



HAL
open science

Analyse des propriétés antivirales de l'interleukine-26

Vincent Larochette

► **To cite this version:**

Vincent Larochette. Analyse des propriétés antivirales de l'interleukine-26. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2018. Français. NNT : 2018ANGE0041 . tel-02955501

HAL Id: tel-02955501

<https://theses.hal.science/tel-02955501>

Submitted on 2 Oct 2020

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.

THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Vincent LAROCLETTE

Analyse des propriétés antivirales de l'interleukine-26

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 2018-12-18

Unité de recherche : Unité INSERM 1232, équipe 7 « Immunité innée et immunothérapie »

Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie Bendriss-Vermare
Jean-Claude Sirard

Chargée de recherche, INSERM U1052, Lyon
Directeur de recherche, INSERM U1019, Lille

Composition du Jury :

Examineurs : Nathalie Bendriss-Vermare
Jean-Claude Sirard
Philippe Roingeard
Alain Morel

Dir. de thèse : Yves Delneste

Chargée de recherche, INSERM U1052, Lyon
Directeur de recherche, INSERM U1019, Lille
Directeur de recherche, INSERM U1259, Tours
Professeur, Université d'Angers, Angers
Directeur de recherche, INSERM U1232, Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury pour l'évaluation de ma thèse, et tout spécialement à ceux qui ont accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également le Dr Yves Delneste pour avoir supervisé mes travaux au cours de ces années depuis le Master 2, que ce soit sur l'IL-26, la clusterine et le C1q, et pour avoir relu de nombreuses versions de cette thèse ainsi que d'articles, de revues, de diaporamas et de posters. Merci au Pr Pascale Jeannin pour ses conseils et ses idées sur de nombreux projets autour de l'IL-26.

Je souhaiterais remercier Le Dr Élodie Beaumont et le Pr Philippe Roingeard pour la collaboration sur l'étude des effets de l'IL-26 sur les infections par HCV, qui constitue une grande partie de cette thèse, ainsi que pour la rédaction du manuscrit visant à publier ces travaux. Merci à Élodie pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse avec le Dr Jean-François Fonteneau.

Je remercie aussi le Pr Alain Morel pour sa contribution au manuscrit, pour m'avoir conseillé ce laboratoire après mon stage de M1, sans oublier ses cours à la faculté. Je remercie Jonathan Dauvé pour les modèles et prédictions bio-informatiques.

Merci également aux collègues du laboratoire, notamment à mes camarades doctorants Léa, Clément et Loukas. Merci à Simon et Laurence pour m'avoir appris beaucoup de manips. Merci à Sonia pour sa bonne humeur. Merci à Julie Tabiasco pour ses conseils et à Pascale Pignon pour de nombreux protocoles (et à ces deux dernières pour leur humour et notre culture musicale commune). Merci à Laëtitia Basset pour l'aide sur de nombreuses expériences. Je remercie Caroline Poli et Charline Miot pour leur étude des propriétés de l'IL-26, et pour leurs résultats qui ont préparé le terrain pour ma thèse. Merci au Dr Beauvillain et au Pr Couez pour leurs conseils. Merci à Laëtitia Aymeric pour ses présentations passionnantes sur le microbiote. Merci également à l'équipe 6 : à Laurent Marsollier et Estelle Marion pour l'aide lors de mes rares utilisations de bactéries, à Jérémie pour m'avoir aidé sur des manips à mon arrivée, et à Marie, Amélie et Mélanie pour nos expériences ou cultures cellulaires en commun (et pour les sorties hors-labo : victoire à l'escape game !).

Je voudrais remercier mes amis pour les week-ends passés ensemble au cours de ces trois ans, notamment le groupe de jeu de rôle. Merci à Simon d'avoir tenu la coloc en mon absence. Merci à Hécate pour son amour félin. Je tiens enfin à remercier ma famille pour leur soutien, en particulier mes parents.

Table des matières

1	Introduction.....	9
1.1	L'immunité innée.....	9
1.1.1	Les récepteurs cellulaires	9
1.1.1.1	Les récepteurs membranaires.....	9
1.1.1.1.1	TLR membranaires.....	10
1.1.1.1.2	Récepteurs d'épuration.....	11
1.1.1.1.3	Récepteurs de type lectinique (C-type lectin-like).....	15
1.1.1.2	Les récepteurs endosomaux.....	16
1.1.1.3	Les récepteurs cytoplasmiques	18
1.1.1.3.1	Famille NLR (NOD-like receptors).....	18
1.1.1.3.2	Famille RLR (RIG-like receptors)	19
1.1.1.3.3	Autres récepteurs cytoplasmiques.....	19
1.1.2	Les récepteurs extracellulaires de l'immunité innée	21
1.1.2.1	Collectines	22
1.1.2.2	Pentraxines (PTX3, CRP, SAP)	23
1.1.2.3	Ficolines	24
1.1.3	Les récepteurs non conventionnels	24
1.1.3.1	Description	24
1.1.3.2	Expression.....	25
1.1.3.3	Rôle antimicrobien direct.....	26
1.1.3.4	Interaction avec le système immunitaire.....	27
1.2	L'interleukine 26.....	28
1.2.1	Découverte et généralités	29
1.2.2	Le gène IL26.....	29
1.2.3	Le récepteur IL-20R1 / IL-10R2	30
1.2.4	Expression et sécrétion	31
1.2.5	Fonctions biologiques.....	32
1.2.5.1	Activité pro-inflammatoire.....	32
1.2.5.2	Autres rôles de l'IL-26.....	34
1.2.5.2.1	Rôles directs	34
1.2.5.2.2	Rôles via le système immunitaire.....	36
1.3	Le virus de l'hépatite C et la réponse antivirale	37

1.3.1	Le virus de l'hépatite C	37
1.3.1.1	La particule virale	37
1.3.1.2	Cycle de réplication du virus	38
1.3.2	L'hépatite C.....	39
1.3.2.1	Épidémiologie.....	39
1.3.2.2	Signes cliniques.....	40
1.3.2.3	Diagnostics.....	41
1.3.2.4	Traitements	41
1.3.3	La réponse antivirale	42
1.3.3.1	Généralités sur la réponse antivirale innée.....	42
1.3.3.2	Détection des virus à ARN	42
1.3.3.3	Les facteurs de transcription IRF	43
1.3.3.4	Les interférons et leur récepteurs.....	44
1.3.3.4.1	Les interférons de type I.....	44
1.3.3.4.2	L'interféron de type II.....	45
1.3.3.4.3	Les interférons de type III.....	46
1.3.3.5	Les ISG	46
1.3.3.6	La réponse antivirale adaptative	47
1.3.3.7	Échappement du HCV au système immunitaire.....	48
2	Contexte et objectifs	49
3	Résumé des résultats	51
3.1	L'IL-26 protège les hépatocytes de l'infection <i>in vitro</i> par HCV	51
3.2	L'IL-26 n'induit pas l'expression des ISG par les cellules de la lignée Huh7.5.....	52
3.3	L'IL-26 n'inhibe pas l'entrée des virions dans les hépatocytes	53
3.4	L'IL-26 se fixe à l'ARN viral.....	54
3.5	L'IL-26 inhibe <i>in vitro</i> la réplication de l'ARN viral	56
3.6	L'IL-26 rend l'ARN pro-inflammatoire	57
3.7	L'IL-26 induit l'expression d'IFN α par les pDC.....	58
3.8	La réponse des mdDC dépend du type d'acide nucléique complexé à l'IL-26.....	59
3.9	Manuscrit en préparation	60
4	Discussion et perspectives	83
4.1	L'IL-26 inhibe la réplication de l'ARN viral.....	83
4.1.1	L'IL-26 protège <i>in vitro</i> les cellules Huh7.5 de l'infection par HCV	83
4.1.2	Mécanisme de protection	83

4.2	Les complexes d'IL-26 et d'ARN activent l'immunité innée	86
5	Conclusion	89
6	Annexes	91
6.1	Annexe I : IL-26 confers pro-inflammatory properties to extracellular DNA.	91
6.2	Annexe II : IL-26, an intriguing member of the IL-20 cytokine family.	122
6.3	Annexe III : Immune properties of HSP70.	148
7	Références bibliographiques	181

Liste des abréviations

AAV	ANCA-Associated Vasculitis
ACAMP	Apoptotic Cell-Associated Molecular Pattern
ACD	Allergic Contact Dermatitis
AIM2	Absent in melanoma 2
ALR	AIM2-Like Receptor
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
APOL6	Apolipoprotein 6
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
CARD	C-terminal caspase recruitment domain
CD	Cluster of Differentiation
cGAMP	cyclic GMP-AMP
cGAS	cyclic GAMP synthase
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CIITA	Class II MHC Transactivator
CLEC	C-type Lectin
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRD	Carbohydrate-Recognition Domain
CRP	C-Reactive Protein
CTLD	C-Type Lectin-like Domain
DAA	Direct Antiviral Agent
DAI	DNA-dependent activator of IFN regulatory factors
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAP	L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelic acid
DDX41	DEAD-Box Helicase 41
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
dsRNA	Double strand RNA
ECP	Eosinophil Cationic Protein
GVHD	Graft-versus-Host Disease
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HIN	Hematopoietic Interferon-inducible Nuclear antigen
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HSP	Heat-Shock Protein
IAV	Influenza A Virus
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	Innate Lymphoid Cells
IRAK	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
LBP	LPS Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LPS	Lipopolysaccharide

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MBL	Mannan-Binding Lectin
MD2	myb-regulated gene 2
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated gene 5
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
MxA	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
NAB	NGFI-A-binding protein
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E, TEP1
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLR	NOD-Like Receptor
NS	Non Structural
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PD-1	Programmed cell death protein 1
pDC	plasmacytoid Dendritic Cells
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKR	Protein Kinase R
poly(I:C)	Polyinosinic-polyicytidylic acid
PRM	Pattern Recognition Molecule
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAGE	Receptor for Advanced Glycosylation End-products
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
RLR	RIG-Like Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
SAP	Serum Amyloid Protein
SMC	Smooth Muscle Cells
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SP-A	Surfactant Protein A
SR	Scavenger Receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-Like Receptor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor

Avant-propos : le système immunitaire

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des éléments cellulaires et moléculaires assurant la défense de l'organisme. Ce rôle inclut la surveillance de l'organisme, la phase effectrice de la réponse immunitaire, et le maintien de l'homéostasie tissulaire. L'immunité se divise en deux composantes distinctes mais interdépendantes : l'immunité innée, qui est de mise en place rapide et non spécifique d'antigène, et l'immunité adaptative, de mise en place plus lente, qui est spécifique d'antigène et constitue le support de la mémoire immunitaire.

L'immunité innée a pour fonction principale la reconnaissance des dangers, à l'origine d'une réponse effectrice constituée d'une combinaison de mécanismes incluant l'élimination du danger, l'inflammation, le recrutement de cellules immunitaires, l'activation du complément et l'induction d'une réponse adaptative via la présentation d'antigènes. La notion de danger est un élément majeur dans la compréhension actuelle du système immunitaire. Plusieurs définitions du « danger » ont été proposées suite à l'évolution des connaissances en immunologie. Charles Janeway a d'abord proposé la notion de reconnaissance des pathogènes d'origine exogène (qu'il qualifie de non soi) comme activateurs du système immunitaire et des éléments endogènes de l'organisme (le soi) qui n'activent pas le système immunitaire (Janeway, 1989). Ce modèle permet d'expliquer l'activation du système immunitaire par les pathogènes alors que le soi n'est pas menacé. Polly Matzinger définit pour sa part un modèle « du danger » où la distinction entre l'activation de la réponse immunitaire ou l'établissement d'une tolérance est dépendante du type de mort cellulaire (apoptose ou nécrose), et non du caractère exogène ou endogène du danger (Matzinger, 1994). Le modèle repose sur l'existence de pathologies où le soi est reconnu comme inducteur d'une immunité, notamment en cas de mort cellulaire importante (maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques). Ruslan Medzhitov et Charles Janeway proposent alors un nouveau concept reposant sur la capacité du système immunitaire inné à distinguer le soi du non soi (microbes) et du soi modifié (motifs moléculaires endogènes). Les motifs moléculaires du non soi et du soi modifié sont reconnus par les mêmes familles de récepteurs (Medzhitov, 1997).

La première étape de l'activation du système immunitaire est donc la détection de ces motifs de danger. Les récepteurs responsables de cette reconnaissance se lient à des éléments constitutivement présents sur les microbes, appelés PAMP (pour Pathogen-Associated Molecular Pattern), ou exprimés par des éléments du soi modifié, appelés DAMP (pour Danger-Associated Molecular Pattern). Les motifs du soi modifié étant plus spécifiquement exprimés lors de la mort

cellulaire, ils sont également appelés ACAMP (pour Apoptotic Cell-Associated Molecular Pattern). Les molécules impliquées dans la détection des signaux de danger sont soit des récepteurs cellulaires, appelés PRR (Pattern Recognition Receptors), soit des molécules extracellulaires, appelées PRM (Pattern Recognition Molecules). Ces deux familles de protéines sont exprimées par de nombreux types de populations cellulaires, immunitaires ou non immunitaires, comme les cellules épithéliales. La liaison à leurs ligands va induire l'activation du système immunitaire inné puis la mise en place d'une réponse qui pourra être différente selon la nature du danger. En effet, alors que le non soi induit l'inflammation, le soi modifié peut conduire à un phénotype inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction de la nature et de l'intensité des signaux fournis.

Chacune des deux composantes de l'immunité dispose de multiples moyens pour répondre aux différentes situations rencontrées selon leur nature, amplitude, durée et localisation. Contrairement à ce que peut laisser penser la dichotomie suggérée par les appellations « innée » et « adaptative », l'immunité innée est également capable d'induire des réponses « adaptées » en fonction de la nature du danger détecté (Griebel, 2011 ; Tan, 2014). Les défenses immunitaires sont organisées en réponses cellulaires ou humorales, c'est-à-dire dépendantes de l'action de cellules effectrices ou de molécules solubles présentes dans les milieux extracellulaires. L'immunité cellulaire adaptative comprend les cellules lymphoïdes exprimant les récepteurs spécifiques des antigènes (lymphocytes B et T), alors que le pan humoral est constitué des anticorps produits par les plasmocytes. En ce qui concerne l'immunité innée, le bras humoral est représenté essentiellement par les facteurs du complément, les récepteurs solubles et les peptides antimicrobiens, tandis que le bras cellulaire est représenté par les cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes innées.

Les réponses immunitaires innées et adaptatives sont finement régulées en conditions normales (non pathologiques). Les cytokines sont des médiateurs solubles qui jouent des rôles essentiels dans ce processus puisqu'elles interviennent dans toutes les phases de la réponse immunitaire, à savoir son initiation, sa phase effectrice et sa résolution. Ces molécules contrôlent notamment la nature, l'amplitude et la durée des réponses immunitaires. Parmi ces cytokines se trouve l'interleukine-26, découverte il y a moins de vingt ans, et dont les propriétés biologiques sont encore mal connues. Ce travail s'est focalisé sur l'analyse des propriétés non-conventionnelles de l'IL-26, qui la rapprochent des récepteurs de l'immunité innée. Nous développerons dans cette introduction les mécanismes de l'immunité innée, et tout particulièrement ses récepteurs, pour s'intéresser ensuite plus spécifiquement à l'interleukine-26.

1 Introduction

1.1 L'immunité innée

Les cellules immunitaires innées détectent la présence de dangers endogènes ou exogènes à l'aide de senseurs, associés aux cellules ou solubles, de natures et de fonctions diverses (Tableau 1). Les récepteurs peuvent avoir une fonction de signalisation cellulaire ou d'endocytose, tandis que les molécules solubles jouent principalement un rôle d'opsonisation.

1.1.1 Les récepteurs cellulaires

Les récepteurs cellulaires de l'immunité innée peuvent être localisés dans trois compartiments subcellulaires distincts, en fonction de la nature de leurs ligands (Chow, 2015), à savoir la membrane plasmique, le cytoplasme et les endosomes.

Tableau 1. Les différentes familles de senseurs de l'immunité innée et les principaux membres.

Localisation	Famille	Membres décrits dans ce manuscrit
Membranaire	TLR membranaires	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6
	Récepteurs d'épuration	<i>voir Tableau 2</i>
	Récepteurs C-type lectin-like	MCL, Mincle, Dectin-2, DNGR-1, MICAL, CLEC1, CLEC2
Endosomale	TLR endosomaux	TLR3, TLR7, TLR8, TLR9
Cytoplasmique	Récepteurs de type NOD	NOD-1, NOD-2, NLRA, NLRB, NLRC3-5, NLRX1, NLRP1-14
	Récepteurs de type RIG	RIG-1, MDA5, LGP2
	Autres récepteurs	AIM2, IFI16, STING, cGAS, DNA-PK, DDX41, Rad50, DAI
Extracellulaire	Pentraxines	PTX3, CRP, SAP
	Collectines	C1q, MBL, SP-A, SP-D
	Ficolines	Ficolin-1, Ficolin-2, Ficolin-3
	Peptides antimicrobiens	LL37

1.1.1.1 Les récepteurs membranaires

Les récepteurs membranaires sont localisés à la membrane des cellules immunitaires (Medzhitov, 1997) et non immunitaires (Cario, 2000). Ils disposent d'un domaine extracellulaire impliqué dans la détection de leurs ligands, d'une région transmembranaire (pouvant prendre différentes formes : un ou plusieurs domaines transmembranaires, ancre GPI, ...), et, éventuellement, d'un domaine intracellulaire apte à induire une cascade de signalisation. Exprimés sur de nombreux types cellulaires, ces récepteurs ont d'abord été décrits chez les cellules de la lignée myéloïde, telles que

les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Les principales familles sont décrites ci-dessous.

1.1.1.1.1 TLR membranaires

Les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors ou TLR) constituent une famille de récepteurs transmembranaires de signalisation. Le récepteur Toll a été initialement identifié chez la drosophile (Nomura, 1994), puis le rôle immunitaire de ses paralogues chez les mammifères et leurs ligands ont été identifiés chez l'homme et la souris (Medzhitov, 1997). La liaison des ligands induit l'activation d'une protéine adaptatrice, MyD88 (Takeuchi, 2000), puis l'activation des voies IRAK/TRAF, MAPK, ou NF- κ B (Zhang, 1999), qui aboutiront à la synthèse de protéines pro-inflammatoires (telles que IL-6, IL-12, TNF α) ou antivirales (comme les interférons de type I).

Le premier TLR identifié comme récepteur de l'immunité innée fut la molécule TLR4. Des mutations présentes sur son gène chez des souris peu sensibles au lipopolysaccharide (LPS) ont suggéré que TLR4 était le récepteur au LPS, constituant majeur de la paroi des bactéries Gram négatif (Poltorak, 1998). La reconnaissance du LPS nécessite d'autres récepteurs en plus du TLR4 : la protéine MD-2 (myeloid differentiation protein 2 ; Shimazu, 1999) se lie à la partie extracellulaire de TLR4 et assure son adressage vers la membrane cellulaire, alors que la protéine soluble LBP (LPS-binding protein ; Su 2000) se lie au LPS, le complexe formé étant reconnu par CD14 (Wright, 1995). Ce complexe LPS-LBP s'associe à TLR4 pour initier une signalisation intracellulaire (Akashi, 2000). TLR4 détecte également d'autres ligands, tels que les mannanes sur les mycètes (Kawasaki, 2000) ou la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (Kurt-Jones, 2000). Il permet en outre de détecter certaines molécules endogènes comme les HSP (heat-shock proteins), libérées dans le milieu extracellulaire en cas de stress (choc thermique, infections virales ou bactériennes, ...) et capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Kol, 2000).

TLR2 reconnaît un très grand nombre de ligands, tels que les lipoprotéines des bactéries (Aliprantis, 1999), des protéines de parasites à ancrage GPI (Campos, 2001), ou le zymosan des mycètes. Ce TLR peut former des dimères avec TLR1 et TLR6 (ainsi qu'avec SR-B2 ; voir plus bas), ce qui permet d'élargir le spectre des ligands reconnus et de différencier les signaux de danger (Ozinsky, 2000). Le dimère TLR2/TLR1 reconnaît les lipopeptides triacylés, tandis que le dimère TLR2/TLR6 reconnaît les lipopeptides diacylés.

TLR5 agit comme un PRR activé par la flagelline, principal constituant du flagelle des bactéries motiles (Hayashi, 2001). Une protéine semblable à TLR5 a été identifiée dans le règne végétal, nommée FLS2, ce qui suggère que la détection de la flagelline constitue un signal d'alerte très conservé par les organismes multicellulaires (Baker, 1997).

1.1.1.1.2 Récepteurs d'épuration

Les récepteurs d'épuration, ou scavenger receptors (SR), constituent un groupe hétérogène de récepteurs membranaires qui peuvent se lier à des molécules endogènes modifiées, conférant aux cellules qui les expriment la capacité de « nettoyer » le milieu extracellulaire des débris et cellules mortes par endocytose ou phagocytose (Fogelman, 1981). Les SR peuvent aussi lier des motifs microbiens et entraîner leur endocytose ainsi qu'une signalisation intracellulaire (Krieger, 1997).

Ces récepteurs présentent des structures très différentes et leurs gènes partagent très peu de séquences conservées. La superfamille des SR est définie par la faculté à se lier aux LDL (Low Density Lipoproteins) modifiés, essentiellement oxydés (Goldstein, 1979). Les différentes classes seront présentées ici selon la plus récente nomenclature, basée sur des homologues structurales et établie par Prabhudas *et al.* en 2017 (Figure 1).

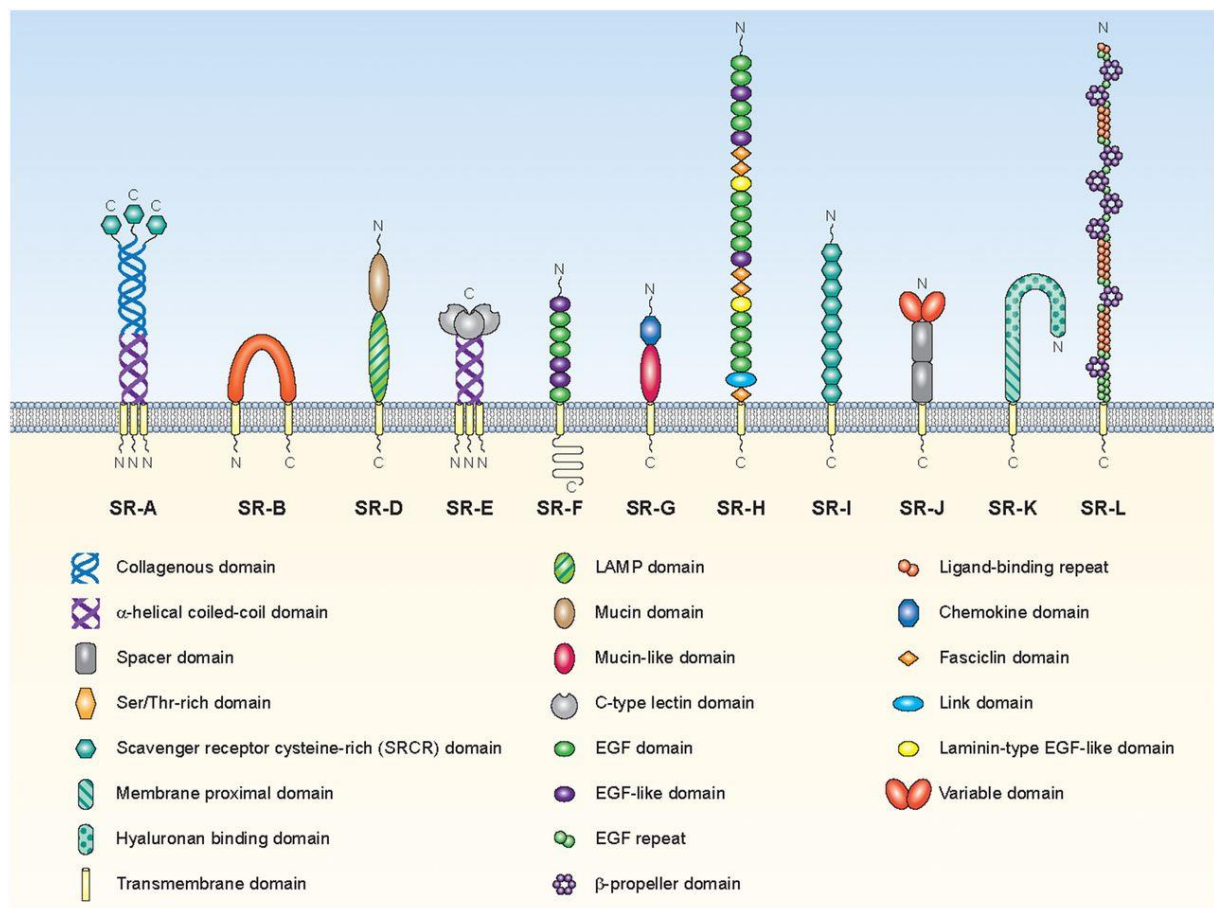


Figure 1. Structure des récepteurs d'épuration. Schéma des 12 familles de la nouvelle classification des récepteurs d'épuration avec leurs différents domaines protéiques. La classe C est omise car présente uniquement chez la drosophile. Issue de Prabhudas *et al.*, 2017.

Les membres de la classe A des récepteurs d'épuration (SR-A1, SR-A3, SR-A4, SR-A5, SR-A6) partagent une structure homotrimérique (Gowen, 2001). Leur expression est augmentée par le stress oxydatif (Mietus-Snyder, 1997). SR-A1 et SR-A3 sont impliqués dans l'endocytose d'une grande variété de PAMPs. SR-A4 joue un rôle dans l'immunité infectieuse, grâce à sa capacité de liaison aux glucides de microbes (bactéries et levures) qui conduit à leur phagocytose (Ohtani, 2001). SR-A5 agit comme un récepteur de la ferritine, impliqué dans le transport et le métabolisme cellulaire du fer (Li, 2009), et son homologue murin agit également comme récepteur de bactéries (Jiang, 2006). L'expression de SR-A6 par les macrophages leur permet de phagocyter les bactéries présentes dans les poumons et le sang (Van der Laan, 1999), et sert de porte d'entrée pour les adénovirus (Stichling, 2018).

La classe B dispose aussi de fonctions immunitaires. CD36 (désormais appelé SR-B2), agit comme co-récepteur du dimère TLR2/TLR6 (Stuart, 2005) et permet la reconnaissance de bactéries et d'hématies infectées par *Plasmodium falciparum*, ainsi que l'élimination des cellules mortes (Ren, 1995). SR-B1 et SR-B3 seraient impliqués dans la détection de particules virales (Yamayoshi, 2012). SR-B1 est également un récepteur aux HDL (High Density Lipoproteins ; Peng, 2004).

Les récepteurs d'épuration de classe C n'ont été décrits que chez la drosophile et ne possèdent pas d'homologue chez les mammifères. Il s'agit d'une classe de récepteurs aux LDL acétylés ayant aussi pour fonction la détection de motifs bactériens (Ramet, 2001).

