de la littérature il a été montré chez l'Homme et le porc (Gu et al., 2016; Jing et al., 2015), que lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles peuvent subir une perte du FcγRIII (CD16), par un clivage induit par l'enzyme ADAM17 (Middelhoven et al., 2001) mais ce phénomène n'a pas été décrit chez la souris.

Il est donc d'autant plus nécessaire de réitérer ces expériences avec un anticorps spécifique pour ce récepteur. Afin d'approfondir les modulations d'expression de ce récepteur on peut également envisager de quantifier le CD16 soluble dans le surnageant comme cela a été fait dans certaines études (Huizinga et al., 1990; Teillaud et al., 1993; Wang et al., 2016b). On pourrait également envisager d'utiliser une technologie qui nous permette de visualiser la perte ou non de ce récepteur sur la membrane, avec l'AMNIS (imaging flow cytometer) qui allie les propriétés de la cytométrie et de la microscopie. Ce type de technologie nous permettrait de visualiser la perte ou la surexpression de FcγR et nous donnerait un aperçu de la proportion de chaque type de FcγR à la surface des cellules immunitaire, dans les différents contextes de notre étude.

Par ailleurs l'expression du FcγRIIB, à la surface des lymphocytes B, s'est révélée être hétérogène en fonction du sous type de lymphocytes B de la rate. Il est intéressant de noter que celle-ci est nettement plus élevée sur les lymphocytes de la zone marginale comparé aux lymphocytes B folliculaires. Cette différence d'expression basale est d'autant plus pertinente que le recrutement de cette population de lymphocytes est significativement augmenté dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM et qu'elle est dépendante de la présence de neutrophiles (Naranjo-Gomez et al, 2018). Cela est d'autant plus intéressant que le FcγRIIB, est le seul FcγR de type I exprimé sur les lymphocytes B. Sur cette population cellulaire, son rôle ne se résume pas à une fonction inhibitrice. Il est aussi impliqué dans le maintien de la tolérance en contribuant à éliminer les cellules B auto-reactifs (Nimmerjhan et al, 2006) et à la maturation de l'affinité des B des centres germinaux. Lors de l'agglomération des FcγRIIB à la surface de la cellule, un signal pro-apoptotique est généré, mais lorsqu'il y a co-engagement du FcγRIIB et du BCR, ce signal est bloqué par le recrutement de phosphatase (SHIP 1) (Ravetch, 2003) empêchant ainsi la mort de la cellule. Il serait donc intéressant de mener de nouvelles investigations afin d'évaluer les conséquences biologiques de l'expression de ce récepteur, à la surface de cette population de lymphocyte B de la zone marginale.

En ce qui concerne le répertoire d'expression du FcγRIV, il a été montré de façon générale une modulation importante du FcγRIV à la surface des cellules myéloïdes (neutrophiles et monocytes surtout) chez les animaux infectés à J8 p.i. et chez les animaux infectés-traités à J14 p.i.. De façon étonnante j'ai noté qu'il n'y avait pas d'augmentation d'expression du FcγRIV à J8 p.i. à la surface des cellules myéloïdes des animaux infectés-traités. Ce manque de modulation d'expression du FcγRIV chez les animaux infectés-traités à J8 p.i. pourrait s'expliquer par le fait que l'immunothérapie par AcM est encore très présente à J8 et que l'action neutralisante de l'AcM 667, combiné à ses fonctions effectrices (ADCC, ADCP, CDC...) permet de limiter la propagation virale, réduisant ainsi l'inflammation.

En revanche à J14 p.i. l'expression du FcγRIV est potentialisée dans les cellules myéloïdes chez les animaux infectés-traités comparé aux animaux contrôles et infectés. Cette différence pourrait aussi s'expliquer par la modification de l'environnement inflammatoire induit par l'immunothérapie par AcM, qui module l'activation des acteurs de la réponse immunitaire innée, et notamment leur production de cytokines pro-inflammatoires. Ce contexte entraîne une augmentation de l'expression du FcγRIV, qui a d'ailleurs une haute affinité pour l'isotype IgG2a, qui est l'isotype de l'AcM thérapeutique utilisé.

En outre la réalisation de ce répertoire m'a permis de mieux caractériser une sous population de neutrophiles, récemment découverte, les neutrophiles Ly6G^{int}. Ces neutrophiles sont principalement présents dans des conditions inflammatoires, à savoir chez les animaux infectés et infectés traités et subissent une augmentation considérable de l'expression du FcγRIV à leur

surface, à J8 sur les animaux infectés et à J14 sur les animaux infectés et infectés-traités. Cette population de neutrophiles était jusqu'ici quasiment inconnue, puisqu'elle n'a fait l'objet que d'une seule publication. (Deniset et al, 2017)

D'autre part cette population Ly6G^{int} contrairement aux autres neutrophiles Ly6G^{hi} est particulièrement sensible au blocage du FcγRIV. En effet lors de l'étude à court terme de l'activation de ces cellules, j'ai constaté que l'ajout de l'anticorps bloquant le FcγRIV entraînait une diminution de son recrutement à J14 p.i. et de son activation à J8 p.i. de façon significative. Les raisons biologiques de cet impact préférentiel du blocage du FcγRIV sur cette population restent encore à être déterminées. Néanmoins je ne peux exclure que ces effets soient dû à la liaison importante du 9E9 sur le FcγRIV qui est fortement exprimé sur les neutrophiles Ly6G^{int}. En effet lors de la mise au point du protocole de blocage du FcγRIV, j'avais observé que des doses trop importantes de 9E9 entraînaient la mort des neutrophiles Ly6G^{hi} chez les animaux infectés-traités, probablement dû à un fort engagement des FcγRs, par le blocage combiné à l'immunothérapie par AcM. Or les neutrophiles Ly6G^{int} fixent à leur surface bien plus d'anticorps 9E9 que les neutrophiles Ly6G^{hi}, ce qui pourrait aboutir à la mort cellulaire de ces cellules et expliquer la différence du pourcentage de cellules observée dans les conditions où le 9E9 a été administré.

L'ensemble des résultats du répertoire de l'expression des FcγRs dans les différents contextes de mon étude ont permis d'apporter de nouvelles informations quant à leur modulation dans un contexte pathologique viral et un contexte d'infection virale traitée par immunothérapie par AcM. Désormais il faudrait établir le rôle de chacun des FcγRs, dans l'effet protecteur induit par l'immunothérapie antivirale par AcM. Pour ce faire plusieurs stratégies sont traditionnellement utilisées dans la littérature. L'utilisation d'animaux KO est la plus répandue, mais malheureusement cette stratégie n'est pas envisageable dans notre cas car les animaux ne sont pas disponibles pour notre souche de souris 129/Sv/Ev. D'où l'utilisation de stratégies alternatives tel que le blocage des FcγRs par des anticorps bloquants spécifique de chaque FcγR, mais là encore nous sommes confrontés à des difficultés car il n'existe pas d'anticorps bloquant pour le FcγRI. De plus même si des AcM existent, un traitement supplémentaire (déglycosylation) de l'anticorps est parfois nécessaire pour empêcher la liaison aux autres FcγRs, par le fragment Fc de l'anticorps.

Pour réaliser l'étude des FcγRIII et FcγRIIB, il faudrait se procurer les anticorps bloquants valables pour notre souche de souris (129/Sv/Ev), qui pour le FcγRIIB, ne sont pas disponibles.

Au cours de ma Thèse je me suis également intéressée au rôle du FcRn dans l'établissement des effets vaccinaux induit par une immunothérapie antivirale par AcM. Les raisons principales de cet intérêt résident sur le rôle du FcRn sur la demi-vie des anticorps, mais surtout sur son implication dans l'augmentation de la réponse humorale, démontrée dans un modèle de souris transgénique exprimant un FcRn bovin, immunisées par un système OVA et un vaccin contre le virus influenza (Cervenak et al., 2011).

Afin d'établir le rôle du FcRn dans notre modèle, j'ai d'abord voulu évaluer si son expression pouvait être modulée dans les différentes conditions de notre modèle. A ce moment il n'existait pas d'anticorps de cytométrie fonctionnel pour évaluer l'expression intracellulaire du FcRn, et la quantification protéique du FcRn par Western Blot n'a pas été non plus satisfaisante. J'ai ensuite réalisé des expérimentations préliminaires *in vitro* sur l'activation des neutrophiles avec un AcM 667 invalidé pour la liaison au FcRn suite à des mutations dans son fragment Fc. Cet anticorps muté a été produit par Martine Cerutti (CNRS UPS3044, Saint Christol lès Ales) et l'absence de liaison au FcRn a été vérifiée par la technique de SPR par Martine Pugnère (**Plateforme Protéomique Imagerie et Interactions moléculaires (PP2I, IRCM,**

Montpellier). Les résultats de ces travaux, encore préliminaires suggèrent que l'abolition de la liaison de l'AcM 667 muté, et par conséquent des IC, au FcRn, diminuait l'activation phénotypique des neutrophiles et diminuait l'activation fonctionnelle par la diminution de la sécrétion de CCL3. Néanmoins de nouvelles investigations doivent être réalisées pour confirmer ces résultats, avant d'envisager des expérimentations *in vivo* dans notre modèle pré-clinique.

III. Rôle du FcγRIV dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM

Ces données fournies par le répertoire d'expression des FcγRs, ont mis en lumière une modulation particulièrement marquée du FcγRIV, notamment sur les neutrophiles. Il est alors apparu comme une cible intéressante dans la compréhension du rôle des neutrophiles dans l'induction d'une immunité antivirale protectrice sur le long terme dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM.

De façon surprenante l'ensemble des études sur le FcγRIV, récepteur récemment découvert (2005) comparé aux autres FcγRs, ont été réalisées dans des modèles de maladies auto-immunes (Kasperkiewicz et al., 2012; Mancardi et al., 2011; Schulze et al., 2014), de cancer (Otten et al., 2008; Simpson et al., 2013) ou d'hypersensibilité de type III (Stamatiades et al., 2016). Quasiment aucune étude ne mentionne son rôle dans un contexte infectieux, en particulier viral et encore moins dans un contexte d'immunothérapie antivirale.

De plus les quelques travaux réalisés sur ce récepteur se sont majoritairement focalisés sur son rôle sur les fonctions effectrices des cellules immunitaires, très peu ont établi son rôle dans les fonctions immunomodulatrices des cellules. En ce qui concerne ces dernières, Dillilo et al (DiLillo and Ravetch, 2015b) ont montré dans un modèle de cancer que le FcγRIV était nécessaire pour induire la réponse immune cellulaire anti-tumorale médiée par l'AcM anti-hCD20. Néanmoins aucune étude n'a montré le rôle du FcγRIV dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM.

C'est pourquoi j'ai étudié le rôle du FcγRIV dans notre modèle d'immunothérapie antivirale par AcM. Pour cela j'ai utilisé un anticorps bloquant spécifiquement le FcγRIV, le 9E9 sous forme déglycosylée, afin de garantir sa spécificité. Le choix de cette stratégie a été motivé par le fait que des animaux KO pour le FcγRIV n'étaient pas disponibles dans notre souche de souris 129/Sv/Ev.

Après de nombreuses expérimentations de mise au point, les conditions optimales ont pu être établies. J'ai alors observé que le blocage du FcγRIV impactait grandement la survie des animaux infectés-traités, perdant ainsi le bénéfice thérapeutique de l'immunothérapie par AcM, comparé aux animaux infectés-traités, traités avec un anticorps contrôle du même isotype CIso. J'ai pu établir que cet impact sur la survie n'était pas le résultat du rôle du FcγRIV, ni sur la propagation virale, ni sur la réponse cellulaire, ce qui peut paraître surprenant. En effet Dillilo et al, et Lehmann et al ont montré que le FcγRIV était exprimé sur les cellules CD11c⁺ CD8⁺ et qu'il était impliqué dans la réponse cellulaire T (DiLillo and Ravetch, 2015a; Lehmann et al., 2017). Or même si j'ai également détecté le FcγRIV sur ces mêmes cellules dendritiques, je n'ai pas pu établir le rôle du FcγRIV dans la réponse cellulaire spécifique du virus. Il faut souligner que l'étude de la réponse cellulaire dans mes travaux, s'est focalisée sur le pourcentage de lymphocytes cytotoxiques T CD8⁺ spécifiques, et sur une expérience analysant la capacité cytotoxique de ces derniers (données préliminaires, non présentées). Pour

déterminer fermement l'impact du blocage du FcγRIV sur la réponse cellulaire il faudrait réaliser d'autres expériences, permettant d'évaluer non seulement la fréquence des cellules T CD8+ spécifiques du virus mais aussi leur activation fonctionnelle, ainsi que celle des CD4. La différence d'implication du FcγRIV dans la réponse cellulaire peut aussi s'expliquer par la différence de contexte pathologique (cancer versus infection virale), montrant que la réponse immunitaire médiée par l'engagement des FcγRs et en particuliers le FcγRIV n'est pas unique mais peut être modulée par la nature de l'antigène.

En revanche dans notre modèle d'infection virale traité par immunothérapie par AcM, j'ai démontré que l'effet important du blocage du FcγRIV sur la survie des animaux infectés traités était dû à un impact important sur la réponse humorale de ces animaux, révélant de façon originale, un rôle du FcγRIV dans la réponse humorale. Cet effet se manifeste par une diminution importante de la sécrétion d'IgG endogènes spécifiques du virus FrCas^E, d'une partie des animaux infectés-traités. En effet de façon surprenante en analysant la production individuelle d'IgG anti-FrCas^E de ces animaux, j'ai observé qu'il y avait deux profils bien distincts. Ceci a également été corroboré au niveau clinique par le profil dichotomique du pourcentage d'hématocrite des animaux infectés-traités où le FcγRIV avait été bloqué. Une partie des animaux développant une forte réponse humorale anti-FrCas^E et étant protégés contre la pathologie et l'autre partie avec une réponse humorale anti-FrCas^E faible et n'étant pas protégés contre le développement de l'érythroleucémie. Ces résultats confirment ceux de nos récents travaux publiés, qui démontrent une corrélation entre production d'IgG anti-FrCas^E et protection des animaux.

De plus j'ai été également surprise par le taux extrêmement élevé de sécrétion d'IgG anti-FrCas^E des animaux infectés-traités 9E9 protégés contre le développement de la pathologie. Cela est d'autant plus surprenant que ce taux dépasse celui produit par les animaux infectés-traités CIso, comme si dans un cas le blocage du FcγRIV annihilait la réponse humorale et dans l'autre la renforçait. Les raisons de l'apparition de ce profil dichotomique ne sont pas encore identifiées, et d'autres investigations seront nécessaires pour élucider ce phénotype particulier. Il est notamment prévu de caractériser de façon plus approfondie la réponse humorale au niveau qualitatif en analysant la nature isotypique (IgG1et IgG2a) de la production endogène d'IgG spécifiques du virus.

Cependant je me dois aussi de notifier que comparé à nos travaux récemment publiés, j'ai observé des différences comparées à nos travaux récemment publiés, dans l'allure de la réponse humorale des animaux infectés traités. Dans la publication la cinétique de la réponse humorale présente un pic alors qu'elle est constante et forte dès le début de l'expérience y compris pour les animaux ayant reçu l'anticorps contrôle (CIso) dans les travaux sur le rôle du FcγRIV. Je ne peux exclure un effet de l'origine de l'anticorps bloquant ou de son isotype contrôle qui sont issus du hamster et qui par des mécanismes encore inexpliqués pourrait influencer la réponse humorale.

D'une part ayant montré un rôle important du FcγRIV sur la réponse humorale endogène spécifique du virus, et d'autre part ayant établi que les neutrophiles étaient indispensables à l'induction de cette même réponse humorale, il serait intéressant d'évaluer si le FcγRIV est responsable du rôle des neutrophiles sur la réponse humorale et de façon plus générale sur leurs fonctions B-Helper. Nos résultats présentés dans Naranjo-Gomez et al (Naranjo-Gomez et al, 2018), montrent que les neutrophiles issus des animaux infectés traités ont une sécrétion de BAFF plus importante que celle des animaux infectés, montrant un lien entre immunothérapie par AcM (et donc des IC) sur la potentialisation des fonctions B-Helper des neutrophiles. Il est donc logique de penser que le blocage d'un des FcγR majoritaire des neutrophiles puisse

impacter ces fonctions dans un contexte d'immunothérapie par AcM. Dans cet optique j'ai réalisé des expérimentations préliminaires où j'ai quantifié la sécrétion de BAFF par les neutrophiles issues des différents groupes d'animaux (contrôle, infecté, infecté-traité) bloqué ou non pour le FcγRIV à J8 p.i. Ces résultats bien que préliminaires ont montré pour une expérimentation une sécrétion plus importante de BAFF par les neutrophiles issus des animaux infectés et infectés traités comparés à ceux issus des animaux contrôles et ont montré également que le blocage du FcγRIV diminuait la production de BAFF par les neutrophiles issus des animaux infectés traités, alors qu'une autre expérience n'a pas montré de différence entre ces deux dernières conditions. De nouvelles expérimentations sont nécessaires pour statuer sur ce point. De plus il serait également intéressant d'évaluer le rôle du FcγRIV sur la sécrétion d'autres cytokines impliquées dans la réponse B telle que la lymphotoxine α pour caractériser davantage le rôle du FcγRIV sur les fonctions B-Helper des neutrophiles. Néanmoins le faible volume collecté suite aux tri *ex vivo* des neutrophiles ne permet d'effectuer qu'un nombre très limité d'expériences, il faudra donc reproduire des expériences *in vivo*.

Par ailleurs on ne peut exclure que l'impact du FcγRIV sur la survie et la réponse humorale, y compris son profil dichotomique soit le résultat de phénomènes bien plus précoces dans la réponse immune, comme c'est le cas des effets vaccinaux induit par l'immunothérapie par AcM, qui produisent une immunité protectrice à long terme, alors que les animaux sont traités seulement dans les 5 jours suivant l'infection.

Afin de comprendre le rôle du FcγRIV sur le long terme il a donc fallu caractériser son implication de façon plus précoce, sur la réponse immune innée. Étant donné que ces investigations requièrent l'euthanasie des animaux, des expérimentations à court terme (J8 et J14 p.i.) ont dû être réalisées pour caractériser le rôle du FcγRIV sur l'activation phénotypique et fonctionnelle des principales cellules l'exprimant.

D'un point de vue phénotypique pour les neutrophiles et les monocytes on note que le blocage du FcγRIV n'a soit pas d'effets, soit, affecte autant les animaux infectés traités que les animaux infectés (Ly6G^{int}), avec les paramètres observés (marqueurs d'activation de surface).

Nous n'avons pas d'indications sur le rôle du FcγRIV sur les fonctions effectrices des neutrophiles telles que la phagocytose, la sécrétion de ROS (reactive oxygen species), ou le relargage de NET (Neutrophil extracellular trap), qui peuvent elles aussi moduler les propriétés immunomodulatrices des neutrophiles (Mantovani et al., 2011). Il serait donc important d'évaluer ces fonctions car le rôle du FcγRIV sur les fonctions effectrices des cellules, n'a jamais été étudié ni dans le cadre d'une infection virale, ni dans celui d'une immunothérapie antivirale par AcM.

De façon surprenante, le blocage du FcγRIV impacte également l'activation des neutrophiles par les virus, soulevant la question d'une éventuelle interaction entre ce récepteur et le virus, ou à un effet du 9E9 sur l'activation des neutrophiles. De nouvelles investigations devront être réalisées afin de confirmer et d'expliquer ces hypothèses.

De plus l'absence d'effets du blocage du FcγRIV que ce soit sur le recrutement ou l'activation phénotypique des neutrophiles et des monocytes inflammatoires à des moments précoces de la réponse immune, pourrait trouver sa source dans un phénomène de redondance fonctionnelle avec les autres FcγRs présents sur les cellules exprimant le FcγRIV. En effet le FcγRIV n'est pas le seul FcγR activateur exprimé sur ces cellules, on retrouve également le FcγRIII et le FcγRI qui est également un récepteur de haute affinité pour les IgG et dont l'expression est augmentée significativement à J14 chez les animaux infectés traités à la surface des neutrophiles Ly6G^{int} et des monocytes. Cette hypothèse s'est d'ailleurs vérifiée dans d'autres modèles; comme l'a démontré Otten et al dans un modèle de métastases hépatiques traitées par immunothérapie par AcM avec une redondance entre le FcγRIV et le FcγRI (Otten et al.,

2008) ou dans un modèle d'infection par le CMV (Benonisson et al., 2018) et Jakus et al qui dans un modèle de maladie auto-immune où des neutrophiles ont été activés par des IC immobilisés, a montré un rôle redondant entre le FcγRIV et le FcγRIII (Jakus et al., 2008). En cohérence avec ces études, lors d'expérimentations préliminaires *in vitro*, j'avais observé qu'un blocage du FcγRIV ou du FcγRII-III seul, ne suffisait pas à diminuer l'activation induite par les IC sur les neutrophiles. Ceci confirme que les récepteurs activateurs peuvent avoir des rôles redondants et que le blocage d'un récepteur peut être compensé par les autres FcγRs, comme l'ont montré Nimmerjahn et al, où la délétion du FcγRIV sur des souris C57BL/6 entraînait une légère augmentation de l'expression du FcγRIII et réciproquement (Nimmerjahn et al., 2010). Ceci pourrait expliquer également en partie l'effet partiel du blocage du FcγRIV sur la survie (60% mortalité) et la réponse humorale, mais pas pourquoi certains animaux bénéficieraient de ces effets compensatoires et pas d'autres. Les mécanismes à l'origine de cette dichotomie restent encore inexpliqués.

Les résultats sur l'activation fonctionnelle des cellules exprimant le FcγRIV, triées à partir des animaux des différentes conditions expérimentales, n'a pas non plus permis de se prononcer sur le rôle du FcγRIV en raison du faible nombre d'expérimentations et de l'impact encore inexpliqué du blocage sur les animaux contrôles.

IV. Profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique des cellules exprimant le FcγRIV

L'établissement des profils de sécrétion cytokinique et chimiokinique, en particulier chez des animaux n'ayant pas reçu l'anticorps bloquant le FcγRIV, ont permis d'apporter des informations sur les propriétés immunomodulatrices des neutrophiles et sur leur rôle orchestrateur de la réponse immune.

En effet les neutrophiles peuvent sécréter une pléiade de cytokines et de chimiokines, qui est conditionnée par le contexte pathologique dans lequel ils se trouvent.

Des études sur les TAN (TAN : tumor infiltrating neutrophils), ont montré que les neutrophiles humains pouvaient interagir directement avec le microenvironnement tumoral, notamment par le relargage de chimiokines. (Fridlender et al., 2012). Il en va de même pour les TAN d'origine murine qui à travers plusieurs études ont montré la sécrétion de diverses chimiokines, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL13, CCL2, CCL3, CCL7 et CCL17. (Fridlender and Albelda, 2012)

La sécrétion chimiokinique des neutrophiles fait aussi l'objet de publications dans d'autres contextes, notamment suite à une stimulation par des agents infectieux. La plupart de ces publications se référant à des infections bactériennes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*), de levures (*Candida albicans*), ou parasitaire (*Toxoplasma gondii*).

En revanche peu de données existent sur la production de chimiokines par les neutrophiles suite à une stimulation par un agent viral. Les résultats de ces études montrent que des neutrophiles stimulés par des agents viraux, sécrètent différentes chimiokines qui peuvent favoriser l'interaction des neutrophiles avec d'autres cellules immunitaires. La majorité de ces études ont été réalisées chez l'Homme et ont montré que des neutrophiles humains stimulés *in vitro* par le VIH induisent la sécrétion de CXCL8 qui est impliquée dans le recrutement des neutrophiles eux-mêmes, alors que leur stimulation par le RSV montre en plus, une sécrétion de CCL3 et de CCL4, impliquées dans le recrutement des monocytes et des cellules NK. Une stimulation par

HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1), entraîne quant à lui une production de CXCL9, impliqué entre autre dans la mobilisation des lymphocytes T.

Il est important de remarquer que la plupart des données présentent dans la littérature en matière de production chimiokinique par les neutrophiles, sont issues d'études *in vitro*. Même si les fonctions des chimiokines sur la mobilisation des cellules immunitaires est connue, le rôle qu'elles confèrent aux neutrophiles dans des contextes pathologiques *in vivo*, doit être approfondi, notamment dans un contexte d'infection virale ou d'immunothérapie antivirale où peu ou pas de données existent.

De façon originale mes travaux de thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments sur la nature de la sécrétion de chimiokines et de cytokines, dans un contexte d'immunothérapie antivirale, non seulement pour les neutrophiles « classique » Ly6G^{hi} mais aussi pour la population de neutrophile Ly6G^{int}, dont les profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique n'ont jamais été décrits, quelque soit le contexte.

Les profils de sécrétions des chimiokines réalisées *in vitro* et *ex vivo* démontrent que dans un contexte d'immunothérapie antivirale, les neutrophiles Ly6G^{hi} sécrètent précocement des chimiokines impliquées majoritairement dans le recrutement des neutrophiles eux même mais aussi des monocytes et des cellules NK.

De manière intéressante nos derniers travaux publiés, ont montré que les NK étaient impliqués dans le contrôle de la propagation virale chez les souris infectées traitées par le biais de l'ADCC et que l'immunothérapie permettait de potentialiser leur production d'IFN γ , en présence de neutrophiles (Naranjo-Gomez et al, 2018). Ceci suggère une réelle collaboration entre ces deux types cellulaires dans l'efficacité de l'immunothérapie antivirale par AcM. La littérature nous fournit d'ailleurs de nombreux exemples de cette coopération entre neutrophiles et NK (Scapini and Cassatella, 2014) dans des contextes variés. En effet les neutrophiles sont essentiels dans le maintien des fonctions des NK, que ce soit dans leur homéostasie (Jaeger et al., 2012b) dans des modèles de cancer (Ogura et al., 2018);(Choi.2012.Tumor Biol), de maladies auto-immunes (Nadkarni et al., 2014) ou dans le cadre d'une infection fongique (Hao.2013.Am J Blood Res) ou bactérienne par *Legionella pneumophila* (Sporri et al., 2008). Il a été montré que les neutrophiles pouvaient agir sur la prolifération et les fonctions cytotoxiques des NK, notamment la sécrétion d'IFN γ , comme nous l'avons démontré lors dans notre récente publication (Naranjo-Gomez et al, 2018). Réciproquement les NK peuvent aussi moduler l'activation des neutrophiles, notamment par la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ ou le TNF α (Costantini and Cassatella, 2011), qui d'ailleurs, d'après mes expérimentations *in vitro* peuvent tous deux potentialiser l'activation des neutrophiles par des IC.

Actuellement des travaux sont en cours au laboratoire afin de caractériser de façon plus approfondie les mécanismes qui régissent cette coopération entre neutrophiles et cellules NK dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM.

Les profils de sécrétion chimiokinique des neutrophiles Ly6G^{hi}, notamment *in vitro* ont également révélé une forte sécrétion de CCL2, impliqué dans le recrutement des monocytes, suggérant la mise en place d'une coopération précoce entre neutrophiles et monocytes (**Figure 61**).

En effet il a été décrit que les neutrophiles sont importants pour le recrutement des monocytes, (Soehnlein et al., 2008) ainsi que pour leurs fonctions que ce soit chez la souris, dans un modèle de déficience des granules des neutrophiles (Shiohara et al., 2004), ou chez l'Homme dans un contexte de détresse respiratoire aiguë (Mokart et al., 2008).

Mes résultats sur l'étude des monocytes dans notre modèle, aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo*, suggèrent également une collaboration ou du moins un dialogue entre les neutrophiles et les monocytes. Lors de l'étude sur le rôle du FcγRIV, j'ai été amenée à étudier de plus près les monocytes et notamment les monocytes inflammatoires. J'ai montré que l'immunothérapie permettait de potentialiser l'activation de ces cellules à J14 p.i., aussi bien d'un point de vue phénotypique que fonctionnel avec la sécrétion de chimiokines et de cytokines sécrétées de façon préférentielle par les monocytes issus des animaux infectés traités. Les chimiokines et cytokines sécrétées sont également majoritairement impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes eux-mêmes (CCL2, CXCL1), ainsi que des chimiokines sécrétées en réponse à l'IFNγ, (CCL5, CXCL9, CXCL10) dont la sécrétion est également potentialisée par l'immunothérapie. Ceci est cohérent avec les expérimentations réalisées *in vitro*, présentées en données complémentaires, qui montrent que la présence de facteurs inflammatoires combinés aux IC permet de potentialiser la sécrétion ces mêmes chimiokines. Il apparaît donc que l'immunothérapie potentialise également les fonctions immunomodulatrices des monocytes et que ce contexte favorise l'interaction réciproque entre monocytes et neutrophiles.

Dans l'optique de caractériser la coopération entre monocytes et neutrophiles dans le contexte d'immunothérapie antivirale par AcM j'ai commencé la mise au point d'expérimentations de co-culture entre neutrophiles et monocytes *in vitro*. Le but étant dans un premier temps d'analyser l'effet de la co-culture sur leur activation réciproque puis dans un second temps d'établir si cette activation est dépendante d'un contact intercellulaire par des expériences de « transwell », c'est-à-dire des puits séparés par une membrane, ce qui permet d'empêcher le contact direct entre les cellules mais laisse le passage des facteurs solubles.

Le profil de sécrétion cytokinique des neutrophiles et des monocytes a aussi été examiné dans notre contexte d'immunothérapie antivirale. Il en ressort que les cytokines majoritairement sécrétées par ces populations, sont des cytokines pro-inflammatoires, IL6, TNFα et IFNγ, qui sont souvent décrites dans des contextes inflammatoires. Ce qui est d'autant plus intéressant c'est que lors des expérimentations réalisées *in vitro* sur les neutrophiles et les monocytes primaires j'ai montré que l'ajout de IFNγ, à la stimulation par les IC permettait d'augmenter l'activation des cellules au niveau phénotypique mais aussi fonctionnel par l'augmentation de la sécrétion de chimiokines, CCL4, CCL5 et CXCL10 pour les neutrophiles et CCL2, CXCL1 et CXCL10 pour les monocytes, créant ainsi une boucle d'auto-activation entre ces deux types cellulaires. Ce type de régulation de l'IFN de type I sur les neutrophiles et les monocytes dans un contexte infectieux, a aussi été décrit par Seo et al (Seo et al., 2011) dans le cadre d'une pneumonie virale aiguë chez la souris. De plus la potentialisation de la production de CCL4 pour les neutrophiles et de CCL2 pour les monocytes par de l'IFN, pourrait aussi avoir un impact sur le recrutement des NK. En effet des coopérations entre ces types cellulaires par le biais de cytokines a déjà été décrit dans d'autres contextes. Uyangaa et al ont montré l'impact de la signalisation par l'IFN de type I sur le recrutement des monocytes Ly6Chi et des NK dans un modèle murin d'infection par HSV (Herpes simplex virus)(Uyangaa et al., 2015), tout comme les travaux de Lee qui montre dans la cadre d'un modèle d'infection par HSV2, que les souris déficientes pour la signalisation par l'IFN, subissent une forte diminution du nombre de monocytes inflammatoires, qui s'accompagne d'une diminution de sécrétion d'IL18 et d'une diminution des fonctions des NK, mesurée par leur production d'IFNγ (Lee et al., 2017).