La classe D n'est représentée que par le récepteur SR-D1, aussi appelé CD68 ou LAMP4. CD68 est un marqueur de l'engagement dans la lignée monocyte/macrophage (Holness, 1993). Outre son rôle de liaison aux LDL oxydés (Ramprasad, 1996), SR-D1 est capable de se lier au zymosan en fonction de son type de glycosylation (Da Silva, 1999). Son expression est corrélée avec la capacité des macrophages à éliminer les corps apoptotiques.

Les deux premiers membres de la classe E sont issus de la famille des récepteurs lectiniques de type C (ou CLEC), une famille de récepteurs présents sur les lymphocytes, principalement les cellules NK, et impliqués dans la reconnaissance de microbes. Toutefois, comme la plupart des CLEC ne se lient pas aux LDL modifiés, ils ne font pas partie de la famille des SR. Ces deux familles se superposant partiellement, les récepteurs CLEC disposant d'une activité d'épuration sont décrits dans ce paragraphe, tandis que les autres CLEC sont décrits dans la section suivante.

SR-E1 (LOX-1, ou CLEC8A) est impliqué dans l'élimination de LDL oxydés, de bactéries, de virus, ainsi que de cellules apoptotiques (Oka, 1998 ; Shimaoka, 2001). Ce récepteur est exprimé par des cellules immunitaires comme les macrophages et les plaquettes, et des cellules non immunitaires comme les cellules de l'endothélium vasculaire, les adipocytes, ou les cellules musculaires lisses. SR-E2 (dectin-1, CLEC7A) se lie à des β -glucanes présents sur les bactéries, champignons et cellules végétales, et

induit, d'une part, leur phagocytose et, d'autre part, en tant que partenaire du TLR2, l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Dillon, 2006).

Les deux autres SR de classe E sont SR-E3 (C206, mannose receptor 1) et SR-E4 (ASGPR1). SR-E3 est impliqué dans la détection des microbes (via leurs protéines mannosylées) et leur phagocytose ; il facilite la présentation des antigènes (Wollenberg, 2002). SR-E4, initialement identifié comme le récepteur des glycoprotéines dépourvues d'acide sialique en position terminale (Ashwell, 1981), est localisé à la membrane des hépatocytes et peut se lier à un spectre très large de ligands présentant des galactoses ou N-acétylgalactosamines terminaux, incluant la fibronectine, les anticorps, la phosphatase alcaline ainsi que les cellules apoptotiques (Dini, 1992). Une étude rapporte également une liaison aux lymphocytes T cytotoxiques (McVicker, 2013).

La classe F des SR est constituée de récepteurs portant des domaines EGF et de type EGF (EGF-like). Bien que SR-F1 (SCARF1) puisse se lier aux LDL oxydés, acétylés ou carbamylés, SR-F2 (anciennement SCARF2) n'a pas été classé comme SR dans la nouvelle classification, en dépit de ses fonctions de récepteur de l'immunité (Ramirez-Ortiz, 2013). Une autre protéine a obtenu le nom de SR-F2, MEGF10, en raison de sa capacité à lier la protéine amyloïde bêta ainsi que la protéine du complément C1q, ce qui la rend apte à faciliter l'élimination des cellules apoptotiques (Iram, 2016).

Une unique protéine constitue la classe G, ne partageant aucune similarité avec les autres récepteurs d'épuration. La forme membranaire de SR-G (anciennement SR-PSOX) reconnaît la phosphatidylsérine et les LDL oxydés, et permet également la détection et la phagocytose de bactéries par les cellules présentatrices d'antigènes (Shimaoka, 2003). Le clivage de SR-G génère une forme soluble possédant une activité chimiotactique. Cette molécule, CXCL16, est impliquée dans la migration des lymphocytes T et des plasmocytes sur les sites inflammatoires.

La classe H comprend les protéines stabilin-1 et stabilin-2, aussi appelées FEEL-1 et FEEL-2, caractérisées par de très grands domaines extracellulaires. SR-H1 est exprimée par les macrophages et les cellules endothéliales, tandis que l'expression de SR-H2 est restreinte aux cellules endothéliales. À leur rôle de récepteurs des LDL acétylés s'ajoutent ceux d'élimination des cellules apoptotiques, des hématies âgées (Park, 2008), de reconnaissance de bactéries (Adachi, 2002) et de recrutement de lymphocytes T régulateurs (Shetty, 2011).

La classe I des SR correspond à la famille du CD163 et de ses variants. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules de la lignée monocyte/macrophage, et constituent des marqueurs de la polarisation vers un phénotype immuno-régulateur. Le récepteur SR-I1 (CD163, ou M130) est impliqué dans l'endocytose et la dégradation dans les lysosomes de l'hémoglobine (ou complexes hémoglobine-haptoglobine) présente dans le plasma en cas d'hémolyse (Kristiansen, 2001). Le récepteur SR-I1 est

également capable de reconnaître les bactéries Gram positif et Gram négatif (Fabriek, 2009). Des études sont en cours pour identifier les ligands des autres récepteurs de cette famille (M160/CD163B/SR-I2 et SCART-1/CD163c- α /SR-I3).

Le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycosylation End-products) est le seul membre de la classe J. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs à domaine de type immunoglobuline. SR-J1.1 reconnaît de nombreux ligands, tels que la protéine S100, l'amyloïde bêta, la phosphatidylsérine et HMGB1. L'activation de RAGE induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que sa propre expression, ce qui enclenche un rétrocontrôle positif (Li, 1997). Une version soluble de RAGE, nommée SR-J1.2, agirait comme inhibiteur de l'endocytose des LDL par SR-B2 (Marsche, 2007).

La Classe K est composée de l'unique protéine SR-K1, aussi connue sous le nom de CD44. D'abord identifiée comme le récepteur de l'acide hyaluronique, elle permet son endocytose et sa dégradation. Elle est également responsable de la dégradation du collagène de type XIV, de la fibronectine et de la laminine (Turley, 1984). SR-K1 supprime l'activation des cellules immunitaires par les TLR, agissant comme un régulateur de l'inflammation (Kawana, 2008). L'activité de ce récepteur est aussi détournée par les staphylocoques de groupe A : suite à leur liaison au CD44, les réarrangements cytosquelettiques qui s'ensuivent facilitent l'invasion des tissus par la bactérie (Cywes, 2001).

Les SR de classe L sont SR-L1 (aussi appelé LRP1, AM2R, APOER ou CD91) et SR-L2 (LRP2 ou mégaline). Ces protéines sont très conservées chez tous les métazoaires et LRP1 est de taille très importante (deux sous-unités de 515 et 85 kDa). SR-L1 peut lier des dizaines de ligands, et possède un double rôle d'endocytose, d'une part, pour « nettoyer » le milieu extracellulaire et de signalisation, d'autre part, pour « renseigner » la cellule sur son environnement. La liaison à différents ligands induit différentes signalisations intracellulaires, et renseigne ainsi la cellule sur l'état de la matrice extracellulaire, l'activité des protéases, ou la disponibilité en nutriments (Dieckmann, 2010). Parmi ses principales fonctions se retrouvent le métabolisme énergétique (principalement le transport et le métabolisme des lipides et lipoprotéines), la régulation de l'inflammation, la migration cellulaire, et l'entrée de différents virus, bactéries, ou la détection des toxines. Ses fonctions extracellulaires incluent, entre autres, l'homéostasie de la synapse neuronale et la transmission synaptique, l'élimination de l'amyloïde beta, la coagulation sanguine, l'angiogenèse, et l'assemblage du collagène.

Table 2. Nomenclature révisée des récepteurs d'épuration (adapté de Prabhudas, 2017).

Nouvelle nomenclature	Anciens noms du récepteur
SR-A1	MSR1, SCARA1, CD204
SR-A1.1	Splice form of SR-A1
SR-A3	SCARA3
SR-A4	COLEC12, SCARA4, SRCL
SR-A5	SCARA5, TESR, NET33
SR-A6	MARCO, SCARA2
SR-B1	SCARB1, CD36L1
SR-B1.1	SCARB2, LIMP2, CD36L2, LGP85
SR-B2	CD36, SCARB3, FAT, GPIV, PAS4
SR-D1	CD68, gp110, SCARD1, LAMP4
SR-E1	OLR1, LOX-1, , SCARE1, CLEC8A
SR-E2	Dectin 1, CLEC7A
SR-E3	CD206, mannose receptor 1
SR-E4	ASGPR1, CLEC4H1, HL-1
SR-F1	SREC-I, SCARF1
SR-F2	MEGF10, EMARDD
SR-G	CXCL16, SR-PSOX
SR-H1	STAB1, FEEL-1
SR-H2	STAB2, FEEL-2
SR-I1	CD163, M130
SR-I2	CD163L1, M160, CD163B
SR-I3	SCART-1, CD136c- α
SR-J1	RAGE
SR-J1.1	Soluble splice form of RAGE
SR-K1	CD44, Ly24, Pgp-1, HERMES
SR-L1	LRP1, CD91, A2MR
SR-L2	LRP2, Megalin, gp330

1.1.1.1.3 Récepteurs de type lectinique (C-type lectin-like)

Les protéines portant un domaine C-type lectin-like (CTLD) constituent un large groupe aux fonctions variées, notamment immunitaires. Le domaine CTLD permet la reconnaissance de glucides, dépendamment d'un ion Ca^{2+} (Drickamer, 1988 x2). La plupart des protéines à motif CTLD induisent l'endocytose de leurs ligands et l'activation de la voie NF- κ B (Loeb, 1987), mais certaines ont un rôle inhibiteur de la réponse immunitaire. Ces récepteurs sont regroupés en deux clusters sur le chromosome 12 chez l'Homme (Renedo, 1997). Le cluster Dectin-2 contient les gènes codant pour MCL, mincle et Dectin-2, tandis que le cluster Dectin-1 contient les gènes codant pour CLEC9A (DNDR-1), CLEC12A (M1CL), CLEC1, CLEC2, et Dectin-1 (CLEC7A, décrit ici comme SR-E2).

Dectin-2 reconnaît les mannoses et mannanes des mycobactéries et mycètes (Hardison, 2012), et active la phagocytose, la production de ROS (Reactive oxygen species ; Ifrim, 2014), et de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Gringhuis, 2011). Mincle se lie aux mannoses et tréhaloses des mycobactéries et mycètes (Wells, 2008), ainsi qu'à la protéine SAP30, normalement nucléaire mais retrouvée en surface des cellules nécrotiques. Le motif CTLD de MCL reconnaît des glycolipides, notamment présents sur des mycobactéries (Ishikawa, 2009), et se lie au récepteur gamma du fragment constant des immunoglobulines (Fc γ R).

Dectin-1, décrit plus haut en tant que SR-E2, est un PRR capable d'identifier différents micro-organismes et de se lier à TLR2. DNGR-1, aussi appelé CLEC9A, se lie à l'actine exposée à la surface des cellules apoptotiques ou nécrotiques (Zhang, 2012). CLEC9A est exprimé sélectivement par les cellules dendritiques (Huysamen, 2008), et induit la présentation croisée des antigènes des cellules nécrotiques aux lymphocytes T cytotoxiques (Zelenay, 2012). Les autres membres du cluster Dectin-1 sont moins bien décrits : CLEC-2 est la cible de la rhodocytine, présente dans un venin de serpent (Suzuki-Inoue, 2006), qui induit une agrégation plaquettaire conduisant à une thrombose mortelle. Les ligands de CLEC-1 et CLEC-12A (MICL) restent à découvrir, mais ces récepteurs pourraient avoir un rôle inhibiteur (Marshall, 2004) car l'ARNm codant pour CLEC-1 est induit par l'IL-10. Une étude indique que des souris déficientes pour CLEC-12A développent des encéphalomyélites auto-immunes (Sagar, 2017).

D'autres membres de la famille CLEC sont situés hors de ces deux clusters. Sur le chromosome 19 se trouve CLEC4L, plus connu sous le nom de DC-SIGN ou CD209, et sur le chromosome 2 CLEC4K (langerine ou CD207). DC-SIGN reconnaît des virus (Alvarez, 2002), parasites et bactéries, et induit leur phagocytose ainsi qu'une signalisation intracellulaire immunorégulatrice aboutissant à la production d'IL-10 (Geijtenbeek, 2003). Langerin se lie aux protéines fortement mannosylées (Stambach, 2003), notamment des virus, et provoque leur endocytose et adressage aux granules de Birbeck des cellules de Langerhans où ils sont dégradés (Valladeau, 2000).

1.1.1.2 Les récepteurs endosomaux

Les récepteurs endosomaux sont responsables de la détection des acides nucléiques microbiens et font partie de la famille des TLR (Nishiya, 2004). TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 entrent en contact avec leurs ligands internalisés par endocytose, phagocytose, ou fusion de vésicules d'autophagie. Les différents senseurs des acides nucléiques sont résumés dans la figure 2.

TLR3 a comme ligands les ARN double brin des virus (Alexopoulou, 2001). Il reconnaît des séquences double brin de plus de 40 paires de bases, ainsi que le ligand synthétique poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid). Ces ARN double brins peuvent être le génome de certains virus (virus à ARN

bicaténaire, tels que les *reoviridae* ou les *cystoviridae*), ou des intermédiaires de réplication (virus à ARN monocaténaire, de polarité positive comme le virus de l'hépatite C (HCV, Hepatitis C virus) de la famille *flaviviridae*, ou de polarité négative comme le virus Influenza). Contrairement aux autres TLR, il shunte MyD88 et active la voie NF- κ B via TRIF, ce qui conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, et à l'activation de IRF (Interferon Regulatory Factor) 3 via PI3K, ce qui résulte en la production des interférons de type I (IFN α et IFN β), principales cytokines antivirales (Doyle, 2002). TLR3 est exprimé par de très nombreux types cellulaires, immunitaires et non immunitaires.

TLR7 et TLR8 sont des molécules très similaires qui reconnaissent les ARN simple brin, ainsi que les ligands synthétiques imiquimod et resiquimod, voire certains siRNA et miRNA. Ils permettent la détection d'ARN viral simple brin (tel que HIV) dans les phagosomes des macrophages et cellules dendritiques (Heil, 2004). Les virus à ARN simple brin (tels que le virus respiratoire syncytial ou le virus de l'encéphalomyocardite) passent par un intermédiaire double brin durant leur réplication, qui peut être détecté par TLR3. Cette redondance entre la détection des virus par TLR3 et TLR7/8 permet de maintenir une réponse antivirale si l'une des deux voies est inhibée par le virus. Par ailleurs, des récepteurs à l'ARN viral localisés dans le cytoplasme (décrits dans le paragraphe 1.2.1.3.2) ajoutent un autre niveau de redondance dans la détection des infections virales. TLR7 et TLR8 activent Myd88, IRAK1, TRAF6 et, finalement, le facteur de transcription IRF7 impliqué dans la production des interférons de type I. Ces TLR ont une distribution mutuellement exclusive : TLR7 est exprimé par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, tandis que TLR8 est exprimé par les cellules dendritiques de la lignée myéloïde ainsi que par les monocytes et les macrophages (Jarrossay, 2001).

TLR9 permet de détecter les séquences d'ADN riches en dinucléotides CpG non méthylés (Hemmi, 2000). Ces séquences se retrouvent dans le génome des bactéries et des virus mais sont rares chez les mammifères et souvent méthylées (Jabbari, 2004). Exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les lymphocytes B, TLR9 lié à son ligand va migrer du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et les endosomes, pour induire une réponse de type inflammatoire et antivirale. TLR9 est également impliqué dans les maladies auto-immunes lorsqu'une reconnaissance de l'ADN du soi se produit (Leadbetter, 2002). La localisation nucléaire de l'ADN et la séquestration du TLR9 dans les endosomes sont des éléments cruciaux pour éviter une reconnaissance accidentelle de l'ADN du soi. Plus précisément, dans des conditions physiologiques, TLR9 n'entre pas en contact avec l'ADN séquestré dans le noyau ou parfois exposé dans le milieu extracellulaire en cas d'apoptose. En revanche, des agents de transfection permettant à l'ADN d'entrer dans la cellule peuvent conduire à une activation via TLR9.

1.1.1.3 Les récepteurs cytoplasmiques

Les TLR ont été les premiers senseurs aux PAMP décrits. Toutefois, des souris déficientes en TLR restent souvent capables d'induire des réponses immunitaires protectrices, suggérant l'existence d'autres catégories de détecteurs. Différentes nouvelles familles de PRR, localisés dans le cytoplasme, ont alors été découvertes ; ces molécules fixent de nombreux ligands du soi et du non soi.

1.1.1.3.1 Famille NLR (NOD-like receptors)

Premiers identifiés, NOD1 et NOD2 ont donné leur nom à une famille de 22 PRR appelés NOD-like receptors (NLR). Cette famille a été constituée en raison de la localisation intracellulaire de tous ses membres et de la présence d'une séquence conservée (Ting, 2008). Cette séquence porte le nom de NACHT, d'après quatre de ses premiers membres identifiés (NAIP, CIITA, HET-E et TEP-1). Ces récepteurs ont un large spectre de ligands, allant des PAMPs et DAMPs jusqu'aux minéraux tels que le silicium et l'aluminium (Dostert, 2008). La liaison d'un NLR à son ligand a pour conséquence la formation de l'inflammasome et la production d'IL-1 β (Agostini, 2004), l'induction de l'autophagie ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II) (Travassos, 2010 ; Biswas, 2012).

Les membres fondateurs de cette famille, NOD1 et NOD2, classés dans la sous-catégorie NLRC, reconnaissent respectivement les peptidoglycanes DAP (L-Ala-D-Glu-meso-diaminopimelic acid) des bactéries Gram négatif et MDP (muramyl-dipeptide) des bactéries Gram positif (Girardin, 2003a et 2003b). NOD1 et NOD2 sont impliqués dans la reconnaissance de bactéries intracytoplasmiques. L'activation de ces PRR induit l'inflammation via l'activation de NF- κ B et des MAPK.

Les autres membres de la sous-catégorie NLRC sont NLRC3, inhibiteur de l'activation de TLR, NLRC4, PRR pour la flagelline, NLRC5, inducteur de l'expression du CMH-I, et NLRX1, présent dans la mitochondrie et responsable de la production de ROS. Le seul membre du sous-groupe NLRA est CIITA, régulateur de l'expression du CMH-II, et le seul membre du sous-groupe NLRB est NAIP, également PRR de la flagelline et inhibant l'apoptose (Kim, 2016).

La sous-famille NLRP contient 14 membres, impliqués dans la formation de l'inflammasome. NLRP1, premier membre identifié, reconnaît le peptidoglycane MDP et la toxine de l'anthrax. L'interaction de NLRP1 avec ses ligands déclenche la formation de l'inflammasome et active la caspase-1, responsable de la maturation du précurseur de l'IL-1 β (Faustin, 2007). Pour sa part, NLRP3 reconnaît un spectre large de ligands, tels que les ARN viraux présents dans le cytoplasme, des toxines bactériennes, des mycètes, des protozoaires ou des composés minéraux comme l'aluminium ou l'amiante (Davis, 2011). De plus, NLRP3 induit la pyroptose, une mort cellulaire inflammatoire

caractérisée par la libération de cytokines et du contenu intracellulaire. D'autres membres de la sous-famille NLRP sont impliqués entre autres dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B ou dans l'embryogenèse (Murdoch, 2006).

1.1.1.3.2 Famille RLR (RIG-like receptors)

Après l'identification des TLR et la découverte de NOD1 et NOD2, une molécule anciennement connue sous le nom de RIG-I (Retinoic acid-inducible gene 1), dont la fonction était inconnue, fut caractérisée comme senseur cytoplasmique des virus (Yoneyama, 2004). RIG-I possède un domaine hélicase hélicase, ainsi qu'une fonction de signalisation via les molécules MAVS (aussi appelée IPS1 ou CARDIF) et IRF3, aboutissant à la production des interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires. Deux autres protéines contenant le domaine hélicase DEAD spécifique de l'ARN ont été rapportées comme induisant cette voie de signalisation : MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5 ; Kang, 2002) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2 ; Yoneyama, 2005).

RIG-I se fixe à de courts fragments d'ARN viral double brin, principalement aux extrémités 5' triphosphorylées (5'ppp ; Hornung, 2006). Ces structures se retrouvent dans les ARN viraux tandis que l'ARN du soi est masqué ou modifié à son extrémité 5' (par exemple par l'ajout d'une coiffe, une modification co-transcriptionnelle aussi impliquée dans l'adressage de l'ARN, sa protection contre les nucléases et l'initiation de la traduction). La synthèse par la RNA polymérase III du brin complémentaire d'un ARN viral monocaténaire peut également produire une extrémité 5'ppp détectable par RIG-I (Ablasser, 2009). Pour sa part, MDA5 reconnaît des fragments d'ARN viral double brin, mais de taille beaucoup plus importante que RIG-I (Kato, 2008), tandis que LGP2 reconnaît les extrémités double brin à bords francs (extrémités sans aucun nucléotide non apparié) des ARN viraux (Li, 2009). MDA5 induit la même signalisation inflammatoire et antivirale que RIG-I, tandis que LGP2 a une activité inhibitrice de l'activation de RIG-I et MDA5 (Yoneyama, 2005).

Les virus disposent de mécanismes pour éviter leur détection par les récepteurs de leurs hôtes. À titre d'exemple, la protéine non structurale 1 (NS1) du virus de la grippe A (IAV), inhibe l'activation de RIG-I (Guo, 2007). Le virus HCV peut également l'inhiber grâce à la protéase NS3/4A (Breiman, 2005).

1.1.1.3.3 Autres récepteurs cytoplasmiques

En plus des familles NLR (détectant les peptidoglycanes) et RLR (détectant les ARN), d'autres senseurs de l'immunité innée existent afin de permettre à la cellule de détecter l'ADN anormalement présent dans le cytoplasme, lors d'infection par des virus à ADN ou des rétrovirus, de bactéries cytoplasmiques, ou de libération accidentelle de l'ADN nucléaire ou mitochondrial.

AIM2 est une protéine ayant donné son nom à une famille de senseurs à l'ADN. Cette famille (nommée ALR, AIM2-like receptors) se compose de protéines ayant un domaine HIN (hematopoietic

expression, interferon-inducible nature, and nuclear localization) et un domaine PYR (Pyrin), servant, respectivement, à la liaison à l'ADN (Shaw, 2014) et au recrutement de ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing C-terminal caspase recruitment domain [CARD] ; Martinon, 2001). Le recrutement de l'adaptateur protéique ASC induit la formation de l'inflammasome (Fernandes-Alnemri, 2009). AIM2 détecte la présence d'ADN double brin. IFI16, un autre membre de la famille ALR, signale la présence d'ADN simple ou double brin (Unterholzner, 2010).

STING est, d'une part, une protéine au rôle central dans la détection de l'ADN cytoplasmique par sa capacité à lier directement à l'ADN (Abe, 2013) et peut, d'autre part, agir comme adaptateur entre des senseurs à ADN et l'induction des messagers secondaires IRF3 (aboutissant à la production d'interféron) et NF- κ B (responsable de l'inflammation ; Ishikawa, 2009). Aussi appelée MITA, ERIS ou MPYS, STING est conservé chez les vertébrés et invertébrés. Il s'agit d'une protéine transmembranaire localisée sur le réticulum endoplasmique (Ishikawa, 2008), codée par le gène TMEM173. STING est activé par la présence de dinucléotides cycliques, tels que cGAMP (cyclic GMP-AMP ; Wu, 2013) produits par cGAS (cyclic GAMP synthase), par exemple lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Watson, 2015). La synthèse de cGAMP par une cellule infectée permet également aux cellules avoisinantes d'initier une réponse antivirale préventive par activation de STING grâce à un transfert des dinucléotides cycliques à travers les jonctions communicantes (GAP junctions ; Ablasser, 2013).

D'autres activateurs connus de STING sont les protéines DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) et DDX41 (DEAD-Box Helicase 41). DNA-PK est impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN, mais agit comme un PRR dans le cytoplasme (Ferguson, 2012). Tout comme les autres activateurs de STING, DNA-PK induit la transcription de médiateurs pro-inflammatoires et antiviraux suite à la détection d'ADN. DDX41 est une hélicase à domaine DExD/H, tout comme RIG-1, mais induit une réponse immunitaire inflammatoire suite à sa liaison à l'ADN (Zhang, 2013). Par ailleurs, DDX41 peut activer STING en réponse à la production de cGAMP (Parvatiyar, 2012).

La protéine Rad50 est impliquée dans la réparation de l'ADN dans le noyau ainsi que dans l'induction d'une réponse inflammatoire lorsque l'ADN est détecté dans le cytoplasme (Roth, 2014). Formant avec les protéines MRE11 et NBS1 un complexe appelé MRN (Lee, 2004), Rad50 se lie à l'ADN et induit, via la protéine adaptatrice CARD9, l'activation de NF- κ B et la production d'IL-1 β .

Les différents senseurs à l'ADN partagent une régulation commune. Toutefois, les implications ne sont pas encore pleinement comprises : par exemple, IFI16, activant l'inflammasome, régule négativement l'activation de STING (Corrales, 2016). La protéine DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, aussi appelée ZBP1 ou DLM-1) est un senseur de l'ADN (Takaoka, 2007) et

induit une réponse inflammatoire et antivirale via l'activation de TBK1 et IRF3, ainsi que par RIPK3 et MAVS, même si ces voies semblent avoir une action inhibitrice l'une envers l'autre (Downey, 2017).

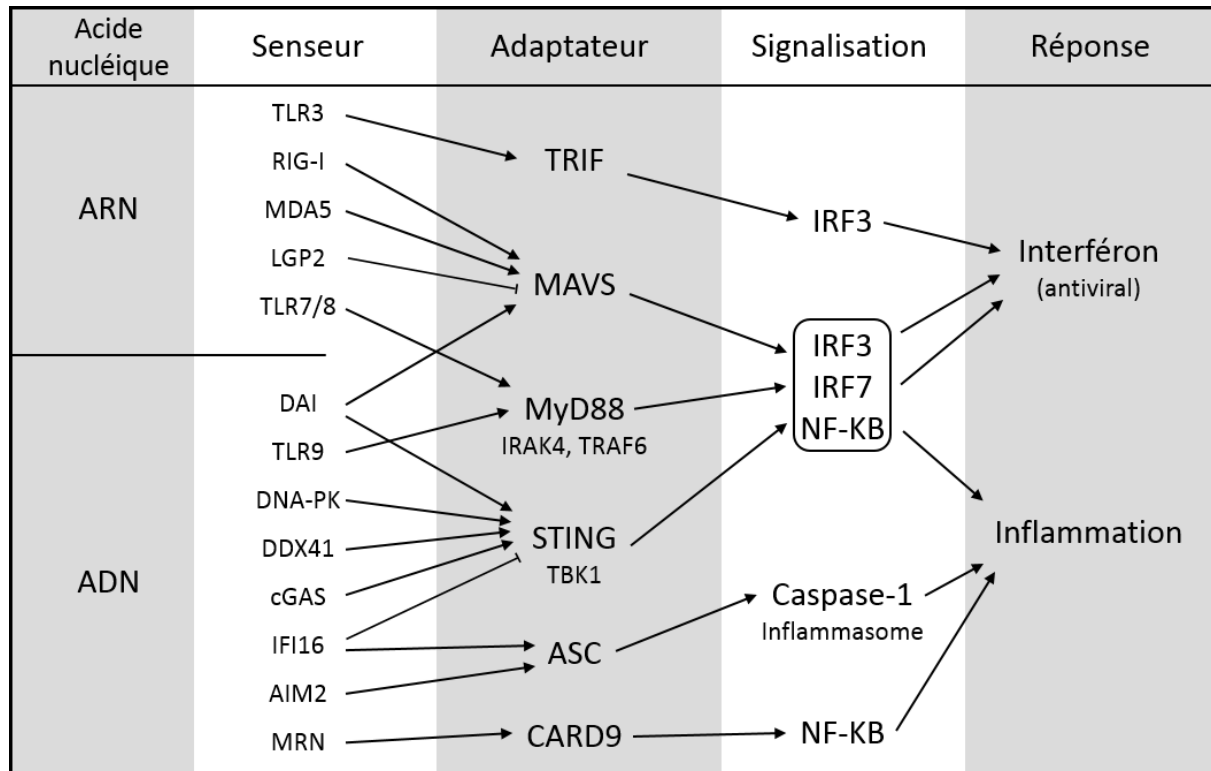


Figure 2. Détection des acides nucléiques chez l'humain. Senseurs, seconds messagers, facteurs de transcription et type de réponse immunitaire en présence d'ADN ou ARN.

1.1.2 Les récepteurs extracellulaires de l'immunité innée

Les récepteurs solubles de l'immunité innée présentent une activité similaire aux PRR membranaires puisqu'ils reconnaissent les signaux de danger. Ils se fixent sur différents motifs endogènes comme exogènes et les neutralisent, induisent leur agrégation, et facilitent leur phagocytose. Cette activité justifie le terme d'opsonine qui leur est parfois attribué.

Les différentes sous-familles de PRM solubles sont 1) les collectines, disposant de plusieurs sites de liaison aux glucides (CRD, carbohydrate-recognition domain) de type lectin (lectin-like) réunis par la présence de domaines collagen-like, 2) les pentraxines, d'organisation cyclique et partageant la séquence consensus éponyme, et 3) les ficolines, structurellement similaires aux collectines mais dont le CRD est semblable au fibrinogène et non aux lectines (Bottazzi, 2010).

1.1.2.1 Collectines

Comme évoqué plus haut, les collectines, groupe constitué chez l'humain par C1q, MBL, SP-A, SP-D, CL-P1, CL-K1 et CL-L1, partagent une organisation commune (figure 3). À l'exception de SP-D, qui s'organise en forme d'étoile (Crouch, 1994), les collectines disposent de plusieurs « têtes » capables de lier leurs ligands, et qui sont liées ensemble par une « tige » constituée de domaines collagène, donnant une structure ressemblant à un « bouquet de tulipes » (Holmskov, 1994). Les multiples sites de liaison permettent d'agglutiner les cibles, facilitant leur phagocytose (Benne, 1995). Les domaines CRD responsables de la liaison aux ligands sont de type lectiniques, excepté pour C1q, qui a toutefois été inclus dans cette famille en raison d'une grande homologie de structure et de fonction. Les collectines induisent l'activation du complément par la voie des lectines, tandis que C1q est capable de reconnaître directement des ligands tout en étant le point de jonction entre la voie classique (par les anticorps et pentraxines) et la voie des lectines (par les collectines et ficolines). Trois collectines supplémentaires ne se retrouvent que chez les bovins, à savoir conglutinin, CL-43 et CL-46 (Hansen, 2003).

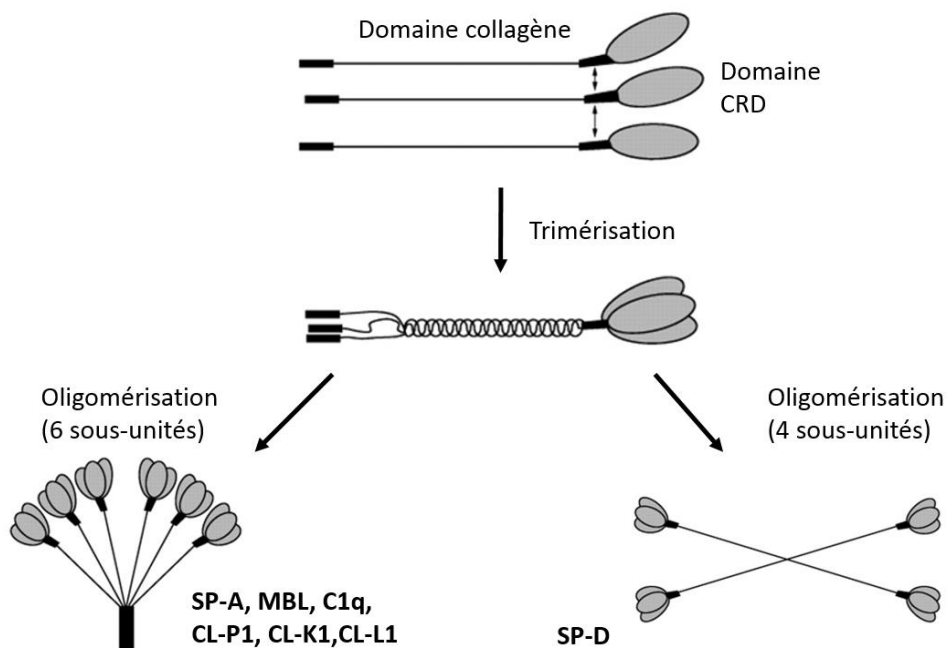


Figure 3. Schéma d'association des sous-unités constituant les collectines. Les monomères s'associent par leur domaine collagène, puis ces trimères prennent leur forme mature (en « bouquet de tulipes » ou en étoile) par liaison covalente. (Adapté de Clark, 2003)

MBL est principalement produite par le foie, et sa concentration plasmatique, normalement basse, augmente lors du processus inflammatoire. SP-A et SP-D sont retrouvées dans de nombreux organes, mais sont majoritairement présentes dans les poumons.

MBL et les protéines surfactantes (SP-x) partagent de nombreux rôles anti-infectieux. Elles peuvent se lier aux molécules fortement glycosylées des mycètes, bactéries ou enveloppes virales (Leth-Larsen, 2007). Ces molécules sont également capables de faciliter la phagocytose de cellules apoptotiques (Ogden, 2001).

Plus récemment identifiées et moins étudiées, les collectines CL-L1, CL-P1 et CL-K1 (Ohtani, 2001) ont fait l'objet d'une revue récente (Hansen, 2016). Ces collectines disposent des fonctions communes à leur famille, à savoir une liaison aux glucides des microbes et l'activation de la voie des lectines du complément.

La molécule C1q, principalement produite par les macrophages et cellules dendritiques immatures (Loos, 1989) ainsi que par les mastocytes (van Schaarenburg, 2016), est la première molécule impliquée dans l'activation du complément par les voies classique et des lectines (la voie alterne étant activée par C3b). Néanmoins, C1q est également capable de se lier directement à ses ligands. Plusieurs récepteurs membranaires à C1q ont été décrits (CR1, CRT, C1q-Rp (CD93) et C1q-R), et certaines collectines peuvent partager une fixation sur certains d'entre eux (par exemple, CRT les lie toutes). C1q occupe également un rôle central dans l'élimination immunitairement « silencieuse » des cellules apoptotiques (Nauta, 2003). En effet, la déficience en C1q est associée à la production d'anticorps anti-nucléaires et le développement de signes d'auto-immunité (Botto, 1998).

1.1.2.2 Pentraxines (PTX3, CRP, SAP)

Les pentraxines constituent une famille très conservée au cours de l'évolution, chez les invertébrés comme chez les vertébrés. Elle se divise en deux sous-groupes, les pentraxines courtes, représentées par les protéines de la phase aigüe de l'inflammation CRP (C reactive protein) et SAP (serum amyloid protein), et les pentraxines longues, dont le prototype est PTX3 (Daigo, 2016). Les pentraxines courtes sont composées de cinq sous-unités de 115 kDa organisées en forme cyclique, tandis que les pentraxines longues forment un octamère (Bottazzi 1997, Inforzato 2008). CRP et PTX3 sont utilisés comme biomarqueurs d'un état inflammatoire, car leurs concentrations peuvent varier d'un facteur mille (Shine, 1981), tandis que la concentration sérique de SAP reste constante (environ 30 à 50 µg/mL ; Bijl, 2004). PTX3 est produite de façon quasi-ubiquitaire dans l'organisme, en réponse à des cytokines pro-inflammatoires mais également anti-inflammatoires (Garlanda, 2005 ; Jaillon, 2007), ainsi qu'à des composants microbiens.

Les pentraxines longues et courtes ont des propriétés similaires. CRP et SAP se lient aux bactéries (Szalai, 2000) et aux virus (Andersen, 1997), ainsi qu'aux cellules apoptotiques tardives et interagissent avec C1q pour induire l'activation de la voie classique du complément (Roumenina, 2006). PTX3 se lie également aux bactéries (Jaillon, 2013 ; Jeannin, 2005), virus (Reading, 2008), mycètes (Garlanda, 2002) et cellules apoptotiques (Jaillon, 2009) tout en facilitant leur phagocytose par les macrophages (Diniz, 2004). PTX3 active également le complément (Nauta, 2003).

1.1.2.3 Ficolines

Les ficolines partagent un rôle d'agrégation et d'aide à la phagocytose avec les collectines, ainsi que d'activation de la voie des lectines du complément (Ichijo, 1993). Elles peuvent également se fixer au récepteur C1qRp. Le domaine CRD de type fibrinogène-like leur permet de reconnaître les protéines bactériennes N-glycosylées (et non mannosylées comme le font les collectines ; Aoyagi, 2008). Les ficolines disposent également d'une fonction homéostatique en contribuant à l'élimination des cellules apoptotiques (Honore, 2008).

Les trois ficolines décrites chez l'Homme, L-ficoline, H-ficoline et M-ficoline, sont exprimées par des tissus différents. La protéine M-ficoline est retrouvée dans les monocytes, et son ARNm est détectable également dans les neutrophiles et macrophages (Frankenberger, 2008), tandis que L-ficoline et H-ficoline sont produites dans le foie et les poumons.

1.1.3 Les récepteurs non conventionnels

Les peptides antimicrobiens sont des éléments de système immunitaire impliqués dans la détection et l'élimination de nombreux microbes. Ils peuvent ainsi interférer avec leur cycle de vie ou contribuer à l'interaction entre les récepteurs de l'immunité innée et leurs ligands.

1.1.3.1 Description

Les peptides antimicrobiens (AMP, anti-microbial peptides) sont de petites protéines ou des fragments de protéines ayant la capacité de détruire directement les microbes. Ils possèdent également une activité immunomodulatrice. Il existe des protéines de plus grande taille disposant de caractéristiques antimicrobiennes : ces protéines peuvent avoir un effet microbicide direct ou inhiber la croissance de microbes par d'autres moyens, par exemple séquestrer le fer nécessaire au développement des bactéries, comme la lactoferrine (Ward, 2004). La lactoferrine peut être clivée par des protéases et servir de précurseur à trois fragments de plus petite taille, qui sont des peptides antimicrobiens. La plupart des AMP ont une répartition de charges très caractéristique qui leur permet de perturber les membranes lipidiques. D'autres protéines de grande taille peuvent agir ainsi, comme le lysozyme (Fleming, 1922 ; Wilson, 1968), la psoriasine (Gläser, 2005) ou l'ECP (Eosinophil

cationic protein ; Hamann, 1990), mais l'appellation AMP est réservée, par convention, à des molécules de moins de 50 acides aminés.

L'étude moderne des AMP commence approximativement il y a trois décennies, avec la découverte des défensines (Selsted, 1985) et les liens qui sont faits entre leur nature et leur fonction. Les années suivantes verront un nombre important de découvertes de nouveaux AMP, ainsi qu'un élargissement conséquent du spectre de leurs ligands. Des milliers d'AMP ont été décrits depuis, et sont répertoriés dans la banque de données APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Ils proviennent de tous les règnes du vivant et sont très conservés, comme en témoigne l'utilisation par un protozoaire d'un AMP aux propriétés semblables au lysozyme pour tuer des bactéries (Jacobs, 1995). Les AMP les mieux décrits sont classés en familles, telles que les défensines (Selsted, 1995). Ici, nous nous intéresserons principalement à des généralités sur les peptides antimicrobiens et au peptide LL37, qui possède une structure et des propriétés similaires à certaines hélices de l'interleukine-26.

Ce peptide a été découvert aux alentours de 1995 par plusieurs équipes. En se reposant sur les séquences conservées des cathélicidines retrouvées chez différents mammifères, le gène *CAP18* fut cloné (Larrick, 1995) alors qu'une autre équipe prédisait, d'après les mêmes homologies, le peptide antimicrobien FALL-39, nommé du fait que sa séquence de 39 acides aminés commence par la séquence Phénylalanine-Alanine-Leucine-Leucine (Agerberth, 1995). Parallèlement, hCAP-18 (la protéine codée par le gène *CPA18*, précurseur du peptide LL37) fut isolé comme une molécule de 19 kDa produite par les neutrophiles (Cowland, 1995). Le peptide actif sera isolé l'année suivante dans une étude qui confirmera son activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, ainsi que sa production par les granulocytes (Gudmundsson, 1996). Des fragments de LL37 aux séquences encore plus courtes ont également été démontrés comme ayant une activité antimicrobienne (Wang, 2014).

1.1.3.2 Expression

Les peptides antimicrobiens sont présents dans un très large spectre de tissus. Ils sont principalement exprimés chez les mammifères au niveau de la peau et des poumons, là où l'organisme procède à des échanges avec le milieu extérieur, afin de défendre ces portes d'entrée contre les pathogènes (Cole, 2001 ; Li, 2001). La dermicine, notamment présente dans la sueur, est constitutivement sécrétée (Rieg, 2004), alors que l'expression de LEAP-1, aussi appelée hepcidine, est induite par l'inflammation (Krause, 2000). L'expression des AMP est retrouvée dans de nombreux types cellulaires, en particulier immunitaires. Les cellules de l'immunité peuvent notamment exprimer ces protéines pour remplir d'autres fonctions, en plus de leur activité antimicrobienne, comme par exemple la granulysine, aux effets cytolytiques et pro-apoptotiques, ou la vasostatine-2, qui inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Lugardon, 2000 ; Linde, 2005).

Les peptides antimicrobiens sont souvent issus du clivage d'un pro-peptide (Michaelson, 1992). Une même protéine peut avoir un rôle propre distinct de son activité antimicrobienne sous sa forme complète, et un rôle antimicrobien lorsque certains peptides sont générés par protéolyse. Ce processus a notamment été décrit pour des peptides impliqués dans l'immunité, comme la thrombocidine issue du clivage des chimiokines de type CXC (Krijgsveld, 2000), ou ayant d'autres fonctions, comme le neuropeptide Y (Shimizu, 1998). De très nombreuses protéines de la famille des chimiokines disposent également d'une activité antimicrobienne sans clivage, comme CCL20 ou CXCL9 (Yang, 2003).

Une protéine peut servir de pro-peptide pour plusieurs AMP différents, comme c'est le cas pour la lactoferrine (voir plus haut). Ce phénomène n'est pas isolé, la production de multiples AMP par un seul précurseur se retrouvant jusque dans le règne végétal (Tailor, 1997).

1.1.3.3 Rôle antimicrobien direct

Les peptides antimicrobiens sont généralement cationiques et amphipathiques, leurs charges positives pouvant interagir avec la membrane négativement chargée des bactéries, et leur amphiphilie leur permettant potentiellement de traverser ces mêmes membranes (Scott, 1999).

L'accumulation d'AMP à la membrane des bactéries entraîne la formation de pores et la perméabilisation des bactéries, provoquant leur mort par fuite du contenu intracellulaire. Plusieurs types de pores peuvent être induits par les AMP, à savoir (a) le pore toroïdal, induit par exemple par le peptide LL37 (Henzler Wildman, 2003), (b) le pore hélicale, induit par l'alaméthicine (Barrel stave pore ; Constantin, 2007), et (c) le modèle en tapis de la cécropine déstabilisant la membrane plasmique (Gazit, 1995). Toutefois, l'activité antibactérienne des AMP ne se limite pas à ses seuls effets sur la membrane : de nombreux effets intracellulaires ont été décrits (résumés dans Brogden, 2005). Ces effets vont de la perturbation de membranes intracellulaires à l'inhibition de la synthèse de la paroi, en passant par toute une gamme d'interactions avec des enzymes impliquées dans la transcription ou la traduction. Un effet particulièrement intéressant pour cette étude est la fixation aux acides nucléiques et l'inhibition de leur réplique (Lehrer, 1989).

Les AMP, initialement décrits comme antibactériens, ont également une activité lytique ou inhibitrice sur de nombreux types de microbes. Ils sont efficaces contre les virus, comme le RSV (Domachowske, 1998) ou le virus de l'hépatite C (Matsumura, 2015). Par exemple, le peptide LL37 inhibe la réplique du VIH (Bergman, 2007) en neutralisant simultanément plusieurs enzymes impliquées dans sa réplique (Wong, 2011). Les AMP ont également des rôles antifongiques (Lopez-Garcia, 2005) et antiparasitaires (Rico-Mata, 2013).

Leur cytotoxicité est très limitée contre les cellules du soi (Svensson, 2015) ; cependant, des effets néfastes pour l'hôte ne sont pas à exclure : l'amyloïde beta, qui dispose de propriétés antimicrobiennes (Kumar, 2016), peut s'accumuler en fibrilles insolubles et causer la maladie d'Alzheimer. Un autre mécanisme délétère des AMP vient notamment de leur capacité à induire une réponse inflammatoire. Leur expression étant elle-même induite par l'inflammation, leur expression chronique pourrait jouer un rôle dans l'initiation de signes d'auto-immunité (Gilliet, 2008). Cette boucle d'amplification est soulignée dans la figure 4, qui résume les différentes activités des peptides antimicrobiens.

1.1.3.4 Interaction avec le système immunitaire

Les peptides antimicrobiens modulent également la réponse immunitaire locale. Les AMP peuvent induire la production de cytokines pro-inflammatoires par fixation sur un récepteur membranaire, comme P2X7 pour le peptide LL37. Les voies de signalisation impliquées sont multiples, telles que les voies PI3K/Akt et NF- κ B (Yu, 2007).

Les AMP peuvent avoir un rôle chimioattractant intrinsèque. LL37, par exemple, induit la migration de neutrophiles, monocytes, et lymphocytes (De, 2000). Ce recrutement permet d'amplifier la réponse immunitaire, les cellules nouvellement recrutées pouvant à leur tour sécréter des AMP et cytokines, induisant une boucle d'amplification. LL37 dispose également d'autres rôles, comme la modulation de l'apoptose des cellules immunitaires (Barlow, 2006) ou l'induction de la réparation tissulaire (Oudhoff, 2010).

L'une des propriétés qui nous intéresse principalement dans cette étude est la capacité de certains AMP à agir comme des molécules cargo des acides nucléiques. En effet, les peptides antimicrobiens, et en particulier LL37, ont la capacité de se lier aux ADN et ARN, qu'ils soient d'origine exogène ou endogène, pour induire une réponse immunitaire. Les caractéristiques physicochimiques des AMP, notamment leur amphiphilie et leur cationicité, leur confèrent des propriétés de cell-penetrating peptides (CPP). Ils induisent l'internalisation des acides nucléiques extracellulaires, leur permettant alors d'interagir avec les senseurs endosomaux ou cytoplasmiques. Ainsi, les complexes formés de LL37 et d'ARN viral permettent de détecter une infection via TLR3 (Lai, 2011). Cette facilitation de la détection des PAMP de nature nucléique se passe au sein des cellules épithéliales ciblées par les microbes (Chen, 2013), ou dans les cellules immunitaires. Les motifs dinucléotidiques CpG se fixent au peptide LL37 et les complexes activent les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Toutefois, cet effet bénéfique peut être à l'origine de maladies auto-immunes lorsque les AMP transportent de l'ADN du soi et induisent une inflammation via TLR9 (Lande, 2007). Les pDC, en présence d'ADN du soi présent dans le milieu extracellulaire à cause d'une mort

excessive liée à l'inflammation, peuvent être activés par des complexes d'ADN et de LL37 et entretenir la réponse inflammatoire (Gilliet, 2008). Ce processus est relayé par les senseurs à l'ADN, mais également par TLR7/8 (Ganguly, 2009) ou TLR3. Il semblerait que plusieurs mécanismes soient impliqués, car l'homologue murin du LL37, CRAMP, n'induit pas la capture des séquences CpG par les macrophages, mais des souris déficientes pour ce gène détectent moins efficacement ce PAMP (Nakagawa, 2015).

Le peptide LL37 n'est pas le seul AMP à disposer de cet effet, mais tous ne le partagent pas. Les bêta-défensines 2 et 3, par exemple, peuvent transporter l'ADN jusqu'à TLR9, mais d'autres AMP comme la psoriasin ou la bêta-défensine 1 ne présentent pas cette fonction.

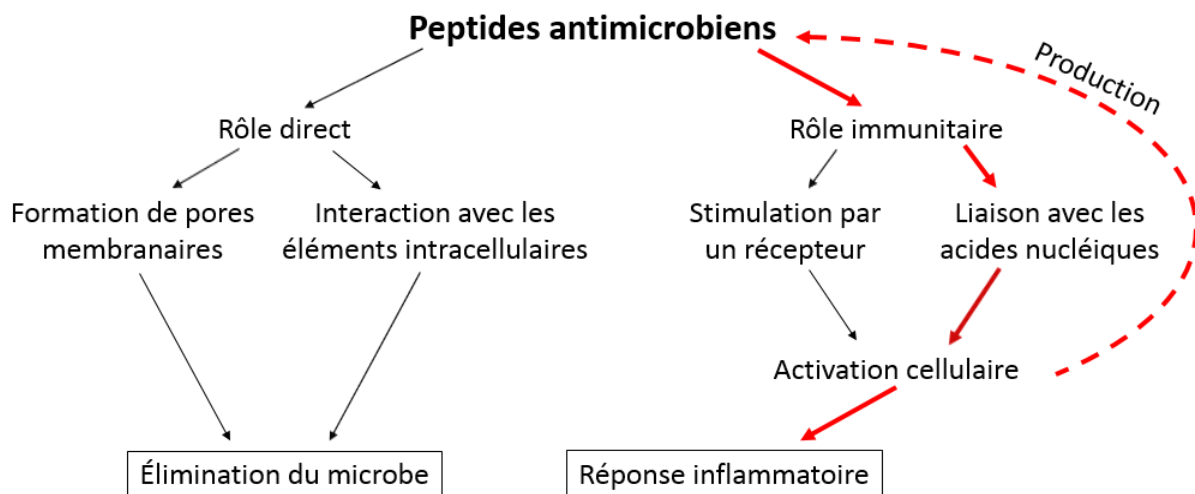


Figure 4. Schéma d'action des peptides antimicrobiens. Présentation des effets directs et indirects (via le système immunitaire) des peptides antimicrobiens, et présentation de la boucle d'amplification induisant leur expression et l'emballement de l'inflammation dans le cas des maladies auto-immunes inflammatoires chroniques.

1.2 L'interleukine 26

L'interleukine-26 (IL-26) est une molécule découverte en 2000, et dont les propriétés biologiques restent encore majoritairement à découvrir. Son rôle pro-inflammatoire a été rapporté dans de nombreuses maladies auto-immunes chroniques, mais de récentes publications font également état de propriétés non immunitaires. La présente thèse visera à caractériser de nouvelles propriétés de cette protéine et en expliciter les mécanismes.

À l'heure actuelle, plusieurs effets sont bien caractérisés, et d'autres restent à confirmer, tandis que chaque année un nouveau pan de la biologie de cette molécule est découvert. Les publications les

plus anciennes en font une cytokine, un médiateur du dialogue entre cellules immunitaires, tandis que les plus récentes rapportent des effets directs, indépendamment de son récepteur.

1.2.1 Découverte et généralités

L'IL-26 a été découverte en 2000 par l'équipe du Pr Helmut Fickenscher, tout d'abord sous le nom AK155 (Knappe, 2000 ; Hor, 2000). Cette protéine fut identifiée comme surexprimée par des lymphocytes T humains infectés par *herpesvirus saimiri*. AK155 sera par la suite rapidement renommée interleukine-26 en raison d'une grande similarité de séquence et de structure secondaire avec l'interleukine-10 (environ 25% d'homologie au niveau protéique et 47% de similarité).

La famille de l'IL-10 est constituée des molécules IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 et IL-26. Elle comptait aussi autrefois les cytokines IL-28A, IL-28B et IL-29, maintenant regroupées sous le nom d'interférons lambda. Les membres de cette famille partagent des récepteurs communs, comme décrits en 1.3.3. La famille de l'IL-10 forme, avec les interférons, le groupe de cytokines hélicoïdales de classe II (Lutfalla, 2003). Ils partagent des homologies de séquence primaire et surtout de conformation secondaire, mais présentent des activités biologiques très variées, voire même opposées.

La protéine IL-26 est constituée de 171 acides aminés pour un poids moléculaire prédit de 19 kDa. La forme sécrétée est constituée d'un homodimère au poids apparent de 36 kDa en western blot, et bien qu'une publication lui prédise la capacité de former des multimères d'ordre plus élevé (Meller, 2015), il reste à le confirmer expérimentalement. L'IL-26 possède un point isoélectrique très élevé (10,77), calculé dès la publication de sa découverte, mais les implications de cette caractéristique physicochimique, inhabituelle pour une cytokine, sur son activité ne furent comprises que plus tardivement.

1.2.2 Le gène IL26

Le gène codant pour l'interleukine-26, nommé *IL26*, est localisé chez l'humain sur le chromosome 12 au locus 12q15 (Goris, 2001). Ce locus comprend les gènes de plusieurs cytokines, celui codant pour l'IL-26 se trouvant entre ceux de l'interleukine-22 et de l'interféron γ . Une publication plus récente décrit la présence d'une séquence dans la région non codante entre l'IL-26 et l'IFN γ , régulant de façon commune l'expression des deux gènes (Collins, 2012).

Depuis sa découverte chez l'Homme, des orthologues de l'IL-26 ont été décrits chez de nombreuses autres espèces animales du phylum des vertébrés (allant des poissons aux grands singes) mais il n'en existe pas chez les rongeurs tels que la souris et le rat (Dambacher, 2009), ce qui a considérablement ralenti l'étude des fonctions de cette protéine.