Ces études ainsi que mes résultats suggèrent un dialogue tripartite entre les neutrophiles, les monocytes et les NK dans la mise en place de la réponse antivirale ou anti-infectieuse, comme cela a été montré dans un modèle de Candidose (Dominguez-Andrés et al., 2017). Comprendre

de telles interactions de coopérations cellulaires dans notre modèle, pourrait apporter de précieuses connaissances dans la compréhension de la mise en place des effets vaccinaux suite à une immunothérapie antivirale.

Afin de caractériser ces interactions entre ces différentes cellules du système immunitaire, il serait intéressant de réaliser des coupes histologiques et de réaliser ensuite de l'immunohistochimie ou de l'immunofluorescence afin de visualiser ces interactions et de les localiser au sein de la rate, un des principaux foyers infectieux. En effet la localisation influe sur la proximité des cellules immunitaires et d'ailleurs Cassatella et Scapini ont décrit l'influence de la localisation des neutrophiles dans la rate sur leurs fonctions dans un contexte d'infection bactérienne (Scapini and Cassatella, 2017) en s'appuyant sur les travaux de Deniset et Kubes (Deniset et al, 2017). Ils décrivent que dans les conditions homéostatiques deux populations de neutrophiles subsistent dans la pulpe rouge de la rate, les neutrophiles matures dit « mobile » $Ly6G^{hi}$ et les neutrophiles immatures, dit « immobilisés » car ils forment un pool, les neutrophiles $Ly6G^{int}$. Lors de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* les macrophages de la pulpe rouge sont les premiers à intervenir pour éliminer les bactéries, suivies des neutrophiles $Ly6G^{hi}$, en parallèle les neutrophiles $Ly6G^{int}$ prolifèrent et vont se différencier en $Ly6G^{hi}$ pour renouveler le pool de neutrophiles dans la pulpe rouge. Entre 24 et 48h les neutrophiles de la circulation sont recrutés dans la zone marginale de la rate et acquièrent des fonctions B-Helper pour potentialiser la production d'anticorps par les lymphocytes B de la zone marginale.

Cette publication a permis de caractériser phénotypiquement cette population de neutrophiles $Ly6G^{int}$ ainsi que sa cinétique de déplacement et sa localisation spécifique dans la rate. L'étude réalisée lors de mes travaux de thèse a permis d'apporter des données supplémentaires et inédites sur cette population. J'ai montré que ces cellules dans les conditions inflammatoires de notre modèle, étaient activées phénotypiquement par les marqueurs d'activation de surface (CD11b, CD62L), mais surtout par leur expression du $Fc\gamma RIV$ qui est la plus importante de toutes les cellules immunitaires. J'ai également mis en évidence les propriétés immunomodulatrices de ces cellules par l'établissement d'un profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique, divers et varié, qui est modulé en fonction du contexte infectieux ou d'immunothérapie antivirale par AcM. De manière intéressante et inattendue j'ai constaté que le profil de sécrétion obtenue était distinct du profil de sécrétion des neutrophiles $Ly6G^{hi}$, montrant ainsi non pas une immaturité, comme le décrit Denise et al, mais bien des caractéristiques propres, faisant des neutrophiles $Ly6G^{int}$ une population à part entière. Pour caractériser davantage cette population dans notre modèle d'infection virale traité par immunothérapie par AcM, il serait intéressant de déterminer si sa localisation et ses partenaires sont les mêmes que dans le contexte d'infection bactérienne décrit par Deniset et al.

Ce raisonnement est également valable pour les autres acteurs de notre étude qui sont les neutrophiles $Ly6G^{hi}$ et les monocytes $Ly6C^{hi}$, qui de par leur forte sécrétion de chimiokines et de cytokines peuvent influencer la mobilisation des cellules immunitaires et de façon générale, participer à la modulation de la réponse immune. Il serait donc intéressant dans l'avenir, de visualiser les interactions entre les différentes cellules immunitaires non seulement d'un point de vue spatial par leurs localisations dans les différentes conditions pathologiques de notre modèle mais aussi d'un point de vue temporel au cours des différentes étapes de la réponse immune.

D'autre part l'établissement des profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique a aussi mis en évidence que même si l'immunothérapie antivirale par AcM permet de potentialiser l'activation des différents types cellulaires, ces derniers possèdent chacun leur propre profil de

sécrétion. De plus en dehors d'une différence dans la nature du profil, on constate une différence dans la cinétique de sécrétion des chimiokines et des cytokines.

En effet, certaines chimiokines et cytokines sécrétées par les neutrophiles à J8 p.i., ne le sont plus à J14 p.i. A contrario, certaines chimiokines (CCL3, CCL4 ou CCL5), mais surtout les cytokines sécrétées par les neutrophiles et, l'IFN γ pour les monocytes, voient leur sécrétion augmenter au cours du temps, en comparant les profils de sécrétion *ex vivo* à J8p.i (neutrophiles) ou J14 p.i.(monocytes). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, ces résultats pourraient s'expliquer par la maturation du système immunitaire, car je rappelle que les expériences sont réalisées sur des souris de 2 à 3 semaines, mais également et surtout par l'environnement inflammatoire qui est très riche *in vivo* dans le cadre l'infection virale ou de l'immunothérapie et qui permet de potentialiser la sécrétion de chimiokines et de cytokines.

D'un autre côté, les neutrophiles activés *in vitro* sécrètent faiblement, un nombre réduit de cytokines, cependant le profil de sécrétion des neutrophiles Ly6G^{hi} à J8 p.i. montre une sécrétion détectable des 12 cytokines analysées.

Ceci pourrait être expliqué par la concentration de cellules utilisées pour réaliser le dosage de cytokines/chimiokines *ex vivo*, qui est 4 fois plus concentrée que celle utilisée pour les expérimentations *in vitro*, suggérant un effet dose-dépendant ou un effet seuil, nécessitant un nombre minimum de cellules pour déclencher la sécrétion de certaines cytokines. Comme pour l'évolution des profils de sécrétion entre J8 et J14 p.i., une autre explication plausible est l'effet de l'environnement inflammatoire qui est absent *in vitro* et très riche *in vivo* dans le cadre l'infection virale ou de l'immunothérapie et qui permet de potentialiser la sécrétion de chimiokines et de cytokines.

De façon intéressante le phénomène inverse est aussi observé, des chimiokines sont fortement sécrétées *in vitro* et leurs concentrations diminuent *ex vivo* à J8 et à J14 p.i.

En effet certaines chimiokines fortement sécrétées *in vitro* par les neutrophiles Ly6G^{hi} et les monocytes ly6C^{hi}, (CCL2, CXCL1, CXCL5) impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes eux-mêmes, ne sont retrouvées qu'en faible quantité dans le profil de sécrétion chimiokinique *ex vivo*. Ces différences observées entre profils *in vitro* et *ex vivo*, pourraient être expliquées par un aspect cinétique. En effet on peut imaginer des vagues successives, de sécrétion de chimiokines et de cytokines, l'expérimentation *in vitro* correspondant au premier contact entre les cellules et les déterminants viraux (temps t0) suivie d'une évolution à J8 puis à J14 p.i. Suivant cette théorie, dans la mesure de la confirmation des résultats, les chimiokines CCL2, CXCL1 et CXCL5 seraient les toutes premières sécrétées par les neutrophiles et les monocytes dans le cadre d'une infection virale et de par leur fonction chemo-attractante participeraient à la cinétique de recrutement des cellules immunitaires, plaçant les neutrophiles et les monocytes au cœur de l'orchestration de la réponse immune antivirale très précoce.

V. Bilan des travaux de Thèse dans une perspective thérapeutique

Durant ma Thèse, j'ai montré que l'immunothérapie par AcM potentialisait les fonctions immunomodulatrices des neutrophiles, dont l'action rayonne aussi bien sur la réponse adaptative avec l'induction d'une forte réponse humorale endogène (Naranjo-Gomez et al, 2018), que sur l'immunité innée, (dans la mesure de la confirmation des résultats présentés *ex vivo*) avec l'orchestration de la réponse immune antivirale précoce et la mise en place des effets vaccinaux, par la sécrétion de chimiokines et de cytokines. Les neutrophiles représentent donc une cible particulièrement intéressante pour l'amélioration de l'efficacité des immunothérapies

antivirale. Mes travaux ont également démontré un rôle essentiel du FcγRIV, dans la protection des animaux traités par AcM antiviraux, notamment par son action sur la réponse humorale. De façon intéressante ce récepteur est également fortement surexprimé suite à l'immunothérapie à la surface des neutrophiles et des monocytes inflammatoires. Dans le but de transposer ces données chez l'Homme, afin d'améliorer les immunothérapies antivirales par AcM, il faudrait concevoir des AcM antiviraux qui ont une forte affinité pour le récepteur homologue du FcγRIV chez l'Homme, à savoir le FcγRIIIA. Cependant celui-ci n'est pas exprimé sur les neutrophiles humains, mais sur les monocytes, qui semblent aussi jouer un rôle dans la modulation très précoce de la réponse antivirale induite par l'immunothérapie. Les neutrophiles humains expriment le FcγRIIA, qui même s'il n'est pas l'homologue structural du FcγRIV pourrait bien être son homologue fonctionnel, aux vues des publications décrivant son influence sur les fonctions des neutrophiles, notamment effectrice avec la production de ROS (Tsuboi et al., 2008).

L'ensemble de mes travaux de Thèse a permis d'apporter des réponses dans la compréhension des mécanismes responsable de l'induction d'une immunité protectrice sur le long terme, ou effets vaccinaux, par des AcM antiviraux.

Cependant les études pré-cliniques comme ce fut le cas de celle ma Thèse, ne sont bien entendu pas comparable à des études cliniques et ne permettent pas d'aboutir directement à un médicament thérapeutique, mais elles n'en restent pas moins indispensables dans la compréhension des mécanismes d'action des AcM antiviraux, sans quoi aucune n'amélioration thérapeutique ne pourrait être faite. Il est plus qu'encourageant d'observer que ce concept « d'effet vaccinal » des immunothérapie antivirale par AcM, démontré chez la souris puisse aujourd'hui être démontré dans d'autres modèle toujours plus proches du réel contexte pathologique chez l'Homme, comme c'est la cas des travaux de Nishimura et al (Nishimura et al., 2017). Dans cette étude ils ont montré dans un modèle de macaques infectés par SHIV, qu'une immunothérapie antivirale précoce par des anticorps hautement neutralisant de seconde génération (3BNC117 et 10-1074), utilisés actuellement dans des essais cliniques sur des patients atteints par le VIH, pouvait aboutir à une immunité protectrice sur le long terme. Les travaux de Schoofs et al sont encore plus encourageants (Schoofs et al, 2016) montrant que le traitement de patients infectés par le VIH avec l'AcM 3BNC117 potentialise la réponse humorale antivirale de ces dernières.

Néanmoins malgré un véritable engouement pour les AcM antiviraux ces dernières années, trop peu sont aujourd'hui en cliniques (Nishimura and Martin, 2017; Salazar et al., 2017) et il est plus que jamais nécessaire d'identifier les mécanismes régissant la modulation de la réponse immune par les immunothérapies à base d'AcM antiviraux, pour développer encore davantage leur efficacité et pouvoir démocratiser leur application.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les AcM antiviraux représentent un réel espoir thérapeutique pour de nombreuses pathologies virales et notamment des infections virales chroniques qui impactent grandement la vie des patients et constituent un lourd cout pour la société.

Les travaux précédents de l'équipe ont montré dans un modèle murin d'infection rétrovirale qu'un traitement court par AcM antiviraux pouvait induire des effets vaccinaux, se traduisant par l'établissement d'une immunité protectrice antivirale sur le long terme. Désormais il est important d'identifier les mécanismes responsables de l'établissement de cette immunité protectrice afin d'améliorer les immunothérapies antivirales par AcM.

Dans cet optique, nos travaux récemment publiés auxquels j'ai participé pendant ma Thèse, ont mis en lumière le rôle clé des neutrophiles dans l'induction des effets vaccinaux, en particulier par leur implication dans l'induction d'une forte réponse humorale endogène spécifique du virus.

Afin d'expliquer ce rôle prépondérant des neutrophiles dans l'efficacité de l'immunothérapie antivirale par AcM, mes travaux de Thèse ont en partie, visé à identifier et à caractériser le rôle des IC sur l'activation des neutrophiles. Plus particulièrement ils ont étudié leurs propriétés immunomodulatrices, qui ne sont que peu, voire pas du tout décrites dans la littérature dans un contexte d'immunothérapie antivirale par AcM.

Pour répondre à ces questions j'ai utilisé deux approches complémentaires *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats *in vitro* ont montré que les neutrophiles étaient plus efficacement activés, au niveau phénotypique, par les IC comparé au virus et ce de façon Fc-dépendant. En revanche peu de différences ont été observées au niveau fonctionnel, caractérisées par le profil de sécrétion chimiokinique et cytokinique suite à la stimulation par les virus et les IC.

Dans le but de se rapprocher du contexte pathologique retrouvé *in vivo*, des facteurs inflammatoires et/ou immunomodulateurs ont été ajoutés aux conditions de stimulations *in vitro* (virus, IC) ce qui a permis de potentialiser l'activation par les IC, montrant l'importance de l'environnement inflammatoire sur la modulation de l'activation des neutrophiles par les IC. Cette étude m'a également permis de révéler en dehors des marqueurs d'activation de surface, une augmentation de l'expression des FcγRs, suite à la stimulation par les IC et le virus mais uniquement en présence de facteurs inflammatoires (IFN). Compte tenu de ces résultats, et du fait que les IC activent les cellules immunitaires par le biais des FcγRs exprimés à leur surface, je me suis intéressée à l'expression des FcγRs à la surface des différentes cellules immunitaires *in vivo*, dans les différentes conditions de notre étude. L'originalité de cette démarche repose sur le fait que de tels répertoires ont été déjà décrits dans la littérature dans des conditions contrôlées mais aucun ne mentionne l'influence de l'infection et encore moins de l'immunothérapie antivirale par AcM sur l'expression des FcγRs.

Cette étude a montré une modulation des FcγRs en fonction des différentes conditions, et notamment une augmentation du FcγRIV dans les conditions d'immunothérapie antivirale par AcM sur les cellules myéloïdes, en particulier les neutrophiles et les monocytes inflammatoires. Ce répertoire d'expression des FcγRs m'a également permis d'apporter de nouvelles données sur une population de neutrophiles (Ly6G^{int}) de la rate encore peu caractérisée. A leur surface l'expression du FcγRIV est considérablement augmentée, dans des conditions inflammatoires, que ce soit suite à l'infection (J8 p.i.) ou à l'immunothérapie antivirale (J14 p.i.), comparé aux autres cellules exprimant ce récepteur, y compris les neutrophiles « conventionnels » (Ly6G^{hi}).

L'exploitation de ces résultats m'a conduit à étudier de façon plus précise, le FcγRIV *in vivo* et notamment son rôle dans l'induction des effets vaccinaux par immunothérapie antivirale par AcM, qui n'a jamais été établie jusqu'à présent. De plus, il est aussi le récepteur présentant la plus forte affinité pour l'isotype de l'AcM thérapeutique employé dans notre modèle expérimental. Pour cela, j'ai utilisé une stratégie de blocage en utilisant un anticorps bloquant spécifiquement dirigé contre le FcγRIV. J'ai montré que le blocage de ce récepteur avait un impact sur la survie des animaux infectés-traités (60% de mortalité) et tout comme pour nos travaux sur les neutrophiles, que cet effet sur la survie, n'était pas dû à l'implication du FcγRIV dans le contrôle de la charge virale ou à un rôle sur la réponse cellulaire mais à un impact sur la réponse humorale endogène des animaux infectés-traités, confirmant ainsi la corrélation entre la forte production d'anticorps endogènes antiviraux et la protection des animaux. La similarité des résultats suggère également que le FcγRIV serait impliqué dans le rôle des neutrophiles sur la réponse humorale endogène induite par l'immunothérapie.

De façon surprenante, en quantifiant la production individuelle d'anticorps endogène anti-FrCas^E des animaux infectés traités où le FcγRIV a été bloqué, j'ai mis au jour deux phénotypes distinctes, un suivant le profil d'animaux infectés, ayant une faible réponse humorale et n'étant pas protégé de l'érythroleucémie et un autre similaire aux animaux infectés traités non bloqués avec une forte réponse humorale et une protection efficace contre le développement de la pathologie. Ce profil dichotomique ne peut être expliqué pour le moment et de nouvelles investigations devront être déployées pour en décortiquer les mécanismes sous-jacents.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du rôle du FcγRIV dans les effets vaccinaux, et après avoir établi qu'il était impliqué dans la réponse adaptative je me suis intéressée à son rôle sur la réponse immune innée précoce. J'ai ainsi caractérisé l'activation phénotypique et fonctionnelle des principales cellules innées l'exprimant à savoir les neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) et les monocytes inflammatoires, issus d'animaux des différentes conditions expérimentales (contrôle, infectée, infectée traitée) où le FcγRIV a été bloqué ou non, et ceux à court terme (J8 et J14 p.i.). Pour cela, j'ai réalisé un immunophénotypage par cytométrie en flux et un tri des neutrophiles et des monocytes, dans le but d'évaluer leur fonctions immunomodulatrices *ex vivo*, par l'établissement d'un profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique. De manière intéressante les profils rencontrés sont cohérents avec ceux rencontrés lors des expérimentations *in vitro* sur les neutrophiles et les monocytes activés par des IC en présence des cytokines TNFα, IFNγ et IFNα11, renforçant le concept de synergie entre immunothérapie par AcM et conditions pro-inflammatoires.

Il a été d'autant plus intéressant de constater qu'il y a une chronologie dans l'action des cellules myéloïdes dans ce contexte d'immunothérapie antivirale. Avec un rôle précoce des neutrophiles Ly6G^{hi} et un rôle plus tardif des neutrophiles Ly6G^{int} et des monocytes inflammatoires. Les profils de sécrétion détectés suggèrent également de par leur nature une coopération intercellulaire entre neutrophiles et monocytes, mais également avec d'autres cellules, comme les NK, plaçant les neutrophiles au cœur de l'orchestration de la réponse immunitaire lors d'une immunothérapie antivirale par AcM.

Les résultats de cette étude confirment l'évolution de la vision des neutrophiles qui se complexifie d'année en année. De simples cellules effectrices, elles sont désormais considérées comme des cellules orchestratrices de la réponse immune dans de nombreux contextes pathologiques y compris infectieux, comme nous venons de le démontrer. Il en va de même pour leur homogénéité en tant que population cellulaire. Jusqu'à récemment on les considérait comme une population homogène et bien définie, mais qui apparait dorénavant beaucoup plus

hétérogène et diversifiée que l'on ne pensait, renforçant encore davantage l'intérêt pour ces cellules aux multiples facettes.

Leur considération est essentielle dans la conception des futures immunothérapies antivirales par AcM, en raison de leurs propriétés immunomodulatrices, qui potentialisent la réponse immune endogène lors d'une immunothérapie par AcM. Il serait donc intéressant de cibler préférentiellement ces cellules, notamment en favorisant la liaison des IC aux FcγRs exprimés sur les neutrophiles.

Il est vrai que les FcγRs ne sont pas de simples récepteurs, mais des acteurs essentiels de la réponse immune, surtout dans le cadre d'une immunothérapie, car ils sont un lien entre l'AcM thérapeutique et la cellule immunitaire. La caractérisation de leur rôle est donc cruciale pour l'amélioration des immunothérapies par AcM. Mes travaux de Thèse ont apporté de nouvelles données sur le rôle du FcγRIV dans un contexte où il n'avait jamais encore été étudié, à savoir une immunothérapie antivirale. J'ai démontré qu'il jouait un rôle important sur la réponse adaptative antivirale, tout comme les neutrophiles qui l'expriment, et que son expression était grandement augmentée lors de l'immunothérapie par AcM.

Ainsi, malgré une contribution certaine dans la compréhension des mécanismes immunomodulateurs des immunothérapies par AcM sur la réponse immune endogène, ces résultats ne peuvent être transposés directement à l'Homme. Malgré une forte conservation au cours de l'évolution des mammifères, l'expression de certains FcγRs diffère entre l'Homme et la souris, dont le FcγRIV, qui n'est pas présent chez l'Homme. Néanmoins, d'autres FcγRs peuvent occuper des fonctions similaires, comme le FcγRIIA exprimé sur les neutrophiles, et impliqué dans nombreuses de ses fonctions (Tsuboi et al., 2008).

Les immunothérapies antivirales par AcM, ne sont peut-être pas encore la « magic bullet » prédite par Paul Ehrlich il y a plus d'un siècle, pour guérir n'importe quelle infection, mais l'amélioration continue de leur spécificité, de leurs propriétés neutralisantes, ainsi et surtout, que le caractère unique de leur fonction immunomodulatrice sur la réponse immune endogène de l'hôte, font de ces biothérapeutiques, une arme de choix dans la lutte contre les infections virales, aussi bien aiguës que chroniques, permettant ainsi à de nombreux patients à travers le monde de pouvoir à nouveau espérer.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

➤ Animal modèle utilisé :

Les souris immunocompétentes de la souche 129/Sv/Ev (*H-2D^b* haplotype), ont été élevées dans une animalerie SPF (specific pathogen free), sur le site de l'IGMM (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier). Elles ont été utilisées à différents âges en fonction des besoins expérimentaux, sans distinction de sexe.

➤ Production de particules virales et de virus :

Le virus a été produit à partir du surnageant de culture d'une lignée fibroblastique, *Mus dunni*, transfectée avec le clone proviral FrCas^E (Portis et al., 1990). Le surnageant de culture des cellules transfectées contenant des particules virales infectieuses a été utilisé pour réaliser des infections consécutives afin d'augmenter le titre viral. Ces surnageants ont été congelés et utilisés par la suite pour produire les différents lots de virus. Pour chaque production, des cellules *Mus dunni* ont été infectées avec des surnageants viraux. Une fois les cellules arrivées à confluence, le milieu a été remplacé par du milieu frais, qui a été ensuite collecté 24 h plus tard. Cette opération a été reproduite une autre fois. Puis le surnageant a été centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min et filtré à l'aide d'un filtre à 0,45 µm de diamètre, afin d'enlever les débris cellulaires. Le surnageant a été ensuite ultracentrifugé à 28000 rpm, pendant 2h à 4°C pour concentrer le virus. A la fin de l'ultracentrifugation, le milieu a été retiré et les virus ont été resuspendus 15 min plus tard :

-Pour la préparation du virus utilisé, dans les expérimentations *in vitro* et *in vivo*, les virus ont été resuspendus avec du milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) à 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 100UI/ml pénicilline, 100UI/ml streptomycine dans un volume correspondant à 5% du volume initiale, puis stockés à -80°C.

-Pour la préparation des particules virales utilisées pour réaliser l'ELISA, visant à quantifier les IgG anti-FrCas^E, les virus ont été resuspendus avec du PBS (Phosphate Buffer saline : 0.15 M NaCl, 0.01 M Na phosphate, pH 7)-Triton X100 1%, en étant concentré 40 fois et stockés à -20 °C.

➤ Évaluation du titre viral par FIA (Focal immunofluorescence assay)

Des cellules *Mus dunni* non infectées (2000 cellules/puit) ont été déposées dans des plaques 96 puits. Lorsqu'elles ont atteint 25% de confluence, elles ont été mises en culture avec des dilutions sériées de surnageants viraux (ou des virus ultracentrifugés) et du polybrène (8 µg/ml) pour faciliter l'infection des cellules, pendant une nuit. Le lendemain matin le surnageant viral a été remplacé par du milieu de culture (DMEM-10%). Au bout de 48h les foyers infectieux (FFU: focus-forming units) ont été visualisés par immunofluorescence indirecte. Tout d'abord les cellules ont été incubées avec du surnageant de culture d'hybridome de l'AcM 667(McAtee and Portis, 1985) (Dreja.2003.J Virol) pendant 1h, puis un lavage avec du PBBS (*) a permis de retirer les AcM 667 non fixés aux cellules infectées. Puis un anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC (fluorescein isothiocyanate) dilué au 1/256 (Sigma) a été incubé pendant à 1h à température ambiante (TA) dans le noir. Puis

après deux séries de lavages au PBBS, les foyers infectieux ont été visualisés et quantifiés par microscopie à fluorescence.

(*) PBBS pour 5L : KH_2PO_4 (1g à 0,2 g/l) ; NaHPO_4 (5,75 g à 1,15 g/l) ; CaCl_2 (0,7 g à 0,14 g/l) ; KCl (1,6 g à 0,32 g/l) ; NaCl (36 g à 7,2 g/l) ; $\text{MgCl}_2 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$ (1 g à 0,2 g/l) ; $\text{Mg SO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$ (1g à 0,2 g/l) ; D-Glucose (dextrose) (5 g à 1 g/l) ; H_2O q.s.p. 5 litres

➤ **Anticorps utilisés lors des expérimentations *in vivo* et *in vitro* :**

L'AcM thérapeutique 667, est produit par la société BioXCell. C'est un AcM neutralisant de souris d'isotype IgG2a et dirigée contre la glycoprotéine virale gp70 (McAtee and Portis, 1985)(Dreja.2003.J Virol).

Les deux anticorps impliqués dans les expérimentations *in vivo* du blocage du $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ sont 9E9 et PIP. L'anticorps bloquant 9E9, est une IgG1 issue du hamster arménien et est dirigé contre le $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ (Nimmerjahn et al., 2005). L'hybridome produisant le 9E9 nous a été généreusement fourni par le Dr. Pierre Bruhns (Institut Pasteur, Paris). L'AcM 9E9 a été produit par la société BioXCell.

L'anticorps PIP est une IgG1 de hamster arménien du même isotype que 9E9, dirigé contre la GST (Glutathione-S-Transférase). Il a été utilisé en tant que contrôle isotypique de l'AcM 9E9.

L'anticorps 2.4G2 est une IgG2b de rat (bloquant les $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ et $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) (Unkeless, 1979) provient de chez BioXCell.

Production de l'anticorps anti-Gag (H34) :

L'anticorps H34 a été produit par culture de l'hybridome H34 (Chesebro et al., 1981) dans du RPMI-10% SVF. Le surnageant de culture a été récolté puis centrifugé et filtré pour enlever les débris cellulaires. Les IgG présentes dans le surnageant ont été précipitées par ajout d'ammonium sulfate (314g pour 1l), mises sous agitation pendant 6h à 4°C. Les IgG précipitées ont été centrifugées à 4000 rpm pendant 30 min et re-suspendues dans un volume correspondant à 10% du volume de surnageant initial. Ensuite les IgG ont subi deux cycles de dialyse dans du PBS, grâce à des boudins de dialyse pour enlever les sels de la solution d'anticorps.

Les anticorps ont ensuite été purifiés par chromatographie d'affinité.

Des billes couplées à des protéines G ont été déposées sur une colonne. La solution d'IgG a été diluée au 1/2 avec le tampon phosphate buffer (20mM pH7). La solution a été passée plusieurs fois dans la colonne pour assurer la fixation des IgG aux protéines G. Puis les IgG ont été éluées par ajout de Glycine (100mM) à pH 2,7, les fractions ont été récupérées dans des eppendorfs contenant une solution basique de Tris (1M) pH 9 pour neutraliser la solution. La quantité d'AcM H34 produite a été quantifiée par nanodrop (ThermoScientific). Puis afin d'être utilisé en cytométrie en flux, l'anticorps H34 a été couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 650), à l'aide d'un kit de couplage commercial (DyLight NHS Ester. ThermoFischer Scientific).

➤ **Purification des neutrophiles issus de la moelle osseuse**

Les neutrophiles ont été purifiés à partir de la moelle osseuse de souris naïves, âgées de 8 à 11 semaines. Les animaux ont été euthanasiés par inhalation de CO_2 , puis leurs membres inférieurs ont été collectés, en vue de récupérer la moelle osseuse. Pour cela, les os (fémur et tibia) ont été nettoyés et leurs extrémités dégagées et coupées afin de réaliser un « flushing » (récupération de la moelle osseuse en injectant du tampon PBS-2% SVF dans

l'os à l'aide d'une aiguille de 25G avec une pression suffisante pour faire sortir la moelle osseuse hors de l'os).

La moelle osseuse a été ensuite mise en suspension et filtrée sur un tamis en nylon dont les pores ont un diamètre de 0,40 µm. Pour isoler les neutrophiles de souris, un kit commercial de sélection négative a été utilisé par la suite (Miltenyi Biotec ref : 130-097-658). Pour cela, les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 10 min à 4°C, puis re-suspendues à une concentration de 250 millions de cellules/ml dans du tampon composé de PBS-2% SVF, 2 mM EDTA. Puis un cocktail d'anticorps biotinylés a été ajouté (50 µl pour 50 millions de cellules) et incubé pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées par l'ajout de 10 ml de tampon, puis centrifugées à 300g pendant 10 min et resuspendues à 50 millions de cellules dans 400 µl. Ensuite, des microbilles couplées à des anticorps anti-biotine (100µl pour 50 millions de cellules) ont été incubées avec les cellules pendant 15 min à 4°C. Les cellules ont été lavées comme décrit précédemment et resuspendues à 100 millions de cellules dans 500 µL. Enfin les cellules ont été isolées grâce à des colonnes magnétiques (LS-colonne-Miltenyi, ref:130-042-401). La suspension cellulaire a été déposée dans la colonne magnétique, suivie de 3 lavages de 3 x 3 ml de tampon, les neutrophiles étant dans la fraction de cellules non retenues par la colonne. La purification et la viabilité des cellules ont été vérifiées par cytométrie en flux, (FACS LSR Fortessa BD Bioscience), en utilisant des marqueurs spécifiques de cette population (CD45.2-V500, CD11b-AAF, Ly6G-PerCPCy5.5).

➤ Activation des neutrophiles *in vitro*

Une fois purifiés, les neutrophiles ont été re-suspendus dans du milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute) à 10% de SVF et 100 UI/ml pénicilline, 100 UI/ml streptomycine, à une concentration de 1 million/ml, dans des plaques 96 puits à fond rond, 150 000 cellules ont été déposées/puit. Puis les neutrophiles ont été mis en contact avec différents types de stimuli. Au bout de 20h, le surnageant de culture a été récolté et conservé à -20°C, tandis que les cellules ont été marquées avec des anticorps de cytométrie afin de déterminer leur état d'activation, CD11b-AAF, CD62L-FITC, Ly6G-PerCPCy5.5, 9E9-APC, CD16/32-PeCy7, CD64-PE. Les différentes conditions de stimulations furent : (i) non stimulé (NS), correspondant à l'ajout de milieu de culture, (ii) LPS à 1µg/ml (Sigma), (iii) virus FrCas^E avec une MOI (Multiplicity of infection) de 5 (5 particules virales par cellule), (iv) IC constitués du virus FrCas^E (MOI 5) et d'1µg d'AcM 667 et l'AcM 667 seul (1µg). A noter que les IC ont été formés avant d'être ajoutés aux neutrophiles. Pour cela les virus et l'AcM 667 ont été mis en contact pendant 20 min sur une roue à TA.

Afin de se rapprocher des conditions inflammatoires retrouvées *in vivo*, différentes cytokines inflammatoires et/ou immunomodulatrices ont été ajoutés aux conditions de stimulations précédemment décrites. Des expérimentations dose-réponse des différentes cytokines ont été effectuées pour déterminer la concentration optimale. Ces cytokines ont été ajoutées aux neutrophiles seuls ou associés aux virus ou aux IC. Le TNFα à 20 UI enzymatique/puit (Peprotech), l'IFNγ 20 UI/puit (eBioScience), l'IFNα11 à 200 UI/puit, produit et généreusement fourni par le Dr. Gilles Uzé (DIMP, CNRS). Brièvement, l'interféron de souris est produit dans des cellules HEK293T Pour une culture de 900 ml, 700 000 cellules/ml sont ensemencées dans du milieu FreeStyle, puis elles sont transfectées avec un plasmide (900 µg) qui exprime l'IFNα11. 3 à 5 jours plus tard les protéines sont filtrées et récoltées dès le moment que la viabilité cellulaire dépasse les 80%. Les protéines sont sécrétées dans le surnageant combinées à tag Histidine en C-term, ce qui permet de les purifier par la suite par chromatographie sur colonnes à l'aide de billes de Ni. L'IFN est élué

par ajout d'imidazole, et la concentration protéique est déterminée par nanodrop. La pureté à elle été contrôlée par SDS-PAGE (sans β -mercaptoéthanol pour ne pas dénaturer la conformation de la protéine). De plus des expérimentations dose-réponse ont été effectuées pour déterminer la concentration optimale.

L'activation des cellules et la collecte du surnageant a été réalisé par les mêmes marqueurs que précédemment décrit.

➤ **Blocage des Fc γ R exprimés à la surface des neutrophiles *in vitro***

L'activation des neutrophiles par les stimuli présentés précédemment a également été réalisée en présence d'anticorps bloquant les Fc γ Rs exprimés à la surface des neutrophiles. Pour cela, 5 μ g d'anticorps 9E9 (Nimmerjahn et al., 2005) (bloquant le Fc γ RIV) et d'anticorps 2.4G2 (Unkeless, 1979) (bloquant les Fc γ RIIB et Fc γ RIII) ont été incubés avec les neutrophiles purifiés, pendant 45 min à 4°C, sur une plaque de 96 puits à fond rond. Puis un lavage a été effectué en centrifugeant la plaque à 1300 rpm à TA pour enlever les anticorps non fixés. Ensuite le milieu a été retiré et les cellules ont été resuspendues dans du milieu de culture et les stimuli cités précédemment (Virus, IC, 667) ont été ajoutés aux cellules. L'efficacité du blocage a été vérifiée par cytométrie en flux (CD16/32-PeCy7,9^{E9}-APC). L'activation des neutrophiles et la collecte du surnageant a été déterminée par les mêmes marqueurs que précédemment décrit.

➤ **Purification et activation des monocytes issus de la moelle osseuse**

Les monocytes ont été purifiés à partir de moelle osseuse de souris naïves, âgées de 8 à 11 semaines. Les animaux ont été euthanasiés et la moelle osseuse préparée comme précédemment décrit.

L'isolation des monocytes a été réalisée à l'aide d'un kit commercial de sélection négative (Miltenyi Biotec, ref : 130-100-629). Pour cela, les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 10 min à 4°C, puis re-suspendues à une concentration de 250 millions de cellules/ml dans du tampon composé de PBS-2% SVF, 2 mM EDTA. Puis un cocktail d'anticorps biotinylé a été ajouté (50 μ l pour 50 millions de cellules) et incubé pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées par l'ajout de 10 ml de tampon, puis centrifugées à 300g pendant 10 min et resuspendues à 50 millions de cellules dans 400 μ l. Puis des microbilles couplées à des anticorps anti-biotine (100 μ l pour 50 millions de cellules) ont été incubées avec les cellules pendant 15 min à 4°C. Les cellules ont été lavées comme décrit précédemment et resuspendues à 100 millions de cellules dans 500 μ l. Enfin, les cellules ont été isolées grâce à des colonnes magnétiques (LS-colonne-Miltenyi, ref :130-042-401). La suspension cellulaire a été déposée dans la colonne magnétique, suivie de 3 lavages de 3 x 3 ml de tampon, les monocytes étant dans la fraction de cellules non retenues par la colonne. La purification et la viabilité des cellules ont été vérifiées par cytométrie en flux, (FACS LSR Fortessa BD Bioscience), en utilisant des marqueurs spécifiques de cette population (CD45.2-V500, CD11b-AAF, Ly6C-BV605, CD115-BV711).

La stimulation des monocytes a été réalisée en utilisant les mêmes conditions de stimulations que celle utilisées pour l'activation des neutrophiles *in vitro*. L'activation phénotypique des monocytes a été déterminée par l'évaluation du marqueur de surface CD86 et l'activation fonctionnelle par le dosage de cytokines et de chimiokines présentes dans le surnageant de culture.

➤ **Déglycosylation de l'AcM 9E9 :**

L'AcM 9E9 est spécifique du Fc γ RIV, mais par interaction avec son fragment Fc, il peut aussi interagir avec le Fc γ RIII. Le moyen d'annihiler cette interaction est de déglycosyler le fragment Fc de l'anticorps 9E9. Le protocole a été généreusement fourni par, Claire Kizlik-Masson (Equipe : FRAME, Valerie Gouilleux-Gruart, GICC, Tours) qui a mis au point le protocole et vérifié la déglycosylation par spectrométrie de masse. L'anticorps 9E9 a été incubé à 37°C toute une nuit avec la N-Glycosidase F (Roche ref 11365177001-Sigma) à une concentration de 2 UI d'enzyme pour 100 μ g d'anticorps dans un volume total de 100 μ l. Le lendemain une série de lavages a été effectuée afin d'enlever tout résidu d'enzyme pour purifier et concentrer l'anticorps déglycosylé, à l'aide de Vivaspins 2 (dispositif de filtration et de concentration d'une protéine d'un poids moléculaire > 50 kDa dans un volume de 2ml) (Z614270-Sigma). Du PBS a été ajouté à la solution contenant l'anticorps et l'enzyme, puis les vivaspins ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 3 min à 4°C. L'opération a été reproduite 2 fois supplémentaires, et enfin l'anticorps 9E9 déglycosylé a été quantifié par nanodrop.

➤ **Infection, immunothérapie et blocage du Fc γ RIV**

Des souris de souche 129/Sv/Ev ont été infectées 8 jours après leur naissance, par 5×10^4 FFU dans 50 μ l, par une injection intra-péritonéale. Puis les animaux ont été traités ou non, par injection intra-péritonéale de 30 μ g d'AcM 667, à 1h, 2 jours et 5 jours après l'infection. De façon concomitante un anticorps bloquant spécifiquement le Fc γ RIV, l'anticorps 9E9, a été administré à la moitié des animaux, par voie intra-péritonéale dans un volume de 50 μ l /animal. Avant chaque administration les animaux ont été pesés afin d'injecter une dose constante de 5 μ g/g de poids. Les injections ont débuté 7 jours après la naissance des animaux, soit un jour avant l'infection et la première administration de l'AcM 667 puis elles ont été réalisées tous les 3 jours, jusqu'à 21 jours post-infection.

En parallèle, l'autre moitié des autres animaux ont reçu un anticorps du même isotype et de la même espèce que celui du 9E9, l'anticorps PIP servant d'isotype control, administré également à 5 μ g/g tous les 3 jours.

Ainsi 6 groupes d'animaux ont été constitués. Le groupe contrôle, non infecté, non traité, le groupe infecté non traité et le groupe infecté-traité. Chacun de ces groupes a été sous-divisé en deux groupes, un recevant l'anticorps 9E9, et l'autre l'isotype contrôle. Un minimum de 6-8 animaux a été inclus dans chaque condition expérimentale.

➤ **Isolation des cellules exprimant le Fc γ RIV à J8 et J14 p.i.**

Les rates des souriceaux des différents groupes ont été collectés individuellement à J8 et J14 p.i. et placées dans des plaques 6 puits contenant 2 ml de PBS/puit. Puis elles ont été dissociées mécaniquement, à l'aide du piston de seringues de 10 ml et transférées dans des tubes falcon de 15 ml. Une fois les plus gros débris tombés au fond du tube conique, les splénocytes de chaque animal ont été transférés dans de nouveaux tubes de 15 ml. 20 % des splénocytes de chaque animal ont été réservés pour effectuer un immunophénotypage par cytométrie en flux (pour chaque animal de façon individuel) et les 80% restant ont été utilisées pour trier les cellules exprimant le Fc γ RIV. Pour cela, les splénocytes des animaux appartenant à un même groupe ont été rassemblés en un tube commun et ont été filtrés sur un tamis en nylon de 0,70 μ m de diamètre pour enlever les cellules stromales. Compte tenu de la faible proportion des cellules d'intérêt destinées aux tris dans la rate et du jeune âge

des animaux, un enrichissement des populations d'intérêts a dû être réalisé pour augmenter l'efficacité du tri. Pour cela, les cellules majoritaires de la rate ont été retirées afin d'augmenter la proportion de ces cellules à trier. Dans cet optique les globules rouges ont été lysés en centrifugeant les splénocytes puis en resuspendant le culot avec de l'ACK (Ammonium-chloride-potassium), qui induit un choc hypotonique et un éclatement des globules rouges. Après un lavage, des anticorps couplés à de la biotine ont été incubés avec les splénocytes pendant 15 min à TA. Ces anticorps sont dirigés contre les populations non destinées au tri : lymphocytes B (anti-B220.BD), lymphocytes T (anti-CD3 BD) et globules rouges résiduels et/ou précurseurs des érythrocytes (anti-TER-119 BD). Puis des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-biotine (miltenyi 130-090-485), ont été à leurs tours incubées 15 min à TA avec les splénocytes. La préparation a ensuite été placée dans une colonne aimantée (LS-colonne-Miltenyi, ref :130-042-401) afin de laisser passer les cellules minoritaires destinées au tri, et de retenir les cellules ciblées par les anticorps. A la sortie de la colonne, les splénocytes n'ayant pas été retenus ont été placés à une concentration de 30 millions de cellules/ ml et marqués avec des anticorps couplés à des fluorochromes, CD11b-AAF (ebioscience), Ly6G-PerCPCy5.5 (BD), Ly6C-BV605 (BD), CD115-BV711 (BD). Ces anticorps sont spécifiques des populations majoritaires exprimant le FcγRIV qui été destinées au tri, à savoir les neutrophiles (Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) et les monocytes Ly6C^{hi}. Le tri de ces différentes populations a été réalisé à l'aide du trieur Aria IIu Becton Dickinson, sur le site IGMM de la plateforme MRI (Montpellier Ressources imagerie), par la responsable de la plateforme Myriam Boyer). Une fois triées, les cellules de chaque type cellulaire ont été placées en culture à une concentration de 4 millions/ml, dans du milieu RPMI-10% SVF, pénicilline-streptomycine 1 million de cellules / puit). Au bout de 24h, le surnageant de culture a été collecté et conservé à -20°C.

➤ Immunophénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux

L'immunophénotypage des cellules immunitaires de la rate des animaux, a été réalisé par un marquage par des anticorps spécifiques de chaque population cellulaire et pour certaines populations, des anticorps spécifiques de marqueurs d'activation de ces cellules. Cet immunophénotypage a été réalisé sur le FACS LSR Fortessa (BD Bioscience), disponible sur la plateforme MRI de l'IGMM. Pour cela, plusieurs combinaisons d'anticorps ont été réalisées, chaque combinaison comportant de 7 à 13 anticorps différents. Les différents panels d'anticorps utilisés sont représentés en **Tableaux 10 et 11**.

Le marquage des cellules infectées a été réalisé par incubation de l'anticorps H34 (d'isotype IgG2b), pendant 45 min à 4°C, puis un lavage au PBS-2% SVF (1300 rpm, pendant 5 min) a été effectué et les cellules ont été incubées avec un anticorps anti IgG2b couplé au PE, qui avait été au préalable incubé avec des splénocytes naïfs, pour réduire les liaisons aspécifiques., afin de pouvoir visualiser les cellules infectées par cytométrie en flux.

Cellules Myéloïdes			
Anticorps	Clone	fournisseur	nature
B220-PECY5	RA3-6B2	BD Bioscience	population
CCR2-BV421	SA203G11	BioLegend	population
CD11b-AAF	M1/70	eBioscience	Population/activation
CD11c-BV785	HL3	BD Bioscience	population
CD115-BV711	AFS98	BioLegend	population
CD16/32-PECY7	2.4G2	BD Bioscience	Activation
CD45.2-V500	104	BD Bioscience	population
CD62L-FITC	MEL-14	BD Bioscience	Activation
CD64-PE	x54-5/7.1.1	BD Bioscience	Activation
CD80-PE	16-10A1	BD Bioscience	Activation
CD86-PECY7	GL1	BD Bioscience	Activation
Armenian hamster-APC	HTK888	BioLegend	Blocage
IgG2b-PE	eBMG2b	Invitrogen	Infection
Ly6C-BV605	AL-21	BioLegend	population
Ly6G-PerCPCy5.5	1A8	BD Bioscience	population
MHCII-FITC	2G9	BD Bioscience	Activation
9E9-APC	9E9	Produit au laboratoire	Activation

Tableau 10 : Anticorps de cytométrie utilisés pour caractériser les cellules de la lignée myéloïde

Les anticorps de cytométrie utilisés caractérisés par, leurs fluorochromes, leurs clones, leurs fournisseurs et la fonction du marqueur ciblé sur la cellule

Cellules Lymphoïdes			
Anticorps	Clone	fournisseur	nature
B220-PECY5	RA3-6B2	BD Bioscience	population
CD3(e)-FITC	145-2C11	BD Bioscience	population
CD4-BV711	RM4-5	BD Bioscience	population
CD8-BV650	3-6.7	BD Bioscience	population
CD11b-AAF	M1/70	eBioscience	Activation/population
CD19-BV650	1D3	BD Bioscience	population
CD21-AAF	eBio8d9	eBioscience	population
CD23-BV421	B3B4	BD Bioscience	population
CD27-PerCPCy5.5	LG3A10	BD Bioscience	activation
CD45.2-V500	104	BD Bioscience	population
IgM-PE	eB121-15F9	BD Bioscience	population
Nkp46-BV421	29A1.4	BD Bioscience	population
Tet-PE	-	BD Bioscience	Infection

Tableau 11 : Anticorps de cytométrie utilisés pour caractériser les cellules de la lignée lymphoïde

Les anticorps de cytométrie utilisés et caractérisés par leurs fluorochromes, leurs clones, leurs fournisseurs et la fonction du marqueur ciblé sur la cellule.

➤ Réponse CD8 spécifique du virus FrCas^E

Pour déterminer la fréquence de lymphocytes T CD8, spécifiques du virus FrCas^E, des tétramères MHC-classe I, H-2D^b, spécifiques du peptide GagL du virus FrCas^E et couplés au PE (Beckman coulter) ont été utilisés pour marquer les splénocytes. Ces tétramères ont été associés avec d'autres anticorps de cytométrie spécifiques des lymphocytes T (anti-CD8), ces tétramères permettent de visualiser les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus FrCas^E.

➤ Évaluation du pourcentage de l'hématocrite et quantification des IgG endogènes spécifiques du virus FrCas^E

Afin d'évaluer la production sérique d'IgG endogènes spécifiques du virus FrCas^E, des prélèvements sanguins dans le sinus rétro-orbital, ont été effectués tous les quinze jours, à partir de J30 p.i.

Pour cela, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane, puis le prélèvement a été réalisé avec des capillaires héparinés pour éviter la coagulation du sang.

a) Évaluation du taux d'hématocrite :

Un capillaire a été utilisé pour évaluer le pourcentage d'hématocrite, principal signe clinique du développement de l'érythroleucémie. Il correspond au pourcentage du volume occupé par les globules rouges ou érythrocytes sur le volume de sang total. Pour cela, les tubes ont été centrifugés à 700 g pendant 6 min, séparant le sérum des globules rouges/cellules sanguines. À l'aide d'une réglette spéciale on détermine le volume occupé par les globules rouges par rapport au volume total de sang, définissant le taux d'hématocrite. Lorsque le pourcentage des animaux infectés atteignait le point limite de 35 %, les animaux étaient euthanasiés.

b) Quantification des IgG anti-FrCas^E endogènes

Un autre capillaire a servi à collecter le sang dans des eppendorfs pour quantifier la production d'anticorps. Le sang a été centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min, afin de séparer les globules rouges du sérum. Le sérum a été ensuite récupéré et conservé à -20°C.

La quantification des IgG endogènes spécifiques du virus FrCas^E a été effectuée en réalisant un ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), mis au point au laboratoire. Des plaques ELISA ont été recouvertes de Concanavalline A, 5 µg/puit, pendant 1 h à température ambiante (TA), afin de permettre la fixation des particules virales FrCas^E (cf « préparation particules virales »). Puis un lavage a été réalisé par addition de 200 µl/puit de PBS-Tween 0,05%, pendant 5 min, répété 3 fois. Ensuite les particules virales ont été déposées dans les puits, (50 µl/puits) et incubées toute une nuit à 4°C.

Le lendemain un nouveau lavage a été effectué pour enlever les particules non fixées. Puis le sérum de chaque animal à chaque date de prélèvement a fait l'objet de plusieurs dilutions (1/100, 1/1000 puis 1/3000) avant d'être déposé à 1/3000 dans les puits (100 µl/puits) et incubé 2h à température ambiante. Ensuite un anticorps secondaire (chèvre anti-souris γ chain spécifique) couplé à l'HRP (horseradish peroxidase) dilué au 1/1000, et à son tour déposé sur la plaque (100 µl/puits) et incubé pendant 1h à TA. La révélation a été effectuée par ajout d'OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride, SIGMA Ref 9187), substrat soluble de l'HRP. La lecture s'est faite par lecture de l'absorbance à 450 nm (lecteur de microplaque Infinite 2000 pro, TECAN).

➤ Quantification de la cytokine BAFF :

Pour quantifier la sécrétion de BAFF dans le surnageant de culture des neutrophiles stimulés *in vitro* par les cytokines inflammatoires un kit ELISA commercial (R&D-MBLYS0) a été utilisé. Le surnageant de culture (60 µl), dilué à moitié avec le tampon de dilution (60 µl) a été déposé sur une plaque 96 puits où des anticorps monoclonaux anti-BAFF avaient déjà été pré-déposés. Il a été incubé sur une nuit à 4°C, sous agitation orbitale (400 rpm). Le lendemain, des lavages (X5) ont été effectués avec un tampon de lavage. Un anticorps couplé à l'HRP a été incubé pendant 2h à TA sous agitation orbitale (400 rpm), suivi d'un nouveau lavage. Une solution contenant le substrat (peroxyde d'hydrogène +tetramethylbenzidine,) a été ajoutée à chaque puit pendant 30 min à TA, protégé de la lumière. La réaction a été arrêtée par l'ajout d'une solution stop (acide chloridrique). Puis la quantité de BAFF a été déterminée par la lecture de la densité optique à 450 nm (lecteur de microplaque Infinite 2000 pro, TECAN), corrigée avec les valeurs de densité optique obtenue à une lecture à 570 nm. La quantification de BAFF a ensuite été calculée grâce à une courbe standard réalisée à partir d'une série de dilutions de la protéine BAFF à concentration connue.

➤ Quantification de la sécrétion de cytokines et de chimiokines :

La quantification de la sécrétion de cytokines et de chimiokines dans le surnageant de culture des neutrophiles et monocytes (soit stimulés *in vitro*, soit cultivés *ex-vivo*) a été réalisée par l'utilisation de kits commerciaux (LegendPlex-Biolegend), qui se base sur une approche multiparamétrique de type CBA (cytometry bead assay). La quantification de chimiokine a été évaluée par l'utilisation du panel Mouse Proinflammatory chemokine panel (ref 740451) et la quantification de cytokines par le panel Mouse inflammation (ref 740446).

Pour cela, les surnageants de culture des cellules ont été incubés dans des plaques 96 puits à fond conique, pendant une nuit à 4°, sous agitation, avec des billes conjuguées à des anticorps spécifiques pour chaque cytokine ou chimiokine du panel testé. Chaque bille peut être distinguée par sa taille et son intensité de fluorescence pour le fluorochrome APC. Après lavage avec le tampon de lavage fourni dans le kit, des anticorps de détection biotinylés ont été incubés pendant 1h à TA sous agitation. Ces anticorps biotinylés spécifiques de type de cytokines ou de chimiokines permettent de lier les cytokines ou chimiokines au préalablement capturées par les anticorps conjugués aux billes, formant ainsi un sandwich entre la bille, la cytokine ou chimiokine et l'anticorps de détection. Afin d'être visualisable par cytométrie en flux, un fluorochrome PE couplé à de la streptavidine est ajouté et incubé pendant 30 min à TA dans le noir sous agitation. L'intensité du signal de fluorescence étant le reflet de la quantité de cytokines ou de chimiokines liées.

La lecture a été faite sur le cytomètre LSR Fortessa (BD Bioscience) disponible sur la plateforme MRI de l'IGMM. La quantification en pg/ml a pu être déterminée grâce à une gamme standard et un logiciel du fournisseur (LEGENDplex™ data analysis software) qui a permis de traduire le signal d'intensité de fluorescence en concentration protéique. Limites de détections des cytokines et des chimiokines visualisables dans le tableau 12.

LegendPlex			
Chimiokines	Limites de détection (pg/ml)	Cytokines	Limites de détection (pg/ml)
CCL2	2,3	IL1 α	2,3
CCL3	2,6	IL1 β	2,8
CCL4	3,2	IL6	1,9
CCL5	2,3	IL10	3,1
CCL11	1,9	IL12p70	2,7
CCL17	1,7	IL17A	2,8
CCL20	3,8	IL23	4,2
CCL22	2,9	IL27	9,8
CXCL1	1,6	IFN β	4,0
CXCL5	2,7	IFN γ	1,8
CXCL9	1,3	TNF α	1,9
CXCL10	1,1	GM-CSF	2,8
CXCL13	3,1		

Tableau 12 : Limites de détection des cytokines et des chimiokines par la technique du LegendPlex.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : “Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play”. Lambour J, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M, Pelegrin M. 2016; *Emerging Microbes & Infections*.

REVIEW

Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play

Jennifer Lambour, Mar Naranjo-Gomez, Marc Piechaczyk and Mireia Pelegrin

Monoclonal antibodies (mAbs), which currently constitute the main class of biotherapeutics, are now recognized as major medical tools that are increasingly being considered to fight severe viral infections. Indeed, the number of antiviral mAbs developed in recent years has grown exponentially. Although their direct effects on viral blunting have been studied in detail, their potential immunomodulatory actions have been overlooked until recently. The ability of antiviral mAbs to modulate antiviral immune responses in infected organisms has recently been revealed. More specifically, upon recognition of their cognate antigens, mAbs form immune complexes (ICs) that can be recognized by the Fc receptors expressed on different immune cells of infected individuals. This binding may be followed by the modulation of the host immune responses. Harnessing this immunomodulatory property may facilitate improvements in the therapeutic potential of antiviral mAbs. This review focuses on the role of ICs formed with different viral determinants and mAbs in the induction of antiviral immune responses in the context of both passive immunotherapies and vaccination strategies. Potential deleterious effects of ICs on the host immune response are also discussed.

Emerging Microbes & Infections (2016) 5, e92; doi:10.1038/emi.2016.97; published online 17 August 2016

Keywords: antiviral therapy; DC; Fc receptors; immunotherapy; immune complexes; monoclonal antibodies; vaccine-like effects; vaccine strategies

THERAPEUTIC POTENTIAL OF ANTIVIRAL MONOCLONAL ANTIBODIES

Monoclonal antibodies (mAbs) have gained an important place in the therapeutic arsenal against severe human diseases. More than 50 mAbs have been approved or are under review for human use, and several hundred are currently being tested in the clinic,^{1,2} most of them to treat patients suffering from a variety of cancers or inflammatory diseases.

Concerning antiviral mAbs, only one, directed against respiratory syncytial virus (RSV), has been approved for the prophylactic treatment of pediatric infections. However, employing mAbs as antiviral drugs is under consideration for the treatment of several chronic and acute severe viral infections, especially to address the public health emergencies such as the recent Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreaks.^{3–7} Illustrating this trend, the number of antiviral mAbs developed and tested in preclinical and clinical trials has grown exponentially in the past 10 years and includes mAbs directed against life-threatening agents, such as human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), influenza virus, dengue virus, Ebola virus and severe acute respiratory syndrome virus coronavirus, among others.^{8–22} Importantly, recent clinical data have also demonstrated the efficacy of anti-HIV mAbs in controlling viremia, when administered to HIV-infected patients, lending strong support to the idea that

mAbs could broaden the therapeutic arsenal against severe viral infections.^{23,24} Their use as antiviral agents is all the more likely to be considered given that multiple biological activities may account for their therapeutic effects.

Although a few mAbs have been developed to inhibit the recognition of viral receptors or co-receptors on the surface of target cells, most antiviral mAbs have been selected for their ability to neutralize virions through the binding of their antigen-binding (Fab) fragment to viral surface antigens essential for entry into host cells. However, the biological activity of antibodies is also mediated by the fragment crystallizable region (Fc) moiety. Thus, it is interesting to note that most antiviral mAbs in use are immunoglobulin (Ig)-Gs displaying a variety of effector functions, including binding to both complement and Fcγ receptors (FcγRs). Different types of FcγRs are expressed in a regulated manner by many cells of the immune system, including B cells, natural killer cells, dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, granulocytes and mast cells, and their engagement by the Fc antibody moiety is essential for regulating the antibody effector functions.^{25,26} Upon recognition of their target antigens, antiviral mAbs can facilitate virus elimination via two types of complement-mediated mechanisms: (i) inactivation of viral particles and/or phagocytosis of opsonized virus mediated by cells of the innate immune system (Figure 1) and (ii) opsonization and subsequent lysis

‘Equipe Labellisée par la Ligue Contre le Cancer’ - Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535, CNRS, 34293 Montpellier Cedex 5, France; Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

Correspondence: M Pelegrin

E-mail: mireia.pelegrin@igmm.cnrs.fr

Received 15 June 2016; revised 12 July 2016; accepted 14 July 2016

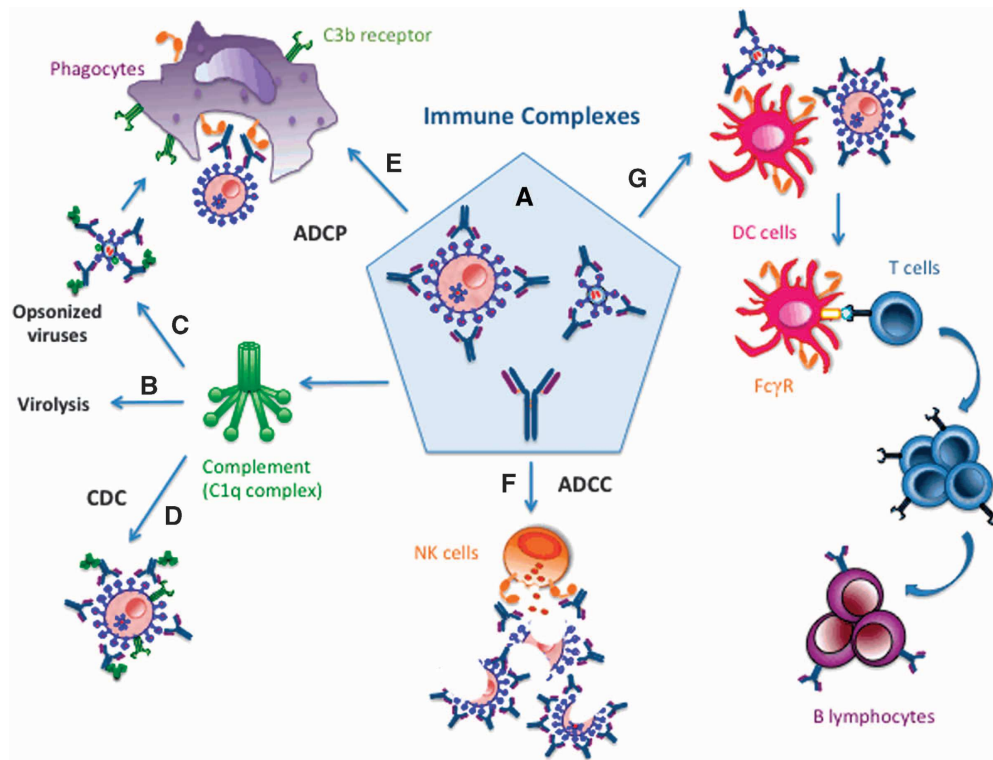


Figure 1 Multiple Fc-mediated activities of antiviral mAbs (monoclonal antibodies). Antiviral mAbs can opsonize viruses, as well as infected cells in situations when viral antigens are also expressed on their surface (A). This can lead to viral clearance through various immune-mediated mechanisms. The Fc domain allows the binding of complement to free virions, inducing direct virolysis (B). Fc- and complement receptors can recognize opsonized virions, leading to their phagocytosis by cells of the innate immune system (C). Infected cells can also be eliminated by complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and/or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) mediated by innate immunity effector cells expressing FcγRs (D–F). Immune complexes (ICs) made with mAbs and different viral determinants (virions or infected cells) can be recognized by FcγRs expressed on antigen-presenting cells such as dendritic cells (DCs) (G). IC recognition by DCs subsequently leads to enhanced antigen uptake and presentation, allowing the induction of stronger antiviral immune responses.

of infected cells, when viral antigens are also expressed on the cell surface (for example, envelope (Env) glycoprotein of lentiviruses such as HIV) via complement-dependent cytotoxicity. In addition to complement-mediated actions, recognition of FcγRs can entail antibody-dependent cellular phagocytosis and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Figure 1).^{20,27–30} Finally, antiviral mAbs also have a role in viral blunting by inhibiting cell-to-cell viral transmission.³¹

In addition to controlling the viral propagation by these mechanisms, the opsonization of viral particles and/or infected cells by therapeutic antiviral mAbs of the IgG type leads to the formation of immune complexes (ICs) recognizable by the FcγRs expressed on antigen-presenting cells (APCs) such as DCs. This can potentially affect the endogenous antiviral adaptive immune response of passive immunotherapy-treated individuals. Despite the fact that the immunoregulatory functions of antibodies (as well as ICs) have been known for a long time, and have been reported in different experimental settings and physiopathological situations,^{25,32–38} the immunomodulatory role of mAbs with clinical potential as antiviral drugs has only recently been considered.

This review mainly focuses on the induction of antiviral immune responses by ICs in both passive immunotherapies and vaccination strategies. The potential deleterious effects of antiviral antibodies on the host immune dysfunction and/or viral propagation are also discussed.