1.2.3 Le récepteur IL-20R1 / IL-10R2

Suite à la découverte d'une nouvelle protéine de la famille des cytokines, l'équipe de H. Fickenscher a cherché à décrire son récepteur en utilisant des lignées épithéliales transfectées exprimant les récepteurs hétérodimériques de la famille de l'IL-10. En effet, les cytokines de cette famille partagent les mêmes sous-unités mais en différentes combinaisons ; par exemple, la sous-unité IL-10R2 sert à la fois à former le récepteur à l'IL-10 quand elle est combiné à IL-10R1 et à l'IL-22 lorsqu'elle est associée à IL-22R1 (figure 5). Cette approche a permis de démontrer qu'une cellule exprimant les formes recombinantes des sous-unités IL-10R2 et IL-20R1 induit la phosphorylation de STAT1 et STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) en réponse à une stimulation par l'interleukine-26 (Hor, 2004 ; Sheikh, 2004), un effet abrogé par l'incubation avec un anticorps anti-IL-26. Cette phosphorylation de STAT3 a été confirmée dans la lignée de cellules épithéliales Colo 205.

Alors que la sous-unité IL-10R2 est ubiquitaire, l'expression de la chaîne IL-20R1 est restreinte à un nombre limité de cellules, principalement épithéliales. Toutefois, différentes études ont rapporté des effets de l'interleukine-26 sur des cellules immunitaires qui n'expriment pas IL-20R1 (Corvaisier, 2012 ; Che, 2014 ; Miot, 2014), ce qui indique que ce récepteur n'est pas le seul médiateur des activités biologiques de l'IL-26.

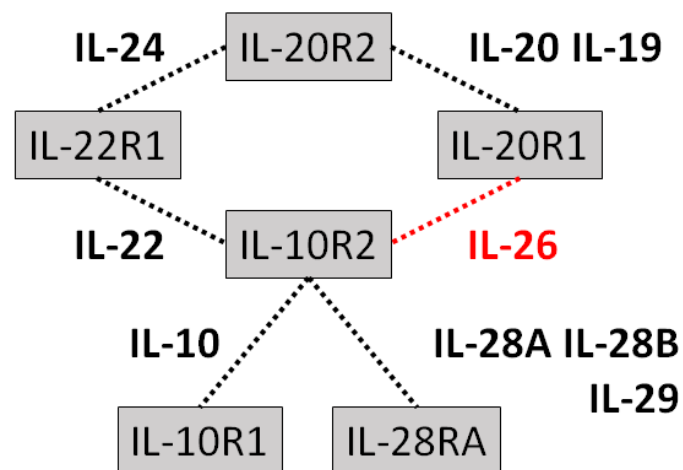


Figure 5. Sous-unités des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-10. Les récepteurs hétérodimériques de cette famille sont le fruit d'une combinaison entre une chaîne R1 (ou RA) et une chaîne R2. Les interleukines-28A, -28B et -29 sont également connues en tant qu'interférons lambdas, ou de type III. IL-28RA est aussi appelé IFNLR1.

1.2.4 Expression et sécrétion

Pendant longtemps, les connaissances sur l'expression de l'IL-26 ont été limitées, avec comme seules populations sources les lymphocytes T mémoires activés (Knappe, 2000). Jusqu'à présent, les signaux extracellulaires, voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans son expression par les cellules immunitaires restent inconnus. Une publication décrit cependant les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion de l'IL-26 par les cellules épithéliales.

L'étude originale mettait en évidence l'expression d'IL-26 (Knappe, 2000) par des lymphocytes T de différents sous-types infectés par un virus ainsi que par les cellules mononucléées de sujets sains. L'ARNm de l'IL-26 est retrouvé dans des lignées lymphocytaires $T\alpha\beta$ CD4+ et CD8+ et $T\gamma\delta$, mais aucune expression n'est détectée dans la lignée myéloïde. Dans les lymphocytes B, l'ARNm ne se retrouve qu'en cas d'infection par un virus. L'expression d'IL-26 est élevée dans les lymphocytes T mémoires et réduite dans les lymphocytes T naïfs et dans les lymphocytes T régulateurs (Wolk, 2002). La polarisation en lymphocytes Th1 induit la plus grande augmentation d'expression du transcrite codant l'IL-26.

Une publication plus récente (Wilson, 2007) révèle une expression élevée d'IL-26 dans les lymphocytes Th17. Cette population, obtenue *in vitro* par culture de lymphocytes CD4+ en présence d'anticorps anti-CD3, anti-CD28, ainsi que d'IL-1 β et d'IL-23, co-exprime l'IL-17 et l'IL-26, ainsi que l'IL-22 et l'IFN γ . Les Innate Lymphoid Cells (ILC) de type III, expriment également l'ARNm codant pour l'IL-26 (Cools, 2016).

Récemment, une étude s'est intéressée à l'expression d'IL-26 dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD ; Ohnuma, 2015). Les auteurs ont utilisé des cellules humaines CD4+ isolées de sang de cordon et montré qu'une co-stimulation avec un anticorps anti-CD26 induit une expression d'IL-26 supérieure à celle induite par une co-stimulation avec un anticorps anti-CD28. Toutefois, ces cellules n'expriment pas d'IL-2, d'IFN γ ou d'IL-17A, que ce soit après une co-activation par des anticorps anti-CD26 ou anti-CD28. Ce résultat peut s'expliquer par le statut immature des cellules utilisées dans cette étude.

L'IL-26 est également exprimée par les cellules NK (Braum, 2012), notamment dans le cas d'une infection par HCV. Toutefois, la nature des facteurs induisant cette expression reste inconnue. Les macrophages des voies respiratoires seraient également producteurs d'IL-26 (Che, 2014). Dans leur publication, les auteurs montrent que, suite à une stimulation par une endotoxine, les macrophages ainsi que les lymphocytes T (aussi bien auxiliaires que cytotoxiques) expriment des taux élevés d'IL-26. Ceci n'entre pas en contradiction avec la première publication (Knappe, 2000), qui n'avait mesuré l'expression d'IL-26 que sur des lignées et non des cellules primaires.

Parmi les cellules non immunitaires, l'expression d'IL-26 a systématiquement été retrouvée dans un contexte inflammatoire, comme par exemple dans les synoviocytes de patients présentant une polyarthrite rhumatoïde (Corvaisier, 2012). Cette observation a été confirmée dans une étude récente (Heftdal, 2017) qui rapporte l'expression d'IL-26 par les synoviocytes de patients présentant une spondylarthrite. Les cellules musculaires lisses de l'endothélium des vaisseaux sanguins soumis à une forte inflammation au cours d'une vascularite à ANCA sécrètent également l'IL-26 (Poli, 2017).

Les cellules épithéliales, notamment celles des voies respiratoires, peuvent produire de l'IL-26, (Che, 2017). Les auteurs montrent que des cellules épithéliales primaires humaines du poumon expriment l'IL-26 en réponse à une stimulation par des ligands des TLR endosomaux, mimant une infection virale. Cependant, un blocage de la signalisation en aval de TLR3 (TRIF, p38, JNK1-3, ERK1/2 ou NF- κ B) ne diminue pas l'expression d'IL-26, mais inhibe uniquement sa sécrétion, ce qui laisse penser que d'autres voies existent pour réguler à la fois l'expression de l'ARNm et le transport de la protéine. Notamment, les auteurs montrent qu'une stimulation des cellules épithéliales par l'IL-17A augmente la transcription du gène codant pour l'IL-26 ainsi que son accumulation intracellulaire.

1.2.5 Fonctions biologiques

L'interleukine-26 présente de nombreuses fonctions biologiques, en raison de sa double fonction de cytokine et de peptide antimicrobien et semble impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Dans ce paragraphe, nous distinguerons son rôle strictement pro-inflammatoire de ses autres activités.

1.2.5.1 *Activité pro-inflammatoire*

Le premier et le plus fréquemment rapporté des rôles de l'interleukine-26 est son activité pro-inflammatoire. Une stimulation par l'IL-26 induit la production de cytokines pro-inflammatoires par de nombreux types cellulaires, tandis que ces cytokines vont, en retour, induire l'expression d'IL-26. Cette boucle d'amplification semble jouer un rôle central dans l'activité de l'IL-26 au cours des processus inflammatoires chroniques. Une expression élevée d'IL-26 dans un contexte inflammatoire est retrouvée dans des pathologies variées, telles que les infections virales, les maladies auto-immunes inflammatoires chroniques, ou la GVH.

La première pathologie pour laquelle un rôle de l'IL-26 a été rapporté est la maladie de Crohn (Dambacher, 2009). Les auteurs ont analysé des biopsies de muqueuses du côlon de 22 patients souffrant de maladie chronique de l'intestin (IBD, Inflammatory Bowel Disease), à la recherche de l'ARNm de l'IL-26. Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent une corrélation entre l'expression du gène *IL26* et l'inflammation du tissu ; cette corrélation n'est pas retrouvée chez les patients souffrant de rectocolite hémorragique. De plus, les concentrations sériques d'IL-26 sont

significativement augmentées chez les patients comparativement aux sujets sains. Des expériences d'immunohistochimie ont révélé que l'IL-26 était produite par les lymphocytes Th17 infiltrés dans le tissu.

Les mécanismes par lesquels l'IL-26 agit dans l'IBD n'ont pas été élucidés à l'époque. Cependant, les données récentes sur ses fonctions laissent supposer une induction de la production de cytokines pro-inflammatoires via son rôle cargo, provoquant une expression d'IL-26 par les lymphocytes Th17 infiltrant.

L'interleukine-26 semble également impliquée dans l'arthrite rhumatoïde (Corvaisier, 2012). Les taux sériques d'IL-26 sont plus importants chez les patients, et cette concentration est fortement augmentée au site de l'inflammation. En accord avec le fait que le liquide synovial présente des taux d'IL-26 élevés, suggérant une production locale, les auteurs montrent que les fibroblastes synoviaux sont les principales cellules productrices de la cytokine. La production d'IL-26 par les synoviocytes est notamment augmentée par l'IL-17. En accord avec son rôle pro-inflammatoire, les auteurs montrent la capacité de l'IL-26 à induire la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α par les monocytes, impliqués dans la polarisation de lymphocytes en Th17, qui expriment à leur tour IL-26 et IL-17.

Une étude sur les polymorphismes du gène *IL26* montrait déjà que des mutations dans la région promotrice commune à l'IFN γ et à l'IL-26 sont associées à une susceptibilité accrue de développer une arthrite rhumatoïde ou une sclérose en plaque (Vandenbroeck, 2003). D'après les auteurs, cette prédisposition ne concerne que les femmes, un résultat en accord avec les différences liées au sexe rapportées pour la susceptibilité à ces maladies.

Une autre équipe a étudié l'implication de l'IL-26 dans la GVHD induite par transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Ohnuma, 2015 ; Ohnuma, 2016). Dans cette pathologie, une infiltration de lymphocytes Th17 est associée aux manifestations cutanées et pulmonaires de la maladie. Les auteurs ont utilisé un modèle murin, en émettant l'hypothèse que, même si les souris sont dépourvues d'IL-26, la cytokine humaine aurait les mêmes effets. Cette supposition n'est pas dénuée de sens, certaines propriétés biologiques de l'IL-26 étant indépendantes du récepteur décrit et associées à ses caractéristiques physicochimiques. Dans un modèle de souris développant une bronchiolite oblitérante, les auteurs rapportent une infiltration de cellules adoptives exprimant l'IL-26, ainsi qu'une augmentation du dépôt de collagène par les fibroblastes murins. Ils ont alors cherché quels facteurs induisent l'expression d'IL-26 par les lymphocytes T CD4+ en utilisant des cellules humaines de cordon ombilical. Comme décrit plus haut, les auteurs rapportent une

augmentation d'expression d'IL-26 en réponse à une stimulation via CD26 ; ce résultat reste néanmoins à relativiser en regard de l'état immature des cellules employées.

Dans une étude récente, des taux élevés d'IL-26 ont été détectés dans le sérum, le liquide céphalorachidien et les lavages broncho-alvéolaires de patients souffrant de la maladie de Behçet, une vascularite avec, notamment, des manifestations oculaires (Kaabachi, 2017 ; Lopalco, 2017). Cette maladie est caractérisée par une inflammation associée à une infiltration de lymphocytes Th17 et une diminution des taux des cytokines immunorégulatrices IL-10 et TFG- β . Les auteurs montrent qu'une stimulation des lymphocytes T CD4+ par de l'IL-26 induit une augmentation de la production d'IL-17 et d'IL-23 (facteur de survie et de prolifération des lymphocytes Th17). Ces données renforcent l'hypothèse du rôle de l'IL-26 dans la mise en place d'une boucle d'amplification de la réponse inflammatoire, et suggèrent que l'IL-26 serait un driver dans l'initiation de réponses auto-immunes.

En 2018, l'IL-26 a été rapportée comme exprimée chez des patients souffrant de dermite de contact d'origine allergique (Allergic contact dermatitis ou ACD ; Caiazza, 2018). L'IL-26 est retrouvée dans les lésions, le plasma, et le surnageant de culture de cellules mononucléées isolées de patients. Les auteurs montrent que ces cellules présentent une cytotoxicité accrue comparativement aux cellules de donneurs sains, et que cette toxicité diminue en cas d'extinction d'expression de l'ARNm par siRNA. Il s'agit de la deuxième étude à montrer une induction de la cytotoxicité par l'IL-26, la première montrant une induction de l'expression de TRAIL par les lymphocytes NK (Miot, 2015).

1.2.5.2 Autres rôles de l'IL-26

De nombreuses études rapportent désormais des rôles autres que pro-inflammatoires pour l'IL-26. Toujours rapportés dans un contexte immunologique, ils sont le plus souvent indépendants de son récepteur, qu'ils soient liés à une activité intrinsèque de la molécule sur les microbes ou inducteurs d'une réponse cellulaire.

1.2.5.2.1 Rôles directs

L'hypothèse d'un rôle direct de l'interleukine-26 a été avancée dans le cadre des infections virales, en raison de la découverte de la molécule dans des lymphocytes infectés. Les auteurs ont ainsi décrit que l'IL-26 module l'infection *in vitro* par trois virus (Braun, 2013) : l'une est augmentée (infection de la lignée Colo-205 par le virus de la stomatite vésiculaire), une autre est inchangée (infection de la lignée Vero par le virus herpès simplex 1), et la dernière est diminuée (infection de la lignée Colo-205 par le cytomégalovirus humain).

En 2015, une équipe a rapporté un effet antimicrobien direct de l'IL-26 (Meller, 2015). Cette observation repose sur une comparaison de la distribution des charges au sein des hélices E et F de

l'IL-26 et des peptides antimicrobiens (Figure 6). Les auteurs avancent l'hypothèse que l'IL-26 pourrait former des multimères, même si l'existence de cette forme n'a pas encore été confirmée *in vivo*. Cette structure serait inédite parmi les membres de la famille de l'IL-10, en raison de l'absence dans l'IL-26 d'un résidu proline (P113), responsable de la dimérisation des autres membres de sa famille (Meller, 2015).

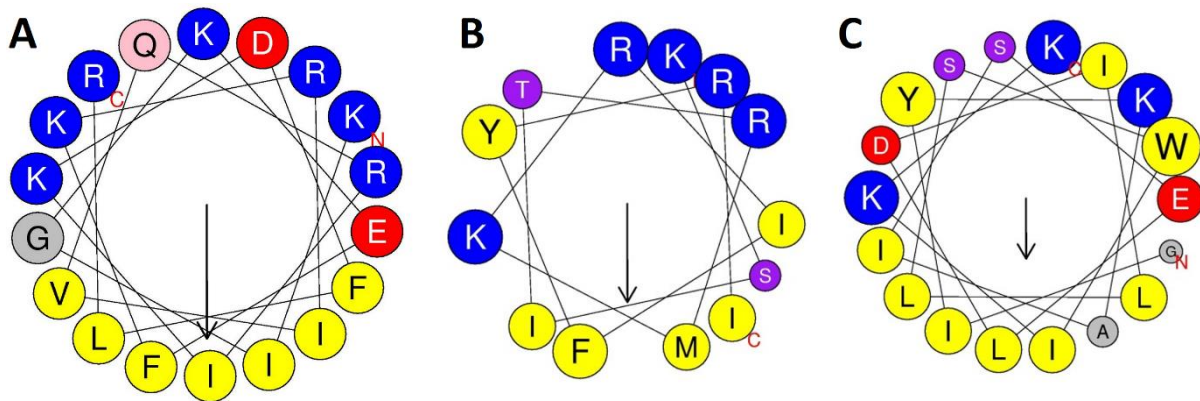


Figure 6. Distribution des acides aminés au sein des hélices α du LL-37 et de l'IL-26. (A) LL37. (B) Hélice E de l'IL-26. (C) Hélice F de l'IL-26. Les acides aminés en jaune sont hydrophobes, en bleu sont chargés positivement, et en rouge négativement. Adapté de Poli, 2017.

Les auteurs ont évalué l'activité antibactérienne de l'IL-26 sur plusieurs bactéries Gram négatif. Ils observent un effet bactéricide direct de l'IL-26 par formation de pores dans la membrane des bactéries, un mécanisme similaire à celui de nombreux peptides antimicrobiens. De plus, l'IL-26 diminue la charge bactérienne dans les organes des souris traitées, comparativement aux contrôles. Les auteurs ne rapportent pas cet effet protecteur pour toutes les souches bactériennes testées, et une publication récente (Agak, 2017) ajoute *Propionibacterium acnes* aux bactéries résistantes à l'IL-26.

Suite à la première publication rapportant la fixation de l'IL-26 à l'ADN, une autre équipe a évalué le lien entre IL-26 et ADN bactérien circulant chez des patients présentant une pathologie intestinale (Pinero, 2017). Les auteurs rapportent que les taux d'IL-26 dans le sang des patients sont augmentés lorsque ceux-ci ont des concentrations élevées d'ADN bactérien. Cette augmentation est également corrélée à une expression accrue des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-12, et IFN γ . Ils ont également rapporté que les patients portant des variants du gène *IL26* présentaient des taux sériques réduits, et que les cellules mononucléées des mêmes patients avaient une capacité

antibactérienne moindre. Par ailleurs, la présence de ces variants influence aussi la réponse des patients au traitement avec un anticorps anti-TNF α .

1.2.5.2.2 Rôles via le système immunitaire

Des expériences réalisées parallèlement par deux laboratoires ont cherché à valider l'hypothèse selon laquelle l'IL-26 serait capable de se lier à l'ADN : une expérience de fixation *in vitro* (Poli, 2017) et une expérience de retard sur gel (Meller, 2015) ont confirmé cette propriété. De plus, les fragments d'ADN complexés avec l'IL-26 présentent une résistance partielle à la dégradation par les DNAses.

La liaison des AMP à l'ADN extracellulaire étant connue pour augmenter leur immunogénicité (voir plus haut), l'équipe du Pr Gilliet a évalué la capacité des complexes à activer les cellules immunitaires. Leur étude rapporte une induction des cytokines IL-1 β et IL-6 par les cellules mononucléées et une forte augmentation de la production de la cytokine antivirale IFN α par les pDC. Une expérience utilisant des lignées transfectées pour exprimer différents TLR montre que l'activation des pDC serait dépendante de TLR9. Par ailleurs, les auteurs montrent que l'IL-26 augmente l'immunogénicité de l'ADN humain.

Notre laboratoire s'est intéressé au rôle de l'IL-26 dans le contexte de la vascularite à ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody), ou AAV, une pathologie auto-immune induisant une inflammation chronique (Poli, 2017). Il est admis que l'ADN extracellulaire joue un rôle central dans cette pathologie inflammatoire stérile. Les taux d'interleukine-26 sont augmentés chez les patients. Il est également confirmé la capacité de l'IL-26 à se lier à l'ADN et à lui faire franchir la membrane des monocytes. Dans ce modèle, les complexes constitués d'ADN et d'IL-26 induisent la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et d'IFN β via la voie de l'inflammasome, sous la dépendance du complexe STING. Dans l'AAV, les cellules musculaires lisses (SMC) de l'endothélium apparaissent comme une source importante d'IL-26, ajoutant une nouvelle population à la liste des producteurs d'IL-26.

L'équipe ayant rapporté l'expression d'IL-26 par l'épithélium pulmonaire a également montré que l'instillation nasale d'IL-26 et de LPS active la réponse immunitaire en comparaison au LPS seul (Bao, 2017). L'IL-26 recombinante humaine induit la phosphorylation de STAT3 et entraîne un recrutement plus important de macrophages et de neutrophiles dans l'espace bronchoalvéolaire, ainsi que des taux accrus d'ARNm pour de nombreuses cytokines et chimiokines, protéinases et metalloprotéases.

En raison des nombreuses publications décrivant un effet sur les cellules épithéliales, il est difficile de remettre en cause l'activité cytokinique de l'IL-26 et son appartenance à la famille de l'IL-10, tout comme il est difficile d'ignorer l'activité de peptide antimicrobien qu'elle ne partage pas avec les autres membres. Heureusement, de nombreuses publications ces dernières années rapportent un

rôle double pour les peptides antimicrobiens, à la fois acteurs directs et indirects via le système immunitaire, comme le LL-37 décrit plus haut (Pinheiro Da Silva, 2017). L'IL-26 n'a pas la taille d'un peptide. Toutefois, une activité antimicrobienne a été décrite pour des protéines et polypeptides. La catégorie des kinocidines regroupe ces molécules, dont l'IL-26 pourrait faire partie au même titre que l'IFN β , récemment décrit comme ayant lui aussi une action antibactérienne directe via les caractéristiques physicochimiques de son hélice 4 (Kaplan, 2017).

En plus des maladies auto-immunes présentant une inflammation chronique stérile, l'IL-26 a été retrouvée surexprimée dans le sérum de patients présentant une hépatite chronique consécutive à l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV ; Miot, 2015). Les données montrent que l'IL-26 s'accumule dans les lésions, là où l'inflammation est la plus forte (figure 7), et semble sécrétée par les lymphocytes T infiltrés dans le foie. Le rôle de l'IL-26 lors d'une infection par HCV est multiple. Tout d'abord, l'IL-26 induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules NK, mais également d'IFN γ , qui orchestre les réponses antivirales innées et adaptatives, et d'IFN β , principal acteur de la réponse antivirale. L'IL-26 induit également l'expression de TRAIL par les lymphocytes NK, augmentant leur capacité à lyser les hépatocytes infectés par HCV.

1.3 Le virus de l'hépatite C et la réponse antivirale

1.3.1 Le virus de l'hépatite C

1.3.1.1 La particule virale

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN simple brin de polarité positive, découvert en 1989 comme étant un virus induisant une hépatite ni A ni B (Choo, 1989). Le génome contenu dans les particules virales est un ARN simple brin, codant pour les protéines virales. HCV appartient donc au groupe IV de la classification de Baltimore, plus précisément à la famille des *Flaviviridae*.

Le génome de HCV est long d'environ 9600 bases, et code pour une polyprotéine d'approximativement 3000 acides aminés. Cette polyprotéine est clivée par des enzymes aussi bien du virus que de l'hôte pour former les protéines matures du virus. Trois sont structurales : la protéine core servant à assembler la particule virale, et les glycoprotéines E1 et E2 faisant partie de l'enveloppe. Ces protéines étant accessibles aux anticorps, elles sont hautement variables. La protéine p7 est un canal ionique, impliqué dans l'assemblage et la libération des virions. Les protéines non structurales (NS) sont au nombre de 6 : NS2 et NS3 sont des protéases impliquées dans la maturation des protéines virales. NS3 dispose également d'une activité protéasique, permettant de contourner le système immunitaire en clivant les adaptateurs MAVS et TRIF, en aval

de la détection par TLR3. NS4A est un cofacteur pour la protéase NS3, tandis que le rôle de NS4B reste méconnu. NS5A est une métalloprotéine à doigt de zinc pouvant se fixer à l'ARN viral, et NS5B est la polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RNA-dependent RNA polymerase, ou RdRP) responsable de la réplication du virus.

La particule virale de HCV est de petite taille et hétérogène. Deux formes sont retrouvées *in vitro*, une de grande taille (60 nm de diamètre), enveloppée et fortement infectieuse, et l'autre, de plus petite taille (40 nm de diamètre), avec une membrane indétectable et peu infectieuse (Gastaminza, 2010). Par ailleurs, la faible fidélité de la polymérase virale est responsable d'une grande mutabilité de ce virus. La particule virale est constituée d'une nucléocapside, formée par l'ARN viral et la protéine core, ainsi que d'une enveloppe sur laquelle se trouvent E1 et E2. Ces particules s'associent aux LDL et VLDL, formant des lipovirions. Ces dernières comprennent également de nombreuses apolipoprotéines, comme ApoB, ApoC1, ApoC2, ApoC3 et ApoE.

1.3.1.2 Cycle de réplication du virus

HCV est capable d'infecter plusieurs types cellulaires (comme les lymphocytes B ou différentes cellules épithéliales), mais sa réplication ne s'effectue que dans les hépatocytes. Les particules virales reconnaissent leurs cellules hôtes grâce aux domaines hyper-variables des protéines de l'enveloppe. Celles-ci peuvent se lier à différentes protéines membranaires des hépatocytes, telles que le récepteur aux HDL SR-B1, ou à la tétraspanine CD81. Ces deux molécules sont impliquées dans la phase précoce de l'entrée du virus dans les cellules hôtes, tandis que d'autres protéines peuvent intervenir dans la phase tardive, comme les récepteurs à l'EGF ou Eph2A, ainsi que les molécules des jonctions serrées Claudin-1 ou Occludin. La fixation du virus est suivie de son internalisation par la voie des clathrines.

L'ARN viral est ensuite libéré des vésicules dans le cytoplasme grâce à un mécanisme dépendant du pH, et sera traduit, au niveau du réticulum endoplasmique, en une grande polyprotéine, clivée, comme décrit plus haut, en 10 protéines matures. Le génome du virus est répliqué par la polymérase virale NS5B, responsable à la fois de la synthèse du brin complémentaire de polarité négative et de l'amplification de l'ARN viral à partir de cet intermédiaire.

Les phénomènes de traduction et transcription ont lieu dans des structures particulières appelées « membranous web », qui s'apparentent à des structures en forme de vasques composées d'une double membrane isolant les sites de réplication du virus des senseurs intracytoplasmiques à l'ARN (Egger, 2002). La production des virions est alors effectuée en détournant la voie de synthèse des vésicules lipidiques des hépatocytes. Les nouvelles enveloppes sont issues de la membrane du

réticulum endoplasmique et sont libérées hors de la cellule par les voies de l'exocytose. Le cycle de réplication du virus est illustré dans la figure 7.

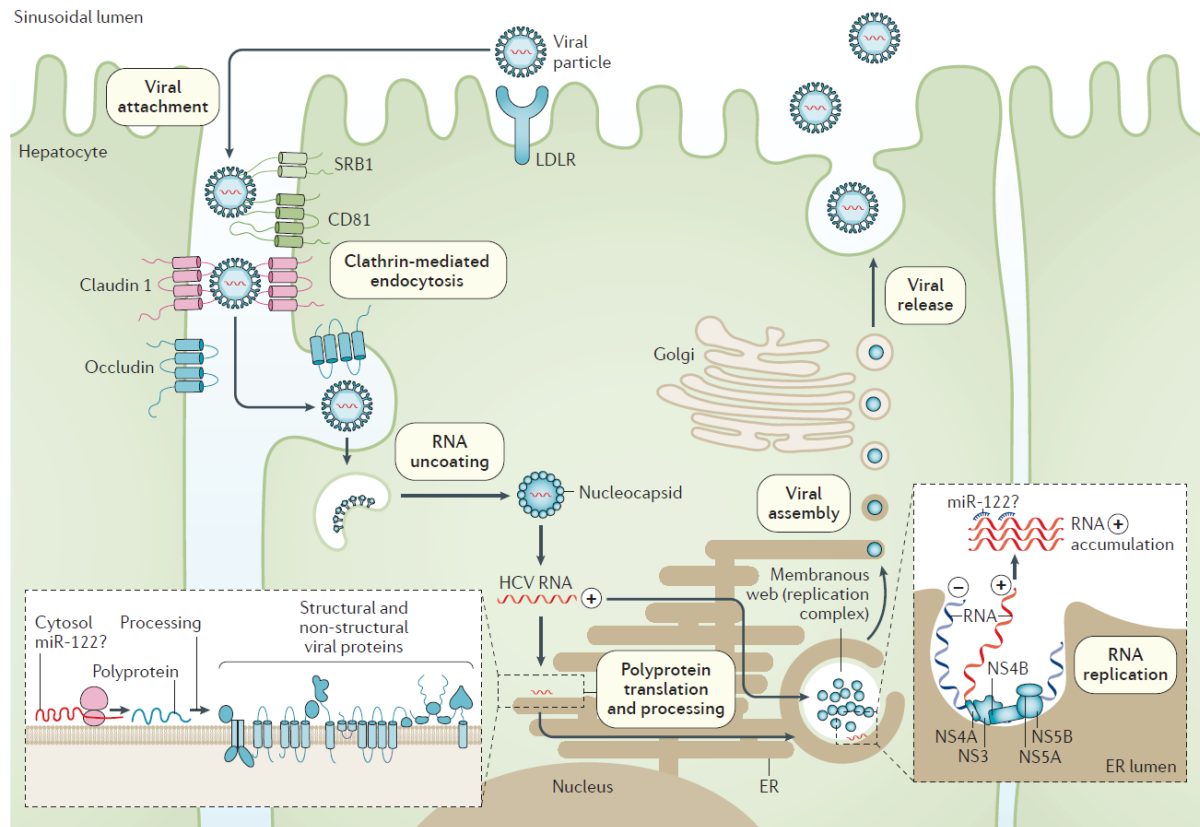


Figure 7. Cycle de réplication de HCV. Schéma représentant l'entrée de HCV dans les cellules-hôtes (par liaison à différentes protéines membranaires), la réplication de son génome et l'expression de ses protéines, ainsi que l'assemblage des virions et leur sécrétion (d'après Manns, 2015).

1.3.2 L'hépatite C

1.3.2.1 Épidémiologie

Le virus de l'hépatite C cause une maladie hépatique qui touche actuellement plus de 70 millions de personnes, soit 1% de la population mondiale (The Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017). Les porteurs ignorant souvent leur statut, le virus se propage très largement dans les populations à risque, et l'OMS estimait qu'environ 1,75 million de nouvelles infections eurent lieu en 2015. La mortalité induite par cette maladie est en augmentation, ce qui a incité l'OMS à établir des plans d'éradication pour contrer l'épidémie. Pour le moment, seuls quelques pays sont en voie d'accomplir une réduction de 90% des personnes infectées et de 65% de la mortalité (l'objectif fixé par l'OMS), dont l'Égypte, qui présente la prévalence la plus haute.

L'hépatite C a une distribution très inégale dans le monde, mais est retrouvée dans tous les pays. Les pays les plus touchés se situent autour de la mer Méditerranée, notamment en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (Figure 8). Le virus de l'hépatite C existe sous différents génotypes et sous-génotypes, dont la distribution change selon la zone géographique étudiée (résumé dans Manns, 2017).

L'hépatite C fait partie d'une famille d'hépatites virales. L'hépatite B est la plus répandue (260 millions de porteurs estimés, avec une possibilité de co-infection avec HCV et HIV), tandis que les hépatites A, D et E sont très minoritaires. Les hépatites B et C sont transmissibles par le sang, tandis que les autres se transmettent via l'eau contaminée. Par ailleurs, les premières sont les seules à pouvoir causer des infections chroniques, les secondes se limitant à la phase aiguë initiale. Les hépatites B et C sont responsables de la quasi-totalité de la mortalité associée aux hépatites. Mais, alors qu'il existe un vaccin contre l'hépatite B, aucun n'est actuellement disponible contre l'hépatite C.

La transmission de l'hépatite C est principalement liée à l'utilisation de drogues par voie intraveineuse ou à des transfusions sanguines non sécurisées, le contact avec du sang contaminé pouvant transmettre le virus à partir de très petits volumes. La transmission sexuelle est rare, tout comme la transmission materno-fœtale ou lors de l'accouchement.

1.3.2.2 Signes cliniques

Le temps d'incubation de la maladie est très variable, allant de 2 à 12 semaines. S'ensuit une phase dite « aiguë », asymptomatique dans la plupart des cas (70%), ou pouvant afficher des symptômes non-spécifiques (fièvre, fatigue, nausées, vomissements, douleurs abdominales et le plus souvent ictère). Une forme plus grave, appelée fulminante, est rare et surtout associée à des comorbidités telles que des co-infections virales.

Dans moins de 20% des cas, le système immunitaire du patient s'avère capable d'éliminer totalement le virus ; ce pourcentage peut grandement varier selon les génotypes : le génotype 1, le plus répandu, abaisse ce taux à moins de 10%, alors que les génotypes les plus rares peuvent l'augmenter jusqu'à 40%. Toutefois, une surveillance est nécessaire pour confirmer que le virus ne fera pas de réapparition tardive. Pour la majorité des patients, l'infection entre dans une phase chronique. Caractérisée par une absence de symptômes, cette infection persistant plus de six mois peut entraîner des complications graves liées à l'inflammation chronique et la fibrose.

Dans les vingt ans suivant l'infection initiale, 30% des patients ayant évolué vers la chronicité vont développer une cirrhose et 4% développeront un carcinome hépatocellulaire (CHC). La mortalité directement associée à l'infection virale est faible, mais la cirrhose et le cancer associés aux symptômes hépatiques furent responsables d'environ 400 000 morts dans le monde en 2015.

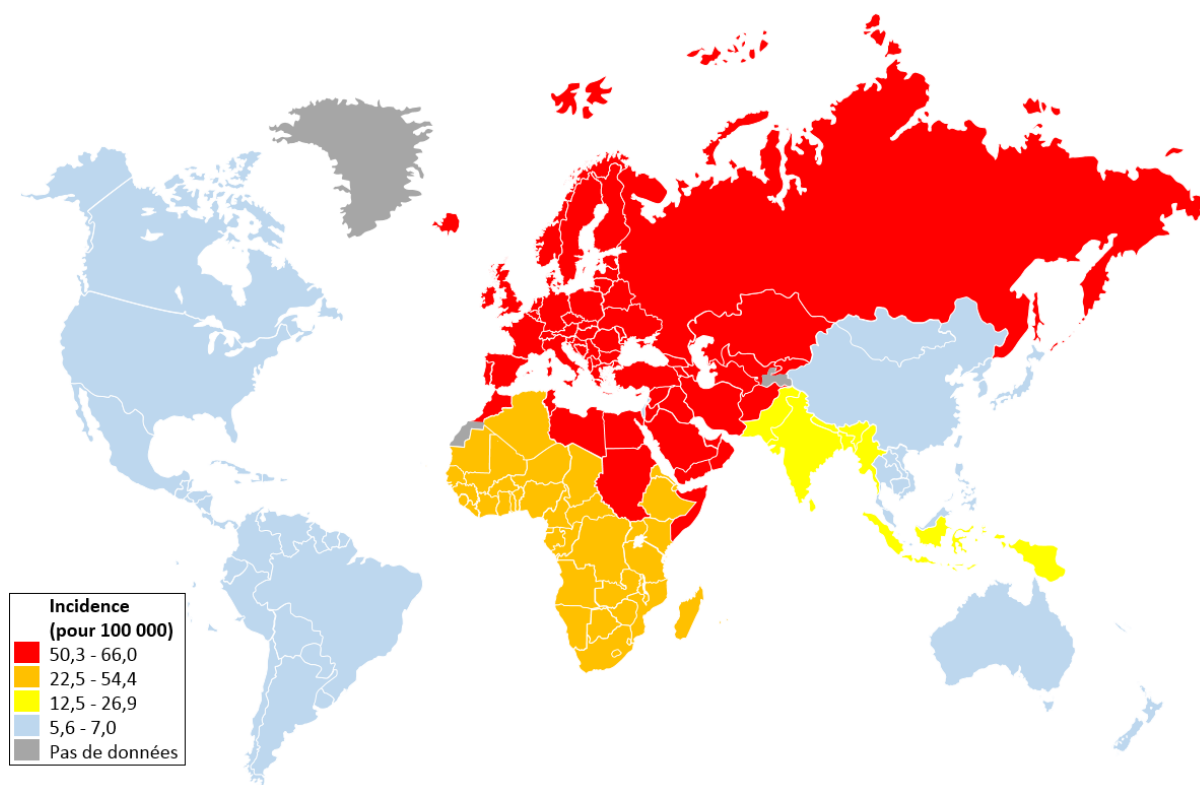


Figure 8. Incidence de l'hépatite C dans le monde. L'incidence pour 100 000 personnes est représentée d'après le rapport *Global hepatitis report 2017* de l'Organisation Mondiale de la Santé.

1.3.2.3 Diagnostics

Le diagnostic est rarement effectué pendant la phase aiguë en raison de l'absence de symptômes. Les dépistages sont réalisés lors d'une suspicion d'infection (par exemple en cas d'antécédents de toxicomanie ou si les taux d'enzymes hépatiques du sujet présentent des anomalies), lors d'un don de sang ou d'une grossesse.

Le diagnostic est possible par sérologie, via la détection d'anticorps anti-HCV. Toutefois, ces anticorps ne se manifestent qu'après plusieurs semaines d'infection, et le résultat doit être confirmé par un second prélèvement. Les anticorps anti-HCV peuvent être le reflet d'une infection aiguë, chronique, ou d'une ancienne infection éliminée par l'immunité. La méthode par qPCR renseigne sur la présence du virus et donne une valeur quantitative de la charge virale. Par ailleurs, ce test est positif dès le premier jour de l'infection.

1.3.2.4 Traitements

Le traitement de l'hépatite C n'est préconisé qu'en cas de fibrose grave, d'inflammation importante, de comorbidité ou d'un projet de grossesse.

Depuis les années 2000, un traitement à base d'IFN α pegylé et de ribavirine est disponible. L'interféron induit une réponse antivirale nécessaire à l'inhibition de la réplication du virus dans les cellules hôtes, ainsi qu'à l'activation du système immunitaire du patient. La ribavirine, un analogue de la guanosine, inhibe la réplication du virus. Ce traitement présentait un taux de succès bas (environ 50% selon le génotype), un prix très élevé et de nombreux effets secondaires parfois graves.

Depuis les années 2010, de nouveaux traitements sont disponibles, agissant directement sur le virus. Ces agents antiviraux directs (DAA, Direct Antiviral Agent) ciblent les protéines non structurales du virus (comme la polymérase NS5B pour le sofosbuvir). Ces molécules sont utilisées en combinaison entre elles et avec les anciens traitements afin d'éviter l'acquisition de résistances par le virus. Un autre avantage est d'éviter l'usage d'interférons, responsables des effets secondaires.

En parallèle, un inhibiteur du miRNA miR-122, cofacteur de la réplication du virus, est actuellement en essai clinique de phase II.

En cas d'insuffisance hépatique grave ou de carcinome, une transplantation hépatique est recommandée, mais l'infection du greffon est fréquente.

1.3.3 La réponse antivirale

1.3.3.1 Généralités sur la réponse antivirale innée

La réponse antivirale innée est principalement orchestrée par les lymphocytes NK, agissant par deux mécanismes : l'activation de la voie des interférons et la cytotoxicité (revue de Heim, 2014). La présence du virus est identifiée grâce aux PRM, notamment par les senseurs à l'ARN. Le bras humoral de l'immunité innée est porté par les interférons qui induisent la protection des cellules par l'expression de gènes antiviraux, tandis que le bras cellulaire consiste en la lyse des cellules infectées par les lymphocytes NK. La figure 9 résume cette protection depuis la détection du virus jusqu'à l'expression des gènes antiviraux.

1.3.3.2 Détection des virus à ARN

Parmi les différents senseurs de l'immunité innée décrits précédemment, seuls quelques-uns sont capables de détecter les virus à ARN. En revanche, comme évoqué précédemment, cette détection est redondante afin de parer à d'éventuelles mutations ou inhibitions. En effet, la lutte entre le système immunitaire et les virus est comparée à une course à l'armement : l'organisme peut détecter un large spectre de ligands, mais les virus peuvent muter rapidement, et si l'organisme prend pour cible des motifs invariants, alors les virus développent, par pression de sélection, des inhibiteurs de la détection ou de la réponse immunitaire (Hoffmann, 2015).

Le génome des virus à ARN peut être détecté dans le cytoplasme des cellules infectées par le senseur RIG-I et la famille des RLR (Sumpter, 2005 ; Loo, 2006). Ces molécules se lient à l'ARN double brin et discriminent, respectivement, l'ARN du soi et du non soi (absence ou présence d'extrémités 5' triphosphorylées ; Pichlmair, 2006). RIG-I se fixe sur un motif très conservé du génome viral, nécessaire à la réplication des virus à ARN (Friebe, 2002). Ne pouvant esquiver cette détection, les virus ont développé d'autres stratégies, présentées plus loin. L'activation de RIG-I induit une signalisation intracellulaire via MAVS, puis NF- κ B et IRF3, aboutissant à la transcription des ARNm codant pour les interférons de type I.

Les TLR sont également impliqués dans la reconnaissance des composants viraux. Les protéines des capsides virales peuvent être détectées à la surface des cellules par TLR2, en complexe avec TLR1 ou TLR6 (Dolganiuc, 2004 ; Shepardson, 2017). Les ARN viraux sont détectés par les TLR endosomiaux spécifiques de l'ARN simple brin, à savoir TLR7 pour les pDC et TLR8 pour les cellules myéloïdes (Lund, 2004), ainsi que par TLR3, qui reconnaît l'ARN bicaténaire. TLR7/8 induisent une signalisation via la protéine adaptatrice Myd88, qui déclenche une réponse antivirale via IRF7 et pro-inflammatoire via NF- κ B (Ablasser, 2009). TLR3 est présent dans la majorité des populations cellulaires et initie une réponse antivirale relayée par TRIF et IRF3 (Wang, 2009).

TLR3 et RIG-I sont activés lors de l'infection par des virus à ARN simple brin du fait de la synthèse d'un intermédiaire de réplication double brin (Le Goffic, 2007). Toutefois, certains virus masquent leurs ARN double brin, détournent des coiffes 5' des cellules hôtes, ou ne gardent leurs intermédiaires de réplication que de façon très transitoire (Wisskirchen, 2011). Ceci rend leur détection difficile en laboratoire, et a conduit à croire que les virus à ARN simple brin de polarité négative ne passeraient pas par un stade double brin. L'utilisation d'un anticorps anti-dsRNA a finalement permis de confirmer la présence de ces intermédiaires de réplication (Son, 2015).

NLRP3 a deux fonctions antagonistes lors d'une infection virale. D'une part, il permet de détecter les ARN viraux (Allen, 2009) et d'induire une réponse inflammatoire protectrice via l'activation de la caspase-1 et de l'inflammasome (Thomas, 2009). D'autre part, il est détourné par le virus HCV, qui emploie l'activation de SREBP, en aval de NLRP3, pour activer le métabolisme lipidique nécessaire à sa réplication (McRae, 2016).

1.3.3.3 Les facteurs de transcription IRF

Les différents senseurs d'une infection virale vont tous aboutir à l'activation de certains facteurs de transcription de la famille IRF (Interferon-regulatory factor), responsables de l'expression des gènes des interférons. Les IRF sont au nombre de 9, mais deux d'entre-eux, IRF3 et IRF7, sont principalement impliqués dans la réponse aux virus à ARN. Les membres de cette famille de facteurs

de transcription (revue de Ikushima, 2013) portent tous un domaine DBD reconnaissant la séquence consensus GAAANNGAAA présente dans les séquences ISRE (Interferon-Stimulated Response Element), qui sont retrouvées dans les promoteurs des gènes codant pour les interférons. Ils portent également un domaine IAD, existant sous deux formes, IAD1 dans les IRF 3 à 9, et IAD2 dans les IRF1 et IRF2. Ces motifs sont responsables du type de liaison protéine-protéine que va pouvoir effectuer le facteur de transcription, et déterminera sa fonction activatrice ou inhibitrice de la transcription. IRF3, IRF5 et IRF7 comportent des sites de phosphorylation (cibles de TBK1 et IKKε) qui leur permettent d'être adressés au noyau, les autres devant interagir avec des partenaires protéiques. Une fois dans le noyau, les IRF interagissent avec des cofacteurs (par exemple CBP et p300) pour induire l'expression des gènes inflammatoires et antiviraux sous la dépendance de l'ISRE, notamment l'IL-12 et les interférons.

1.3.3.4 Les interférons et leur récepteurs

Les interférons sont des cytokines, évolutivement proches des interleukines de la famille de l'IL-10, et qui possèdent des effets pléiotropiques. Ils sont organisés en sous-familles, désignées par des lettres grecques (α , β , γ , ϵ , κ , λ et ω), et regroupées en trois types. Les interférons de type I sont constitués de la famille de l'IFN α (13 membres) et des IFN β , IFN ϵ , IFN κ et IFN ω . Les interférons de type II ne sont représentés que par l'IFN γ , tandis que les interférons de type III sont l'ancienne famille de l'IL-28, renommés IFN λ (revue de Hoffmann, 2015). La proximité génétique entre les différents interférons est présentée dans la figure 10.

1.3.3.4.1 Les interférons de type I

Tous les interférons de cette famille partagent le même récepteur, formé d'un hétérodimère des récepteurs à activité tyrosine kinase, IFNAR1 et IFNAR2 (De Weert, 2007). Ces récepteurs membranaires, après fixation de leur ligand, s'associent par paire et se phosphorylent mutuellement, ce qui conduira à la phosphorylation des molécules STAT et, finalement, à la transcription de gènes antiviraux. Les interférons sécrétés permettent notamment de protéger les cellules avoisinantes n'ayant pas encore été en contact avec le virus.

Les gènes des IFN α sont réunis en un locus unique situé sur le chromosome 9 (9p21), et le gène de l'IFN β est localisé en position 9p22, suggérant une origine commune récente (Diaz, 1995). Les ARNm des interférons de type I ont une organisation très semblable entre eux, notamment une absence d'introns et une taille voisine. Les gènes codant pour les sous-unités du récepteur IFNAR partagent un locus commun (21q22) avec ceux des chaînes des récepteurs pour les types II et III (Lutfalla, 1990).

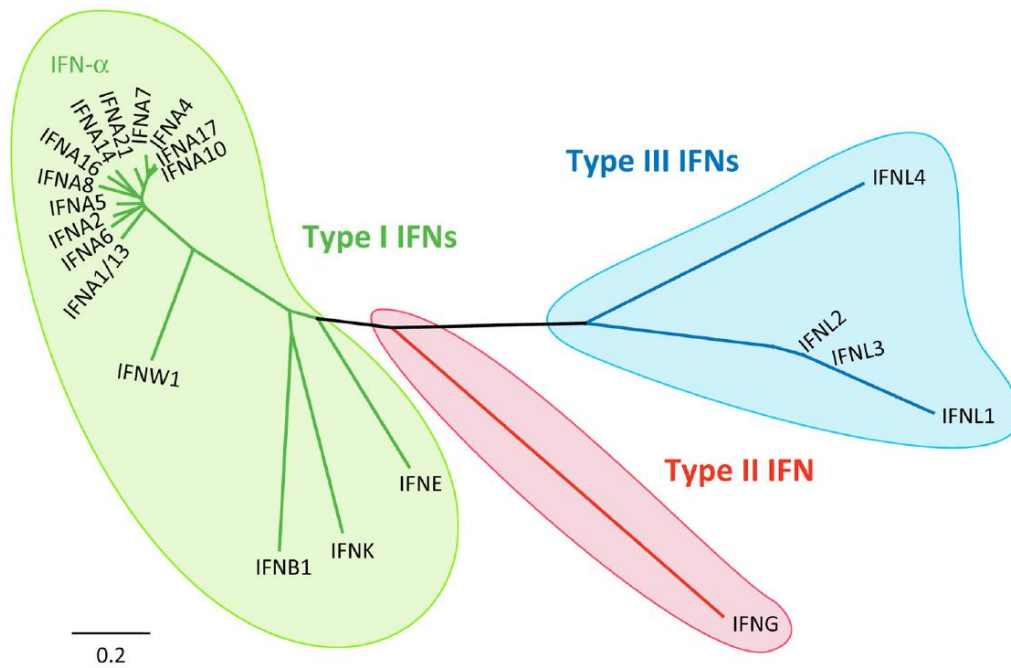


Figure 9. Arbre phylogénétique des interférons. Comparaison des séquences protéines des interférons humains. La distance est exprimée en moyenne de substitutions par site. (Issu de Hoffmann, 2015 ; généré par le logiciel Geneious).

La signalisation en aval d'IFNAR, relayée par les kinases JAK-1 et TYK-2, conduit à la phosphorylation de STAT1 et STAT2, qui vont s'associer entre eux ainsi qu'à la protéine IRF9. Cet ensemble, appelé ISGF3 (Fu, 1990), induit l'expression des ISG (Interferon-stimulated genes), un groupe hétérogène d'un millier de gènes environ ayant pour fonction d'interférer avec l'infection virale. Les phosphorylations de STAT1 et STAT3 vont induire l'expression de molécules pro-inflammatoires. Des gènes anti-inflammatoires sont également exprimés, probablement pour contrôler l'amplitude de la réponse antivirale.

1.3.3.4.2 L'interféron de type II

Le type II n'est représenté que par la protéine IFN γ . Son gène est situé sur le locus 12q24 et celui de son récepteur dans le cluster 21q22. La forme active de l'IFN γ est un homodimère. Véritable chef d'orchestre de la réponse antivirale, l'IFN γ active les cellules immunitaires et potentialise les effets des interférons de type I. Le rôle de cet interféron n'est pas d'une importance centrale pour cette étude, aussi, pour plus d'informations, ses propriétés sont résumées dans (Schroder, 2004).

1.3.3.4.3 Les interférons de type III

Les interférons de type III, constitués par la famille des interférons lambda, sont aussi connus sous les noms IL-28A, IL-28B et IL-29 (Sheppard, 2003). Un nouveau membre a été identifié plus récemment, sous le nom d'IFNL4 (Prokunina-Olsson, 2013). Les gènes codant pour cette famille d'interférons se trouvent au locus 19q13. Leur récepteur est hétérodimérique, composé d'une chaîne commune à d'autres cytokines de classe II, IL-10R2 (présent dans le cluster 21q22), et de la chaîne IFNLR1 (situé sur le chromosome 1), aussi appelée IL-28RA (Kotenko, 2003).

Les interférons de type III ont des fonctions partagées avec les interférons de type I, toutefois sur des populations cellulaires différentes. Alors que la plupart des cellules de l'organisme sont capables d'initier une réponse antivirale suite à une stimulation par les interférons de type I, le récepteur IL-28RA est principalement exprimé par les cellules épithéliales (Sommereyns, 2008). L'ensemble des fonctions des IFN de type III reste encore à explorer. Cependant, leur importance dans le contexte d'une infection virale semble confirmée par une étude montrant que des polymorphismes des gènes codant pour l'IFN λ 3 seraient associés à la clairance virale ou à l'établissement d'une infection chronique par HCV (Ge, 2009).

1.3.3.5 Les ISG

Le terme ISG regroupe une famille de plus de 1000 gènes dont l'expression confère aux cellules un phénotype antiviral. Ils ont pour rôle d'inhiber l'infection, la réplication ou la propagation des virus (Schoggins, 2011). Comme leur nom l'indique, ces gènes sont exprimés à la suite de l'activation des interférons via IFNAR.

Quatre d'entre eux ont été utilisés dans cette étude. Parmi les premiers ISG identifiés, PKR (Protéine Kinase R, ou EIF2AK2) se lie à l'ARN double brin et stoppe sa traduction en phosphorylant eIF2 (Hovanessian, 1989). En revanche, PKR stabilise l'ARNm des interférons de type I, ce qui va renforcer le potentiel antiviral de la cellule (Schulz, 2010). La protéine MXA agit comme inhibiteur précoce de l'entrée du virus, en s'associant aux composants de la particule virale et en empêchant la transcription de son génome (Gao, 2010). Il s'agit d'une GTPase proche de la dynamine, dont les effets reposent sur sa capacité à former des oligomères. ISG15 se fixe aux protéines virales, agissant comme une ubiquitine en adressant ces protéines vers un processus de dégradation appelé ISGylation. Son rôle est notamment rapporté pour les virus à ARN (Lenschow, 2007). L'Apolipoprotéine 6 a également été associée à un effet antiviral (Schoggins, 2011), ainsi qu'à l'induction de l'apoptose (Liu, 2005).

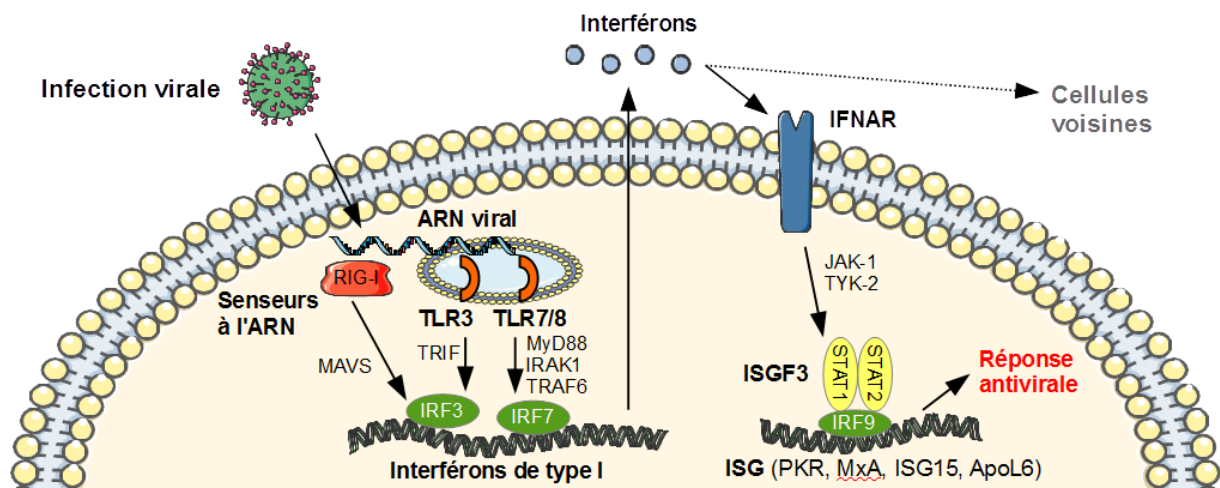


Figure 10. Mise en place de la réponse antivirale par les interférons. Suite à la détection des constituants viraux (l'exemple pris ici concerne l'ARN), les gènes codant pour les interférons de type I sont activés. Les interférons sont sécrétés et, une fois liés à leur récepteur IFNAR, le complexe ISGF3 va induire l'expression des ISG et conférer un statut antiviral aux cellules avoisinantes. (figure réalisée à l'aide de la banque d'images Servier Medical Art).