ANTIVIRAL MABS CAN ENHANCE THE HOST ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSE IN AN FC-DEPENDENT MANNER

Only recently have studies addressed whether and how passive immunotherapies utilizing antiviral mAbs are able to enhance the antiviral immunity in infected individuals. This is largely due to the limited availability of suitable immunocompetent animal models of viral infection that allow in-depth investigations of the endogenous immune response. The concept that passive immunotherapies utilizing antiviral mAbs can induce long-term protective immunity has recently been established using an immunocompetent mouse model, consisting of short immunotherapies given to young animals infected with the FrCasE murine leukemia virus. The induction of such ‘vaccine-like’ effects by antiviral mAbs, as well as some of the mechanisms involved, are reviewed in detail elsewhere.³⁹ In brief, the inoculation of mouse pups with FrCasE is fatal because the antiviral immune response is too weak to control the viral propagation. In contrast, treatment with a neutralizing mAb for several days shortly after infection blunts viral propagation and induces a lifelong protective antiviral immunity composed of both a highly neutralizing humoral response and a cytotoxic CD8⁺ T-cell response.^{40–45} This induction of protective immunity strictly depends on the Fc fragment of the neutralizing mAbs.^{43,44} Moreover, the formation of ICs composed of the administered mAbs and infected cells rather than virions is crucial for the enhanced antiviral immune response.⁴³ Such ICs are recognized by the

FcγRs expressed by DCs, which facilitate ICs internalization and lead to stronger activation and more efficient antigen presentation by DCs, eventually leading to stronger cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses. An Fc-mediated effect that occurs concurrently is the inhibition of regulatory T-cell (Treg) expansion. This depends on the mAb effector functions⁴⁵ and occurs rapidly. Moreover, it is necessary for the development of the protective humoral and cellular responses, as Treg-mediated immunosuppression is observed in all cases of chronic viral infections, where it dampens antiviral immune responses, thereby permitting the establishment of chronicity. Finally, breastfeeding and placental transfer of maternal anti-FrCasE Igs induced by mAb immunotherapy not only led to the viral propagation blunting in infected pups, but also to the induction of long-lasting protective humoral immunity in these animals.⁴² This is a particularly interesting observation when one considers that the FrCasE model is reminiscent of perinatal infection by HIV, including breastfeeding-mediated mother-to-child virus transmission.

Other evidence for the induction of ‘vaccine-like’ effects by antiviral mAbs comes from studies in several preclinical models of human viral infections and from HIV-infected patients.

In a mouse model of RSV infection, the administration of a neutralizing mAb directed against the virus attachment protein G induced a shift in the adaptive immune response from Th2- to Th1-type, leading to sustained and enhanced humoral and CD8⁺ T-cell responses.⁴⁶ However, this effect was not Fc-dependent, but rather due to the ability of the therapeutic mAb to counteract the intrinsic immunosuppressive activity of the RSV G protein.

mAb-driven enhancement of the humoral response has also been reported in two preclinical models of henipavirus infection in African green monkeys.^{47,48} Recovery from both Hendra and Nipah virus-induced disease correlated with the development of host antibody responses consequent to the administration of the highly neutralizing 102.4 mAb. This Hendra and Nipah virus cross-reactive mAb is currently being considered for human use.

Finally, anti-HIV antibodies can modulate immune responses in infected organisms. Such effects were initially reported in several non-human primate models of HIV infection and then observed in infected humans. Macaques were infected with different strains of simian immunodeficiency virus (SIV) or simian HIV (SHIV, a chimeric virus in which HIV Env substitutes for that of SIV and allows for the assessment of the antiviral effects of anti-HIV antibodies) following different protocols. These experiments showed

that the administration of highly neutralizing antibodies (either mAbs or polyclonal Igs) enhanced both the humoral and cellular antiviral immune responses of treated animals.^{8,49–51} Interestingly, recent clinical data describe the elicitation of host humoral responses in viremic subjects upon single injection of the potent 3BNC117 anti-HIV mAb.⁵² However, the mechanisms leading to the stimulation of antiviral immune responses in these preclinical models of HIV infection or in infected patients remain uncharacterized. Moreover, it is unknown whether these antiviral responses have genuine protective vaccine-like effects. In any case, these important observations open new avenues for the improvement of mAb-based antiviral HIV therapies. Moreover, as the *in vivo* activity of anti-HIV-1 bNAbs, including viral load control, was recently shown to crucially depend on Fc effector functions,^{53,54} an important issue is identifying that Fc–FcγRs interactions are involved in the induction of vaccine-like effects by antiviral mAbs.

ICS ENHANCE DC ACTIVATION AND INDUCE STRONGER ANTIVIRAL T-CELL RESPONSES: EVIDENCE FROM *IN VITRO* STUDIES

To understand the mechanisms underlying the enhancement of antiviral responses by ICs, several *in vitro* studies have addressed whether antibody-mediated viral uptake by DCs could lead to stronger activation of these cells and the development of stronger virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in an Fc-dependent manner. Such an increase in the cellular immune response has been reported in different infectious settings using ICs made with different types of antigens, including recombinant viral proteins and whole virions, as well as infected cells (Table 1).

Concerning ICs made with viral proteins, several reports have shown that ICs made up of anti-HBV mAbs and the hepatitis B surface antigen (HBsAg) can affect DC function and enhance T-cell responses. HBsAg/anti-HBV ICs significantly increased the uptake of the immunocomplexed HBsAg antigen, and augmented the *in vitro* proliferation of virus-specific T cells and their production of interferon (IFN)-γ.⁵⁵ Moreover, DCs from HBV-infected patients incubated with HBsAg/anti-HBV ICs showed higher expression of major histocompatibility complex (MHC)-II molecules and higher production of interleukin (IL)-12. IC-loaded DCs also enhanced production of IL-2 and IFN-γ by co-cultured T cells.⁵⁶ Interestingly, the therapeutic efficacy of HBsAg/anti-HBV ICs has been tested in clinical trials (see below) in HBV-infected patients with encouraging results.^{60–62}

Table 1 *In vitro* studies of T-cell responses modulation by IC-activated DC

Type of viral determinant	Antigen	Antibody	Immune outcome	Reference
Viral proteins	Recombinant HBsAg	Polyclonal Anti-HBsAg (patients sera)	Increased uptake of IC Augmented <i>in vitro</i> proliferation of T cells Augmented production of IFN-γ by T cells	55
	HBsAg (purified from patients)	Polyclonal anti-HBV (patients sera)	Enhanced IL-2 and IFN-γ production by co-cultured T cells	56
	Recombinant SIV Gag-p55	Polyclonal anti-p55 (monkeys sera)	Enhanced cross-presentation Induction of anti-Gag-specific CD8 ⁺ T-cell responses	57
Virions	SIV virions	Highly neutralizing SIVIG (monkeys sera)	Enhanced virus-specific CD4 ⁺ T-cell responses	58
	HIV-1	Polyclonal anti-HIV (patients sera)	Weak stimulating capacity of HIV-specific CTL response	59
Infected cells	FrCasE-infected cells	Anti-gp70 mAb	Enhanced proliferation of Gag-specific CD8 ⁺ T cells	43

Abbreviations: cytotoxic T lymphocyte, CTL; immune complex, IC; interferon, IFN; interleukin, IL; hepatitis B surface antigen, HBsAg; HBV, hepatitis B virus; human immunodeficiency virus, HIV; polyclonal immune globulin prepared from hyperimmune SIV infected animals, SIVIG.

More recently, in experiments aimed at visualizing immunopotentialization by HBsAg/anti-HBV ICs (see below), live-cell imaging revealed that ICs were internalized via the FcγRs of APCs and were subsequently transported through early and late endosomes into lysosomes, where they co-localized with MHC-I and MHC-II molecules.⁶³ Consistent with the latter observation, the administration of DCs loaded with HBsAg/anti-HBV ICs to mice increased the number of IFN-γ- and tumor necrosis factor-α-producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells. Similarly, in an SIV infection setting, the incubation of APCs with ICs made with a recombinant full-length Gag p55 protein and an anti-p55 IgG increased SIV capsid cross-presentation. Capsid cross-presentation was dependent on FcγR-mediated uptake of the immunocomplexed SIV capsid protein, and required its proteasomal and endosomal degradation to generate stronger Gag-specific CD8⁺ T-cell responses.⁵⁷ From a mechanistic standpoint, these studies indicate that antiviral antibodies might enhance the priming and expansion of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells by both promoting

the secretion of key cytokines and facilitating the uptake and cross-presentation of viral Ags by FcγR-expressing DCs.

Immune-complexed whole virions have also been shown to affect the functional activation of DCs. The stimulation of DCs with ICs composed of SIV virions and highly neutralizing SIV-hyperimmune sera (SVIG) led to the increased virus-specific CD4⁺ T-cell responses in an Fc-dependent manner.⁵⁸ In contrast, DCs stimulated with ICs made of HIV-1 and a polyclonal IgG pool from HIV-infected subjects showed only weak HIV-specific CTL-stimulating activity. This suggested that opsonization of HIV-1 by IgGs might be associated with decreased CTL-stimulatory DC activity.⁵⁹ However, not all IgG isotypes display equivalent effector functions. Therefore, the undefined nature of the antibodies (both in terms of predominant isotypes and neutralization potential) used to form the HIV-ICs in these experiments might explain these observations. Whether HIV-ICs made with highly neutralizing anti-HIV mAbs of a specific IgG isotype might induce stronger CD8⁺ T-cell responses is an important issue deserving further investigation (Figure 2). Moreover, the nature of the viral determinant present in ICs might also be crucial in the stimulation of antiviral responses. Interestingly, as mentioned above, in the mouse FrCasE infection model, ICs made up of a neutralizing mAb and infected cells, but not those made with virions, efficiently induce strong Gag-specific CD8⁺ T-cell responses with high cytotoxic activity.⁴³ This observation shows that the viral and cellular ICs can trigger different immunologic outcomes. In the case of FrCasE, this is explained by the fact the FrCasE-GagL CTL immunodominant epitope is, at best, poorly incorporated into virions. Taken together, these data indicate that the uptake of cellular ICs might allow the presentation of a broader viral antigenic repertoire, leading to stronger effects on immunity (Figure 2).

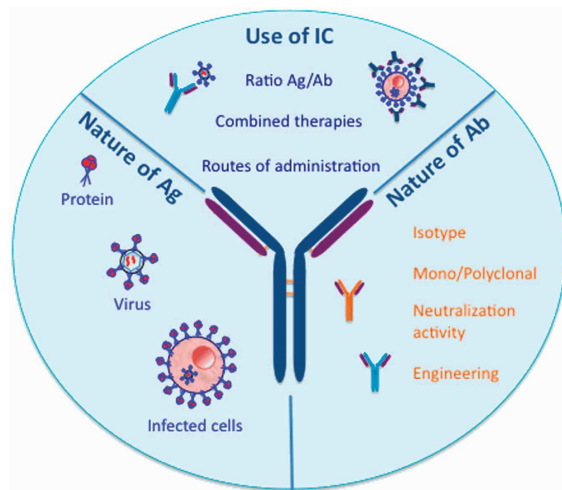


Figure 2 Parameters to consider for achieving optimal IC-mediated modulation of antiviral immune responses. The optimization of vaccine-like-effect-inducing protocols will require the consideration of several parameters such as the nature of the antigen (that is, purified viral proteins, whole virions and infected cells) and the antibody (that is, monoclonal vs polyclonal, nature of the isotype, engineered Fc domain with improved effector functions and so on) used to form the immunogenic ICs, as differences in these parameters might impact immunological outcomes. In addition, whether the optimized ICs are used alone or in combination with immunostimulatory molecules might also be of paramount importance. Several other parameters, including the IC dosage, the route of administration, the choice of adjuvant and the immunological status of patients, will also have to be considered.

MODULATION OF ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSES BY ICS FORMED WITH ENDOGENOUS ANTIBODIES DURING THE COURSE OF VIRAL INFECTIONS

ICs formed with endogenous antibodies generated in virally infected mice have been shown to influence antiviral cellular immune responses in several models (Table 2). Notably, the highly neutralizing humoral response generated against the FrCasE retrovirus in mAb-treated-infected mice was demonstrated to limit the viral propagation and to enhance memory cellular responses long after the disappearance of the therapeutic mAb (which occurs within two weeks post administration, reflecting the natural IgG lifespan *in vivo*). IC-mediated activation of DCs upon binding to FcγR was key for this effect.⁴³ Similarly, in an influenza virus infection model, ICs formed with endogenous antiviral antibodies promoted more sustained antigen presentation by DCs, resulting in stronger CD8⁺ T-cell proliferation.⁶⁴ Interestingly, such prolonged antigen presentation by DCs was dependent on virus-specific, isotype-switched antibodies that facilitated the capture and cross-presentation of viral antigens by

Table 2 Modulation of immune responses by ICs involving antiviral host humoral responses

Murine models of infection	Immune outcome	Reference
FrCasE virus (MLV)	Enhanced memory cellular CD8 ⁺ responses	43
Influenza	Prolonged Ag presentation by DC; enhanced proliferation of CD8 ⁺ T cells	64
RSV	Modification of CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-cell balance	65
LCMV	Innate immune activation; induction of virus-specific CD8 ⁺ T-cell response	66

Abbreviations: lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV; murine leukemia virus, MLV; respiratory syncytial virus, RSV.

FcγR-expressing DCs. In addition, serum antibodies can affect the virus-specific CD4⁺/CD8⁺ T-cell balance in an Fc-dependent manner during RSV infection.⁶⁵ An enhanced ratio of RSV-neutralizing to -non-neutralizing antibodies profoundly enhanced the CD4⁺ T-cell response. In a murine lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection model, endogenous virus-specific antibodies could stimulate innate immunity and thereby positively affect both the induction and the maintenance of the virus-specific CD8⁺ T-cell response. Notably, anti-LCMV antibodies limited viral replication in peripheral organs, but allowed replication of the virus in the marginal zone of the spleen, promoting CD8⁺ T-cell priming.⁶⁶ Interestingly, anti-LCMV antibodies were also reported to be essential for long-term maintenance of the memory CTL response in infected mice.^{67,68}

These observations, together with the *in vitro* studies described above, demonstrate that virus-specific antibodies can promote the acquisition, processing and presentation of antigens that are subsequently instrumental for priming T-cell responses and programming functional CD8⁺ memory in an Fc-dependent manner. They strengthen the concept that antiviral antibodies can regulate the quality and function of antiviral T-cell responses through the formation of ICs. Moreover, they also provide a rationale for developing novel IC-based therapeutic vaccination strategies.

ENHANCEMENT OF ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSES IN IC-BASED VACCINATION STRATEGIES

In 1961, Terres and Wolins⁶⁹ demonstrated the ability of ICs to induce higher antibody titers than antigens alone. Since then, the immunogenic potential of ICs, alone or in combination with different types of adjuvants, has been tested in several viral infection systems, including animal models of human infections, for example, those involving HBV, HIV, RSV or flaviviruses. The immunostimulatory effects of ICs

are principally attributed to the ability of Fc antibody fragments to recruit the host immune system. However, evidence also implicates Fab fragments in modulation of the antiviral immune response, although the outcomes are less documented and were proposed to occur via alterations in antigen conformation and/or in the exposure of specific epitopes.

We describe the enhancement in antiviral immune responses observed in IC-based vaccination experiments below (Table 3).

HBV

ICs have been tested as vaccines to augment protective immune responses in different animal models of HBV infection. In ducks, ICs made with duck HBsAg and rabbit anti-duck HBsAg (DHBsAg/anti-DHB) were used as immunogens in the form of solid matrix–antibody–antigen complexes (SMAA). Such SMAAs contained killed *Staphylococcus aureus* as a solid matrix and mAb-opsonized viruses.⁷⁹ They were initially shown to induce both humoral and CTL responses against the paramyxovirus simian virus 5 in immunized mice.⁸⁰ Immunization of HBV-infected ducks with SMAA-based DHBsAg/anti-DHB ICs led to the viral clearance in 60% of infected ducks. Notably, the administration of DHBsAg/anti-DHB ICs lacking *Staphylococcus aureus* showed decreased immunization efficiency, suggesting that the bacteria-based solid matrix functions as an adjuvant.⁷⁰

ICs have also been tested as a therapeutic vaccine against HBV infection in mice^{63,71,72} and woodchucks.⁷³ BALB/c mice immunized with HBsAg/anti-HBV ICs produced the increased levels of virus-specific antibodies.⁷¹ Moreover, administering HBsAg/anti-HBV ICs to BALB/c mice via intranasal inhalation induced both mucosal and systemic Th1-polarized immune responses, when administered with adjuvants such as cholera toxin or oligodeoxynucleotides containing

Table 3 Vaccine strategies based on immunogenic ICs

Antigen	Antibody	Administration	Host	Adjuvant	Immunological/clinical outcome	Reference
Yeast-derived recombinant HBsAg	HBIG (purified from patients)	Intramuscular	Human (clinical trial)		Decreased viral load Higher titers of HBsAg Ab Increased frequency IFN-γ and IL-2 producing T cells	60–62
DHBsAg	Polyclonal Anti-DHBsAg	Intraperitoneal	Ducks	Bacteria-based solid matrix	Clearance of serum DHBsAg	70
HBsAg (HBV vaccine, GenHevac B)	mAb Anti-HBV (1B11)	Intravenous and subcutaneous	BALB/c mice	Aluminum hydroxide	Enhancement of humoral responses	71
HBsAg (S, PreS1, PrS2 domain of HBV)	Polyclonal Anti-HBV	Intramuscular	C57BL/6 HBsAg-positive transgenic mice	DNA plasmid coding HBsAg	Decreased Ag serum levels Induction of CTL responses	72
WHVsAg	Polyclonal Anti-WHV	Intramuscular	Woodchucks	DNA plasmid coding WHBsAg	Reduction of viral load and antigenemia	73
HBsAg (plasma-derived HBV S protein)	Polyclonal Anti-HBV	Intranasal inhalation	BALB/c mice	Cholera toxin or ODN containing CpG	Mucosal and systemic Th1-polarized immune responses	74
Recombinant HIV-1 gp 120	Anti-CD4 (654-D mAb)	Intraperitoneal	BALB/c mice	MPL/DDA	Enhancement of humoral responses	75–77
RSV A2 strain	Anti-RSV (palivizumab)	Intranasal	C57BL/6 mice	—	Priming of virus-specific T- and B-cell responses	78

Abbreviations: antibody, Ab; cytotoxic T lymphocyte, CTL; dimethyldioctadecylammonium, DDA; duck HBsAg, DHBsAg; hepatitis B immunoglobulin, HBIG; hepatitis B surface antigen, HBsAg; hepatitis B virus, HBV; interferon, IFN; interleukin, IL; monophosphoryl lipid-A, MPL; oligodeoxynucleotide, ODN; respiratory syncytial virus, RSV; woodchuck hepatitis virus, WHV; WHV antigen, WHVAg.

immunostimulatory CpG motifs (CpG). This was not observed using HBsAg alone.⁷⁴ In addition, the administration of HBsAg/anti-HBV ICs to HBsAg-positive transgenic mice decreased the serum HBsAg levels and induced stronger CTL responses than HBsAg alone.⁷² Notably, the co-administration of ICs and a plasmid coding for HBsAg increased the antiviral immune response induced by ICs, indicating the adjuvant effect of DNA in this setting. A similar effect was also reported in a woodchuck model of HBV infection: immunization of woodchuck hepatitis virus (WHV)-infected animals with WHV surface antigen/anti-WHV antibody ICs combined with a DNA vaccine resulted in a higher reduction of both viral load and antigenemia relative to ICs alone.⁷³ Interestingly, the WHV-infected animals were pretreated with lamivudine (a potent HBV antiviral drug able to enhance T-cell responses in chronically HBV-infected patients) before IC/DNA immunization, suggesting that combination strategies should be considered in treating chronic HBV infections (Figure 2).

The enhancement of antiviral immune responses by ICs *in vitro* and in preclinical models of HBV infection paved the way for the development of IC-based therapeutic vaccination strategies against chronic viral hepatitis B infection. A therapeutic vaccine composed of yeast-derived recombinant HBsAg/anti-HBV immunogenic complexes (YICs) has been tested in a series of clinical trials. This vaccine approach was initially shown to be safe and to induce higher titers of HBsAg antibodies, as well as to increase serum IFN- γ and IL-2 levels in a phase I trial.⁶⁰ Importantly, a subpopulation of chronic viral hepatitis B patients showed a decrease in serum HBV viral load and HBsAg levels together with an increase in anti-HBsAg antibody titers in subsequent phase II trials.^{61,62} From a mechanistic standpoint, recent data showing that the administration of YIC-loaded DCs to mice increased both CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses⁶³ suggest that the improved immune responses induced by YICs might account for the antiviral effect observed in a fraction of patients. In an attempt to enhance the immunogenic potential of YIC-based vaccines, a phase III trial tested the therapeutic effect of a higher number of IC doses. Unfortunately, overstimulation with YIC decreased the vaccine efficiency due to host immune fatigue.⁸¹ This suggests that vaccination protocols must be optimized and must take into account both the nature and the dose of ICs, as well as other parameters such as the route of administration, the type of adjuvant and the immunological status of patients to achieve efficient protective immunization (Figure 2).

HIV

In 1988, a study immunized healthy volunteers with HIV peptides.⁸² The authors found that compared with free antigen, recall immunization with ICs induced stronger T-cell responses through uncharacterized mechanisms. Other reports also describe alteration of the anti-HIV response by ICs.^{75–77,83} In particular, the immunization of immunocompetent mice with ICs containing a recombinant HIV-1 gp120 Env glycoprotein and a mAb (654-D mAb) directed to the CD4-binding site induced a higher virus-neutralizing antibody response relative to free antigen. As described above, humoral responses were further increased upon the co-administration of ICs and monophosphoryl lipid-A/dimethyldioctadecylammonium adjuvants. Notably, the interaction of the anti-CD4-binding site mAb with HIV-1 gp120 induced conformational changes in the latter, leading to the enhanced antigenicity and immunogenicity of neutralizing epitopes localized in the HIV-1 V3 loop.⁷⁵ These observations highlight the ability of anti-HIV-1 antibodies to induce antigenic alterations in specific HIV-1 gp120 epitopes upon IC formation. Interestingly, further improvement in the immunogenicity of the V3 loop was

obtained in ICs generated with gp120 mutants lacking site-specific N-linked glycans.^{76,77,83} Taken together, these observations suggest that the ability of ICs to stimulate the induction of neutralizing antibodies is dictated by the nature of the antigen, as well as the specificity and affinity of the mAbs utilized. These results also indicate the potential contribution of Fab-mediated activities in the enhancement of antiviral humoral responses by ICs.

Flavivirus

Tsouchnikas *et al.*⁸⁴ investigated the influence of immunization with ICs on the specificity of antibody responses using the E protein of the tick-borne encephalitis virus as an immunogen. Mice were immunized with a dimeric soluble form of E (sE) alone or in complex with mAbs specific for each of the three domains of E. The antibody response induced by these ICs was compared with that observed after immunization with sE alone. Unexpectedly, immunization with ICs did not change the extent of the overall antibody response in immunized mice. However, substantially different antibody responses were observed between the different ICs. These differences most likely reflected an epitope-shielding phenomenon and antibody-mediated structural changes that led to the dissociation of the sE dimer. Thus, such phenomena can profoundly influence the fine specificity of antibody responses to the same immunogen and must be considered in IC-based vaccination strategies.

RSV

As mentioned above, serum anti-RSV antibodies can affect virus-specific T-cell responses.⁶⁵ On the basis of this, Kruijsen *et al.*⁷⁸ tested whether ICs made with the commercial RSV-neutralizing mAb palivizumab could influence adaptive immune response priming after intranasal administration. Substantial anti-RSV T-cell priming and B-cell responses were observed in mice receiving RSV-ICs, resulting in predominant Th1-type CD4⁺ T-cell response and IgG2c antibody responses. Importantly, the ICs also primed anti-RSV CD8⁺ T cells. These data have important implications for the prophylaxis and treatment of pediatric RSV infections. Nevertheless, interactions between ICs and neonatal versus adult innate and adaptive immune systems still need to be investigated because mouse studies have revealed potential antibody-induced neonatal autoimmunity in certain settings.^{85,86}

ICS AND IMMUNE DYSFUNCTION

In the course of viral infections, the formation of ICs composed of viral determinants and the resulting host humoral responses can potentially produce deleterious effects. Persistent ICs are formed in a variety of chronic viral infections and may lead to unregulated and protracted Fc γ R signaling. This may lead to immune dysfunction instead of stimulating antiviral immune responses. In this regard, the high levels of ICs formed during LCMV infection interfere with Fc γ R-mediated activities.^{87,88} These endogenously formed ICs were shown to outcompete the effector functions of exogenously administered therapeutic mAbs, in particular binding to Fc γ Rs expressed by immune cells. Persistent endogenous ICs are also linked to dysfunctional B-cell responses in HIV infection, including the suppression of antiviral IgA responses and impaired production of neutralizing antibodies (reviewed in Moir *et al.*⁸⁹). The composition of ICs might also negatively affect the efficiency of the antiviral immune response. For instance, the composition of ICs has been shown to be dynamic throughout the course of HIV infections due to changes in both antibody specificities and virion levels. Notably, circulating ICs are initially comprised of antibodies that opsonize both infectious and

non-infectious virions. This results in a decrease in the availability of antibodies able to blunt viral propagation. This phenomenon probably contributes to the reduced efficiency of the antibodies generated during acute infection.⁹⁰ Changes in circulating ICs have also been reported in HCV infections. The level of circulating ICs is low in acutely infected patients, whereas chronically infected individuals show a high proportion of immunocomplexed HCV, raising the possibility that ICs may have a role in the pathogenesis of HCV, namely liver damage.⁹¹ Moreover, the formation of ICs with non-neutralizing antibodies may also lead to the antibody-dependent enhancement of viral infection of FcγR-expressing cells. This happens in several viral infections, including those by the dengue virus.^{92–95} Along this line, the binding of ICs to FcγRs on monocytes/macrophages can paradoxically suppress innate immunity, induce IL-10 production and bias responses from Th1 toward Th2. This in turn leads to the increased infectious outputs by infected cells via intrinsic antibody-dependent enhancement.^{94,96}

Finally, ICs have also been reported to have a role in increasing viral loads in the context of gene transfer-based vaccination strategies. In the STEP HIV-1 vaccine trial, which evaluated a replication-defective adenovirus type 5 vector vaccine, the ICs formed with pre-existing anti-AdV5 antibodies improved the environment for HIV-1 replication in T cells. This may have been due to the IC-driven activation of a DC–T-cell axis that induces the activation of CD4⁺ T cells and leads to a permissive environment for HIV-1 infection. This environment probably explains the increased propagation of HIV-1 infection among adenovirus type 5-seropositive vaccine recipients.⁹⁷

IMPROVEMENT OF POTENTIAL VACCINE-LIKE EFFECTS OF MAB-BASED IMMUNOTHERAPIES

Several approaches can be considered to enhance the immunomodulatory potential of antiviral mAbs, both alone and in the form of ICs, in particular through combining neutralizing mAbs and IC-based vaccination strategies with other therapies. A first possibility would consist of inhibiting immunosuppressive mechanisms in infected individuals by either depleting the Treg response, as suggested by Nasser *et al.*⁴⁵ or targeting immune checkpoints, the latter strategy having already led to improved immune responses against both viral infections and cancer.^{98–101} In addition, the combination of antiviral mAbs with different immunostimulatory agents can also be envisaged. Because the primary structure and glycosylation pattern of the Fc fragment are both essential for antibody effector functions due to their impact on the engagement of type I and type II FcR family members,^{26,27} Fc engineering might also represent another approach, not only to improve direct antiviral effects, but also to induce stronger vaccine-like effects. In this regard, identification of the main FcRs and FcR-mediated mechanisms involved in enhancing the antiviral immune response will be of utmost importance. Taking into account that the various IgG isotypes display different effector functions and interact differently with FcγRs, the careful selection of antiviral mAb subclasses is also crucial for enhancing antiviral immune responses. Finally, as FcγR polymorphisms have already been associated with differences in viral disease progression and the therapeutic efficiency of anticancer mAbs, it will be important to evaluate the extent to which such polymorphisms can affect the vaccine-like effects induced by mAb-based antiviral immunotherapies.

CONCLUSION

The therapeutic potential of antiviral mAbs is now widely accepted, and their use as antiviral drugs is increasingly under consideration. The diverse biological activities of these mAbs lead to the direct

control of viral propagation and the modulation of antiviral immunity. This provides a novel rationale for their use in diverse prophylactic and therapeutic approaches. The improvement in both humoral and cellular responses achieved through the administration of mAbs, either free or in the form of immunogenic ICs, offers new therapeutic options. The challenge now is to improve our understanding of how ICs convert mAb-based immunotherapies from ‘passive’ to ‘active’ and to exploit the underlying mechanisms. This conversion will be crucial in reaching the goal of using antiviral mAbs to induce long-lasting protective immunity against life-threatening viral infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the ‘Ligue Nationale contre le Cancer’, the ‘Fondation ARC’, ‘Sidaction’ and the ‘Fondation pour la Recherche Médicale’. Jennifer Lambour, Mar Naranjo-Gomez, Marc Piechaczyk and Mireia Pelegrin are part of the ‘MabImprove Labex’, a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the ‘Investissements d’Avenir’ program (reference: ANR-10-LABX-53-01) that also supported this work. We are grateful to Drs Eric Kremer (Institute of Molecular Genetics of Montpellier, France) and Robert Hipskind (Institute of Molecular Genetics of Montpellier, France) for critical reading of the manuscript.

- Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* 2015; **67**: 171–182.
- Vaccelli E, Eggermont A, Galon J *et al*. Trial watch: monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013; **2**: e22789.
- Bornholdt ZA, Turner HL, Murin CD *et al*. Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014 Ebola virus outbreak. *Science* 2016; **351**: 1078–1083.
- Corti D, Misasi J, Mulangu S *et al*. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potentially neutralizing antibody. *Science* 2016; **351**: 1339–1342.
- Corti D, Zhao J, Pedotti M *et al*. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 10473–10478.
- Johnson RF, Bagci U, Keith L *et al*. 3B11-N, a monoclonal antibody against MERS-CoV, reduces lung pathology in rhesus monkeys following intratracheal inoculation of MERS-CoV. *J Virol* 2012; **86**: 49–58.
- Qiu X, Wong G, Audet J *et al*. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 2014; **514**: 47–53.
- Barouch DH, Whitney JB, Moldt B *et al*. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* 2013; **503**: 224–228.
- Berry JD, Gaudet RG. Antibodies in infectious diseases: polyclonals, monoclonals and niche biotechnology. *N Biotechnol* 2011; **28**: 489–501.
- Both L, Banyard AC, van Dollenweerd C, Wright E, Ma JK, Fooks AR. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections. *Vaccine* 2013; **31**: 1553–1559.
- Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 705–742.
- de Jong YP, Dorner M, Mommersteeg MC *et al*. Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 254ra129.
- Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S *et al*. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol* 2015; **16**: 170–177.
- Flego M, Ascione A, Cianfriglia M, Vella S. Clinical development of monoclonal antibody-based drugs in HIV and HCV diseases. *BMC Med* 2013; **11**: 4.
- Flyak AI, Illykh PA, Murin CD *et al*. Mechanism of human antibody-mediated neutralization of Marburg virus. *Cell* 2015; **160**: 893–903.
- Flyak AI, Shen X, Murin CD *et al*. Cross-reactive and potent neutralizing antibody responses in human survivors of natural Ebolavirus infection. *Cell* 2015; **164**: 392–405.
- Gautam R, Nishimura Y, Pegu A *et al*. A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* 2016; **533**: 105–109.
- Hessell AJ, Jaworski JP, Epton E *et al*. Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques. *Nat Med* 2016; **22**: 362–368.
- Krawczyk A, Arndt MA, Grosse-Hovest L *et al*. Overcoming drug-resistant herpes simplex virus (HSV) infection by a humanized antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 6760–6765.
- Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 1421–1434.