1.3.3.6 La réponse antivirale adaptative

L'immunité adaptative a un rôle important au cours de la phase aiguë de l'infection par HCV, puisqu'elle serait responsable du type d'évolution de la maladie (clairance hépatique du virus ou chronicisation de l'infection), bien que de nombreux points restent à élucider (Thimme, 2001).

La réponse adaptative concerne principalement la production d'anticorps contre les constituants viraux. Cependant, la plupart des anticorps produits ne sont pas efficaces en raison des nombreux mécanismes d'échappement mis en place par le virus. Les anticorps aptes à neutraliser effectivement le virus seraient impliqués dans l'élimination du virus après l'infection aiguë ; toutefois, leur absence ne signifie pas que la pathologie évoluera vers la chronicité.

La mise en place d'une réponse adaptative de type lymphocytaire T est également liée à l'évolution de la maladie. Les lymphocytes T CD4⁺ sont associés à un pronostic favorable s'ils produisent de l'IL-17 et de l'IL-21, et les lymphocytes T CD8⁺ sont liés à la clairance du virus s'ils sécrètent de l'IFN γ . La réponse cytolytique des lymphocytes T CD8⁺ ne semble protectrice que dans une moindre mesure. Les raisons pour lesquelles ces mécanismes conduisent ou non à la clairance du virus restent méconnues. En effet, si l'expression des interférons de type II et III est corrélée à une protection durant la phase aiguë de la pathologie, ce n'est pas le cas pour les interférons de type I, alors que ces cytokines sont utilisées comme traitement et sont efficaces dans la plupart des cas.

1.3.3.7 Échappement du HCV au système immunitaire

Pour contrer la protection induite par le système immunitaire, le virus de l'hépatite C a développé différentes stratégies lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire innée. Plusieurs protéines virales disposent de propriétés activatrices ou inhibitrices de l'activité de protéines de l'hôte, aboutissant à la mise en échec de la protection antivirale. D'autres mécanismes existent indépendamment d'une interaction protéique, tels que la dissimulation des PAMP au sein de structures membranaires, ou la grande variabilité des antigènes à la surface des particules virales. Ces mécanismes sont résumés dans (Horner, 2009).

La protéine NS3 est capable de cliver, comme évoqué précédemment, l'adaptateur TRIF en aval de TLR3, ce qui altère la signalisation suite à la détection d'ARN viral double brin. NS3 clive aussi MAVS, impliqué dans la signalisation entre le senseur RIG-I et les IRF. La protéine virale core, pour sa part, inhibe la phosphorylation de STAT1 et STAT3, ce qui empêche la formation du complexe ISGF3 en aval d'IFNAR. Cette protéine peut également activer SOCS3, une enzyme de l'hôte inhibant l'action des kinases JAK1 et TYK2, ce qui réduit la signalisation de la voie des STAT et l'expression des ISG. Les ISG eux-mêmes peuvent être ciblés par les protéines virales. Ainsi, NS4A peut inhiber l'action d'OAS et de la protéine kinase R, des enzymes clés dans la réponse antivirale de la cellule.

Le virus échappe également à l'immunité adaptative en phase chronique. Des anticorps neutralisants, produits lors de la phase aiguë, peuvent être contournés par le virus par mutation des antigènes, dissimulation dans les vésicules lipidiques ou par transfert direct du virus entre deux cellules hôtes. La réponse lymphocytaire est également inhibée, notamment par « l'épuisement » des lymphocytes T CD8+, qui ne produisent plus d'IFN γ . Cet état s'acquiert en raison de la durée de la réponse immunitaire, qui aboutit à une expression prédominante des molécules inhibitrices, telles que PD-1, TIM-3 ou 2B4. Par ailleurs, des lymphocytes T régulateurs sont retrouvés dans le foie de patients en phase chronique, ainsi que des lymphocytes T CD8+ produisant la cytokine immunomodulatrice IL-10.

2 Contexte et objectifs

Les données récentes de la littérature suggèrent que la molécule IL-26 présente des propriétés non conventionnelles pour une cytokine, telles que la capacité à se lier à l'ADN et faciliter son internalisation dans certains types de cellules, ainsi qu'une activité antimicrobienne directe, similaire à celle des AMP, capables de former des pores dans la membrane de bactéries. Ces données ont conduit à réévaluer les propriétés de l'IL-26 au regard de ces nouvelles activités, indépendantes du système immunitaire.

Des travaux précédents du laboratoire avaient montré que l'IL-26 est surexprimée chez les patients présentant une infection chronique par HCV et qu'elle jouerait un rôle antiviral en activant les cellules NK (Miot, 2015). Cette étude reposait sur la vision classique des propriétés biologiques de l'IL-26. Cependant, des données expérimentales suggéraient déjà, à l'époque, que l'IL-26 pouvait présenter d'autres activités, avec notamment la mise en évidence de sa présence dans les hépatocytes de patients infectés par HCV (Figure 11), alors que ces cellules n'expriment pas l'ARNm correspondant.

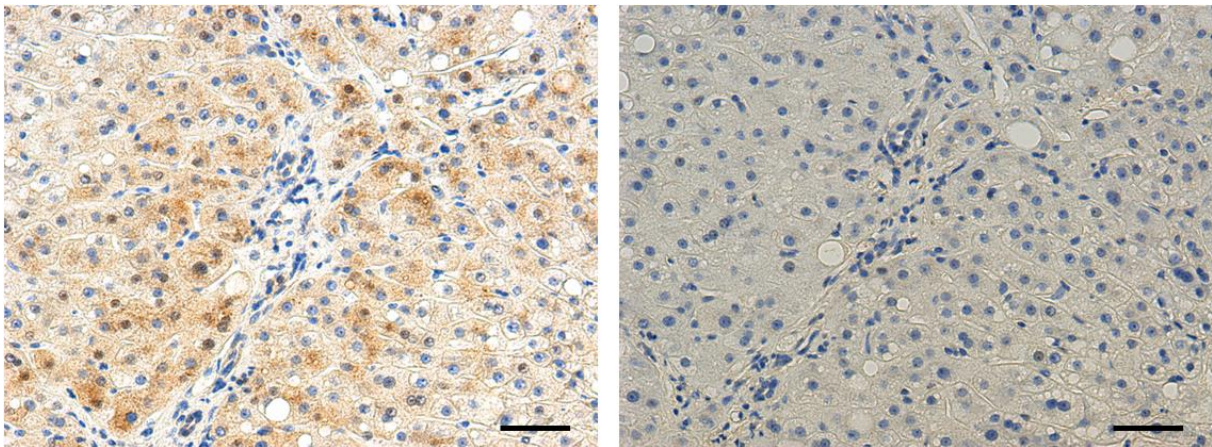


Figure 11. Accumulation d'IL-26 dans les hépatocytes infectés. Analyse de l'expression de l'IL-26 (en marron) et de l'ADN (en bleu) par immunohistochimie. À gauche, coupe de foie de patient infecté par HCV, à droite, coupe de foie de sujet sain. Adapté de Miot et al., 2015. Échelle graphique = 50 μ m.

L'existence d'une ou plusieurs autres activités antivirales de l'IL-26 est soutenue par l'étude du groupe de H. Fickenscher montrant que l'IL-26 est capable de moduler l'efficacité d'une infection virale *in vitro* (Braun, 2013). Toutefois, les résultats contradictoires de cette étude ne permettaient pas de dégager une activité antivirale ou pro-virale claire, pas plus qu'elle ne permettait de proposer un mécanisme d'action.

L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer *in vitro* l'hypothèse d'une activité antivirale directe, indépendante du système immunitaire, et d'en préciser, le cas échéant, le(s) mécanisme(s) mis en jeu.

En collaboration avec l'unité INSERM 966, nous avons utilisé un modèle d'infection virale *in vitro*. Ce modèle repose sur l'utilisation d'une souche de virus HCV optimisée, appelée JFH-1 (Wakita, 2009), dérivée d'une souche du génotype 2a causant une hépatite C fulminante. Par plusieurs cycles de sélection, le potentiel d'infection et de réplication de ce virus a été optimisé en laboratoire. La lignée cellulaire Huh7.5 a été utilisée comme cellule hôte, en raison de sa permissivité pour le virus. Cette lignée, isolée en 1982 d'un patient japonais souffrant d'hépatocarcinome, est la principale lignée utilisée pour étudier *in vitro* l'infection par HCV (la sélection du virus JFH-1 a notamment été effectuée sur cette lignée). Dérivée de la lignée mère Huh7 qui est mutée sur le récepteur TLR3 (Li, 2005), la lignée Huh7.5 est également mutée sur RIG-I (Sumpter, 2005), ce qui la rend encore plus permissive à l'infection en raison d'une détection déficiente de l'ARN viral.

Sur la base des données de la littérature et du laboratoire sur la capacité de l'IL-26 à interagir avec les acides nucléiques (Meller, 2015 ; Poli, 2017), nous avons émis l'hypothèse que l'IL-26 pourrait également interagir avec les ARN viraux. Cette hypothèse est soutenue par des données de la littérature, notamment le fait que l'IL-26 dispose de propriétés communes avec les peptides antimicrobiens, dont certains peuvent inhiber la réplication des virus (Bergman, 2007).

3 Résumé des résultats

3.1 L'IL-26 protège les hépatocytes de l'infection *in vitro* par HCV

La première étape de ce travail a été d'évaluer la capacité de l'IL-26 à moduler *in vitro* la réplication du virus HCV dans les cellules Huh7.5.

Un prétraitement des cellules avant l'infection n'induit pas de protection (Figure 12.A). Toutefois, la charge virale des cultures prétraitées 40 heures avec 100 ng/mL d'IL-26 est inférieure (d'un facteur 100) à celle des cellules non traitées au premier temps de mesure (3 jours). Cette observation suggérait un effet protecteur qui était perdu après élimination de la molécule (par changement de milieu de culture avant d'ajouter le virus). L'IFN α , utilisé comme contrôle de protection, maintient la charge virale au niveau du bruit de fond.

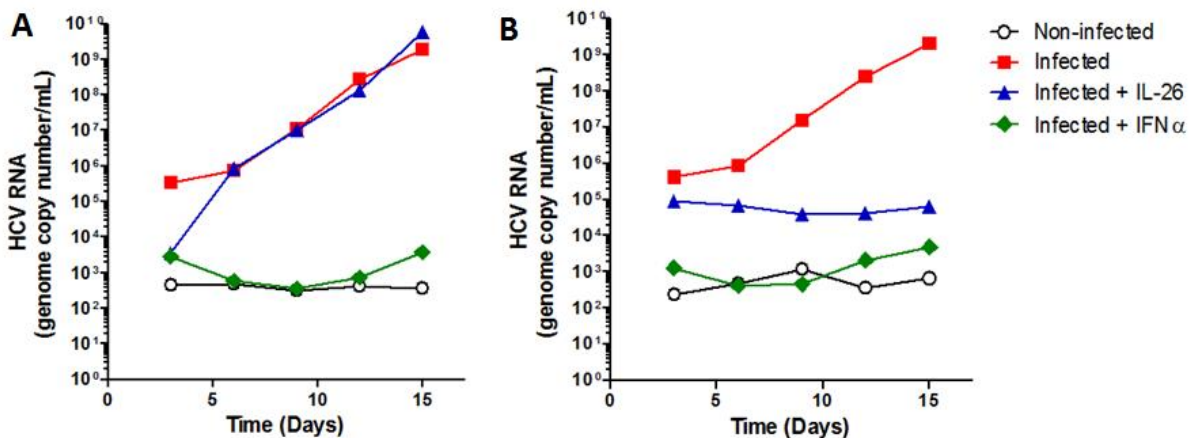


Figure 12. IL-26 réduit la charge virale dans les hépatocytes Huh7.5 infectés par HCV. Les cellules de la lignée Huh7.5 ont été traitées ou non par 100 ng/mL d'IFN α ou d'IL-26 pendant 40 h avant l'infection avec 2×10^4 PFU de souche optimisée JFH-1 pendant 12 heures. Les traitements ont été **(A)** interrompus après l'infection ou **(B)** maintenus jusqu'au jour 9 post-infection. Les cellules ont été décollées par trypsine et remises en culture tous les trois jours. La charge virale a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en nombre de copies du génome viral par mL de milieu de culture. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes.

Un traitement continu d'IL-26 a alors été effectué, c'est-à-dire en traitement pendant 40 heures avant l'infection à 100 ng/mL, ainsi qu'à chaque passage des cellules jusqu'à J9 post-infection à la même concentration. Dans cette condition, l'IL-26 prévient la réplication du virus (Figure 12.B). Bien que l'IL-26 limite la charge virale (à 10⁵ copies par mL de milieu de culture), elle ne permet pas d'éliminer totalement le virus, au contraire de l'IFN α . Un traitement continu d'IL-26 sans

prétraitement n'induit pas de protection des cellules, suggérant que l'IL-26 ne peut contrôler une infection établie. Par ailleurs, le traitement par l'IL-19, autre cytokine de la famille de l'IL-26 mais ne présentant pas ses caractéristiques physicochimiques, ne réduit pas la charge virale.

La différence de protection entre l'IL-26 et l'IFN α laisse supposer que les mécanismes mis en jeu sont différents pour ces deux molécules.

Nous avons alors évalué plusieurs hypothèses pour identifier le ou les mécanismes par lesquels l'IL-26 contrôle l'infection virale.

3.2 L'IL-26 n'induit pas l'expression des ISG par les cellules de la lignée Huh7.5

Premièrement, nous avons analysé par qPCR l'hypothèse d'une protection des hépatocytes par l'induction de l'expression de gènes antiviraux (MXA, PKR, ISG15 et APOL6) par l'IL-26. Les gènes choisis sont des gènes connus pour être exprimés suite à l'infection par HCV (MacQuillan, 2003).

Ces gènes ne sont exprimés ni dans les cellules non infectées, ni dans les cellules infectées (Figure 13), un résultat cohérent avec le fait que la détection du virus soit déficiente dans les cellules Huh7.5. L'IFN α induit l'expression de ces ARNm, montrant que les cellules ont gardé la capacité d'exprimer ces gènes antiviraux. Au contraire, l'IL-26 n'induit pas l'expression des ARNm codant pour MXA, PKR, ISG15 et APOL6, suggérant que la protection induite par l'IL-26 n'est pas dépendante de ce mécanisme. Ce résultat reste cohérent avec le fait que les profils de protection soient différents entre ceux induits par l'IFN α et par l'IL-26.

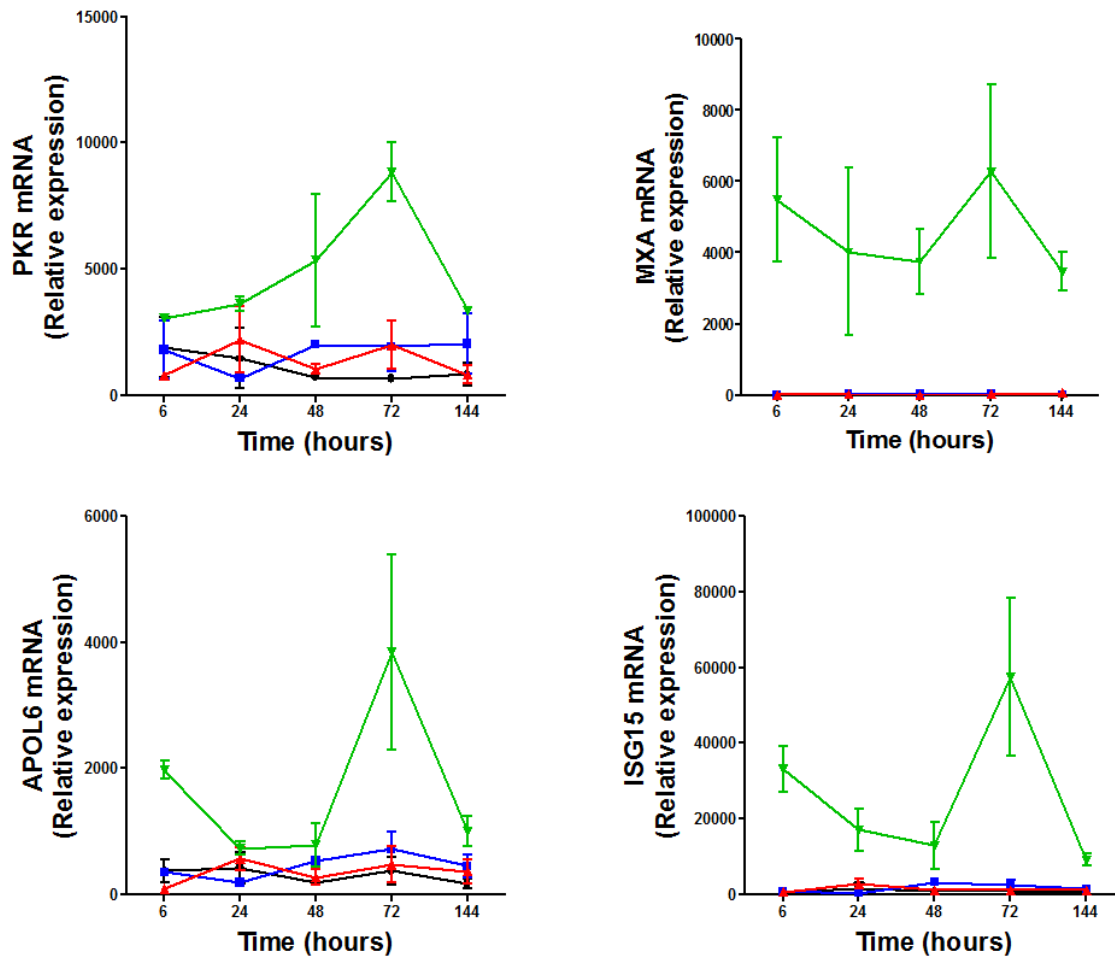


Figure 13. IL-26 n'induit pas l'expression de gènes antiviraux. Les cellules de la lignée Huh7.5 ont été traitées ou non par 100 ng/mL d'IFN α ou d'IL-26 pendant 40 h avant une infection de 12 heures avec 2×10^4 PFU de souche optimisée JFH-1. Les traitements ont été maintenus jusqu'à J9. L'expression de PKR, MXA, APOL6 et ISG15 a été évaluée par RT-qPCR après 6 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 6 jours d'infection. Les résultats sont exprimés en expression relative à la GAPDH $\times 100000$ (moy \pm EM, n=2).

3.3 L'IL-26 n'inhibe pas l'entrée des virions dans les hépatocytes

La deuxième hypothèse que nous avons évaluée était la possible inhibition de l'entrée des particules virales dans les hépatocytes, en raison de ses caractéristiques physicochimiques particulières. Cette hypothèse reposait sur l'observation de l'équipe du Pr Fickenscher en 2013 montrant que l'IL-26 module l'infection *in vitro* par différents virus. Chargée positivement, la protéine pourrait se fixer aux membranes des cellules hôtes ou des virus enveloppés, perturbant ainsi l'infection. Cette hypothèse a été évaluée en utilisant des pseudoparticules virales infectieuses, constituées des glycoprotéines d'enveloppe issues des génotypes 1a, 1b, 2a et 3 de HCV, et porteuses du gène codant pour la luciférase. La mesure de l'expression du gène rapporteur permet d'évaluer la capacité des particules virales à infecter les cellules hôtes.

Les résultats montrent que l'IL-26 n'affecte pas l'entrée des pseudoparticules dans les hépatocytes (Figure 14). L'IFN α n'inhibe pas non plus l'infection des hépatocytes par les pseudoparticules virales.

Au contraire, des anticorps neutralisants dirigés contre la protéine virale E2 ou la protéine membranaire CD81, responsables de la reconnaissance entre le virus et sa cellule cible, diminuent bien l'expression du gène rapporteur. Cette expérience montre que l'IL-26 n'agit pas sur la phase d'entrée du virus.

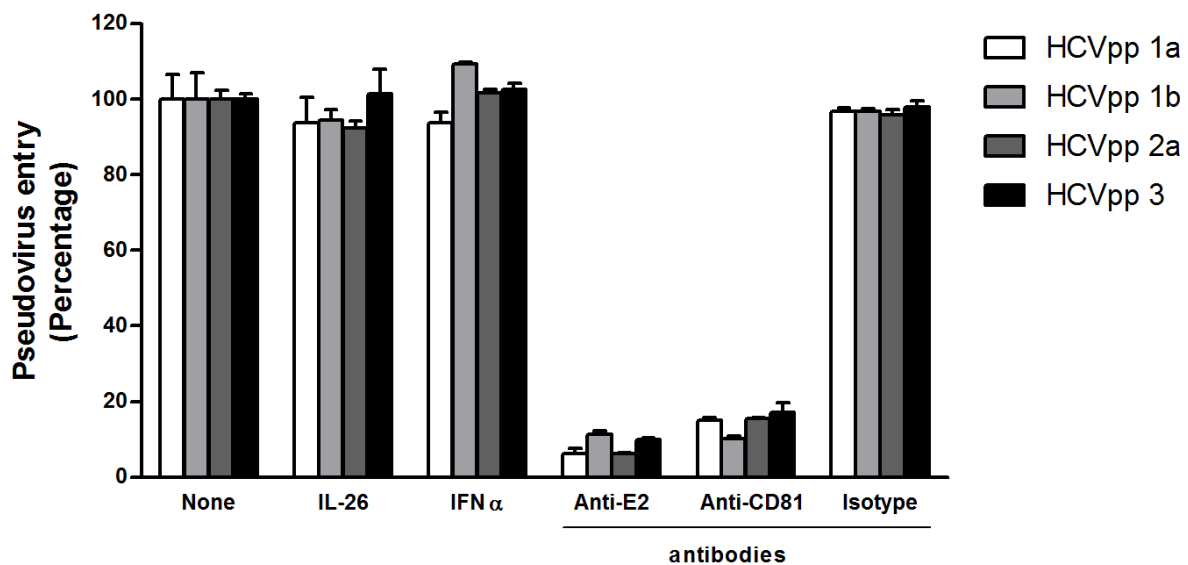


Figure 14. IL-26 n'inhibe pas l'entrée des pseudoparticules virales. Les pseudoparticules ont été incubées 1 heure avec 100 ng/mL d'IFN α ou d'IL-26, ou avec 5 μ g/mL d'anticorps anti-E2, anti-CD81 ou d'anticorps contrôle. Les pseudoparticules, traitées ou non, ont alors été utilisées pour infecter 10^4 cellules Huh7 pendant 6 heures à 37°C. L'activité de la luciférase a été évaluée trois jours post-infection. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la condition contrôle (pseudoparticules virales non traitées). (moy \pm EM, n=2).

3.4 L'IL-26 se fixe à l'ARN viral

La troisième hypothèse repose également sur les caractéristiques physicochimiques de l'IL-26. Suite aux précédentes études qui rapportent une capacité de liaison à l'ADN, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-26 pourrait se lier à l'ARN viral et inhiber sa réplication. Pour s'assurer de la pertinence biologique de cette hypothèse, nous avons recherché, à différents temps après l'infection, une colocalisation entre l'IL-26 mis en traitement continu et l'intermédiaire de réplication double brin de l'ARN viral dans les hépatocytes Huh7.5 infectés *in vitro*.

Les résultats montrent que les deux molécules sont localisées dans les mêmes zones au sein des cellules infectées et traitées (Figure 15). Dans les temps précoces, l'IL-26 est détectée à proximité de

la membrane. Dans les temps plus tardifs, l'IL-26 se distribue de façon ponctiforme dans le cytoplasme, aux mêmes sites que les dsRNA viraux, supposément dans les sites de réplication « membranous web », décrits comme des vasques intracytoplasmiques (Miyinari, 2003).

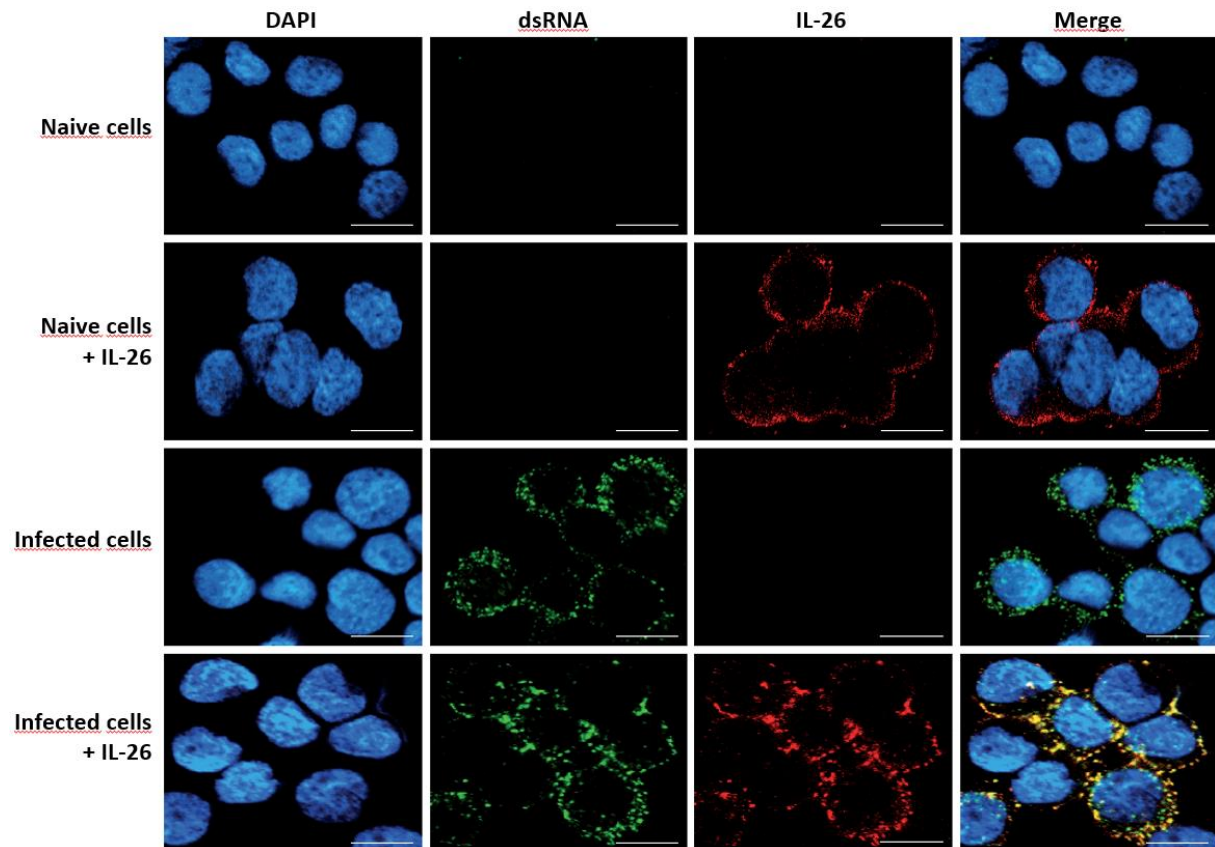


Figure 15. Co-localisation de l'IL-26 avec le dsRNA viral dans les hépatocytes infectés *in vitro*. Les cellules de la lignée Huh7.5 ont été prétraitées ou non avec 1 µg/mL d'IL-26 pendant 40 heures, puis infectés avec 2×10^4 PFU de souche optimisée JFH-1 pendant 12 heures. Après trois jours de culture, pendant lesquels l'IL-26 a été maintenu, les cellules ont été fixées et la localisation de l'IL-26 et de l'ARN viral bicaténaire a été évaluée par microscopie confocale à l'aide des anticorps anti-IL-26 (Alexa 594, coloration rouge) et anti-dsRNA (Alexa 488, coloration verte). Les noyaux sont colorés au DAPI (coloration bleue). Barre d'échelle, 20 µm.