- 21 Tan Y, Ng Q, Jia Q, Kwang J, He F. A novel humanized antibody neutralizes H5N1 influenza virus via two different mechanisms. *J Virol* 2015; **89**: 3712–3722.
- 22 Williams KL, Sukupolvi-Petty S, Beltramello M *et al*. Therapeutic efficacy of antibodies lacking Fcγ receptor binding against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies [corrected]. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003157.
- 23 Caskey M, Klein F, Lorenzi JC *et al*. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 2015; **522**: 487–491.
- 24 Lynch RM, Boritz E, Coates EE *et al*. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci Transl Med* 2015; **7**: 319ra206.
- 25 Bruhns P, Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 2015; **268**: 25–51.
- 26 Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ *et al*. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2014; **15**: 707–716.
- 27 Euler Z, Alter G. Exploring the potential of monoclonal antibody therapeutics for HIV-1 eradication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014; **31**: 13–24.
- 28 Hessel AJ, Haigwood NL. Neutralizing antibodies and control of HIV: moves and counter-moves. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; **9**: 64–72.
- 29 Su B, Moog C. Which antibody functions are important for an HIV vaccine? *Front Immunol* 2014; **5**: 289.
- 30 Nimmerjahn F, Gordon S, Lux A. FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol* 2015; **36**: 325–336.
- 31 Malbec M, Porrot F, Rua R *et al*. Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J Exp Med* 2013; **210**: 2813–2821.
- 32 Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012; **119**: 5640–5649.
- 33 Getahun A, Heyman B. How antibodies act as natural adjuvants. *Immunol Lett* 2006; **104**: 38–45.
- 34 Heyman B. Antibodies as natural adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **382**: 201–219.
- 35 Hjelm F, Carlsson F, Getahun A, Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand J Immunol* 2006; **64**: 177–184.
- 36 Nimmerjahn F, Ravetch JV. FcγR receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 34–47.
- 37 Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 176–189.
- 38 Brady LJ. Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. *Infect Immun* 2005; **73**: 671–678.
- 39 Pelegrin M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. Antiviral monoclonal antibodies: can they be more than simple neutralizing agents? *Trends Microbiol* 2015; **23**: 653–665.
- 40 Gros L, Dreja H, Fiser AL, Plays M, Pelegrin M, Piechaczyk M. Induction of long-term protective antiviral endogenous immune response by short neutralizing monoclonal antibody treatment. *J Virol* 2005; **79**: 6272–6280.
- 41 Gros L, Pelegrin M, Michaud HA *et al*. Endogenous cytotoxic T-cell response contributes to the long-term antiretroviral protection induced by a short period of antibody-based immunotherapy of neonatally infected mice. *J Virol* 2008; **82**: 1339–1349.
- 42 Gros L, Pelegrin M, Plays M, Piechaczyk M. Efficient mother-to-child transfer of antiretroviral immunity in the context of preclinical monoclonal antibody-based immunotherapy. *J Virol* 2006; **80**: 10191–10200.
- 43 Michaud HA, Gomard T, Gros L *et al*. A crucial role for infected-cell/antibody immune complexes in the enhancement of endogenous antiviral immunity by short passive immunotherapy. *PLoS Pathog* 2010; **6**: e1000948.
- 44 Nasser R, Pelegrin M, Michaud HA *et al*. Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J Virol* 2010; **84**: 10169–10181.
- 45 Nasser R, Pelegrin M, Plays M, Gros L, Piechaczyk M. Control of regulatory T cells is necessary for vaccine-like effects of antiviral immunotherapy by monoclonal antibodies. *Blood* 2013; **121**: 1102–1111.
- 46 Boyoglu-Barnum S, Chirkova T, Todd SO *et al*. Prophylaxis with a respiratory syncytial virus (RSV) anti-G protein monoclonal antibody shifts the adaptive immune response to RSV rA2-line19F infection from Th2 to Th1 in BALB/c mice. *J Virol* 2014; **88**: 10569–10583.
- 47 Bossart KN, Geisbert TW, Feldmann H *et al*. A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. *Sci Transl Med* 2011; **3**: 105ra103.
- 48 Geisbert TW, Mire CE, Geisbert JB *et al*. Therapeutic treatment of Nipah virus infection in nonhuman primates with a neutralizing human monoclonal antibody. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 242ra282.
- 49 Jaworski JP, Kobia J, Brower Z *et al*. Neutralizing polyclonal IgG present during acute infection prevents rapid disease onset in simian-human immunodeficiency virus SHIVSF162P3-infected infant rhesus macaques. *J Virol* 2013; **87**: 10447–10459.
- 50 Ng CT, Jaworski JP, Jayaraman P *et al*. Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques. *Nat Med* 2010; **16**: 1117–1119.
- 51 Watkins JD, Siddappa NB, Lakshas SK *et al*. An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PLoS One* 2011; **6**: e18207.
- 52 Schoofs T, Klein F, Braunschweig M *et al*. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* 2016; **352**: 997–1001.
- 53 Bournazos S, Klein F, Pietzsch J, Seaman MS, Nussenzweig MC, Ravetch JV. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. *Cell* 2014; **158**: 1243–1253.
- 54 Halper-Stromberg A, Lu CL, Klein F *et al*. Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* 2014; **158**: 989–999.
- 55 Celis E, Chang TW. HBsAg-serum protein complexes stimulate immune T lymphocytes more efficiently than do pure HBsAg. *Hepatology* 1984; **4**: 1116–1123.
- 56 Zheng BJ, Zhou J, Qu D *et al*. Selective functional deficit in dendritic cell–T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; **11**: 217–224.
- 57 Villinger F, Mayne AE, Bostik P *et al*. Evidence for antibody-mediated enhancement of simian immunodeficiency virus (SIV) Gag antigen processing and cross presentation in SIV-infected rhesus macaques. *J Virol* 2003; **77**: 10–24.
- 58 Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H *et al*. Polyfunctional CD4+ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2009; **83**: 5514–5524.
- 59 Posch W, Cardinaud S, Hamimi C *et al*. Antibodies attenuate the capacity of dendritic cells to stimulate HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**: 1368–1374 e1362.
- 60 Xu DZ, Huang KL, Zhao K *et al*. Vaccination with recombinant HBsAg-HBIG complex in healthy adults. *Vaccine* 2005; **23**: 2658–2664.
- 61 Yao X, Zheng B, Zhou J *et al*. Therapeutic effect of hepatitis B surface antigen-antibody complex is associated with cytolytic and non-cytolytic immune responses in hepatitis B patients. *Vaccine* 2007; **25**: 1771–1779.
- 62 Xu DZ, Zhao K, Guo LM *et al*. A randomized controlled phase IIb trial of antigen-antibody immunogenic complex therapeutic vaccine in chronic hepatitis B patients. *PLoS One* 2008; **3**: e2565.
- 63 Liu H, Geng S, Wang B *et al*. Immuno-potentiating pathway of HBsAg-HBIG immunogenic complex visualized. *Hum Vaccin Immunother* 2015; **12**: 77–84.
- 64 Leon B, Ballesteros-Tato A, Randall TD, Lund FE. Prolonged antigen presentation by immune complex-binding dendritic cells programs the proliferative capacity of memory CD8 T cells. *J Exp Med* 2014; **211**: 1637–1655.
- 65 Kruijsen D, Bakkers MJ, van Uden NO *et al*. Serum antibodies critically affect virus-specific CD4+/CD8+ T cell balance during respiratory syncytial virus infections. *J Immunol* 2010; **185**: 6489–6498.
- 66 Duhan V, Khairnar V, Friedrich SK *et al*. Virus-specific antibodies allow viral replication in the marginal zone, thereby promoting CD8(+) T-cell priming and viral control. *Sci Rep* 2016; **6**: 19191.
- 67 Bachmann MF, Hunziker L, Zinkernagel RM, Storni T, Kopf M. Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 317–326.
- 68 Berghthaler A, Flatz L, Verschoor A *et al*. Impaired antibody response causes persistence of prototypic T cell-contained virus. *PLoS Biol* 2009; **7**: e80.
- 69 Terres G, Wolins W. Enhanced immunological sensitization of mice by the simultaneous injection of antigen and specific antiserum. I. Effect of varying the amount of antigen used relative to the antiserum. *J Immunol* 1961; **86**: 361–368.
- 70 Wen YM, Qu D, Zhou SH. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *Int Rev Immunol* 1999; **18**: 251–258.
- 71 Basalp A, Cirakoglu B, Bermek E. Enhancement of the immune response to hepatitis B virus vaccine by antigen specific IgM. *Immunol Lett* 2000; **73**: 1–6.
- 72 Zheng BJ, Ng MH, He LF *et al*. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies-recombinant DNA composite in HBsAg transgenic mice. *Vaccine* 2001; **19**: 4219–4225.
- 73 Lu M, Yao X, Xu Y *et al*. Combination of an antiviral drug and immunomodulation against hepadnaviral infection in the woodchuck model. *J Virol* 2008; **82**: 2598–2603.
- 74 McCluskie MJ, Wen YM, Di Q, Davis HL. Immunization against hepatitis B virus by mucosal administration of antigen-antibody complexes. *Viral Immunol* 1998; **11**: 245–252.
- 75 Hioe CE, Visciano ML, Kumar R *et al*. The use of immune complex vaccines to enhance antibody responses against neutralizing epitopes on HIV-1 envelope gp120. *Vaccine* 2009; **28**: 352–360.
- 76 Kumar R, Tuen M, Li H, Tse DB, Hioe CE. Improving immunogenicity of HIV-1 envelope gp120 by glycan removal and immune complex formation. *Vaccine* 2011; **29**: 9064–9074.
- 77 Kumar R, Tuen M, Liu J *et al*. Elicitation of broadly reactive antibodies against glycan-modulated neutralizing V3 epitopes of HIV-1 by immune complex vaccines. *Vaccine* 2013; **31**: 5413–5421.
- 78 Kruijsen D, Einarsson HK, Schijf MA *et al*. Intranasal administration of antibody-bound respiratory syncytial virus particles efficiently primes virus-specific immune responses in mice. *J Virol* 2013; **87**: 7550–7557.
- 79 Randall RE, Young DF, Southern JA. Immunization with solid matrix-antibody-antigen complexes containing surface or internal virus structural proteins protects mice from infection with the paramyxovirus, simian virus 5. *J Gen Virol* 1988; **69**: 2517–2526.
- 80 Randall RE, Young DF. Solid matrix-antibody-antigen complexes induce antigen-specific CD8+ cells that clear a persistent paramyxovirus infection. *J Virol* 1991; **65**: 719–726.

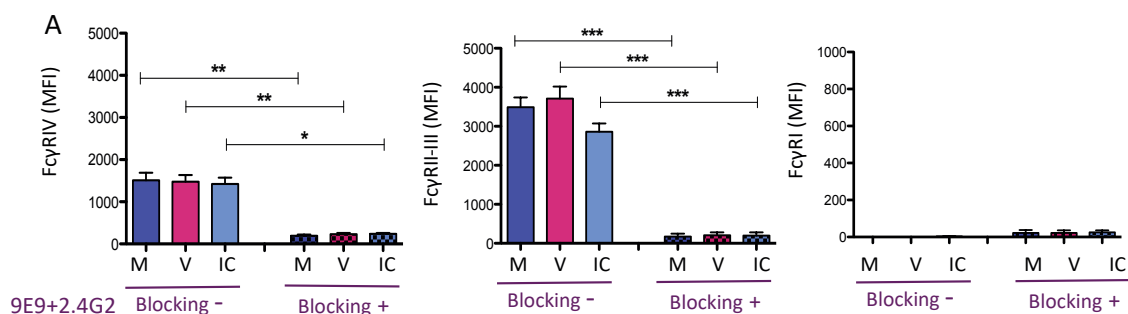
- 81 Xu DZ, Wang XY, Shen XL *et al*. Results of a phase III clinical trial with an HBsAg-HBIG immunogenic complex therapeutic vaccine for chronic hepatitis B patients: experiences and findings. *J Hepatol* 2013; **59**: 450–456.
- 82 Berzofsky JA, Bensussan A, Cease KB *et al*. Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* 1988; **334**: 706–708.
- 83 Kumar R, Visciano ML, Li H, Hioe C. Targeting a neutralizing epitope of HIV envelope Gp120 by immune complex vaccine. *J AIDS Clin Res* 2012; **S8**: pii: 5512.
- 84 Tsouchnikas G, Zlatkovic J, Jarmer J *et al*. Immunization with immune complexes modulates the fine specificity of antibody responses to a flavivirus antigen. *J Virol* 2015; **89**: 7970–7978.
- 85 Rival C, Samy E, Setiady Y, Tung K. Cutting edge: Ly49C/I(-) neonatal NK cells predispose newborns to autoimmune ovarian disease induced by maternal autoantibody. *J Immunol* 2013; **191**: 2865–2869.
- 86 Rival C, Setiady Y, Samy ET, Harakal J, Tung KS. The unique neonatal NK cells: a critical component required for neonatal autoimmune disease induction by maternal autoantibody. *Front Immunol* 2014; **5**: 242.
- 87 Wieland A, Shashidharamurthy R, Kamphorst AO *et al*. Antibody effector functions mediated by Fcγ-receptors are compromised during persistent viral infection. *Immunity* 2015; **42**: 367–378.
- 88 Yamada DH, Elsaesser H, Lux A *et al*. Suppression of Fcγ-receptor-mediated antibody effector function during persistent viral infection. *Immunity* 2015; **42**: 379–390.
- 89 Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 235–245.
- 90 Liu P, Overman RG, Yates NL *et al*. Dynamic antibody specificities and virion concentrations in circulating immune complexes in acute to chronic HIV-1 infection. *J Virol* 2011; **85**: 11196–11207.
- 91 Riva E, Maggi F, Abbruzzese F *et al*. Immune complexed (IC) hepatitis C virus (HCV) in chronically and acutely HCV-infected patients. *Med Microbiol Immunol* 2009; **198**: 13–18.
- 92 Acosta EG, Bartenschlager R. Paradoxical role of antibodies in dengue virus infections: considerations for prophylactic vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2016; **15**: 467–482.
- 93 Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectr* 2014; doi:10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- 94 Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 712–722.
- 95 Ubol S, Halstead SB. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17**: 1829–1835.
- 96 Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS *et al*. Antibody-dependent enhancement infection facilitates dengue virus-regulated signaling of IL-10 production in monocytes. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e3320.
- 97 Perreau M, Pantaleo G, Kremer EJ. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J Exp Med* 2008; **205**: 2717–2725.
- 98 Bengsch B, Martin B, Thimme R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J Hepatol* 2014; **61**: 1212–1219.
- 99 Gardiner D, Lalezari J, Lawitz E *et al*. A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2013; **8**: e63818.
- 100 Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015; **161**: 205–214.
- 101 Sherman AC, Trehanpati N, Daucher M *et al*. Augmentation of hepatitis B virus-specific cellular immunity with programmed death receptor-1/programmed death receptor-L1 blockade in hepatitis B virus and HIV/hepatitis B virus coinfecting patients treated with adefovir. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013; **29**: 665–672.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

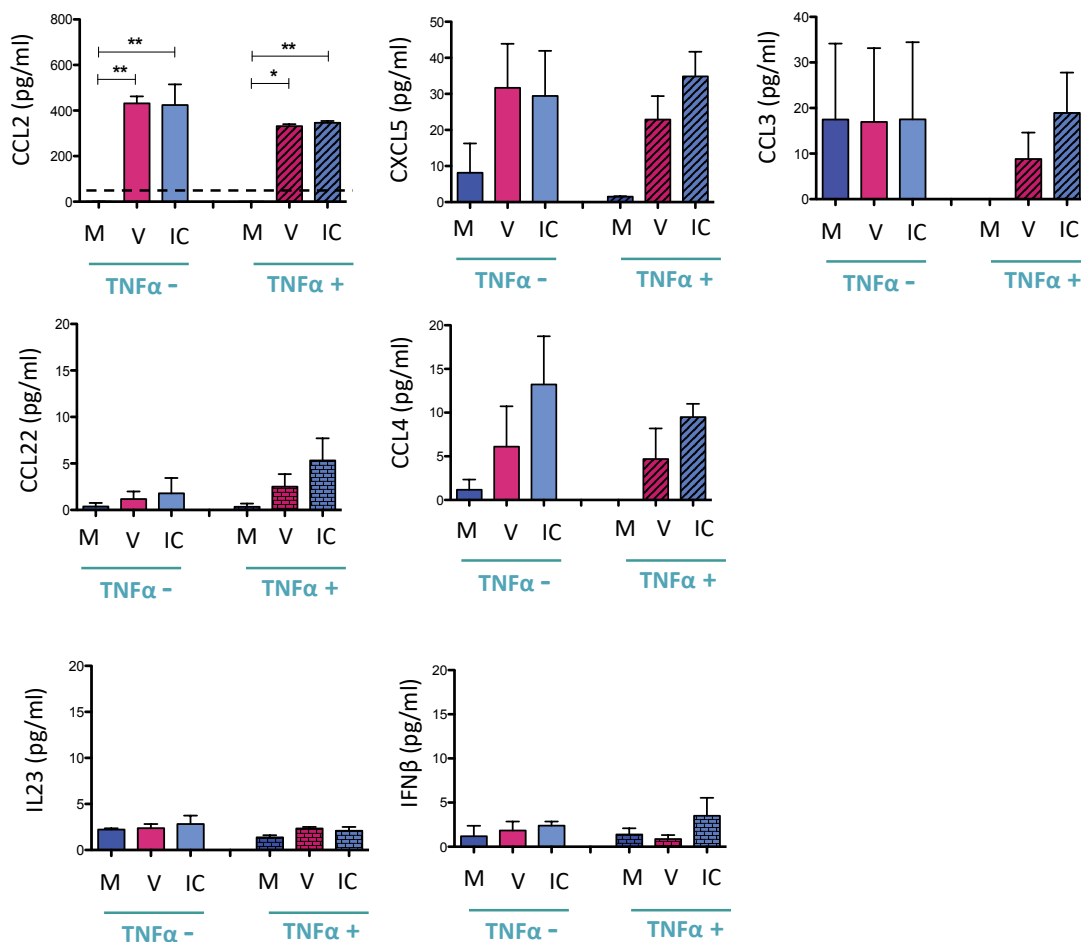
© The Author(s) 2016

■ Ac 667 ■ Virus FrCas^E (V) ■ FrCasE-667 (IC) ■ 9E9+2.4G2 ■ 9E9+2.4G2+V ■ 9E9+2.4G2+IC



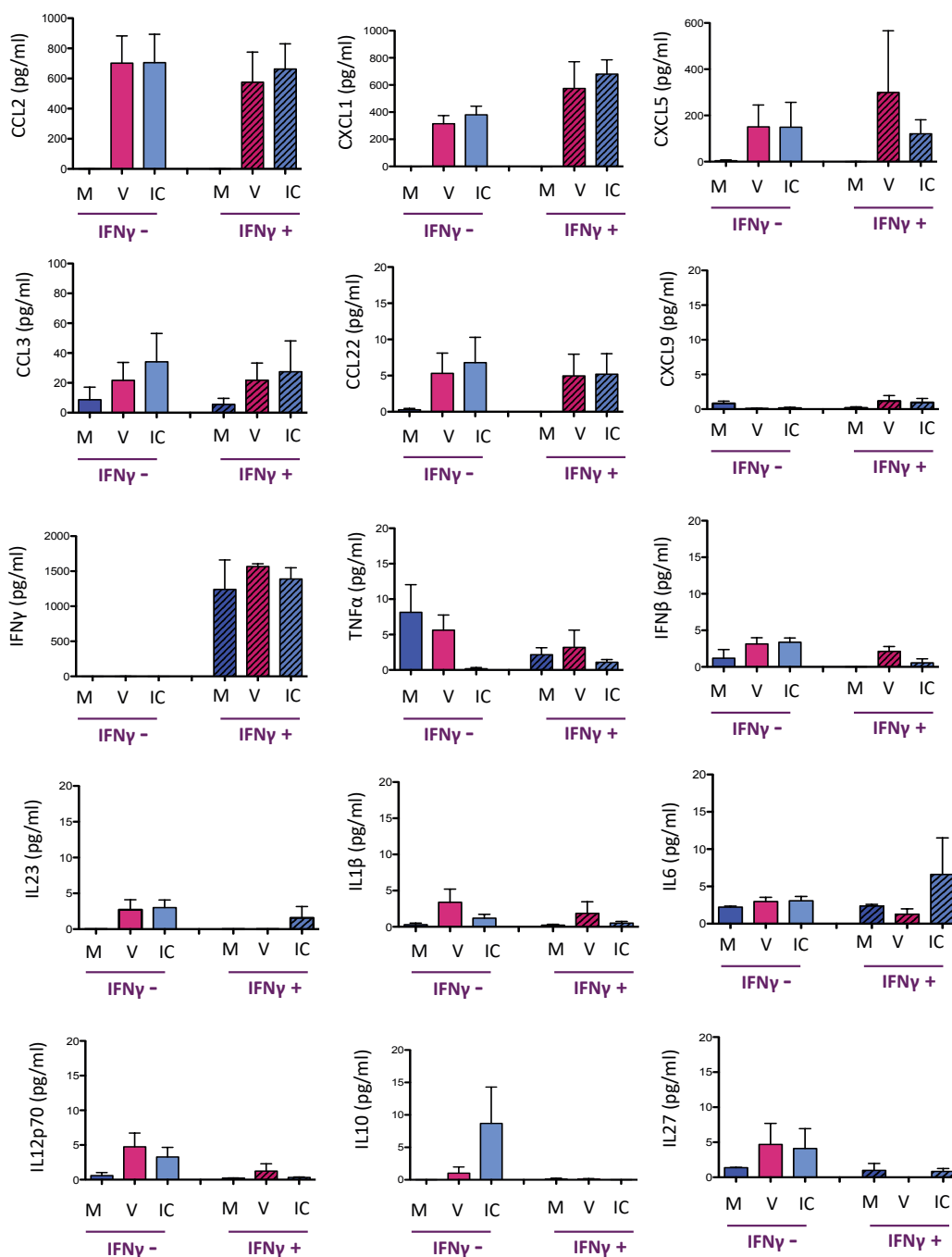
Annexe 2 : Efficacité du blocage des FcγRs exprimés sur les neutrophiles

Efficacité du blocage du FcγRIV (9E9), et des FcγRIII et FcγRIIB (2.4G2) exprimés sur les neutrophiles issus de la moelle osseuse, par cytométrie en flux dans les différentes conditions de stimulations neutrophiles non stimulés, dans du milieu de culture (M), infectés par le virus FrCas^E seul (V) ou le virus associé à l'AcM 667 (IC). Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



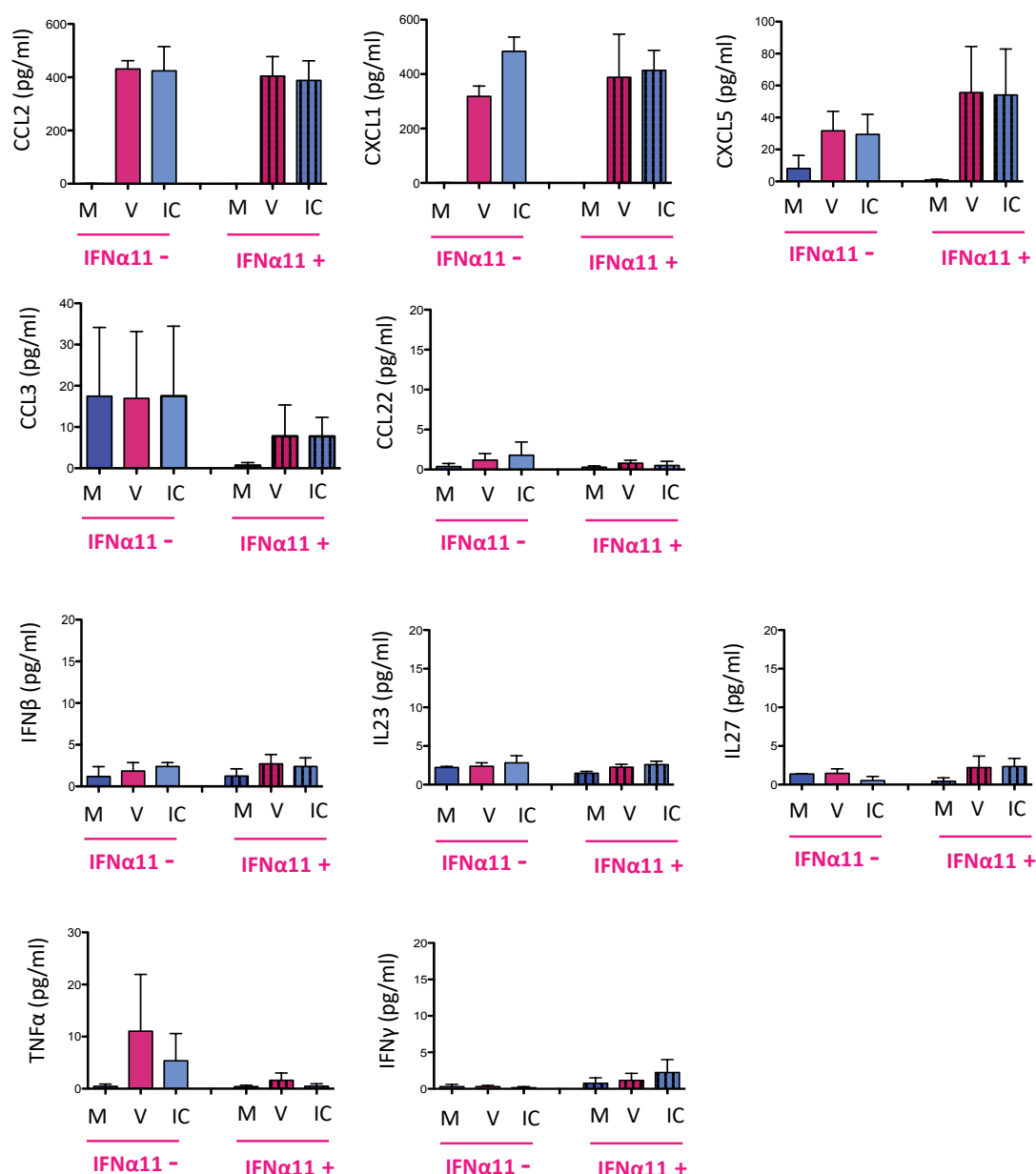
Annexe 3 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines sécrétés par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα

L'activation fonctionnelle des neutrophiles dans les différentes conditions, milieu (M) (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (V)(rouge), ou associé à l'AcM et IC (IC) (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



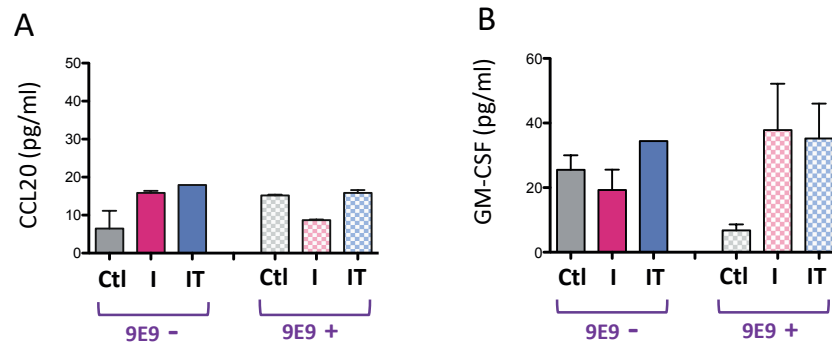
Annexe 4 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines sécrétées par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout de l'IFN γ

L'activation fonctionnelle des neutrophiles dans les différentes conditions, milieu (M) (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (V)(rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans IFN γ (histogramme vide) ou en présence d'IFN γ (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne $\pm$ ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



Annexe 5 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines sécrétés par les neutrophiles, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout de l'IFNα11

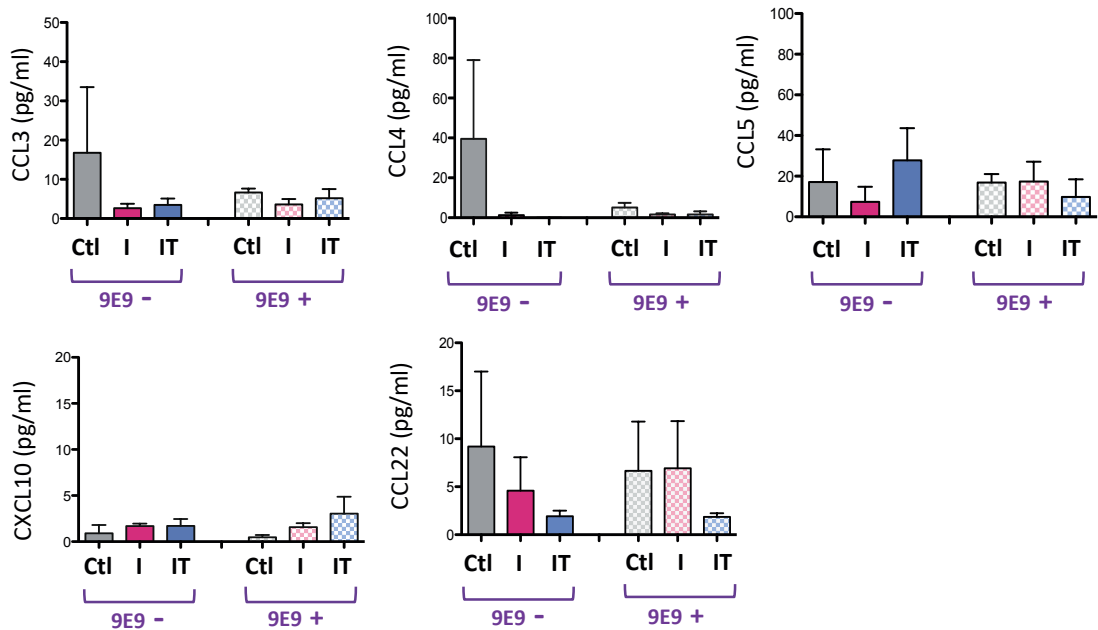
L'activation fonctionnelle des neutrophiles dans les différentes conditions, milieu (M)(Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (V)(rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans IFNα11 (histogramme vide) ou en présence de IFNα11 (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Moyenne +/- ETM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



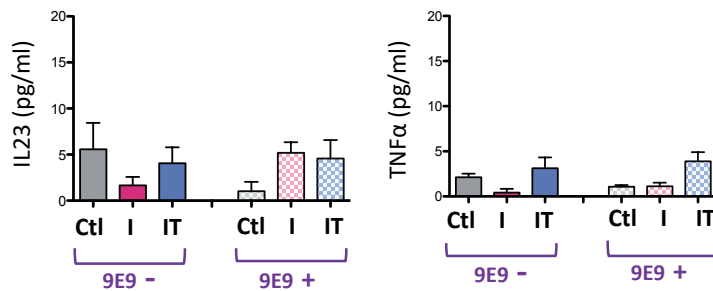
Annexe 6 : Profil de sécrétion de chimiokines et de cytokines sécrétés par les neutrophiles Ly6G^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles CIso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés CIso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités CIso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (**A**) et cytokines (**B**) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions. 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. pour les groupes d'animaux contrôle et infecté et 1 seule expérimentation pour les animaux infectés traités avec 3 à 8 animaux par groupe.

A

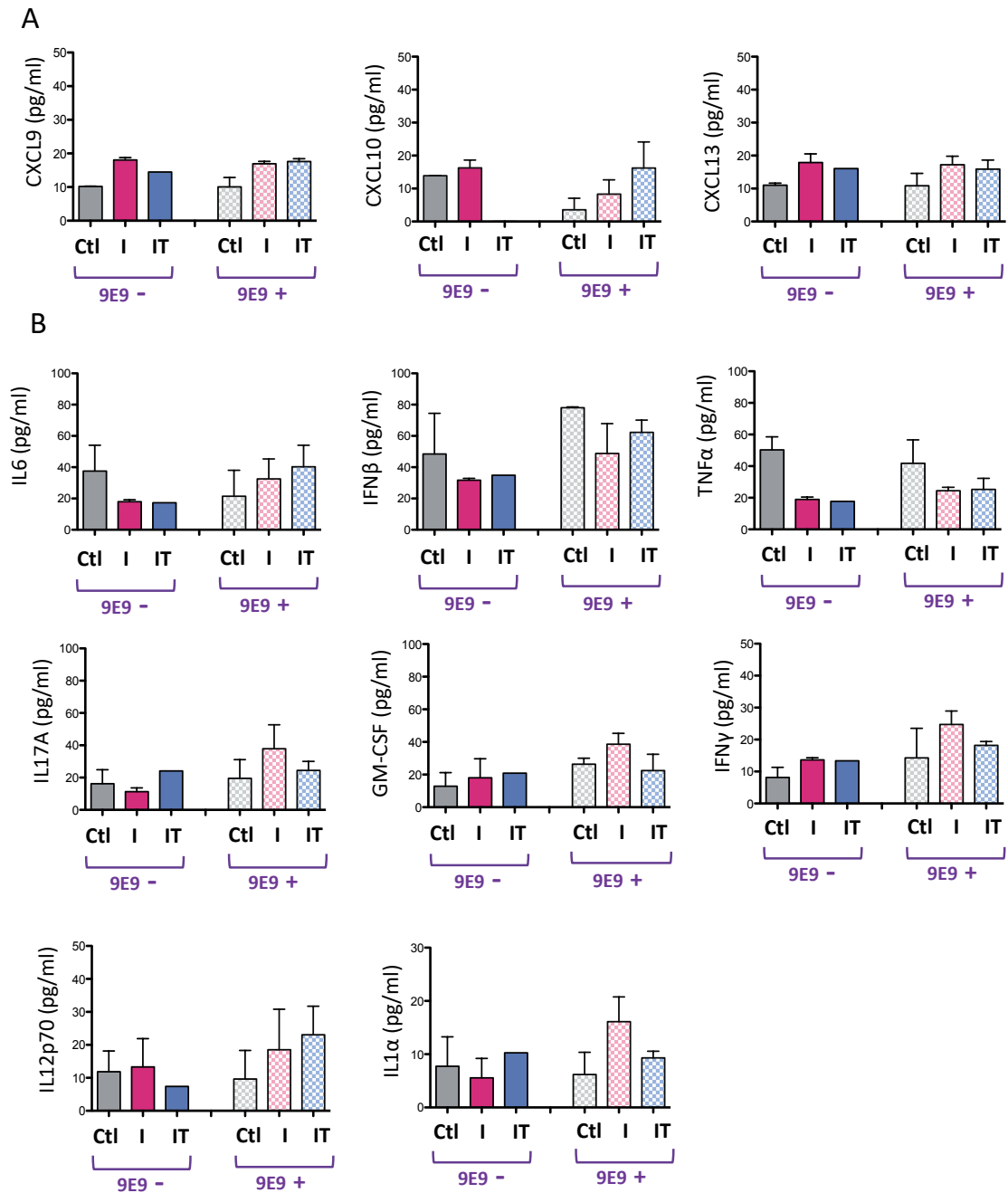


B



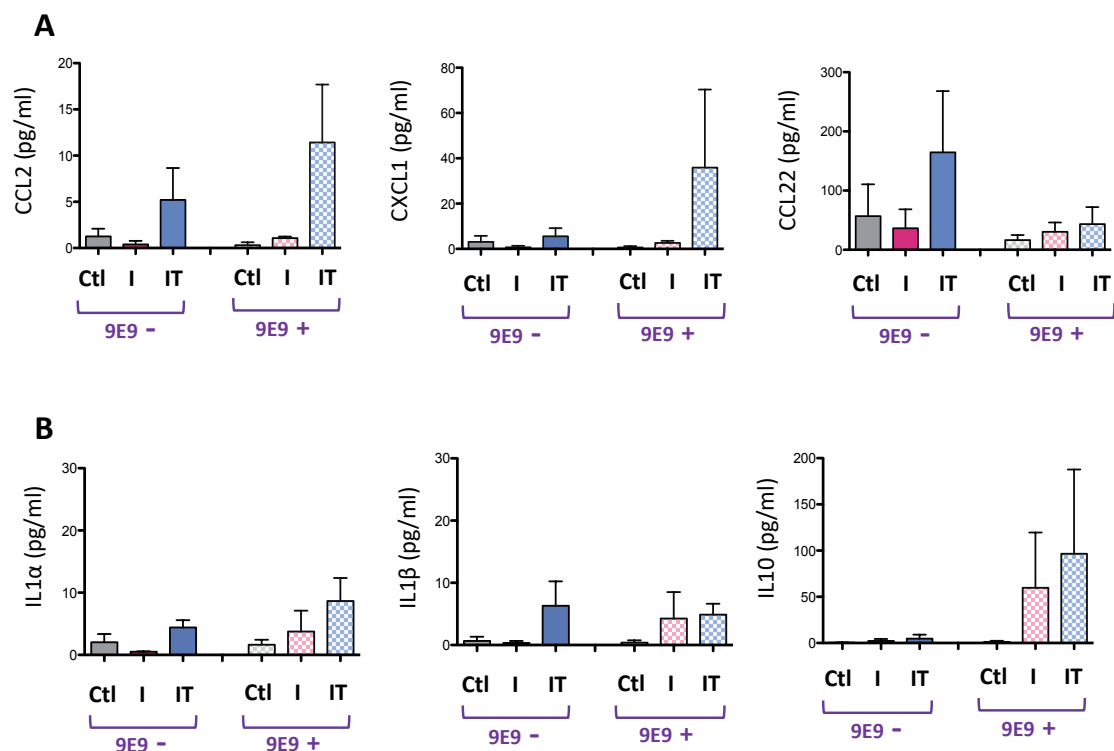
Annexe 7 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines sécrétés par les neutrophiles Ly6G^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J14 p.i.

Les neutrophiles ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles C Iso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés C Iso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités C Iso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (A) et cytokines (B) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions et ont été établis à partir de 3 expérimentations indépendantes avec 3 à 8 animaux par groupe.



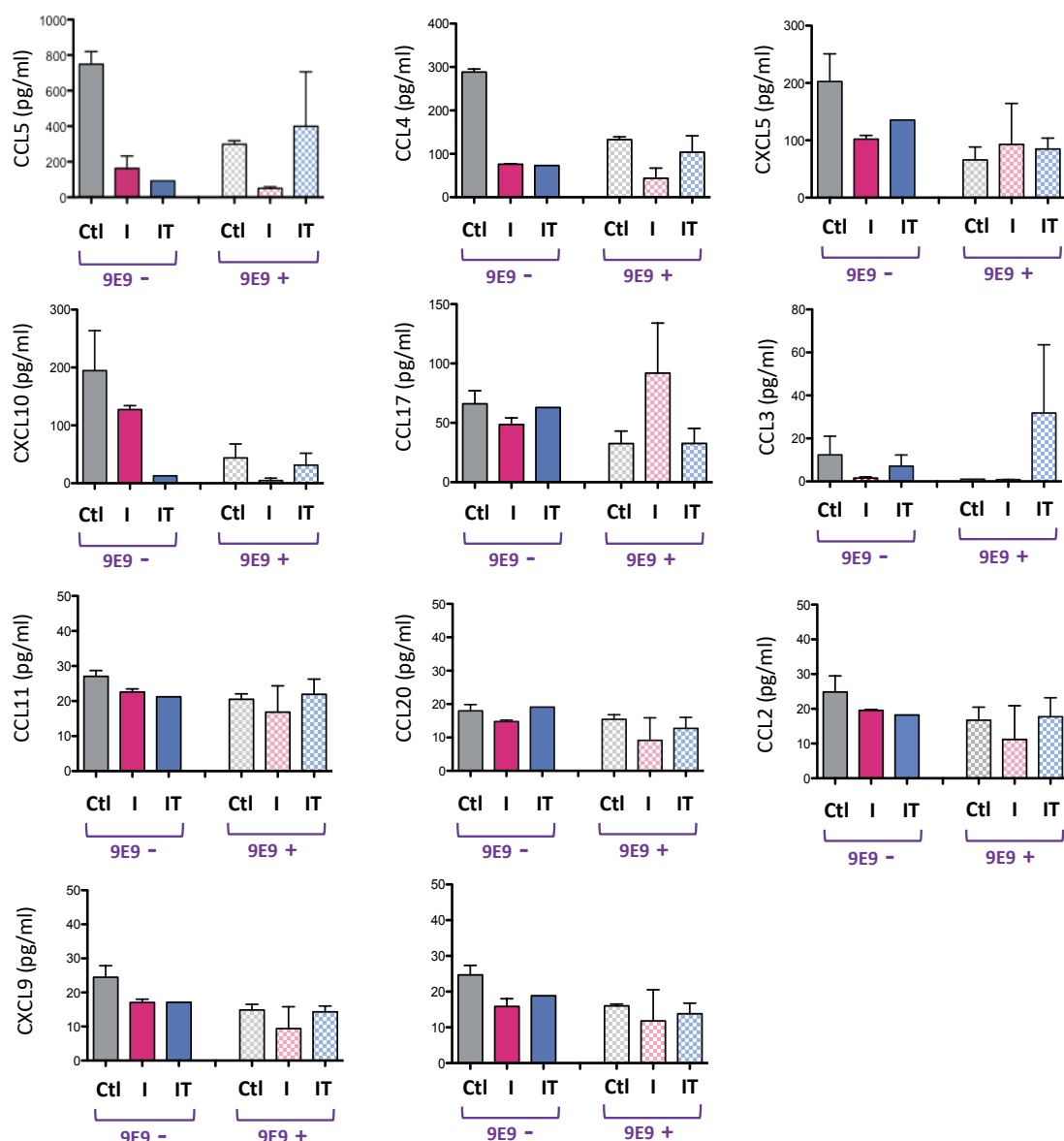
Annexe 8 : Profil de sécrétion de chimiokines et de cytokines sécrétés par les neutrophiles Ly6G^{int}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.

Les neutrophiles ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles C Iso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés C Iso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités C Iso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (A) et cytokines (B) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions. 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. pour les groupes d'animaux contrôle et infecté et 1 seule expérimentation pour les animaux infectés traités avec 3 à 8 animaux par groupe.



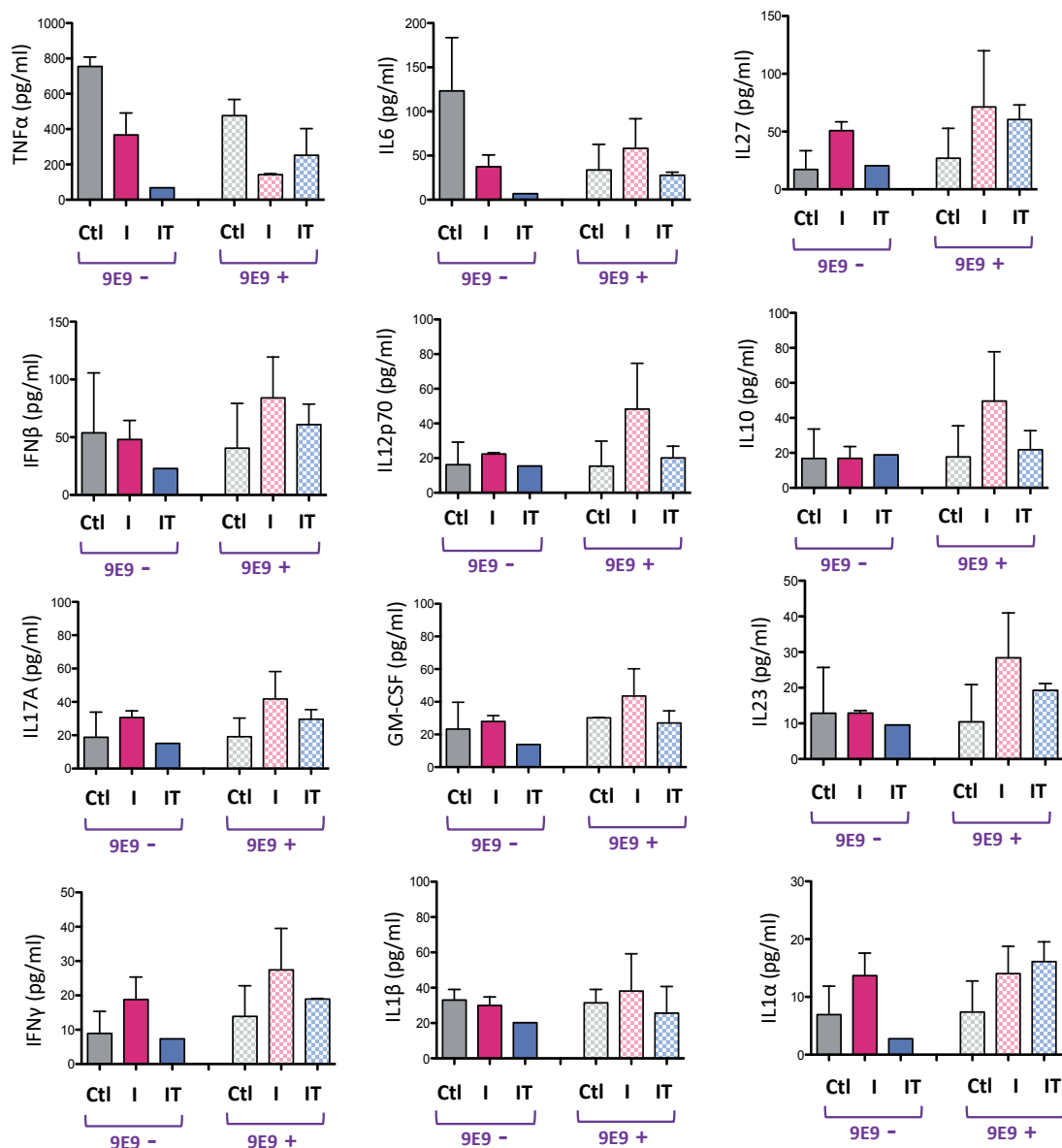
Annexe 9 : Profil de sécrétion des chimiokines et des cytokines sécrétés par les neutrophiles Ly6G^{int}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J14 p.i.

Les neutrophiles ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles CIso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés CIso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités CIso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (**A**) et cytokines (**B**) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions et ont été établis à partir de 3 expérimentations indépendantes avec 3 à 8 animaux par groupe.



Annexe 10 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales à J8 p.i.

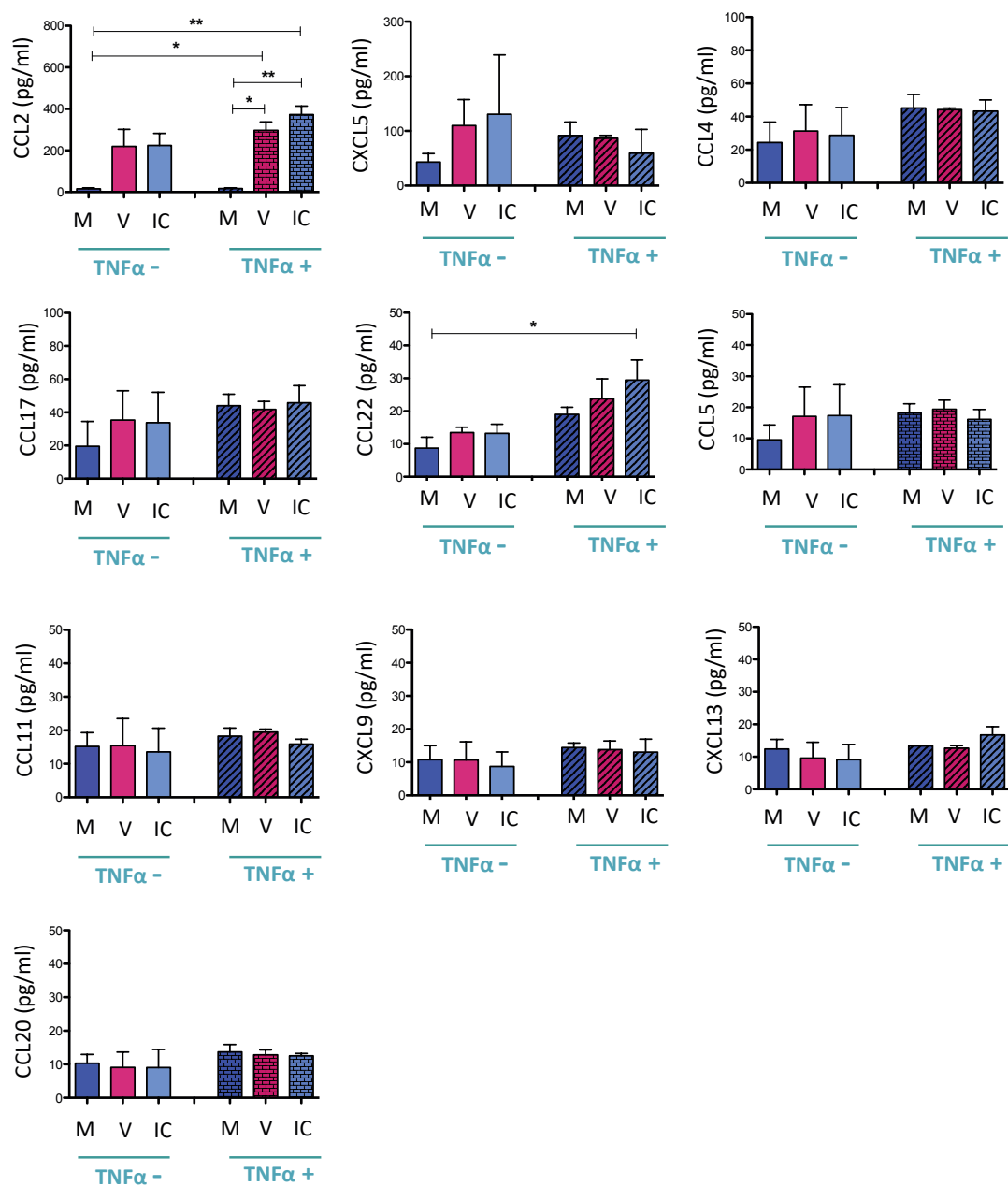
Les monocytes ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles C Iso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés C Iso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités C Iso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (A) et cytokines (B) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions. 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. pour les groupes d'animaux contrôle et infecté et 1 seule expérimentation pour les animaux infectés traités avec 3 à 8 animaux par groupe.



Annexe 11 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes $Ly6C^{hi}$, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, ne présentant pas de différences entre les conditions expérimentales

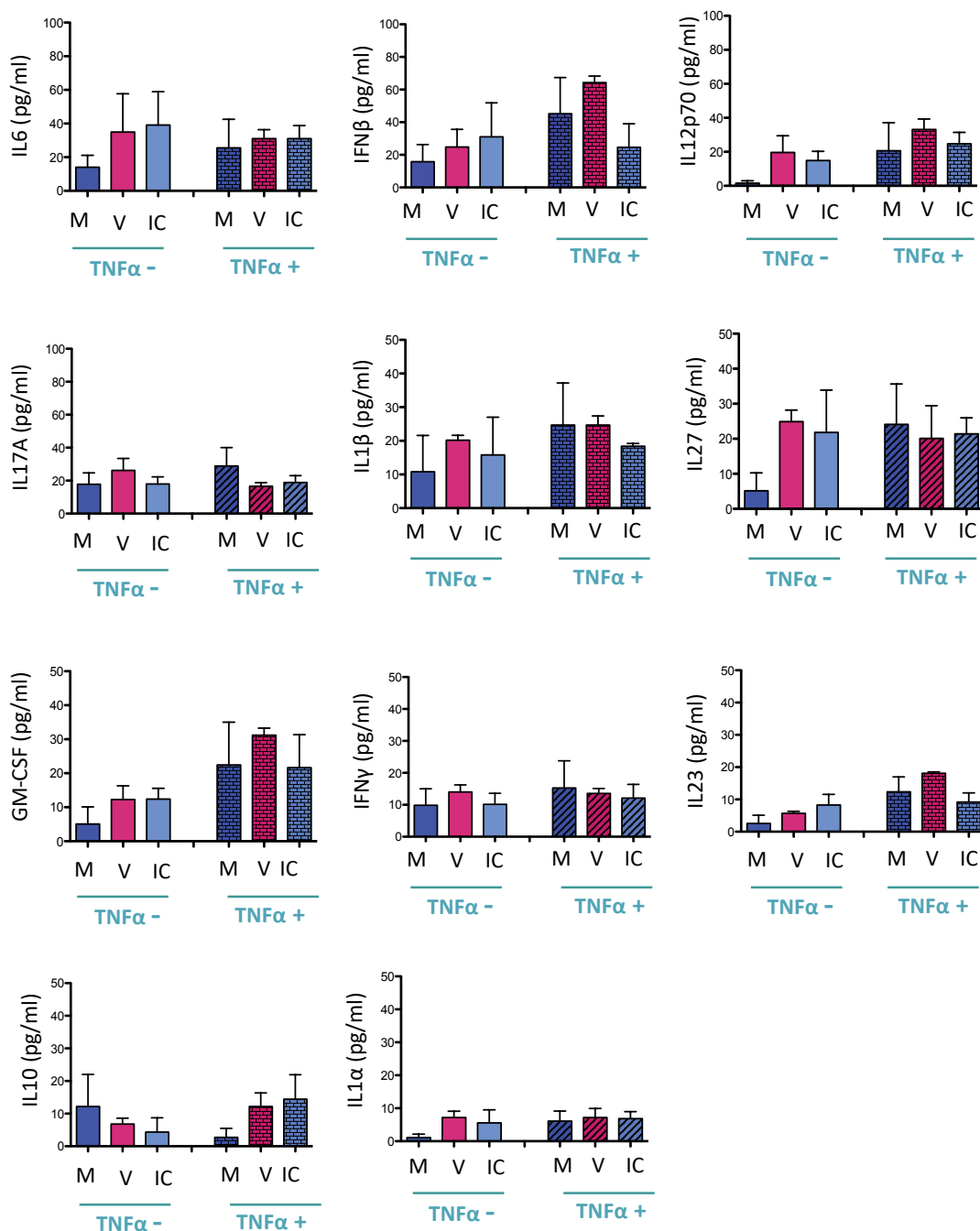
J8 p.i.

Les monocytes ont été isolés à partir des rates des animaux appartenant aux différentes conditions contrôles C Iso (gris foncé) et 9E9 (gris clair) ; infectés C Iso (rouge foncé) et 9E9 (rose clair) ; infectés-traités C Iso (bleu foncé) et 9E9 (bleu clair). Le dosage des chimiokines (A) et cytokines (B) sécrétées (pg/ml) a été réalisé en utilisant l'approche multiparamétrique LegendPlex. Les résultats représentent les chimiokines et cytokines ne présentant pas de différences entre les différentes conditions. 2 expérimentations indépendantes à J8 p.i. pour les groupes d'animaux contrôle et infecté et 1 seule expérimentation pour les animaux infectés traités avec 3 à 8 animaux par groupe.



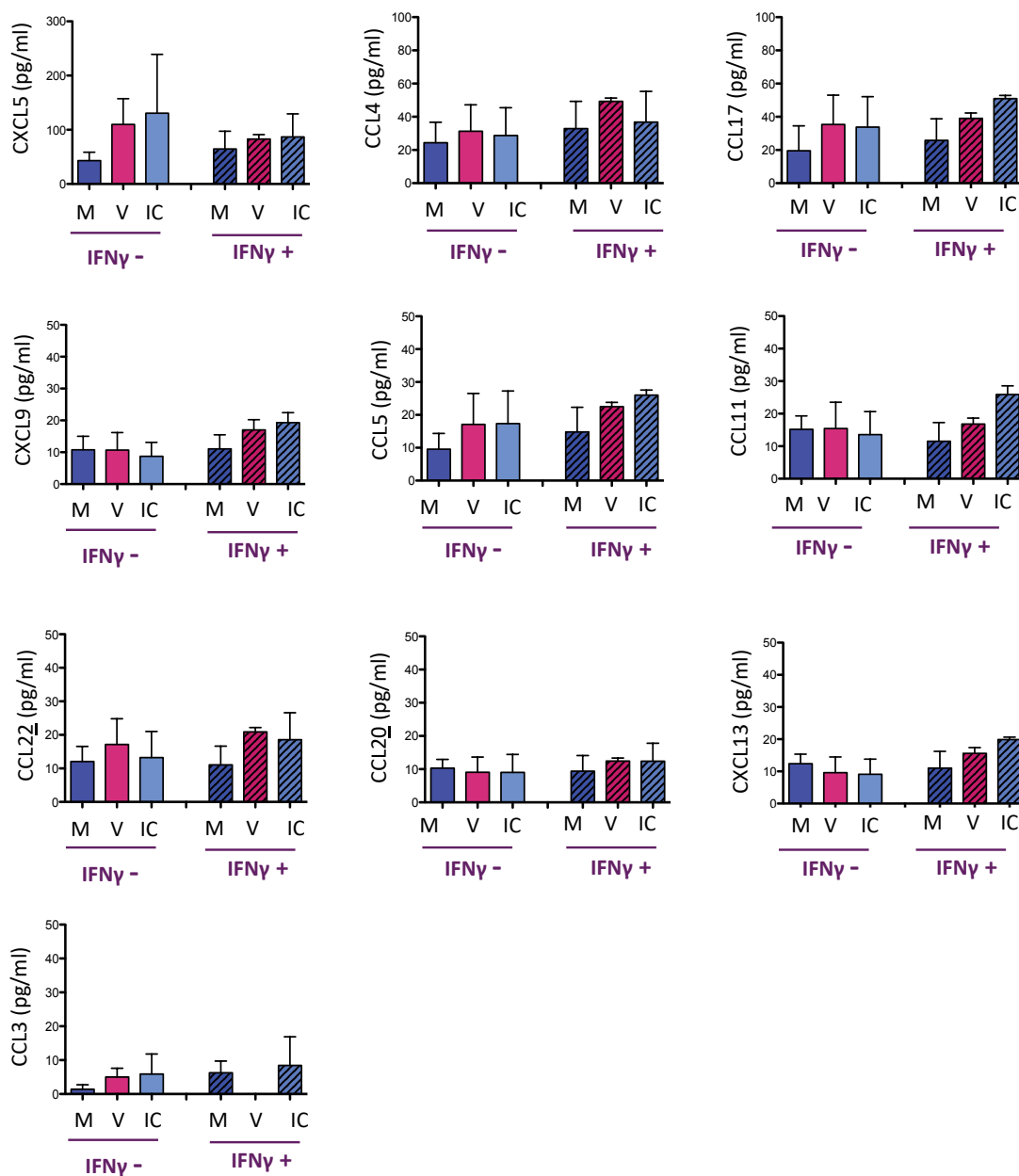
Annexe 12 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



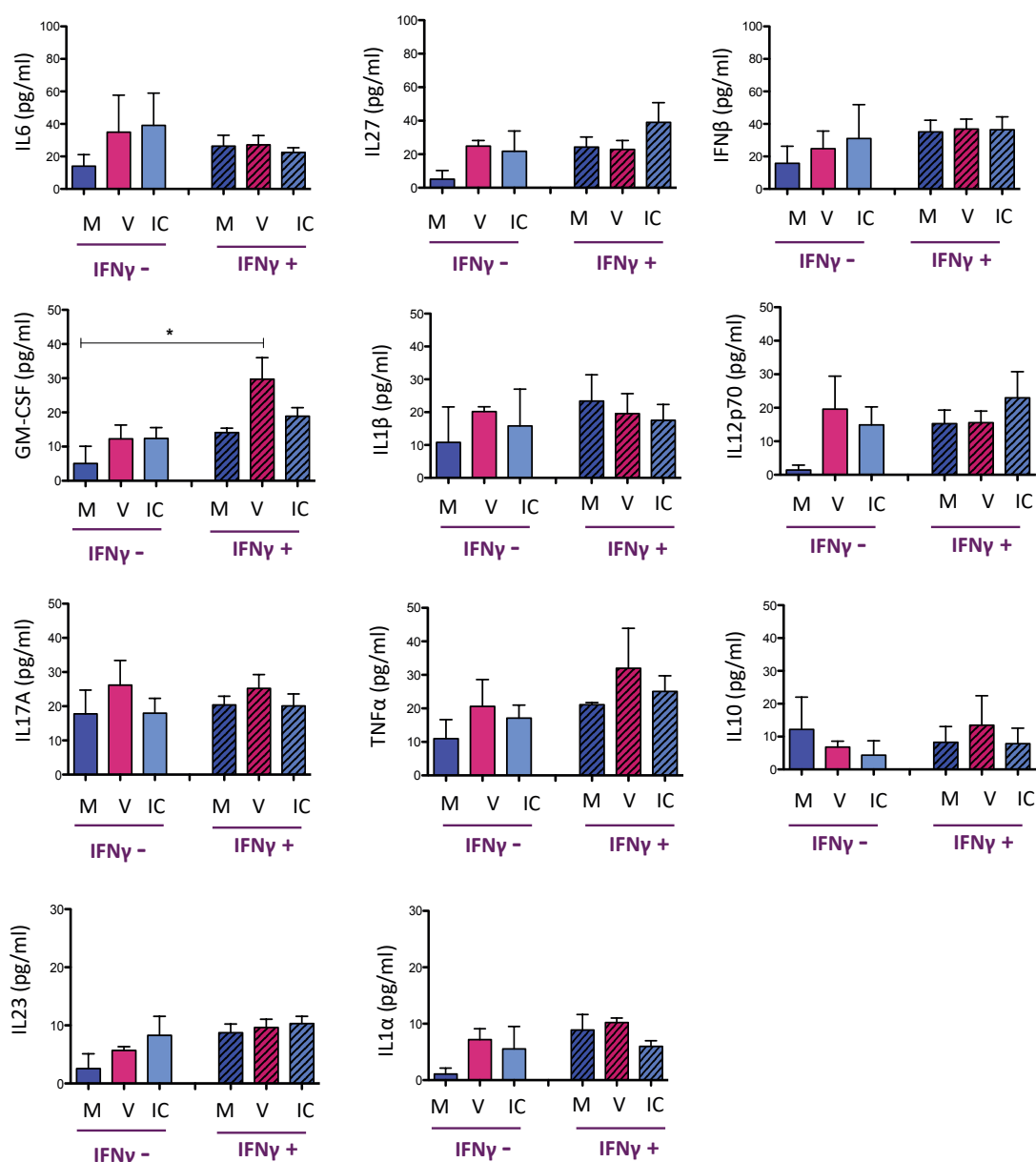
Annexe 13 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout du TNFα

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^F seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