Les données de localisation intracellulaire de l'IL-26 et des dsRNA étaient en faveur d'une possible interaction entre l'IL-26 et les intermédiaires de réplication de HCV. Afin de valider cette hypothèse, nous avons évalué une potentielle interaction directe entre l'IL-26 et l'ARN.

Un site de liaison à l'ARN a été prédit par modélisation bioinformatique (Figure 16.A). Cette liaison a été confirmée par une expérience de fixation en phase solide (Figure 16.B), qui révèle que l'IL-26 est capable de se lier à l'ARN viral, et de manière plus importante à l'ARN bicaténaire.

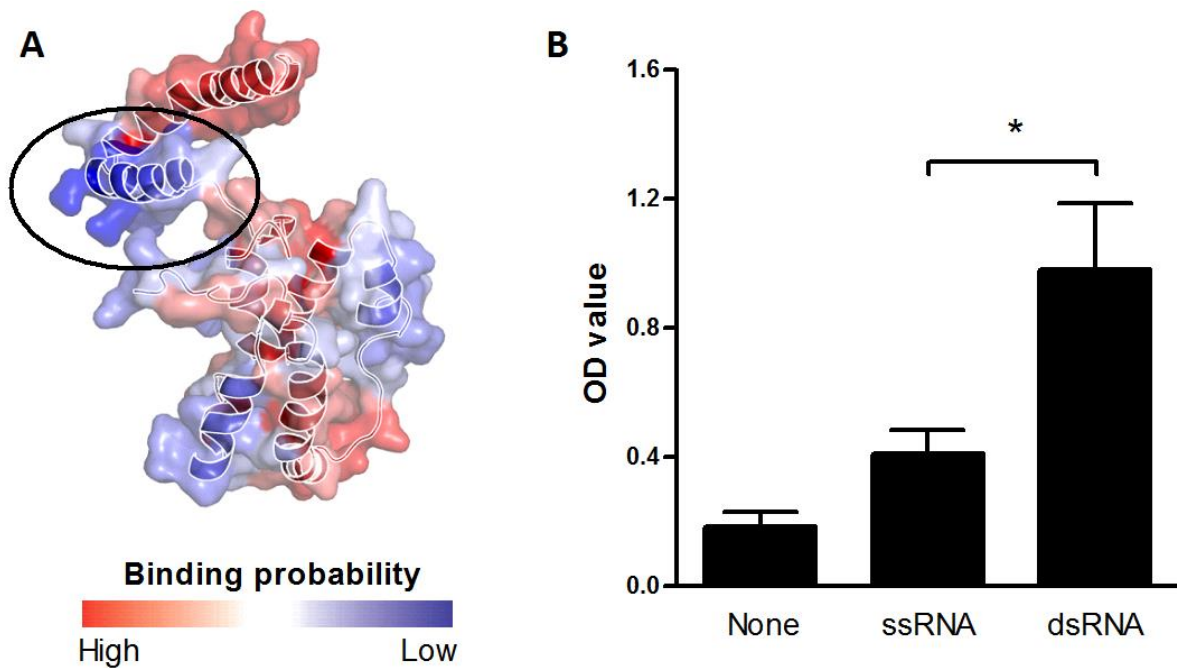


Figure 16. IL-26 se lie à l'ARN viral. (a) Modélisation tridimensionnelle de l'IL-26, basée sur le cristal de l'IL-10, par le logiciel Modeller. Un site de fixation à l'ARN a été prédit au sein de l'hélice E par le logiciel KYG (cercle noir). **(b)** 1 µg d'ARN viral simple brin (ssRNA) ou double brin (dsRNA) a été immobilisé puis mis à incuber avec 20 ng d'IL-26. L'IL-26 lié a été détecté via un anticorps anti-IL-26 biotinylé, révélé par le complexe streptavidine-HRP. Les résultats sont exprimés en valeurs de densité optique (moy ± EM, n=3).

3.5 L'IL-26 inhibe *in vitro* la réplication de l'ARN viral

Nous avons ensuite évalué les conséquences de la fixation de l'IL-26 aux ARN viraux sur la réplication virale. Les deux phases ont été analysées, à savoir, d'une part, la synthèse du brin complémentaire servant d'intermédiaire de réplication à partir d'un ARN viral simple brin et, d'autre part, la néosynthèse d'ARN génomique viral à partir de l'intermédiaire ARN bicaténaire.

Les résultats montrent que, dans les deux cas, l'IL-26 inhibe la réplication du brin d'ARN viral matrice (Figure 17). Pour cette expérience, la polymérase à ARN dépendante de l'ARN du phage φ6 a été employée, en raison de l'indisponibilité d'une polymérase NS5B commerciale biologiquement active.

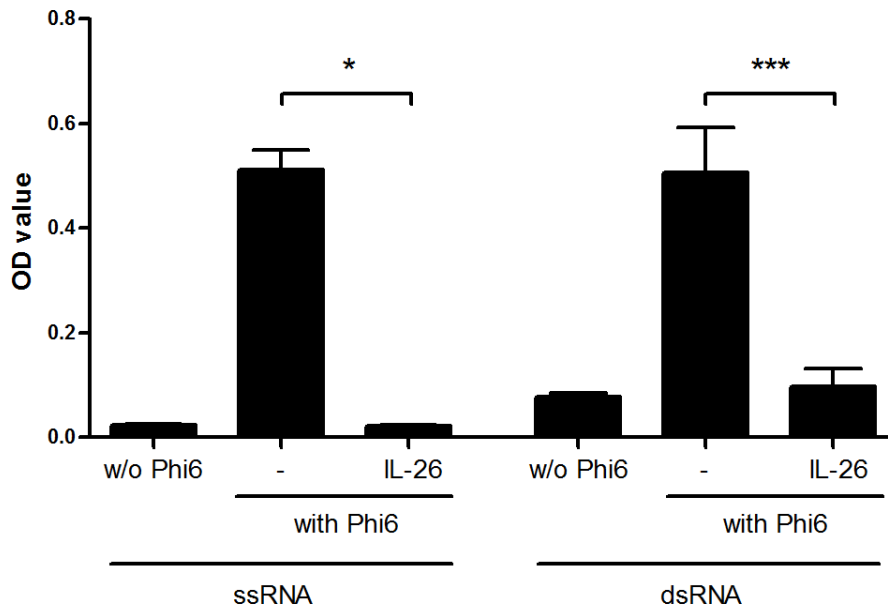


Figure 17. IL-26 inhibe *in vitro* l'activité de la polymérase du phage $\phi 6$. 100 ng d'ARN viral simple ou double brin, incubés ou non avec 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'IL-26, ont servi de matrice pour la transcription *in vitro* par la polymérase ARN dépendante de l'ARN du phage $\phi 6$. La néosynthèse du brin complémentaire a été évaluée en mesurant l'incorporation de CTP biotinylés, révélé par le complexe streptavidine-HRP. Les résultats sont exprimés en valeurs de densité optique (moy \pm EM, n=3 pour le ssRNA, n=7 pour le dsRNA).

3.6 L'IL-26 rend l'ARN pro-inflammatoire

Les complexes formés d'ADN et d'IL-26 ont des propriétés immunostimulantes en permettant à l'ADN extracellulaire d'entrer en contact avec les senseurs aux acides nucléiques intracellulaires (Meller, 2015 ; Poli, 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'IL-26 pourrait également favoriser la mise en place d'une réponse antivirale en agissant comme cargo pour présenter l'ARN viral aux senseurs à l'ARN.

Dans une première série d'expériences, nous avons évalué la capacité de complexes formés d'IL-26 et d'ARN double brin viral (dsRNA) à activer des cellules mononucléées isolées de sujets sains par mesure de la production d'IL-6. En accord avec les résultats du laboratoire, les résultats montrent que l'IL-26 seule induit une production d'IL-6. Cependant, les complexes d'IL-26 et de dsRNA viral induisent des taux plus importants (Figure 18.A). Aucune production d'IL-6 n'est observée suite à une stimulation avec les dsRNA viraux seuls.

Ce résultat indique que l'IL-26 peut agir comme une molécule cargo pour les ARN extracellulaires, comme cela a été rapporté pour l'ADN (Meller, 2015 ; Poli, 2017) et que la présence d'une molécule cargo semble nécessaire à la reconnaissance de l'ARN par les senseurs intracellulaire.

Nous avons ensuite voulu identifier quelle(s) population(s) cellulaire(s) étai(en)t responsable(s) de la production d'IL-6 en réponse aux complexes dsRNA viral / IL-26. La production d'IL-6 par les monocytes a été évaluée en raison de leur capacité à répondre aux complexes formés d'IL-26 et d'ADN (Poli *et al.* 2017). Afin de s'affranchir du signal induit par l'IL-26 non complexée à l'ARN, mais éventuellement à des traces d'ADN extracellulaire, les cellules ont été cultivées en présence de DNase. Les résultats (Figure 18.B) montrent que les monocytes (pré-activés par l'IFN γ) produisent de l'IL-6 suite à la stimulation par les complexes dsRNA viral / IL-26.

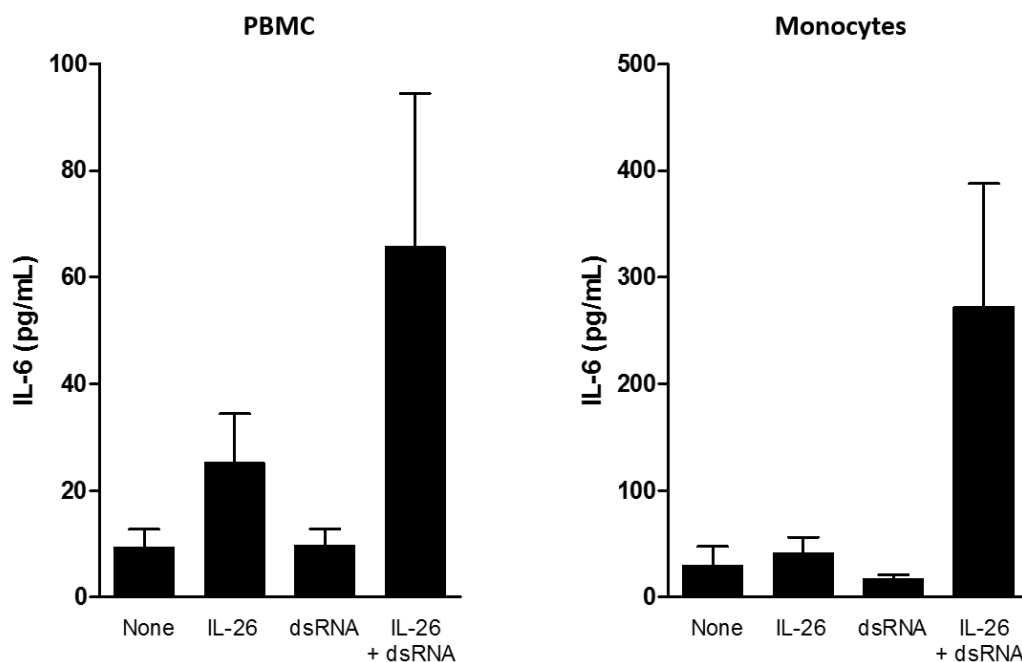


Figure 18. Les complexes composés d'ARN viral double brin et d'IL-26 induisent la production d'IL-6. À gauche, 10^6 PBMC ont été cultivés en présence d'IL-26 (100 ng/mL), d'ARNv (400 ng/mL) ou de complexes d'IL-26-dsRNA formés en pré-incubant les molécules 30 min. À droite, 10^6 monocytes ont été activés par 10 ng/mL d'IFN γ pendant 4 h, puis cultivés en présence d'IL-26, d'ARNv ou de complexes ainsi que de 10 U μ i/mL de DNase I. Après 48h d'incubation, les surnageants ont été collectés et analysés par ELISA. (moy \pm ET, n=10).

3.7 L'IL-26 induit l'expression d'IFN α par les pDC

Dans un second temps, nous avons évalué la capacité des complexes à induire la production de cytokines antivirales. Des cellules dendritiques plasmacytoïdes, principales productrices d'IFN α , ont été stimulées par les complexes et l'expression de la cytokine a été évaluée par RT-qPCR et sa sécrétion par ELISA. Les résultats montrent que les complexes induisent l'expression de l'ARNm codant pour l'IFN α (Figure 19).

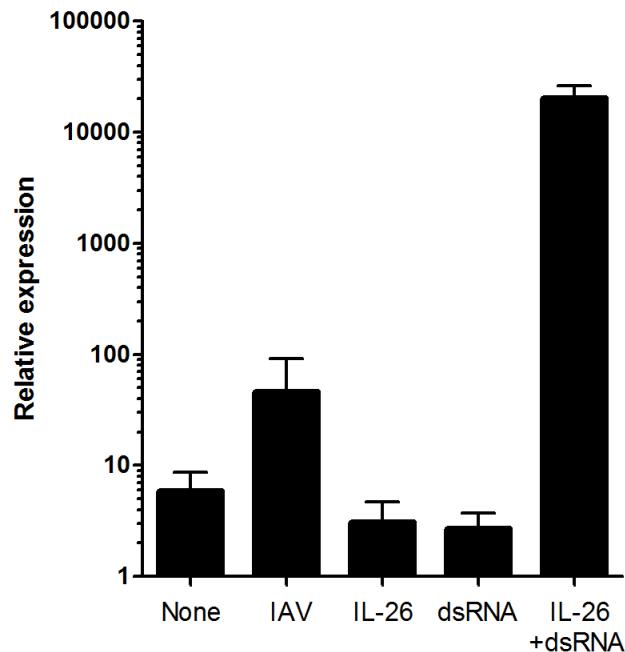


Figure 19. Les complexes d'ARN viral double brin et d'IL-26 induisent la production d'IFN α par les pDC. 10^5 pDC ont été cultivés en présence de 20 ng/mL d'IL-3 et selon les conditions d'IL-26 (100 ng/mL), d'ARNv (400 ng/mL) ou de complexes pré-incubés 30 min. Après 24 h de stimulation, les ARN messagers ont été extraits et l'expression d'IFN α a été quantifiée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en expression relative à la GAPDH $\times 100000$ (moy \pm EM, n=3).

3.8 La réponse des mdDC dépend du type d'acide nucléique complexé à l'IL-26

Nous avons ensuite voulu identifier si un autre mécanisme que celui responsable de la protection des Huh7.5 était mis en jeu. Les cellules Huh7.5, mutées au niveau des senseurs aux ARN, ont permis d'identifier l'effet direct de l'IL-26 sur la réplication virale. Toutefois, l'induction des ISG peut être impliquée dans des cellules où leur voie de synthèse est fonctionnelle. Par ailleurs, nous avons souhaité comparer l'efficacité des complexes composés d'IL-26 et d'ADN à ceux composés d'IL-26 et d'ARN viral.

Comme montré précédemment, la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-26 est potentialisée en présence d'ADN. L'ARN viral, comparativement à l'ADN, ne potentialise que très peu cette production d'IL-6. L'ARNm de MxA est fortement induit par l'ARN viral, et cette induction est légèrement augmentée par la présence d'IL-26. Il est intéressant de noter que, dans cette expérience, l'ADN couplé à l'IL-26 n'induit pas l'expression de ce gène antiviral (Figure 20).

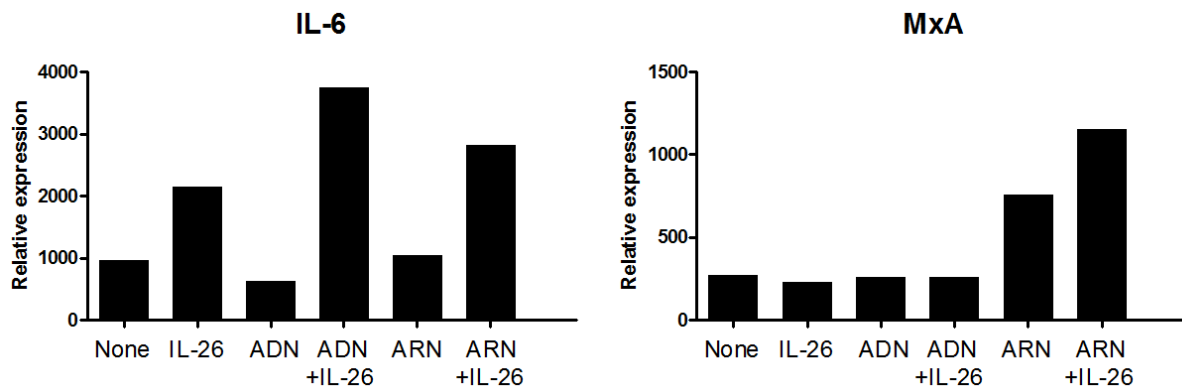


Figure 20. Les complexes induisent l'expression de protéines inflammatoires et antivirales par les mdDC. 10^5 mdDC ont été cultivés en présence d'IL-26 (100 ng/mL), d'ADN (400 ng/mL), d'ARNv (400 ng/mL) ou de complexes d'ADN ou ARN. Après 4 h de stimulation, les ARN messagers ont été extraits et les expressions de l'IL-6 et de MxA ont été quantifiées par RT-qPCR. (Moyenne, n=2).

3.9 Manuscrit en préparation

Un manuscrit a été rédigé afin de soumettre les premiers résultats de cette thèse, co-signé avec les membres de l'Unité Inserm 966. Afin de délimiter clairement chaque nouvelle information, nous avons limité ce manuscrit à l'étude des propriétés antivirales directes de l'IL-26 sur la réplication de HCV. L'effet des complexes d'IL-26 et d'ADN sur l'activation des cellules immunitaires n'y est pas traité.

IL-26 inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes

Élodie Beaumont^{1,†}, Vincent Larochette^{2,3,†}, Laurence Preisser^{2,3}, Pascale Pignon^{2,3}, Simon Blanchard^{2,3,4}, Björn-Thore Hansen⁵, Jonathan Dauvé⁶, Minna M. Poranen⁷, Alain Morel^{2,3,6}, Helmut Fickenscher⁵, Pascale Jeannin^{2,3,4,‡}, Philippe Roingeard^{1,‡}, Yves Delneste^{2,3,4,‡}

1 INSERM unit 1259 MAVIVH, University of Tours, Tours, France

2 CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

3 Labex ImmunoGraftOnco, Angers, France

4 Laboratory of Immunology and Allergology, University Hospital of Angers, Angers, France

5 Institute for Infection Medicine, Christian-Albrecht University of Kiel and University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

6 Paul Papin ICO Cancer Center, Angers, France

7 Department of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors jointly supervised this work.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.D. and P.R. (e-mails: yves.delneste@inserm.fr; roingeard@med.univ-tours.fr)

Abstract

Interleukin-26 (IL-26) is a cationic amphipathic cytokine initially identified as overexpressed in virus-transformed human T lymphocytes. It was recently reported to modulate the infection of epithelial cells by various enveloped viruses, but its antiviral properties have not yet been characterized in detail. We show here that IL-26 penetrates hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes, independently of the heterodimeric IL-20R1/IL-10R2 receptor, and directly interacts with HCV double-stranded RNA replicative intermediates, thereby inhibiting viral replication. IL-26 interferes with viral RNA-dependent RNA polymerase activity, preventing the de novo synthesis of viral genomic single-stranded RNA. Collectively, our results highlight a novel direct protective role of IL-26

against HCV infection, independent of the immune system. This study sheds new light on the complex biology of IL-26 and increases our understanding of the antiviral defense mechanisms contributing to the control of HCV infection.

Introduction

Interleukin-26 (IL-26) was initially identified as a protein overexpressed in herpesvirus saimiri-transformed human T lymphocytes¹. This protein was assigned to the IL-10 cytokine family on the basis of sequence homologies and secondary structure similarities^{1–3}. However, it differs from other members of the IL-10 family in several ways. For example, IL-26 can form dimers and higher-order non-covalent multimers, and is cationic and amphipathic, due to the presence and distribution of positively charged amino acids⁴. Unlike other IL-10 family members, there is no gene for IL-26 in mouse and rat genomes⁵, making it difficult to perform *in vivo* analysis in rodents. The IL-26 mRNA was initially reported to be expressed by activated Th1 and Th17 lymphocytes and natural killer (NK) cells^{6, 7}. This cytokine has been identified as the ligand of the heterodimeric IL-20R1/IL-10R2 receptor, signaling via the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3 proteins^{8, 9}.

Several studies have implicated IL-26 in the pathophysiology of chronic inflammatory disorders. Circulating and tissue levels of IL-26 are high in patients with chronic inflammatory diseases, such as Crohn's disease¹⁰ and rheumatoid arthritis¹¹. Accordingly, IL-26 induces the production of inflammatory cytokines by human epithelial cells via IL20R1/IL-10R2¹⁰. Surprisingly, IL-26 also triggers the production of pro-inflammatory cytokines by monocytes, in the absence of IL-20R1¹¹, suggesting that IL-26 may activate immune cells via an alternative signaling pathway. IL-26 was recently reported to interact with extracellular DNA released by dying bacteria or host cells, and to act as a shuttling molecule, bringing DNA into contact with intracellular DNA sensors. IL-26-DNA complexes activate plasmacytoid dendritic cells (pDCs) via Toll-like receptor 9 (TLR9)⁴, and monocytes via the stimulator of interferon genes (STING) and the inflammasome¹². This property, already reported for cell-penetrating and antimicrobial peptides^{13, 14}, is supported by the nonconventional structural and physicochemical properties of IL-26, resembling those of antimicrobial peptides (amphipathicity, cationicity and capacity to form multimers). The capacity of IL-26 to interact with membrane glycosaminoglycans, such as heparan sulfate⁸, may facilitate this process.

IL-26 has also been reported to have antiviral properties. It has been shown to modulate the infection of epithelial cells by various enveloped viruses, including vesicular stomatitis virus (VSV), human cytomegalovirus (HCMV), and herpes simplex virus type 1 (HSV-1)¹⁵. We also recently reported that IL-26, in which is produced in large amounts in patients infected with hepatitis C virus (HCV), enhances the cytotoxic activity of NK cells against HCV-infected cells, independently of the IL-20R1/IL-10R2 heterodimer¹⁶. Moreover, IL-26 induces the production of the antiviral cytokines interferon (IFN)- β and IFN γ by NK cells. We also observed an accumulation of IL-26 in the cytoplasm of hepatocytes in HCV-infected patients, although no mRNA for this cytokine was detected in these cells. Based on this observation and possible interactions between IL-26 and nucleic acids, we investigated the possibility of IL-26 controlling HCV infection, independently of the immune system. Our results indicate that IL-26 inhibits HCV infection by interacting with viral RNA and blocking its replication in hepatocytes. This study sheds new light on the complex biology of IL-26 and increases our understanding of the antiviral defense mechanisms involved in controlling HCV infection.

Results

IL-26 reduces HCV replication in cell culture

As IL-26 has been shown to differently modulate epithelial cell infection with various enveloped viruses¹⁵, we evaluated more precisely its ability to interfere with HCV replication in Huh7.5 cells. We performed in vitro HCV infection assays in Huh7.5 cells treated or not for 40 hours with the cytokines of interest before infection. We found that IL-26 and IFN α controlled replication of the genotype 2a JFH-1 strain if added 40 hours before infection, as shown by the 1000-fold lower viral load on day 3 post-infection than for untreated infected cells (Fig. 1a). However, unlike IFN α , IL-26 had a transient protective effect, as demonstrated by the gradual increase in viral load (Fig. 1a), suggesting that the mechanism of action of IL-26 was different to that of IFN α .

We then maintained the presence of IL-26 and IFN α in the medium of cell cultures until day 9 post-infection. The sustained presence of IL-26 effectively controlled in vitro HCV replication (Fig. 1b). Viral loads were lower (\sim 105 copies of viral RNA per ml) than in untreated infected cells; however, IL-26 did not completely clear HCV from infected cells in these experimental conditions. Furthermore, no protection was observed when IL-26 was added after HCV infection (Supplementary Fig. 1), suggesting that IL-26 cannot control an already established HCV infection. Finally, IL-19, another member of the IL-10 cytokine family, did not reduce HCV replication in vitro, whatever the protocol

used (Supplementary Fig. 2), suggesting that the protective properties of IL-26 are not found in other members of this cytokine family.

Our findings thus show that IL-26 can control HCV replication in Huh7.5 cells only if present before infection and maintained in the medium throughout the replication period.

IL-26 does not prevent the entry of HCV into Huh7 cells

We then investigated the mechanisms by which IL-26 exerts its antiviral activity. We first evaluated the capacity of IL26 to interfere with the entry of HCV into Huh7 cells, using pseudotyped HIV-1-based retroviruses harboring HCV envelope glycoproteins derived from genotypes 1a, 1b, 2a or 3. IL-26 and IFN α did not prevent the HCV entry into Huh7 cells (Fig. 2). As expected^{17, 18}, neutralizing anti-E2 and anti-CD81 monoclonal antibodies (mAbs), targeting the HCV envelope glycoprotein mediating viral entry and its cellular membrane receptor, respectively, markedly inhibited HCV pseudoparticle (HCVpp) entry (Fig. 2).

Thus, the protective activity of IL-26 against HCV is independent of an inhibitory effect on the entry of the virus into target cells, suggesting that some subsequent early steps of the viral replication cycle are the targets of IL-26.