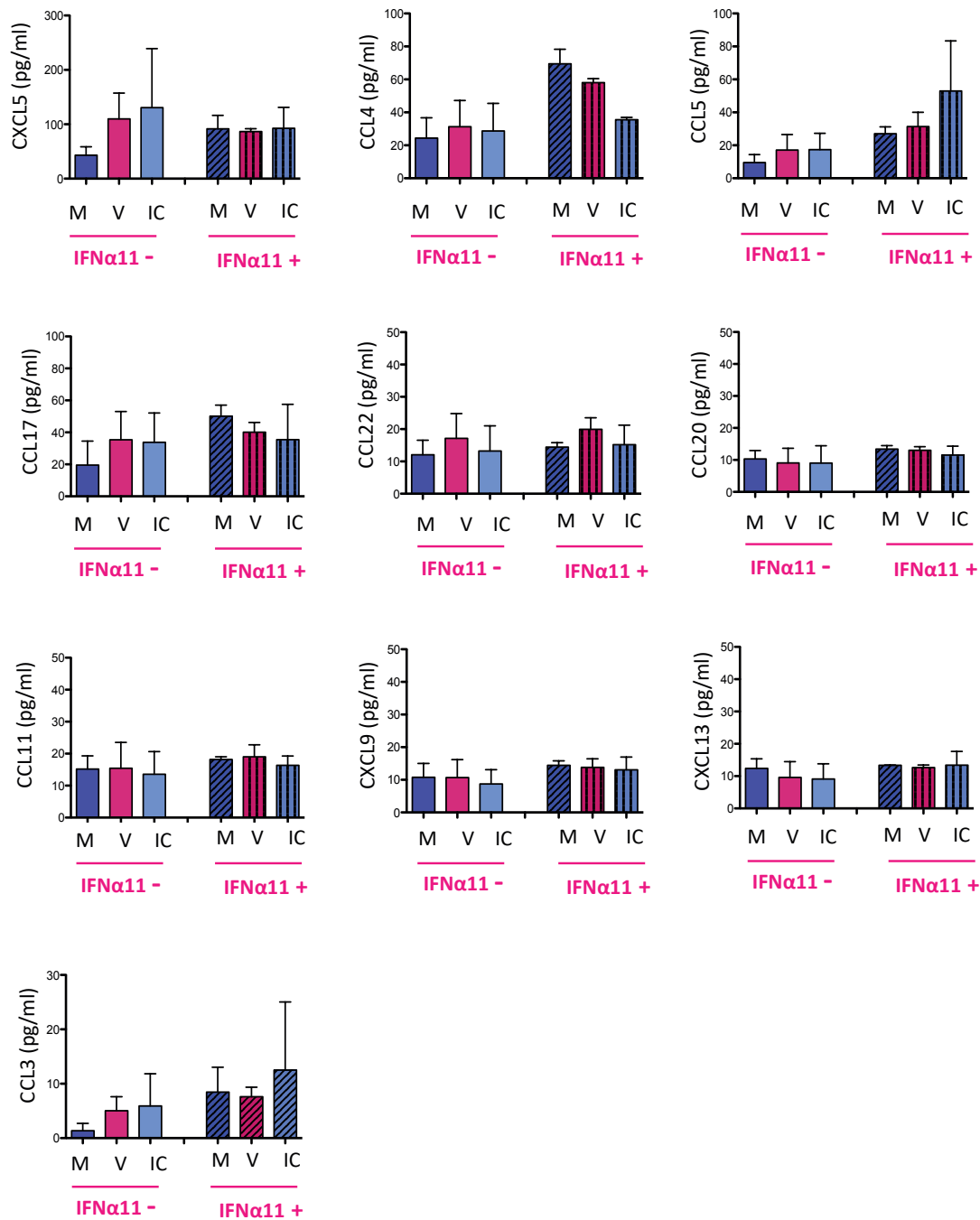
Annexe 14 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout d' l'IFNγ

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



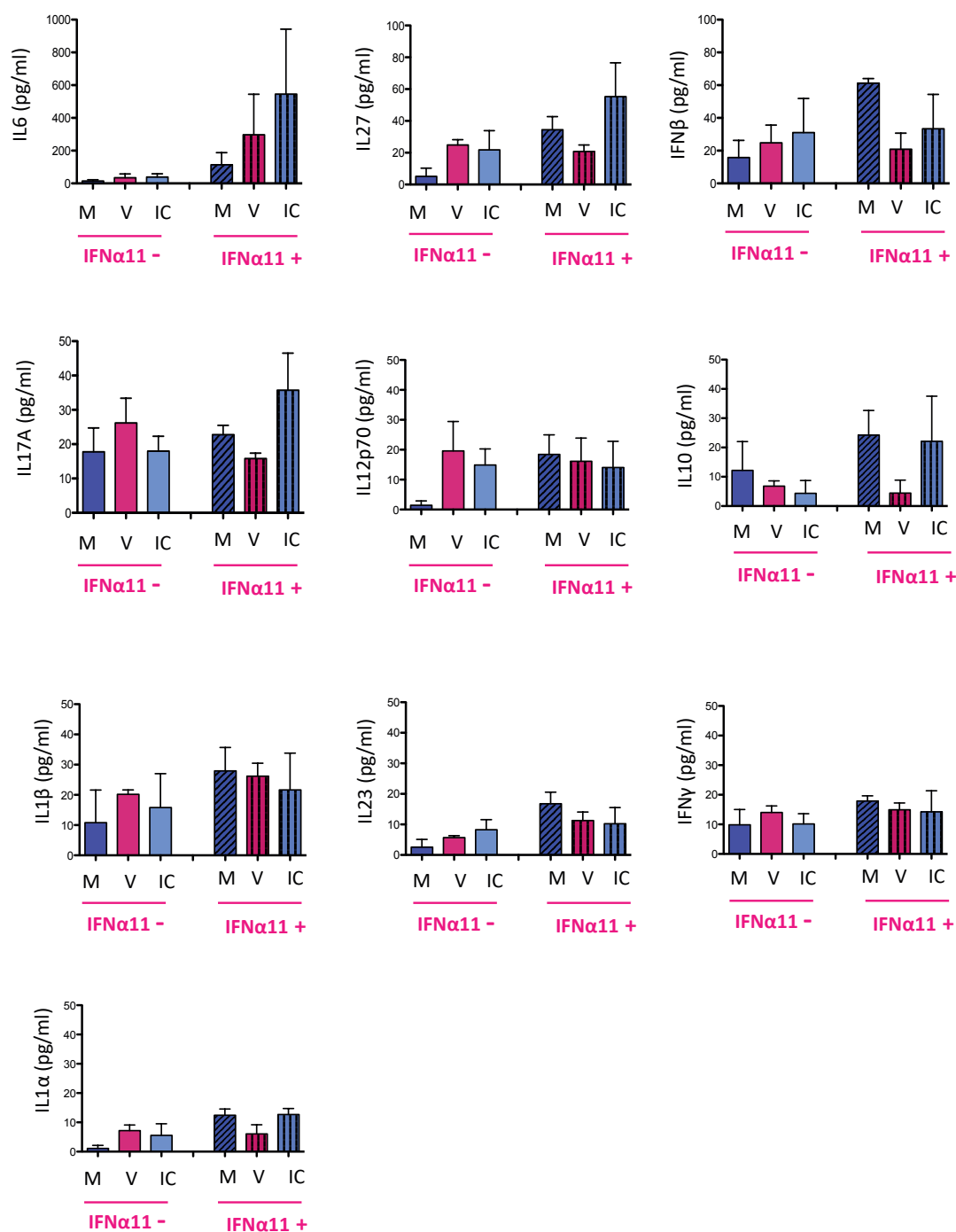
Annexe 15 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout d'IFNγ

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



Annexe 16 : Profil de sécrétion de chimiokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout d'IFNα11.

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion chimiokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)



Annexe 17 : Profil de sécrétion de cytokines par les monocytes Ly6C^{hi}, stimulés par des antigènes viraux *in vitro*, n'étant pas modulé par l'ajout d'IFNα11.

L'activation fonctionnelle des monocytes dans les différentes conditions, milieu (Bleu foncé), infection par le virus FrCas^E seul (rouge), ou associé à l'AcM et IC (bleu clair), sans TNFα (histogramme vide) ou en présence de TNFα (histogramme rayé) a été mesurée par l'établissement du profil de sécrétion cytokinique quantifié par l'approche LegendPlex. Les résultats représentent 4 expérimentations indépendantes et sont exprimés en Mean +/- SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un one-way ANOVA avec correction de Bonferroni. (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdalla, A.E., Li, Q., Xie, L., and Xie, J. (2015). Biology of IL-27 and its Role in the Host Immunity against *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 168–175.
- Abdel-Mohsen, M., Kuri-Cervantes, L., Grau-Exposito, J., Spivak, A.M., Nell, R.A., Tomescu, C., Vadrevu, S.K., Giron, L.B., Serra-Peinado, C., Genescà, M., et al. (2018). CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci. Transl. Med.* *10*, eaar6759.
- Alter, G., Ottenhoff, T.H.M., and Joosten, S.A. (2018a). Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. *Semin. Immunol.*
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 459–489.
- Anderson, C.L., Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C.L., Wani, M.A., and Mohanty, S. (2006). Perspective – FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.* *27*, 343–348.
- Anthony, R.M., Kobayashi, T., Wermeling, F., and Ravetch, J.V. (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* *475*, 110–113.
- Babu, S., Anuradha, R., Ramanathan, V.D., Nutman, T.B., Senbagavalli, P., and Kumaraswami, V. (2011). Heightened Measures of Immune Complex and Complement Function and Immune Complex–Mediated Granulocyte Activation in Human Lymphatic Filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *85*, 89–96.
- Balbino, B., Sibilano, R., Starkl, P., Marichal, T., Gaudenzio, N., Karasuyama, H., Bruhns, P., Tsai, M., Reber, L.L., and Galli, S.J. (2017). Pathways of immediate hypothermia and leukocyte infiltration in an adjuvant-free mouse model of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *139*, 584–596.e10.
- Bardoel, B.W., Kenny, E.F., Sollberger, G., and Zychlinsky, A. (2014). The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host Microbe* *15*, 526–536.
- Barnes, N., Gavin, A.L., Tan, P.S., Mottram, P., Koentgen, F., and Hogarth, P.M. (2002). FcγRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity* *16*, 379–389.
- Barouch, D.H., Whitney, J.B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T.Y., Liu, J., Stephenson, K.E.,
- Chang, H.-W., Shekhar, K., Gupta, S., et al. (2013). Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* *503*, 224–228.
- Başalp, A., Cirakoğlu, B., and Bermek, E. (2000). Enhancement of the immune response to hepatitis B virus vaccine by antigen specific IgM. *Immunol. Lett.* *73*, 1–6.
- Baudino, L., Nimmerjahn, F., Azeredo da Silveira, S., Martinez-Soria, E., Saito, T., Carroll, M., Ravetch, J.V., Verbeek, J.S., and Izui, S. (2008). Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 1948–1953.
- Benonisson, H., Sow, H.S., Breukel, C., Claassens, J.W.C., Brouwers, C., Linssen, M.M., Redeker, A., Fransen, M.F., van Hall, T., Ossendorp, F., et al. (2018). FcγRI expression on macrophages is required for antibody-mediated tumor protection by cytomegalovirus-based vaccines. *Oncotarget* *9*, 29392–29402.
- Berry, J.D., and Gaudet, R.G. (2011). Antibodies in infectious diseases: polyclonals, monoclonals and niche biotechnology. *New Biotechnol.* *28*, 489–501.
- Berzofsky, J.A., Bensussant, A., Cease, K.B., Bourge, J.F., Cheynier, R., Lurhuma, Z., Salaün, J.-J., Gallo, R.C., Shearer, G.M., and Zagury, D. (1988). Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* *334*, 706–708.

- Bevaart, L., Jansen, M.J.H., van Vugt, M.J., Verbeek, J.S., van de Winkel, J.G.J., and Leusen, J.H.W. (2006). The high-affinity IgG receptor, FcγRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer Res.* 66, 1261–1264.
- Boesch, A.W., Alter, G., and Ackerman, M.E. (2015). Prospects for engineering HIV-specific antibodies for enhanced effector function and half-life. *Curr. Opin. HIV AIDS* 10, 160–169.
- Bournazos, S., and Ravetch, J.V. (2017a). Diversification of IgG effector functions. *Int. Immunol.* 29, 303–310.
- Bournazos, S., and Ravetch, J.V. (2017c). Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. *Immunity* 47, 224–233.
- Bournazos, S., Woof, J.M., Hart, S.P., and Dransfield, I. (2009). Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 244–254.
- Bracke, M., Coffey, P.J., Lammers, J.W., and Koenderman, L. (1998). Analysis of signal transduction pathways regulating cytokine-mediated Fc receptor activation on human eosinophils. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 6768–6774.
- Brandsma, A.M., Schwartz, S.L., Wester, M.J., Valley, C.C., Blezer, G.L.A., Vidarsson, G., Lidke, K.A., Ten Broeke, T., Lidke, D.S., and Leusen, J.H.W. (2018). Mechanisms of inside-out signaling of the high-affinity IgG receptor FcγRI. *Sci. Signal.* 11.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119, 5640–5649.
- Bruhns, P., and Jönsson, F. (2015). Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 268, 25–51.
- Burton, D.R., Barbas, C.F., Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M., and Lerner, R.A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10134–10137.
- Canfield, S.D., and Simoes, E.A. (1999). Prevention of respiratory syncytial virus (RSV) infection: RSV immune globulin intravenous and palivizumab. (American Academy of Pediatrics). *Pediatr. Ann.* 28, 507–514.
- Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A.M., Colombo, G., Rizzardi, G.P., Bonara, P., D’Arminio-Monforte, A., and Zanussi, C. (1992). Increased expression of IgG Fc receptor type I on neutrophils and monocytes from HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 175–180.
- Cardile, A.P., Downey, L.G., Wiseman, P.D., Warren, T.K., and Bavari, S. (2016). Antiviral therapeutics for the treatment of Ebola virus infection. *Curr. Opin. Pharmacol.* 30, 138–143.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–758.
- Casadevall, A. (2006). The Third Age of Antimicrobial Therapy. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1414–1416.
- Casadevall, A., and Scharff, M.D. (1995). Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 21, 150–161.
- Cassatella, M.A. (2013). L33. Neutrophil in immunity: a key modulator. *Presse Medicale Paris Fr.* 143, 594–595.
- Casulli, S., and Elbim, C. (2014). Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and polymorphonuclear neutrophils. *J. Innate Immun.* 6, 13–20.

- Celis, E., and Chang, T.W. (1984). HBsAg-serum protein complexes stimulate immune T lymphocytes more efficiently than do pure HBsAg. *Hepatology*. Baltimore, Md 4, 1116–1123.
- Cervenak, J., Bender, B., Schneider, Z., Magna, M., Carstea, B.V., Liliom, K., Erdei, A., Bosze, Z., and Kacs Kovics, I. (2011). Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J. Immunol.* Baltimore, Md 190 186, 959–968.
- Chan MA, Gigliotti NM, Matangkasombut P, Gauld SB, Rosenwasser LJ. (2010). CD23-mediated cell signaling in human B cells differs from signaling in cells of the monocytic lineage. *Clin Immunol.* 137(3). 330-6
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E.I., and Tacchini-Cottier, F. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6, e1000755.
- Chauhan, P., Hu, S., Sheng, W.S., Prasad, S., and Lokensgard, J.R. (2017). Modulation of Microglial Cell Fcγ Receptor Expression Following Viral Brain Infection. *Sci. Rep.* 7, 41889.
- Chesebro, B., Collins, J.K., Wehrly, K., Nishio, J., and Cloyd, M. (1981). Expression of cell surface Friend virus gp70 does not block reinfection by ecotropic murine leukemia viruses. *Virology* 115, 125–129.
- Cheung, W.C., Beausoleil, S.A., Zhang, X., Sato, S., Schieferl, S.M., Wieler, J.S., Beaudet, J.G., Ramenani, R.K., Popova, L., Comb, M.J., et al. (2012). A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat. Biotechnol.* 30, 447–452.
- Chorny, A., Casas-Recasens, S., Sintes, J., Shan, M., Polentarutti, N., García-Escudero, R., Walland, A.C., Yeiser, J.R., Cassis, L., Carrillo, J., et al. (2016). The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. *J. Exp. Med.* 213, 2167–2185.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13, 463–469.
- Clementi, N., Mancini, N., Solforosi, L., Castelli, M., Clementi, M., and Burioni, R. (2012). Phage Display-based Strategies for Cloning and Optimization of Monoclonal Antibodies Directed against Human Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8273–8292.
- Clynes, R., Maizes, J.S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., and Ravetch, J.V. (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* 189, 179–185.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012–2020.
- Conti, H.R., and Gaffen, S.L. (2010). Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 12, 518–527.
- Cortjens, B., de Boer, O.J., de Jong, R., Antonis, A.F., Sabogal Piñeros, Y.S., Lutter, R., van Woensel, J.B., and Bem, R.A. (2016). Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease: NETs in RSV disease. *J. Pathol.* 238, 401–411.
- Costantini, C., and Cassatella, M.A. (2011). The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 89, 221–233.
- Costantini, C., Calzetti, F., Perbellini, O., Micheletti, A., Scarponi, C., Lonardi, S., Pelletier, M., Schakel, K., Pizzolo, G., Facchetti, F., et al. (2011). Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood* 117, 1677–1686.
- Daher, K.A., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60, 1068–1074.

- Dai, L., Lidie, K.B., Chen, Q., Adelsberger, J.W., Zheng, X., Huang, D., Yang, J., Lempicki, R.A., Rehman, T., Dewar, R.L., et al. (2013). IL-27 inhibits HIV-1 infection in human macrophages by down-regulating host factor SPTBN1 during monocyte to macrophage differentiation. *J. Exp. Med.* 210, 517–534.
- Deniset, J.F., Surewaard, B.G., Lee, W.-Y., and Kubes, P. (2017). Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 214, 1333–1350.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabartz, C., Levy, Y., Schwartz, O., et al. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* 543, 564.
- DesGroseillers, L., Rassart, E., and Jolicoeur, P. (1983). Thymotropism of murine leukemia virus is conferred by its long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4203–4207.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.
- Dettogni, R.S., Tristão-Sá, R., dos Santos, M., da Silva, F.F., and Louro, I.D. (2015). Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. *Hum. Immunol.* 76, 717–723.
- DiLillo, D.J., and Ravetch, J.V. (2015a). Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunol. Res.* 3, 704–713.
- DiLillo, D.J., and Ravetch, J.V. (2015b). Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. *Cell* 161, 1035–1045.
- Domínguez-Andrés, J., Feo-Lucas, L., Minguito de la Escalera, M., González, L., López-Bravo, M., and Ardavin, C. (2017). Inflammatory Ly6G^{high} Monocytes Protect against Candidiasis through IL-15-Driven NK Cell/Neutrophil Activation. *Immunity* 46, 1059–1072.e4.
- Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhabiles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al. (2012). Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 37, 917–929.
- Duhan, V., Khairnar, V., Friedrich, S.-K., Zhou, F., Gassa, A., Honke, N., Shaabani, N., Gailus, N., Botezatu, L., Khandanpour, C., et al. (2016). Virus-specific antibodies allow viral replication in the marginal zone, thereby promoting CD8⁺ T-cell priming and viral control. *Sci. Rep.* 6, 19191.
- Edelman, G.M. (1959). DISSOCIATION OF γ -GLOBULIN. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3155–3156.
- Euler, Z., and Alter, G. (2015). Exploring the Potential of Monoclonal Antibody Therapeutics for HIV-1 Eradication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 31, 13–24.
- Evrard, M., Kwok, I.W.H., Chong, S.Z., Teng, K.W.W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J.L., Penny, H.L., Ching, G.C., Devi, S., et al. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* 48, 364–379.e8.
- Fensterl, V., and Sen, G.C. (2009). Interferons and viral infections. *BioFactors* 35, 14–20.
- Flajnik, M.F., Deschacht, N., and Muyldermans, S. (2011). A Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.* 9, e1001120.
- Forthal, D.N. (2014). Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–17.
- Forthal, D.N., Landucci, G., Bream, J., Jacobson, L.P., Phan, T.B., and Montoya, B. (2007). Fc γ RIIIa genotype predicts progression of HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 7916–7923.
- Forthal, D.N., Gabriel, E.E., Wang, A., Landucci, G., and Phan, T.B. (2012). Association of Fc γ receptor IIIa genotype with the rate of HIV infection after gp120 vaccination. *Blood* 120, 2836–2842.

Fossati, G., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (2002). Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 13–19.

Fridlender, Z.G., and Albelda, S.M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949–955.

Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., et al. (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS One* 7, e31524.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241.

Fujiwara, T., Ihara, T., Yamawaki, K., Ito, M., Kamiya, H., and Sakurai, M. (1994). Effect of varicella zoster virus antigen-antibody complexes on hydrogen peroxide generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Acta Paediatr. Jpn. Overseas Ed.* 36, 341–346.

Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra20.

Garcin, G., Paul, F., Staufenbiel, M., Bordat, Y., Van der Heyden, J., Wilmes, S., Cartron, G., Apparailly, F., De Koker, S., Piehler, J., et al. (2014). High efficiency cell-specific targeting of cytokine activity. *Nat. Commun.* 5, 3016.

Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M.C., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Buckler-White, A., Sadjadpour, R., Wang, K., et al. (2016). A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* 533, 105–109.

Getahun, A., and Heyman, B. (2006). How antibodies act as natural adjuvants. *Immunol. Lett.* 104, 38–45.

Gholamreza H, Devoogdt N, DE Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. (2013). Nanobodies and their potential applications. *Nanobodies vol 8* N6

Gibbert, K., Joedicke, J.J., Meryk, A., Trilling, M., Francois, S., Duppach, J., Kraft, A., Lang, K.S., and Dittmer, U. (2012). Interferon-alpha Subtype 11 Activates NK Cells and Enables Control of Retroviral Infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002868.

Gilman, M.S.A., Castellanos, C.A., Chen, M., Ngwuta, J.O., Goodwin, E., Moin, S.M., Mas, V., Melero, J.A., Wright, P.F., Graham, B.S., et al. (2016). Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Sci. Immunol.* 1, eaaj1879–eaaj1879.

van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281–1292.

Gomes, N.E., Brunialti, M.K.C., Mendes, M.E., Freudenberg, M., Galanos, C., and Salomão, R. (2010). Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 43, 853–858.

Gong, R., Wang, Y., Ying, T., and Dimitrov, D.S. (2012). Bispecific Engineered Antibody Domains (Nanoantibodies) That Interact Noncompetitively with an HIV-1 Neutralizing Epitope and FcRn. *PLoS ONE* 7, e42288.

Gougerot-Pocidalo, M.A., el Benna, J., Elbim, C., Chollet-Martin, S., and Dang, M.C. (2002). [Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]. *J. Soc. Biol.* 196, 37–46.

Greenough, T.C., Babcock, G.J., Roberts, A., Hernandez, H.J., Thomas, W.D., Coccia, J.A., Graziano, R.F., Srinivasan, M., Lowy, I., Finberg, R.W., et al. (2005). Development and characterization of a severe acute

respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J. Infect. Dis.* 191, 507–514.

Gros, L., Dreja, H., Fiser, A.L., Plays, M., Pelegrin, M., and Piechaczyk, M. (2005). Induction of long-term protective antiviral endogenous immune response by short neutralizing monoclonal antibody treatment. *J. Virol.* 79, 6272–6280.

Gros, L., Pelegrin, M., Michaud, H.-A., Bianco, S., Hernandez, J., Jacquet, C., and Piechaczyk, M. (2008). Endogenous cytotoxic T-cell response contributes to the long-term antiretroviral protection induced by a short period of antibody-based immunotherapy of neonatally infected mice. *J. Virol.* 82, 1339–1349.

Grund, L.Z., Novaski, I., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., Lopes-Ferreira, M., and Lima, C. (2017). Neutrophils releasing IL-17A into NETs are essential to plasma cell differentiation in inflamed tissue dependent on IL-1R. *Autoimmunity* 50, 86–101.

Gu, W., Guo, L., Li, R., Niu, J., Luo, X., Zhang, J., Xu, Y., Tian, Z., Feng, L., and Wang, Y. (2016). Elevated plasma-soluble CD16 levels in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs: correlation with ADAM17-mediated shedding. *J. Gen. Virol.* 97, 632–638.

Haeuw, J.-F., Caussanel, V., and Beck, A. (2009). Les immunoconjugués, anticorps « armés » pour combattre le cancer. *Médecine/Sciences* 25, 1046–1052.

Haigwood, N.L., Montefiori, D.C., Sutton, W.F., McClure, J., Watson, A.J., Voss, G., Hirsch, V.M., Richardson, B.A., Letvin, N.L., Hu, S.-L., et al. (2004). Passive immunotherapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques accelerates the development of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 78, 5983–5995.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446.

Hioe, C.E., Visciano, M.L., Kumar, R., Liu, J., Mack, E.A., Simon, R.E., Levy, D.N., and Tuen, M. (2009). The use of immune complex vaccines to enhance antibody responses against neutralizing epitopes on HIV-1 envelope gp120. *Vaccine* 28, 352–360.

Huang, H.W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1292–1302.

Huizinga, T.W., de Haas, M., Kleijer, M., Nuijens, J.H., Roos, D., and von dem Borne, A.E. (1990). Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J. Clin. Invest.* 86, 416–423.

Hung, S.-L., Chiang, H.-H., Wu, C.-Y., Hsu, M.-J., and Chen, Y.-T. (2012). Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils: Herpes simplex virus-affected neutrophils. *J. Periodontal Res.* 47, 635–644.

Iking-Konert, C., Ostendorf, B., Sander, O., Jost, M., Wagner, C., Joosten, L., Schneider, M., and Hänsch, G.M. (2005). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1436–1442.

Ioan-Facsinay, A., de Kimpe, S.J., Hellwig, S.M.M., van Lent, P.L., Hofhuis, F.M.A., van Ojik, H.H., Sedlik, C., da Silveira, S.A., Gerber, J., de Jong, Y.F., et al. (2002). Fc gamma RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16, 391–402.

Jaeger, B.N., Donadieu, J., Cognet, C., Bernat, C., Ordoñez-Rueda, D., Barlogis, V., Mahlaoui, N., Fenis, A., Narni-Mancinelli, E., Beaupain, B., et al. (2012b). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J. Exp. Med.* 209, 565–580.

Jakus, Z., Németh, T., Verbeek, J.S., and Mócsai, A. (2008). Critical but overlapping role of Fc gamma RIII and Fc gamma RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 618–629.

Jefferis R. (2012). Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch Biochem Biophys.* 526(2).159-66

- Jenneweine, M.F., and Alter, G. (2017). The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends Immunol.* 38, 358–372.
- Jing, Y., Ni, Z., Wu, J., Higgins, L., Markowski, T.W., Kaufman, D.S., and Walcheck, B. (2015). Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells. *PloS One* 10, e0121788.
- Jones, L.L., Chaturvedi, V., Uyttenhove, C., Van Snick, J., and Vignali, D.A.A. (2012). Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. *Mol. Immunol.* 51, 234–244.
- Jönsson, F., Mancardi, D.A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daëron, M., and Bruhns, P. (2011). Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121, 1484–1496.
- Julg, B., Liu, P.-T., Wagh, K., Fischer, W.M., Abbink, P., Mercado, N.B., Whitney, J.B., Nkolola, J.P., McMahan, K., Tartaglia, L.J., et al. (2017). Protection against a mixed SHIV challenge by a broadly neutralizing antibody cocktail. *Sci. Transl. Med.* 9.
- Kacs Kovics I, Wu Z, Simister NE, Frenyo LV, Hammarstrom L. 1989. Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc Receptor. *J Immunol.* 164(4), 1889-97
- Kaplon, H., and Reichert, J.M. (2018). Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 10, 183–203.
- Kasperkiewicz, M., Nimmerjahn, F., Wende, S., Hirose, M., Iwata, H., Jonkman, M.F., Samavedam, U., Gupta, Y., Möller, S., Rentz, E., et al. (2012). Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J. Pathol.* 228, 8–19.
- Kimura, H., Minakami, H., Ohbuchi, M., Yamaki, N., Tsuchida, S., Kanazawa, K., Hara, Y., Asahina, J., Abe, O., Ike, Y., et al. (1997). Release of superoxide anion from polymorphonuclear leukocytes stimulated by rubella viral antigen-antibody complex in vitro. *Acta Virol.* 41, 329–332.
- Klebanoff, S.J., and Coombs, R.W. (1992). Viricidal effect of polymorphonuclear leukocytes on human immunodeficiency virus-1. Role of the myeloperoxidase system. *J. Clin. Invest.* 89, 2014–2017.
- Klein, F., Mouquet, H., Dosenovic, P., Scheid, J.F., Scharf, L., and Nussenzweig, M.C. (2013). Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science* 341, 1199–1204.
- Ko, S.-Y., Pegu, A., Rudicell, R.S., Yang, Z., Joyce, M.G., Chen, X., Wang, K., Bao, S.,
- Kraemer, T.D., Rath, T., et al. (2014). Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature* 514, 642–645.
- Köhler, G., and Milstein, C. (2005). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 2453–2455.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175.
- Kruijsen, D., Bakkers, M.J., van Uden, N.O., Viveen, M.C., van der Sluis, T.C., Kimpen, J.L., Leusen, J.H., Coenjaerts, F.E., and van Bleek, G.M. (2010). Serum Antibodies Critically Affect Virus-Specific CD4⁺/CD8⁺ T Cell Balance during Respiratory Syncytial Virus Infections. *J. Immunol.* 185, 6489–6498.
- Kuijpers, T., and Lutter, R. (2012). Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 7–15.
- Kumar V, Sharma A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 11, 1325-34
- Kumar, R., Tuen, M., Li, H., Tse, D.B., and Hioe, C.E. (2011). Improving immunogenicity of HIV-1 envelope gp120 by glycan removal and immune complex formation. *Vaccine* 29, 9064–9074.
- Kumar, R., Tuen, M., Liu, J., Nadas, A., Pan, R., Kong, X., and Hioe, C.E. (2013). Elicitation of broadly reactive antibodies against glycan-modulated neutralizing V3 epitopes of HIV-1 by immune complex vaccines. *Vaccine*

31, 5413–5421.

Kwakkenbos MJ, van Helden PM, Beaumont T, Spits H. (2016). Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunol Rev.* 270 (1), 65–77

Kwong, P.D., Mascola, J.R., and Nabel, G.J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 693–701.

Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.

Lambour, J., Naranjo-Gomez, M., Piechaczyk, M., and Pelegrin, M. (2016). Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play. *Emerg. Microbes Infect.* 5, e92.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3, 73ra19.

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Hayes RJ, Dahiyat BI. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *103(11).* 4005-10

Lee, A.J., Chen, B., Chew, M.V., Barra, N.G., Shenouda, M.M., Nham, T., van Rooijen, N., Jordana, M., Mossman, K.L., Schreiber, R.D., et al. (2017). Inflammatory monocytes require type I interferon receptor signaling to activate NK cells via IL-18 during a mucosal viral infection. *J. Exp. Med.* 214, 1153–1167.

Lehmann, C.H.K., Baranska, A., Heidkamp, G.F., Heger, L., Neubert, K., Lühr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Brückner, C., Beck, S., et al. (2017). DC subset-specific induction of T cell responses upon antigen uptake via Fcγ receptors in vivo. *J. Exp. Med.* 214, 1509–1528.

León, B., Ballesteros-Tato, A., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2014). Prolonged antigen presentation by immune complex-binding dendritic cells programs the proliferative capacity of memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 211, 1637–1655.

Leon, P.E., He, W., Mullarkey, C.E., Bailey, M.J., Miller, M.S., Krammer, F., Palese, P., and Tan, G.S. (2016). Optimal activation of Fc-mediated effector functions by influenza virus hemagglutinin antibodies requires two points of contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5944–E5951.

Li, F., Smith, P., and Ravetch, J.V. (2014). Inhibitory Fcγ receptor is required for the maintenance of tolerance through distinct mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 3021–3028.

List, T., and Neri, D. (2013). Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 5, 29–45.

L'Italien, R. (2008). Immunohématologie (Montréal: Centre collégial de développement de matériel didactique).

Liu, J.K.H. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann. Med. Surg.* 3, 113–116.

Liu, S.D., Chalouni, C., Young, J.C., Junttila, T.T., Sliwkowski, M.X., and Lowe, J.B. (2015). Afucosylated antibodies increase activation of FcγRIIIa-dependent signaling components to intensify processes promoting ADCC. *Cancer Immunol. Res.* 3, 173–183.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., and Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.* 28, 3696–3705.

Lofano, G., Gorman, M.J., Yousif, A.S., Yu, W.-H., Fox, J.M., Dugast, A.-S., Ackerman, M.E., Suscovich, T.J., Weiner, J., Barouch, D., et al. (2018). Antigen-specific antibody Fc glycosylation enhances humoral immunity via the recruitment of complement. *Sci. Immunol.* 3.

Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. (2002). Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa

genes. *Am J Trop Med Hyg.* 67(1). 102-6

Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195.

Magdelaine-Beuzelin, C., Ohresser, M., and Watier, H. (2009). FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes. *Médecine/Sciences* 25, 1053–1056.

Malbec, M., Porrot, F., Rua, R., Horwitz, J., Klein, F., Halper-Stromberg, A., Scheid, J.F., Eden, C., Mouquet, H., Nussenzweig, M.C., et al. (2013). Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J. Exp. Med.* 210, 2813–2821.

Mancardi, D.A., Jönsson, F., Iannascoli, B., Khun, H., Van Rooijen, N., Huerre, M., Daëron, M., and Bruhns, P. (2011). Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor Fc γ RIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 1899–1903.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.

Marasco, W.A., and Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 25, 1421–1434.

Marchi, L.F., Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M.D.C., Chedraoui-Silva, S., and Mantovani, B. (2014). In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *Int. Immunopharmacol.* 18, 228–235.

Mayadas, T.N., Tsokos, G.C., and Tsuboi, N. (2009). Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation* 120, 2012–2024.

McAtee, F.J., and Portis, J.L. (1985). Monoclonal antibodies specific for wild mouse neurotropic retrovirus: detection of comparable levels of virus replication in mouse strains susceptible and resistant to paralytic disease. *J. Virol.* 56, 1018–1022.

McCarthy, K.M., Lam, M., Subramanian, L., Shakya, R., Wu, Z., Newton, E.E., and Simister, N.E. (2001). Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. *J. Cell Sci.* 114, 1591–1598.

McGreal, E.P., Miller, J.L., and Gordon, S. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 18–24.

Mei, J., Liu, Y., Dai, N., Favara, M., Greene, T., Jeyaseelan, S., Poncz, M., Lee, J.S., and Worthen, G.S. (2010). CXCL5 Regulates Chemokine Scavenging and Pulmonary Host Defense to Bacterial Infection. *Immunity* 33, 106–117.

Meng, W., Pan, W., Zhang, A.J.X., Li, Z., Wei, G., Feng, L., Dong, Z., Li, C., Hu, X., Sun, C., et al. (2013). Rapid Generation of Human-Like Neutralizing Monoclonal Antibodies in Urgent Preparedness for Influenza Pandemics and Virulent Infectious Diseases. *PLoS ONE* 8, e66276.

Michaud, H.-A., Gomard, T., Gros, L., Thiolon, K., Nasser, R., Jacquet, C., Hernandez, J., Piechaczyk, M., and Pelegrin, M. (2010). A crucial role for infected-cell/antibody immune complexes in the enhancement of endogenous antiviral immunity by short passive immunotherapy. *PLoS Pathog.* 6, e1000948.

Middelhoven, P.J., Van Buul, J.D., Hordijk, P.L., and Roos, D. (2001). Different proteolytic mechanisms involved in Fc gamma RIIB shedding from human neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 125, 169–175.

Mokart, D., Kipnis, E., Guerre-Berthelot, P., Vey, N., Capo, C., Sannini, A., Brun, J.-P., Blache, J.-L., Mege, J.-L., Blaise, D., et al. (2008). Monocyte deactivation in neutropenic acute respiratory distress syndrome patients treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Crit. Care Lond. Engl.* 12, R17.

Morçöl, T., Hurst, B.L., and Tarbet, E.B. (2017). Calcium phosphate nanoparticle (CaPNP) for dose-sparing of inactivated whole virus pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in mice. *Vaccine* 35, 4569–4577.

- Morquin, D., Tuaillon, E., Makinson, A., Bendriss, S., Le Moing, V., and Reynes, J. (2017). Impact of T cell activation, HIV replication and hepatitis C virus infection on neutrophil CD64 expression. *Cytometry B Clin. Cytom.* *92*, 492–497.
- Munde, E.O., Okeyo, W.A., Raballah, E., Anyona, S.B., Were, T., Ong’echa, J.M., Perkins, D.J., and Ouma, C. (2017). Association between Fc γ receptor IIA, IIIA and IIIB genetic polymorphisms and susceptibility to severe malaria anemia in children in western Kenya. *BMC Infect. Dis.* *17*.
- Nadkarni, S., Dalli, J., Hollywood, J., Mason, J.C., Dasgupta, B., and Perretti, M. (2014). Investigational analysis reveals a potential role for neutrophils in giant-cell arteritis disease progression. *Circ. Res.* *114*, 242–248.
- Naegelen, I., Beaume, N., Plançon, S., Schenten, V., Tschirhart, E.J., and Bréchar, S. (2015). Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J. Immunol. Res.* *2015*, 1–15.
- Nakatani, K., Takeshita, S., Tsujimoto, H., Kawamura, Y., Kawase, H., and Sekine, I. (1999). Regulation of the expression of Fc γ receptor on circulating neutrophils and monocytes in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol.* *5*.
- Naranjo-Gomez, M., Lambour, J., Piechaczyk, M., and Pelegrin, M. (2018). Neutrophils are essential for induction of vaccine-like effects by antiviral monoclonal antibody immunotherapies. *JCI Insight* *3*.
- Nasser, R., Pelegrin, M., Michaud, H.-A., Plays, M., Piechaczyk, M., and Gros, L. (2010). Long-lasting protective antiviral immunity induced by passive immunotherapies requires both neutralizing and effector functions of the administered monoclonal antibody. *J. Virol.* *84*, 10169–10181.
- Naumenko, V., Turk, M., Jenne, C.N., and Kim, S.-J. (2018a). Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* *371*, 505–516.
- Naumenko, V., Van, S., Dastidar, H., Kim, D.-S., Kim, S.-J., Zeng, Z., Deniset, J., Lau, A., Zhang, C., Macia, N., et al. (2018b). Visualizing Oncolytic Virus-Host Interactions in Live Mice Using Intravital Microscopy. *Mol. Ther. - Oncolytics* *10*, 14–27.
- Negishi-Koga, T., Gober, H.-J., Sumiya, E., Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Suematsu, A., Suda, T., Sato, K., Takai, T., et al. (2015). Immune complexes regulate bone metabolism through FcR γ signalling. *Nat. Commun.* *6*, 6637.
- Ng, C.T., Jaworski, J.P., Jayaraman, P., Sutton, W.F., Delio, P., Kuller, L., Anderson, D., Landucci, G., Richardson, B.A., Burton, D.R., et al. (2010). Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques. *Nat. Med.* *16*, 1117–1119.
- Ng, C.T., Snell, L.M., Brooks, D.G., and Oldstone, M.B.A. (2013a). Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections. *Cell Host Microbe* *13*, 652–664.
- Ng, T.H.S., Britton, G.J., Hill, E.V., Verhagen, J., Burton, B.R., and Wraith, D.C. (2013b). Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front. Immunol.* *4*.
- Nimmerjahn, F. (2005). Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* *310*, 1510–1512.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fc γ receptors: old friends and new family members. *Immunity* *24*, 19–28.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 34–47.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J.V. (2005). Fc γ RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* *23*, 41–51.
- Nimmerjahn, F., Lux, A., Albert, H., Woigk, M., Lehmann, C., Dudziak, D., Smith, P., and Ravetch, J.V. (2010). Fc γ RIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*,

19396–19401.

Nimmerjahn, F., Gordan, S., and Lux, A. (2015). FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol.* 36, 325–336.

Nishimura, Y., and Martin, M.A. (2017). Of Mice, Macaques, and Men: Broadly Neutralizing Antibody Immunotherapy for HIV-1. *Cell Host Microbe* 22, 207–216.

Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T.-W., Sadjadpour, R., Foulds, K.E., Shingai, M., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Donaldson, M., et al. (2017). Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature* 543, 559–563.

Nordenfelt, P., and Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284.

Ogura, K., Sato-Matsushita, M., Yamamoto, S., Hori, T., Sasahara, M., Iwakura, Y., Saiki, I., Tahara, H., and Hayakawa, Y. (2018). NK Cells Control Tumor-Promoting Function of Neutrophils in Mice. *Cancer Immunol. Res.* 6, 348–357.

Oslund, K.L., Zhou, X., Lee, B., Zhu, L., Duong, T., Shih, R., Baumgarth, N., Hung, L.-Y., Wu, R., and Chen, Y. (2014). Synergistic Up-Regulation of CXCL10 by Virus and IFN γ in Human Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 9, e100978.

Otten, M.A., van der Bij, G.J., Verbeek, S.J., Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., Beelen, R.H.J., van de Winkel, J.G.J., and van Egmond, M. (2008). Experimental antibody therapy of liver metastases reveals functional redundancy between Fc gammaRI and Fc gammaRIV. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 6829–6836.

Parsa, R., Lund, H., Georgoudaki, A.-M., Zhang, X.-M., Ortlieb Guerreiro-Cacais, A., Grommisch, D., Warnecke, A., Croxford, A.L., Jagodic, M., Becher, B., et al. (2016). BAFF-secreting neutrophils drive plasma cell responses during emergency granulopoiesis. *J. Exp. Med.* 213, 1537–1553.

Pauling, L. (1940). A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies *. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2643–2657.

Pelegrin, M., Naranjo-Gomez, M., and Piechaczyk, M. (2015). Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents? *Trends Microbiol.* 23, 653–665.

Perrone, L.A., Plowden, J.K., García-Sastre, A., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2008). H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. *PLoS Pathog.* 4, e1000115.

Perussia, B., Kobayashi, M., Rossi, M.E., Anegón, I., and Trinchieri, G. (1987). Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 765–774.

Petri, B., Phillipson, M., and Kubes, P. (2008). The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *J. Immunol.* 180, 6439–6446.

Pichlmair, A., and Reis e Sousa, C. (2007). Innate Recognition of Viruses. *Immunity* 27, 370–383.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625–627.

Poonia, B., Kijak, G.H., and Pauza, C.D. (2010). High affinity allele for the gene of FCGR3A is risk factor for HIV infection and progression. *PloS One* 5, e15562.

Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119–126.

Portis, J.L., Czub, S., Garon, C.F., and McAtee, F.J. (1990). Neurodegenerative disease induced by the wild mouse

ecotropic retrovirus is markedly accelerated by long terminal repeat and gag-pol sequences from nondefective Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* *64*, 1648–1656.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* *13*, 170–180.

Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J.B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., et al. (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* *514*, 47–53.

Reichert, J.M. (2017). Antibodies to watch in 2017. *MAbs* *9*, 167–181.

Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *7*(8). 2517-27

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1 and IL-1 Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J. Immunol.* *187*, 4835–4843.

Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 715–725.

Rosenberg, A., and Demeule, B. (2015). *Biobetters Protein Engineering to Approach the Curative* (New York, NY: Springer New York ;).

Sadanand, S., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV: New Insights to Inform Vaccine Design. *Annu. Rev. Med.* *67*, 185–200.

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* *12*, 109–116.

Salazar, G., Zhang, N., Fu, T.-M., and An, Z. (2017). Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. *NPJ Vaccines* *2*, 19.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* *187*, 875–883.

Sato, S., Beausoleil, S.A., Popova, L., Beaudet, J.G., Ramenani, R.K., Zhang, X., Wieler, J.S., Schieferl, S.M., Cheung, W.C., and Polakiewicz, R.D. (2012). Proteomics-directed cloning of circulating antiviral human monoclonal antibodies. *Nat. Biotechnol.* *30*, 1039–1043.

Sawant, K.V., Poluri, K.M., Dutta, A.K., Sepuru, K.M., Troshkina, A., Garofalo, R.P., and Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci. Rep.* *6*.

Scapini, P., and Cassatella, M.A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* *124*, 710–719.

Scapini, P., and Cassatella, M.A. (2017). Location in the spleen dictates the function of murine neutrophils. *J. Exp. Med.* *214*, 1207–1209.

Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., et al. (2005). Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* *105*, 830–837.

Scapini, P., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol. Lett.* *116*, 1–6.

Scheid, J.F., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Kreider, E.F., Lu, C.-L., Lorenzi, J.C.C., Feldmann, A., Braunschweig,

M., Nogueira, L., Oliveira, T., et al. (2016). HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature* 535, 556–560.

Schiff, D.E., Rae, J., Martin, T.R., Davis, B.H., and Curnutte, J.T. Increased Phagocyte FcγRI Expression and Improved Fcγ-Receptor – Mediated Phagocytosis After In Vivo Recombinant Human Interferon-γ Treatment of Normal Human Subjects. 9.

Schneider, R., Yaneva, T., Beauseigle, D., El-Khoury, L., and Arbour, N. (2011). IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naïve CD8⁺ T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 47–59.

Schoofs, T., Klein, F., Braunschweig, M., Kreider, E.F., Feldmann, A., Nogueira, L., Oliveira, T., Lorenzi, J.C.C., Parrish, E.H., Learn, G.H., et al. (2016b). HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* 352, 997–1001.

Schulze, F.S., Beckmann, T., Nimmerjahn, F., Ishiko, A., Collin, M., Köhl, J., Goletz, S., Zillikens, D., Ludwig, R., and Schmidt, E. (2014). Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. *Am. J. Pathol.* 184, 2185–2196.

Segal, A.W., Dorling, J., and Coade, S. (1980). Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J. Cell Biol.* 85, 42–59.

Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., and Link, D.C. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17, 413–423.

Seo, S.-U., Kwon, H.-J., Ko, H.-J., Byun, Y.-H., Seong, B.L., Uematsu, S., Akira, S., and Kweon, M.-N. (2011). Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathog.* 7, e1001304.

Shen, L., Guyre, P.M., and Fanger, M.W. (1987). Polymorphonuclear leukocyte function triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG. *J. Immunol. Baltim. Md* 139, 534–538.

Shi, Y., Fan, X., Deng, H., Brezski, R.J., Ryczyn, M., Jordan, R.E., Strohl, W.R., Zou, Q., Zhang, N., and An, Z. (2015). Trastuzumab Triggers Phagocytic Killing of High HER2 Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Interaction with Fcγ Receptors on Macrophages. *J. Immunol.* 194, 4379–4386.

Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O’Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H.A., and Presta, L.G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγγ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 26733–26740.

Shiohara, M., Gombart, A.F., Sekiguchi, Y., Hidaka, E., Ito, S., Yamazaki, T., Koeffler, H.P., and Komiyama, A. (2004). Phenotypic and functional alterations of peripheral blood monocytes in neutrophil-specific granule deficiency. *J. Leukoc. Biol.* 75, 190–197.

Shirey, K.A., Lai, W., Scott, A.J., Lipsky, M., Mistry, P., Pletneva, L.M., Karp, C.L., McAlees, J., Gioannini, T.L., Weiss, J., et al. (2013). The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature* 497, 498–502.

Shultz, L.D., Brehm, M.A., Garcia-Martinez, J.V., and Greiner, D.L. (2012). Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 786–798.

Simmons, C.P., Bernasconi, N.L., Suguitan, A.L., Mills, K., Ward, J.M., Chau, N.V.V., Hien, T.T., Sallusto, F., Ha, D.Q., Farrar, J., et al. (2007). Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *PLoS Med.* 4, e178.

Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210, 1695–1710.

Sips, M., Krykbaeva, M., Diefenbach, T.J., Ghebremichael, M., Bowman, B.A., Dugast, A.-S., Boesch, A.W., Streeck, H., Kwon, D.S., Ackerman, M.E., et al. (2016). Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent

mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal Immunol.* 9, 1584–1595.

Smith, S.A., and Derdeyn, C.A. (2016). Harnessing the protective potential of HIV-1 neutralizing antibodies. *F1000Research*.

Smith, P.K., Wang, S.Z., Dowling, K.D., and Forsyth, K.D. (2001). Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J. Paediatr. Child Health* 37, 146–151.

Sobota, A., Strzelecka-Kiliszek, A., Gładkowska, E., Yoshida, K., Mrozińska, K., and Kwiatkowska, K. (2005). Binding of IgG-opsonized particles to Fc gamma R is an active stage of phagocytosis that involves receptor clustering and phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 4450–4457.

Soehnlein, O., Zernecke, A., Eriksson, E.E., Rothfuchs, A.G., Pham, C.T., Herwald, H., Bidzhekov, K., Rottenberg, M.E., Weber, C., and Lindbom, L. (2008). Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112, 1461–1471.

Soejima, K., and Rollins, B.J. (2001). A Functional IFN- γ -Inducible Protein-10/CXCL10-Specific Receptor Expressed by Epithelial and Endothelial Cells That Is Neither CXCR3 Nor Glycosaminoglycan. *J. Immunol.* 167, 6576–6582.

Soler-Rodriguez, A.M., Zhang, H., Lichenstein, H.S., Qureshi, N., Niesel, D.W., Crowe, S.E., Peterson, J.W., and Klimpel, G.R. (2000). Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 2674–2683.

Sporri, R., Joller, N., Hilbi, H., and Oxenius, A. (2008). A Novel Role for Neutrophils As Critical Activators of NK Cells. *J. Immunol.* 181, 7121–7130.

Stamatiades, E.G., Tremblay, M.-E., Bohm, M., Crozet, L., Bisht, K., Kao, D., Coelho, C., Fan, X., Yewdell, W.T., Davidson, A., et al. (2016). Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell* 166, 991–1003.

Stapleton NM, Anderson JT, Stemerding AM, Verheul RC, Sandie I, de Haas M, Jonsdottir I, van der Schoot CE, Vidarsson G. (2011). Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat Commun.* 2. 599.

Su, B., and Moog, C. (2014). Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front. Immunol.* 5, 289.

Sundd, P., Pospieszalska, M.K., and Ley, K. (2013). Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol. Immunol.* 55, 59–69.

Takaku, Y., Soma, T., Uchida, Y., Kobayashi, T., Nakagome, K., and Nagata, M. (2016). CXC chemokine superfamily induced by Interferon- γ in asthma: a cross-sectional observational study. *Asthma Res. Pract.* 2.

Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T.W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 4886–4890.

Tamassia, N., Bianchetto-Aguilera, F., Arruda-Silva, F., Gardiman, E., Gasperini, S., Calzetti, F., and Cassatella, M.A. (2018). Cytokine production by human neutrophils: revisiting the “dark side of the moon.” *Eur. J. Clin. Invest.* e12952.

Tate, M.D., Deng, Y.-M., Jones, J.E., Anderson, G.P., Brooks, A.G., and Reading, P.C. (2009). Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 7441–7450.

Tecchio, C., and Cassatella, M.A. (2016). Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin. Immunol.* 28, 119–128.

- Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5, 508.
- Teillaud, C., Galon, J., Zilber, M.T., Mazières, N., Spagnoli, R., Kurre, R., Fridman, W.H., and Sautès, C. (1993). Soluble CD16 binds peripheral blood mononuclear cells and inhibits pokeweed-mitogen-induced responses. *Blood* 82, 3081–3090.
- Thulin NK, Wang TT. (2018). The role of Fc gamma receptors in broad protection against influenza viruses. *Vaccines* (3)
- Tipton, T.R.W., Mockridge, C.I., French, R.R., Tutt, A.L., Cragg, M.S., and Beers, S.A. (2015). Anti-mouse FcγRIV antibody 9E9 also blocks FcγRIII in vivo. *Blood* 126, 2643–2645.
- Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M.R., Murphy, B.R., Rappuoli, R., and Lanzavecchia, A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* 10, 871–875.
- TreDenick, T. (2018). The evolution of therapeutic monoclonal antibodies. *Pharmaceutical manufacturing.*
- Tsuboi, N., Asano, K., Lauterbach, M., and Mayadas, T.N. (2008). Human Neutrophil Fcγ Receptors Initiate and Play Specialized Nonredundant Roles in Antibody-Mediated Inflammatory Diseases. *Immunity* 28, 833–846.
- Tutt, A.L., James, S., Laversin, S.A., Tipton, T.R.W., Ashton-Key, M., French, R.R., Hussain, K., Vaughan, A.T., Dou, L., Earley, A., et al. (2015). Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for Mouse and Human Fcγ Receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 5503–5516.
- Uciechowski P, Schwartz M, Gessner JE, Schmidt RE, Resh K, Radeke HH. (1998). IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol.* 28(9).2928-35
- Unkeless, J.C. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150, 580–596.
- Uyangaa, E., Kim, J.H., Patil, A.M., Choi, J.Y., Kim, S.B., and Eo, S.K. (2015). Distinct Upstream Role of Type I IFN Signaling in Hematopoietic Stem Cell-Derived and Epithelial Resident Cells for Concerted Recruitment of Ly-6Chi Monocytes and NK Cells via CCL2-CCL3 Cascade. *PLoS Pathog.* 11, e1005256.
- Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R., and Goossens, J.G. (1980). OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 124, 2708–2713.
- Vermeren, S., Karmakar, U., and Rossi, A.G. (2018). Immune complex-induced neutrophil functions: A focus on cell death. *Eur. J. Clin. Invest.* e12948.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.
- Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrin, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., et al. (2009). Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target. *Science* 326, 285–289.
- Wang, Q., Yang, H., Liu, X., Dai, L., Ma, T., Qi, J., Wong, G., Peng, R., Liu, S., Li, J., et al. (2016a). Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Sci. Transl. Med.* 8, 369ra179-369ra179.
- Wang, Y., Luo, X., Feng, L., Niu, J., Tian, Z., Li, R., Xu, Y., Guo, L., Zhang, J., and Gu, W. (2016b). Elevated plasma-soluble CD16 levels in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs: correlation with ADAM17-mediated shedding. *J. Gen. Virol.* 97, 632–638.
- Watkins, J.D., Siddappa, N.B., Lakhashe, S.K., Humbert, M., Sholukh, A., Hemashettar, G., Wong, Y.L., Yoon, J.K., Wang, W., Novembre, F.J., et al. (2011). An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PloS One* 6, e18207.

- Wei, J., Xia, S., Sun, H., Zhang, S., Wang, J., Zhao, H., Wu, X., Chen, X., Hao, J., Zhou, X., et al. (2013). Critical Role of Dendritic Cell-Derived IL-27 in Antitumor Immunity through Regulating the Recruitment and Activation of NK and NKT Cells. *J. Immunol.* *191*, 500–508.
- Wong, S.L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A.B., Kahn, C.R., and Wagner, D.D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat. Med.* *21*, 815–819.
- Wu, H., Pfarr, D.S., Losonsky, G.A., and Kiener, P.A. (2008). Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *317*, 103–123.
- Xu, D.-Z., Zhao, K., Guo, L.-M., Li, L.-J., Xie, Q., Ren, H., Zhang, J.-M., Xu, M., Wang, H.-F., Huang, W.-X., et al. (2008). A randomized controlled phase IIb trial of antigen-antibody immunogenic complex therapeutic vaccine in chronic hepatitis B patients. *PloS One* *3*, e2565.
- Yamamoto, H., Kawada, M., Takeda, A., Igarashi, H., and Matano, T. (2007). Post-Infection Immunodeficiency Virus Control by Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE* *2*, e540.
- Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Matano, T. (2009). Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* *83*, 5514–5524.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* *2*, 1.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* *194*, 519–527.
- Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M, Kishimoto T. (1988). Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23):tissue-specific and IL4-specific regulation of gene expression. *Cell*.*55*(4), 611-8
- Zimmermann, M., Arruda-Silva, F., Bianchetto-Aguilera, F., Finotti, G., Calzetti, F., Scapini, P., Lunardi, C., Cassatella, M.A., and Tamassia, N. (2016). IFN α enhances the production of IL-6 by human neutrophils activated via TLR8. *Sci. Rep.* *6*, 19674.
- (1999). Palivizumab (Synagis) for prevention of RSV infection. *Med. Lett. Drugs Ther.* *41*, 3–4.
- Zuniga J, Buendia-Roldan I, Zhao Y, Jimenez L, Torres D, Romo J, Ramirez G, Cruz A, Vargas-Alarcon G, Sheu CC, Chen F, Su L, Tager AM, Pardo A, Selman M, Christiani DC.(2012). *Eur Respi J* *39*(3). 604-10

Résumé

Les anticorps monoclonaux (AcM) sont désormais considérés comme une alternative thérapeutique crédible pour traiter les infections virales graves. Comprendre leurs multiples mécanismes d'action est donc crucial pour améliorer leur effet thérapeutique. En utilisant un modèle d'infection virale chez la souris (leucémie induite par le rétrovirus FrCas^E), l'équipe a montré qu'une immunothérapie courte par un AcM neutralisant induisait une immunité antivirale protectrice sur le long-terme (effets « vaccinaux ») qui est dépendante du fragment Fc de l'AcM. Ainsi, des immuns complexes (IC) formés à partir de l'AcM thérapeutique et de déterminants viraux, induisent l'activation de cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques (DCs), *via* leur interaction avec les FcγRs exprimés à la surface des cellules. Cependant, ces interactions IC-FcγR peuvent également concerner d'autres cellules du système immunitaire outre que les DCs, telles que les macrophages, monocytes ou bien encore les neutrophiles, qui expriment elles aussi les FcγRs à leur surface et ce de façon différentielle. Dans ce contexte, il est important d'identifier quels FcγRs et quelles cellules les exprimant sont essentiels à l'induction des effets vaccinaux par les AcM. C'est pourquoi mes travaux thèse se sont focalisés sur l'étude du rôle des neutrophiles et des FcγRs dans la modulation de la réponse immune par les AcM. Cette étude repose sur le caractère Fc-dépendant de l'induction d'une réponse immune protectrice par les AcM ainsi que sur les propriétés immunomodulatrices des neutrophiles, qui ont été décrites dans différents contextes pathologiques mais jamais étudiées dans le cadre d'une immunothérapie antivirale par AcM. Pour cela, j'ai utilisé différentes approches *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

En utilisant le modèle d'infection par FrCas^E, il a été montré que les neutrophiles ainsi que le FcγRIV ont un rôle crucial dans l'induction des effets vaccinaux par les AcM, notamment *via* l'induction d'une réponse humorale antivirale endogène protectrice à très long-terme. De plus lors d'expériences *in vitro*, il a également été souligné que les neutrophiles sont plus efficacement activés par les IC comparé au virus seul et que différentes cytokines pro-inflammatoires et/ou immunomodulatrices (telles que le TNFα et les interférons de type I et II) potentialisent l'activation des neutrophiles induite par les IC. Mes travaux ont aussi mis en évidence que l'infection virale et l'immunothérapie modulent l'expression des FcγRs, et notamment induisent la surexpression du FcγRIV sur deux populations distinctes de neutrophiles (différenciées par le niveau d'expression du marqueur de surface Ly6G: Ly6G^{hi} et Ly6G^{int}) et sur les monocytes inflammatoires. Enfin, mes travaux montrent que l'immunothérapie par AcM module les profils de sécrétion chimiokinique et cytokinique de ces 3 types cellulaires surexprimant le FcγRIV, bien que la nature des profils de sécrétion varie en fonction du type cellulaire et évolue au cours du temps. Ces résultats suggèrent que l'effet immunomodulateur des AcM repose sur l'activation de différents acteurs de la réponse immunitaire précoce, en induisant la sécrétion de chimiokines et de cytokines nécessaires à l'orchestration de la réponse immune. Ils suggèrent aussi une coopération entre ces différents acteurs dans la mise en place d'une immunité protectrice.

Pour finir l'ensemble de mes travaux ont mis en évidence un rôle immunomodulateur clé du FcγRIV, ainsi que des différentes cellules l'exprimant, dans l'induction d'une réponse immune protectrice induite par des AcM antiviraux. Ces révélations pourraient avoir des conséquences importantes dans l'amélioration des immunothérapies à base d'AcM.

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are now considered as a true therapeutic alternative for treating severe viral infections. Figure out their multiple mechanisms of action is therefore crucial to improve their therapeutic effect. Using a mouse model of viral infection (the FrCas^E retrovirus-induced leukemia), the team showed that a short immunotherapy with a neutralizing mAb induces long-term protective antiviral immunity ("vaccine" effects) which is Fc-dependent. Notably, immune complexes (IC) formed with therapeutic mAbs and viral determinants induce the activation of immune cells, especially dendritic cells (DCs) *via* their interaction with FcγRs expressed on the cell's surface. However, IC-FcγR interactions can involve different cells of the immune system in addition to DCs, such as macrophages, monocytes or neutrophils, which differentially express FcγRs. In this context, it is important to identify which FcγRs and which FcγR-expressing cells are crucial in the induction of vaccine effects induced by mAbs. It's the reason why my thesis work has focused on the study of the role of neutrophils and FcγRs in the modulation of immune response by mAbs. This study is based on the Fc-dependent nature of the induction of a protective immune response by mAbs and the immunomodulatory properties of neutrophils, described in different pathological situations but never studied in an mAbs antiviral immunotherapy context. To this end, I used different approaches *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

By using the FrCas^E infection model, it has been shown that neutrophils as well as FcγRIV have a crucial role in the induction of vaccine effects by mAbs, notably *via* the induction of a long-term protective antiviral humoral response. Moreover the *in vitro* experiments, highlighted that neutrophils are more effectively activated by IC compared to virus alone and that different pro-inflammatory and/or immunomodulating cytokines (i.e. TNFα and type I and type II interferons) potentiate the activation of neutrophils induced by IC. My work also revealed that viral infection and immunotherapy modulate the expression of different FcγRs, and notably they induce the overexpression of FcγRIV on two distinct populations of neutrophils (differentiated by their expression levels of the Ly6G surface marker: Ly6G^{hi} and Ly6G^{int}) and inflammatory monocytes. Finally, my work shows that immunotherapy with Mab modulates the chemokinic and cytokinic secretion profiles of these 3 FcγRIV-over-expressing cells, although the nature of the secretion profiles differs according to the cell type and evolves over time. These results suggest that the immunomodulatory effect of mAbs is based on the activation of different actors of the early immune response by inducing the secretion of chemokines and cytokines necessary for the orchestration of the immune response. They also suggest a potential cooperation between these different actors in the establishment of protective immunity.

Altogether, these results show a key immunomodulator role of FcγRIV as well as of different cells expressing it in the induction of a protective immune response by antiviral mAb. They might have important consequences for the improvement of Mab-based immunotherapies.