IL-26 does not increase the expression of antiviral genes

Based on their key roles in inhibiting HCV infection^{19, 20}, we investigated whether the induction of antiviral interferon-stimulated genes (ISGs) was responsible for the ability of IL-26 to control HCV replication. The expression of four selected ISGs [myxovirus resistance gene A (MxA), a viral transcription inhibitor; interferon-stimulated gene 15 (ISG15) involved in viral protein degradation; protein kinase R (PKR), a viral translation inhibitor; apolipoprotein L6 (APOL6) involved in lipid membrane disruption] was analyzed at various time points, in HCV-infected Huh7.5 cells left untreated or treated with IL-26 or IFN α . Consistent with published reports indicating that Huh7.5 cells have defective TLR3 and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) pathways²¹, no ISG expression was observed in infected untreated Huh7.5 cells, whatever the time point analyzed (Fig. 3). By contrast, IFN α induced the expression of MxA, ISG15, PKR or APOL6 specific mRNAs (Fig. 3), demonstrating the functionality of the ISG-inducing pathways in Huh7.5 cells. However, the expression of none of these ISGs was induced in the presence of IL-26 (Fig. 3).

These results suggest that the protective role of IL-26 against HCV may be at least partly independent of the induction of ISGs.

IL-26 binds to viral RNA and inhibits its replication

Recent studies have reported that IL-26 binds to DNA thanks to its original physicochemical properties, especially its cationicity^{4, 12}. We thus hypothesized that IL-26 might also interact with viral RNA, thereby interfering with viral replication. We first investigated the accumulation of IL-26 and HCV-specific double-stranded RNA (dsRNA), the replication intermediate, at various time points after infection, in Huh7.5 cells pretreated or not with IL-26. Confocal microscopy revealed that IL26 gradually accumulated in the cells, as demonstrated by the shift over time from perimembranous labeling to diffuse cytosolic staining (Fig. 4 and Supplementary Fig. 3). More interestingly, punctate staining for IL-26 was observed in the cytosol of infected cells, and this staining colocalized with staining for viral dsRNA, suggesting a potential interaction between IL-26 and viral dsRNA at the endoplasmic reticulum. Consistent with these findings, a structural model predicted the presence of an RNA-binding site within helix E of IL-26 (Fig. 5a). This prediction was confirmed by a solid-phase binding assay showing that IL-26 directly interacted with immobilized HCV-specific RNA molecules, highlighting the higher binding levels for full-length HCV-specific dsRNA than for viral genomic single-stranded RNA (ssRNA) (Fig. 5b). We then explored the consequences of this interaction on de novo viral RNA synthesis in vitro, using the bacteriophage Phi6 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) as a surrogate model for the HCV replicase. These RdRps are structurally highly similar^{22, 23} and both use primer-independent de novo initiation mechanisms^{24, 25}, making our approach realistic. HCV-specific ssRNA molecules constituting the complete genome of the JFH-1 strain, but also HCV-specific dsRNA molecules representing replication intermediates, were used as templates for the Phi6 RdRp, and the effect of IL-26 on de novo genomic ssRNA synthesis was analyzed. We found that IL-26, but not IL-19 used as a control (data not shown), strongly inhibited the polymerase activity of the Phi6 RdRp (Fig. 5c). Consistent with our previous observations, we demonstrated that IL-26 interfered with the last stage of HCV replication by inhibiting the synthesis of new viral genomic ssRNA from the dsRNA replicative intermediate. Collectively, these results suggest that the direct antiviral effects of IL-26 may result from its ability to penetrate and accumulated in HCV-infected cells and bind viral dsRNA, thereby inhibiting viral RNA replication.

Discussion

HCV infection, which affects an estimated 170 million people worldwide²⁶ and frequently leads to severe chronic liver disease²⁷, constitutes one of the greatest challenges to human health of this decade. The recent introduction of highly effective direct-acting antiviral agents has considerably improved the treatment of chronic HCV infection²⁸, but more than 390,000 people die from HCV-related hepatic disease worldwide each year. Moreover, it has been estimated that the world

reservoir of HCV-infected individuals increases by about two million newly infected subjects each year, and that this phenomenon is not limited to developing countries²⁹. The eradication of this viral disease is hampered principally by the very high cost of the new treatments and by most HCV-infected subjects being unaware of their infection status (more than 95% of the HCV-infected population worldwide) due to the asymptomatic nature of both acute and chronic infections³⁰. Most of these individuals do not, therefore, receive treatment, and the risk that they will transmit the infection to others remains. For these reasons, obtaining complete knowledge of the antiviral defense mechanisms contributing to the control of HCV infection is a considerable challenge. We show here that IL-26 can control HCV infection in a direct manner, independently of the induction of antiviral ISGs. As ISG expression is induced by IFNs³¹, our results suggest that IL-26 does not induce the production of type I IFN by hepatocytes, contrary to what was observed for lymphoid and myeloid cells^{4, 12}. We found that IL-26 entered HCV-infected cells, where it interacted with viral RNA, thereby inhibiting HCV replication. These results thus identify IL-26 as a novel actor in the antiviral arsenal, acting independently of the immune system.

IL-26 is considered to be a pro-inflammatory molecule^{10, 11}, but it has recently been shown to have several properties not typical of cytokines, such as direct antibacterial activity and DNA-binding capacity, thanks to its unique physicochemical characteristics^{4, 12}. Since the discovery of IL-26 overproduction in herpesvirus saimiri-transformed human T lymphocytes¹, other studies have confirmed the potential role of IL-26 in antiviral immunity. The prior incubation of target cells or viruses with recombinant IL-26 for short periods has been shown to have several different effects on viral infectivity: an enhancement for VSV, an RNA virus of the Rhabdoviridae family, and an inhibition or no effect, respectively, for HCMV and HSV-1, two DNA viruses of the Herpesviridae family¹⁵. IL-26 is thought to interfere with the adsorption of the virus onto target cells by binding to membrane glycosaminoglycans, but the precise mechanisms underlying these phenomena, independent of the IL-20R1/IL-10R2 receptor, remain uncharacterized. Using the HCV pseudotyped virus model, we showed that IL-26 had no effect on HCV entry into hepatocytes. This discrepancy with respect to previous findings may reflect intrinsic differences between viral models, although the authors of previous studies used IL-26 concentrations 10 to 50 times higher than those used here and significantly different from those found in physiological conditions in infected patients¹⁶. Our findings reveal a novel and original antiviral role of IL-26 in the direct inhibition of HCV replication.

In a recent large cohort study, we observed the accumulation of IL-26 in fibrotic and inflammatory lesions in the livers of patients with chronic HCV infection, and showed that infiltrating CD3⁺ lymphocytes were the main IL-26-expressing cells¹⁶. Surprisingly, immunohistochemistry also revealed the presence of IL-26-immunoreactive staining in the hepatocytes of HCV-infected patients,

whereas hepatocytes produced no IL-26, even when infected with HCV. This intriguing observation may result from the unique biochemical and structural properties of IL-26. Indeed, given its highly cationic nature, IL-26 binds glycosaminoglycans on the surface of target cells, resulting in high local concentrations⁸. Moreover, the presence of an accessible in-plane membrane anchor, allowing the insertion of IL-26 at membrane interfaces and potentially facilitating its entry into cells, has recently been predicted in amphipathic helix F¹². Using confocal microscopy, we demonstrated, in this study, a progressive accumulation of IL-26 in the cytoplasm of IL-26-treated hepatocytes. The mode of entry of IL-26 into hepatocytes remains unclear, but the protective effects of IL-26 against HCV infection seem to depend on this intracellular accumulation. Indeed, although the mRNAs encoding IL-20R1 and IL-10R2 are expressed in Huh7.5 cells, IL-26 did not induce STATs phosphorylation in these cells (data not shown), which exclude the possible involvement of the heterodimeric IL-20R1/IL-10R2 receptor in the observed IL-26-induced antiviral activity.

We then hypothesized that IL-26 might interact with viral RNA, inhibiting its replication, based on previous studies reporting that IL-26 has DNA-binding properties^{4, 12}. Helices B and E of IL-26 have been identified as potential DNA-binding motifs¹², accounting for the capacity of this molecule to shuttle extracellular DNA into cells and into contact with nucleic acid sensors. Using the crystal structure of IL-10 as a template, we were able to establish a structural model of IL-26, which predicted the presence of an RNA-binding site within helix E. In addition, confocal microscopy demonstrated the colocalization of HCV dsRNA and IL26 in HCV-infected Huh7.5 cells. The ability of IL-26 to interact with HCV RNA, and viral dsRNA in particular, was also confirmed in a solid-phase binding assay. Finally, we demonstrated *in vitro* that IL-26 directly inhibited the viral replicase, preventing the production of new genomic ssRNA. In the absence of an acellular assay mimicking HCV genome replication, the bacteriophage Phi6 replicase was used as a surrogate general model for viral RdRps using *de novo* initiation mechanism²³. Studies with this model confirmed, *in vitro*, the ability of IL-26 to interfere with *de novo* viral genomic ssRNA synthesis from the dsRNA replicative intermediates.

IL-26 is cationic and amphipathic^{1, 4}, features also displayed by cell-penetrating antimicrobial peptides³², such as the cathelicidin antimicrobial peptide LL-37^{33, 34}. LL-37 enters target cells³⁵ and exerts its antiviral properties via different mechanisms. Previous studies have reported that LL-37 is virucidal for the vaccinia³⁶ and influenza A viruses³⁷, through alterations to the integrity of the viral membrane structures. LL-37 also interferes with viral entry into host cells, as reported for varicella zoster virus³⁸ and dengue virus type 2³⁹. LL-37 has been reported to inhibit the replication *in vitro* of human immunodeficiency virus (HIV) ^{40, 41}, HCV⁴² and respiratory syncytial virus, independently of the induction of antiviral ISGs⁴³. Wong et al. recently reported that LL-37 inhibits the HIV reverse

transcriptase⁴⁴. The underlying mechanism may be similar to that described here. However, we observed no inhibition in vitro of the reverse transcriptase activity by IL-26 and, unlike IL-26, LL-37 did not inhibit the RNA replication mediated by the Phi6 RdRp in vitro (data not shown). Thus, the ability of IL-26 to interfere with RNA replication is not common to all antimicrobial cationic peptides and our findings suggest that specific elements, such as the viral model and the nature of the host cells, determine the specificity of the antiviral activity of antimicrobial molecules.

IFN β was recently shown to have direct antimicrobial activities, in addition to its well-established role as a cytokine⁴⁵. Kaplan et al. suggested that IFN β should be reclassified as a kinocidin, a recently discovered family of molecules with both immune properties and direct antimicrobial activities. Based on the results reported by Meller et al. and our own results, we also think that IL-26 could be classified as a kinocidin, in light of its pro-inflammatory^{10, 11, 12, 16, 464}, antibacterial and, as reported here, antiviral properties. In conclusion, we have highlighted a novel direct antiviral activity of IL-26 based on the ability of this molecule to bind viral RNA and to inhibit its replication. These properties are dependent on the unique biochemical and structural features of IL-26. This cytokine was initially identified as a pro-inflammatory mediator potentially involved in maintaining chronic inflammation in the liver of HCV-infected patients, but we show here that it may also directly protect against HCV infection.

Recent advances in the treatment of chronic HCV disease with direct-acting antiviral agents have greatly increased the sustained virological response (SVR) in most treated patients, but those infected with HCV genotype 3 still have lower SVR rates than patients infected with other genotypes⁴⁷. The development of additional antiviral therapies based on IL-26 may improve the treatment options available to such patients in the future. Moreover, it will be interesting to determine whether IL-26 is also potentially useful for treating other RNA virus infections for which few treatment options are currently available.

Methods

Cytokines

Recombinant N-terminally His₆-tagged human IL-26 was produced in *Escherichia coli* and purified by nickel-chelate chromatography under denaturing conditions, as previously described^{1, 15}. The IL-26 obtained did not contain detectable levels of endotoxin or contaminating proteins¹². Recombinant human IFN α and IL-19 were obtained from R&D Systems (Abingdon, UK).

In vitro HCV infection

The Huh7.5 cell line (a gift from Dr Rice; Rockefeller University, New York, NY) is a clone of the human hepatoma cell line Huh7 obtained by curing stably selected replicon-containing cells with interferon; these cells support efficient HCV replication⁴⁸. This cell line was grown in glutamine-containing Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies, Waltham, MA) supplemented with 10% (v/v) heatinactivated fetal calf serum (FCS; Eurobio, Les Ulis, France) and antibiotics (Life Technologies).

Huh7.5 cells, cultured in 75-cm² cell culture flasks (2×10⁶ cells per flask), were left untreated or were treated for 40 hours with 100 ng ml⁻¹ IL-26, IFN α or IL-19. Cells were then infected by incubation for 12 hours with 2×10⁴ focus-forming units (FFU; equivalent to a MOI of 0.006) of the genotype 2a HCV JFH-1 strain⁴⁹, optimized by 10 cycles of infection in naive Huh7.5 cells, as previously described⁵⁰. The inoculum was removed, and cells were washed and returned to the incubator at 37°C in fresh medium. Cells were then treated with trypsin every three days, for a 12-day analysis of viral replication kinetics. Under these conditions, this optimized virus infected all cells within six days and did not induce significant cytopathic effects by the end replication. In some experiments, IFN α , IL-26 or IL-19 (100 ng ml⁻¹) was maintained in the medium until day 9 post-infection. Cell pellets were collected at various time points (6 hours and days 1, 2, 3, 6, 9, and 12) for intracellular HCV RNA quantification and an evaluation of transcript levels.

HCV RNA quantification

Total RNA was collected and extracted at various time points (days 3, 6, 9, and 12) during the viral replication kinetics experiment, with the Nucleospin[®] RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). We generated cDNA by reverse transcription of the RNA with the SuperScript First-Strand II Synthesis System (Invitrogen, Waltham, MA), and viral RNA was then quantified by qPCR with the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and primers specific for the 5' untranslated region of HCV (5'-UTRf: 5'-CGCTCAATGCCTGGAGATTTG-3' and 5'-UTRr: 5'GCACGGTCTACGAGACCTCC-3'). RNA integrity and cDNA synthesis were checked by amplifying the β -actin cDNA (β -actinf: 5'-CGCACCCTGGCATTGTCAT-3'; β -actinr: 5'TTCTCCTTGATGTCACGCAC-3'). The results of two independent experiments performed in quadruplicate are shown, expressed in absolute numbers of genome copies per ml.

HCV pseudoparticle entry assay

HCVpp harboring the HCV envelope E1 and E2 glycoproteins derived from genotype 1a (7a)⁵¹, 1b (UKN5.23), 2a (UKN2A.1.2) or 3a (UKN3A.1.28)⁵² isolates were used to assess the capacity of IL-26 to

prevent HCV entry. Env-pseudotyped viruses were generated with an HIV-1 luciferase reporter vector and titrated as previously described⁵³. HCVpp were then incubated for 1 hour at 37°C with IFN α (100 ng ml⁻¹), IL-26 (100 ng ml⁻¹), neutralizing mAbs targeting a discontinuous epitope in the HCV envelope glycoprotein E2 [clone AR3A54, kindly provided by Dr Mansun Law; The Scripps Research Institute, La Jolla, CA] or CD81 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), or isotype controls (R&D Systems); mAbs were used at a concentration of 5 μ g ml⁻¹. Each virus/cytokine or virus/mAb mixture was then incubated with 1 \times 10⁴ Huh7 cells for 6 hours at 37°C for infection. The virus-containing medium was then removed, replaced with fresh medium and infected cells were incubated at 37°C. Infection levels were determined 72 hours later, by measuring the luciferase activity in cell lysates in the Bright Glo luciferase assay (Promega, Fitchburg, WI), with a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The results of two independent experiments performed in quadruplicate are shown, expressed as mean percentage entry relative to mock conditions \pm standard error of the mean (SEM).

Analysis of ISG transcript levels

Levels of mRNA encoding the antiviral proteins MxA, PKR, ISG15, and APOL6 were analyzed by RT-qPCR at different time points (6 hours and days 1, 2, 3, and 6) in viral replication. Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above. Levels of ISG transcripts were evaluated by qPCR with a LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche Diagnostics) and the Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR kit (Thermo Scientific, Illkirch, France). Primer sequences are available upon request. The results of two independent experiments performed in quadruplicate are expressed as mRNA levels relative to GAPDH mRNA levels.

Confocal microscopy

For confocal imaging assessments of the subcellular distribution of IL-26 and HCV dsRNA, Huh7.5 cells, cultured on glass coverslips in six-well plates (2 \times 10⁵ cells per well), were left untreated or were treated with IL-26 (1 μ g ml⁻¹) for 40 hours, and then infected by incubation for 12 hours with 2 \times 10⁴ FFU of the JFH-1 strain (equivalent to a MOI of 0.06). The inoculum was removed, and cells were washed and returned to the incubator at 37°C in fresh medium. IL-26 treatment (1 μ g ml⁻¹) was maintained during the experiment. At various times after infection (12, 24, 48 and 72 hours), the cells were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 minutes and permeabilized by incubation for 30 minutes in 0.05% saponin-0.2% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), in PBS. The cells were then incubated for 1 hour at room temperature with anti-dsRNA mAb (clone J2; Scicons, Budapest, Hungary), anti-IL-26 polyclonal Ab (AF1375; R&D Systems), or an isotype control (R&D Systems), followed by Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 594-

conjugated secondary Abs (Invitrogen). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and coverslips were washed and mounted on the microscope slides with Immuno-Fluore™ medium (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Images were acquired with an Olympus FluoView 500 confocal microscope equipped with argon (488 nm) and HeNe (546 nm) lasers and a 60× PlanApo oil-immersion objective, and analyzed with Fluoview 4.3 software.

Identification of potential RNA-binding sites on IL-26

A virtual 3D model of IL-26 was constructed with Modeller software, and validated with Procheck12. KYG software was used to determine potential RNA-binding residues⁵⁵.

Production of HCV-specific ssRNA and dsRNA molecules

HCV ssRNA was generated in vitro with the T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA production system (Promega) and a XbaI-linearized pJFH-1 plasmid containing the full-length JFH-1 cDNA downstream from the T7 RNA promoter⁴⁹. The synthesized ssRNA was treated with DNase I (Promega) and purified with the Nucleospin® RNA Clean-up kit (Macherey-Nagel). HCV-specific dsRNA was generated from the produced ssRNA template using the Phi6 RdRp and previously optimized reaction conditions⁵⁶. After incubation for 4 hours at 32°C, non-replicated ssRNA was removed by incubation for 30 minutes at 20°C with the S1 nuclease (Thermo Scientific). The produced dsRNA was precipitated by ethanol and sodium acetate and resuspended in 10 mmol l-1 carbonate-bicarbonate buffer.

In vitro interaction of IL-26 with RNA

The interaction of IL-26 with HCV ssRNA and dsRNA was evaluated in a solid-phase binding assay. HCV ssRNA or dsRNA molecules (1 µg) were immobilized on a MAXISORP™ plate (Thermo Scientific). The plates were saturated and incubated for 6 hours at room temperature with 20 ng of IL-26 per well. Bound IL-26 was detected with 1 µg ml⁻¹ biotin-labeled anti-IL-26 mAb, and an irrelevant mAb was used as a control (R&D Systems). Bound mAbs were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin, which was detected by incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a substrate. Results are expressed as optical density (OD) values.

In vitro RNA replicase assay

The capacity of IL-26 to modulate HCV RNA replication was assessed in vitro with the bacteriophage Phi6 RdRp and JFH-1-specific ssRNA or dsRNA as templates. RNA molecules (100 ng) were incubated for 10 minutes at 37°C with 5 µg IL-26 or with BSA, used as a control, before addition of the reaction mixture containing the Phi6 replicase and the nucleotides ATP, UTP, GTP, CTP, and biotin-14-CTP (Life

Technologies) in a 1/1/3/0.5/0.5 ratio. After incubation for 4 hours at 32°C, RNA was purified by ethanolsodium acetate precipitation and resuspended in 10 mmol l⁻¹ carbonate-bicarbonate buffer for immobilization on a MAXISORP™ plate. The plate was saturated and washed, and the incorporated biotin-14-CTP was detected with peroxidase-labeled streptavidin and the chromogenic substrate TMB. Results are expressed as OD values.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). Depending on the experiment, data were analyzed with nonparametric Mann-Whitney or Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests. A result was considered statistically significant if the p value <0.05.

Data availability

The data obtained in this study are available from the corresponding authors on request.

References

1. Knappe, A., Hör, S., Wittmann, S. & Fickenscher, H. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 74, 3881-3887 (2000).
2. Fickenscher, H. et al. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol.* 23, 89-96 (2002).
3. Trivella, D. B., Ferreira-Junior, J. R., Dumoutier, L., Renauld, J. C. & Polikarpov, I. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2909-2935 (2010).
4. Meller, S. et al. T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* 16, 970-979 (2015).
5. Fickenscher, H. & Pirzer, H. Interleukin-26. *Int. Immunopharmacol.* 4, 609-613 (2004).
6. Donnelly, R. P. et al. Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 393-401 (2010).
7. Wolke, K., Kunz, S., Asadullah, K. & Sabat, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.* 168, 5397-5402 (2002).
8. Hör, S. et al. The T cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.* 279, 33343-33351 (2004).
9. Sheikh, F. et al. Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J. Immunol.* 172, 2006-2010 (2004).

10. Dambacher, J. et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58, 1207-1217 (2009).
11. Corvaisier, M. et al. IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces pro-inflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol.* 10, e1001395 (2012).
12. Poli, C. et al. IL-26 confers pro-inflammatory properties to extracellular DNA. *J. Immunol.* 198, 3650-3661 (2017).
13. Henzler-Wildman, K. A., Martinez, G. V., Brown, M. F. & Ramamoorthy, A. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43, 8459-8469 (2004).
14. Wyman, T. B. et al. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 36, 3008-3017 (1997).
15. Braum, O., Klages, M. & Fickenscher, H. The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. *PLoS ONE* 8, e70281 (2013).
16. Miot, C. et al. IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* 64, 1466- 1475 (2015).
17. Pileri, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941 (1998).
18. Zhang, J. et al. CD81 is required for Hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.* 78, 1448-1455 (2004).
19. Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36-49 (2014).
20. Su, A. I. et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 15669-15674 (2002).
21. Sumpter, R. J. et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689-2699 (2005).
22. Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. & Stuart, D. I. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235-240 (2001).
23. Mönttinen, H. A. M., Ravantti, J. J., Stuart, D. I. & Poranen M. M. Automated structural comparisons clarify the phylogeny of the right-hand-shaped polymerases. *Mol. Biol. Evol.* 31, 2741-2752 (2014).
24. Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A. & De Francesco, R. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* 76, 34823492 (2002).
25. Laurila, M. R. L., Makeyev, E. V. & Bamford, D. H. Bacteriophage Phi 6 RNAdependent RNA polymerase: molecular details of initiating nucleic acid synthesis without primer. *J. Biol. Chem.* 277, 17117-17124 (2002).
26. Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57, 1333-1342 (2013).
27. Seeff, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int.* 29, 89-99 (2009).

28. Asselah, T., Boyer N., Saadoun, D., Martinot-Peignoux, M. & Marcellin, P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFNfree treatment and future perspectives. *Liver Int.* 36, 47-57 (2016).
29. Ward, J. W. The hidden epidemic of hepatitis C virus infection in the United States: occult transmission and burden of disease. *Top. Antivir. Med.* 21, 15-19 (2013).
30. Cox, A. L. Global control of hepatitis C virus. *Science* 349, 790-791 (2015).
31. Schneider, W. M., Chevillote, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513-545 (2014).
32. Zasloff, M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 1199-1200 (2002).
33. Chamilos, G. et al. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood* 120, 3699-3707 (2012).
34. Lande, R. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-569 (2007).
35. Lau, Y. E. et al. Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect. Immun.* 73, 583-591 (2005).
36. Howell, M. D. et al. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implication for eczema vaccinatum. *J. Immunol.* 172, 1763-1767 (2004).
37. Tripathi, S. et al. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J. Gen. Virol.* 94, 40-49 (2013).
38. Crack, L. R., Jones, L., Malavige, G. N., Patel, V. & Ogg G. S. Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin. Exp. Dermatol.* 37, 534-543 (2012).
39. Alagarasu, K. et al. In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2. *Peptides* 92, 23-30 (2017).
40. Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B. & Söderlund, J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr. HIV Res.* 5, 410-415 (2007).
41. Sun, L. et al. Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J. Virol.* 79, 14318-14329 (2005).
42. Matsumura, T. et al. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates infection of hepatitis C virus. *Hepatol. res.* 46, 924-932 (2015).
43. Currie, S. M. et al. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One* 8, e73659 (2013).
44. Wong, J. H. et al. Effects of cathelicidin and its fragment on three key enzymes of HIV-1. *Peptides* 32, 1117-1122 (2011).
45. Kaplan, A. et al. Direct antimicrobial activity of IFN β . *J. Immunol.* 198, 4036-4045 (2017).
46. Kaabachi, W. et al. Interleukin-26 is overexpressed in Behçet's disease and enhances Th17 related-cytokines. *Immunol. Lett.* 190, 177-184 (2017).
47. Martin, M. T. & Deming P. Closing the Gap: The Challenges of Treating Hepatitis C Virus Genotype 3 Infection. *Pharmacotherapy* 37, 735-747 (2017).

48. Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290, 1972-1974 (2000).
49. Wakita, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791-796 (2005).
50. Ferraris, P. et al. Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1297-1306 (2013).
51. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633-642 (2003).
52. Lavillette, D. et al. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41, 265-274 (2005).
53. Beaumont, E., Patient, R., Hourieux, C., Dimier-Poisson, I. & Roingeard, P. Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology* 57, 1303-1313 (2013).
54. Law, M. et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat. Med.* 14, 25-27 (2007).
55. Kim, O. T. P., Yura, K. & Go, N. Amino Acid residue doublet propensity in the proteinRNA interface and its application to RNA interface prediction. *Nucleic Acids Res.* 34, 6450-6460 (2006).
56. Makeyev, V. M. & Bamford, D. H. Replicase activity of purified recombinant protein P2 of double-stranded RNA bacteriophage Phi6. *EMBO J.* 19, 124-133 (2000).

Endnotes

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Takaji Wakita for providing the JFH-1 virus strain, Dr. Charles Rice for the Huh7.5 cell line, Dr. Jonathan Ball for the UKN5.23, UKN 2A.1.2, and UKN3A.1.28 plasmids, Dr. Jean Dubuisson for the 7a plasmid, and Dr. Mansun Law for the mAbs, AR3A. This work was supported by institutional grants from INSERM, the University of Angers and the French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis. V.L. was supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research and M.M.P. by a grant from the Academy of Finland (272507) and Sigrid Jusélius Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investments for the future program ANR-11-LABEX-0016-01.

Author contributions

E.B., V.L., L.P., P.P., S.B., J.D., M.M.P., A.M., H.F., P.J., P.R. and Y.D. designed experiments. E.B., V.L., L.P., P.P., S.B., B.T.H. and J.D. performed experiments. E.B., V.L., L.P., M.M.P., A.M., H.F., P.J., P.R. and Y.D. interpreted data. E.B., V.L., P.J., P.R. and Y.D. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors have no competing financial interests to declare.

Figures

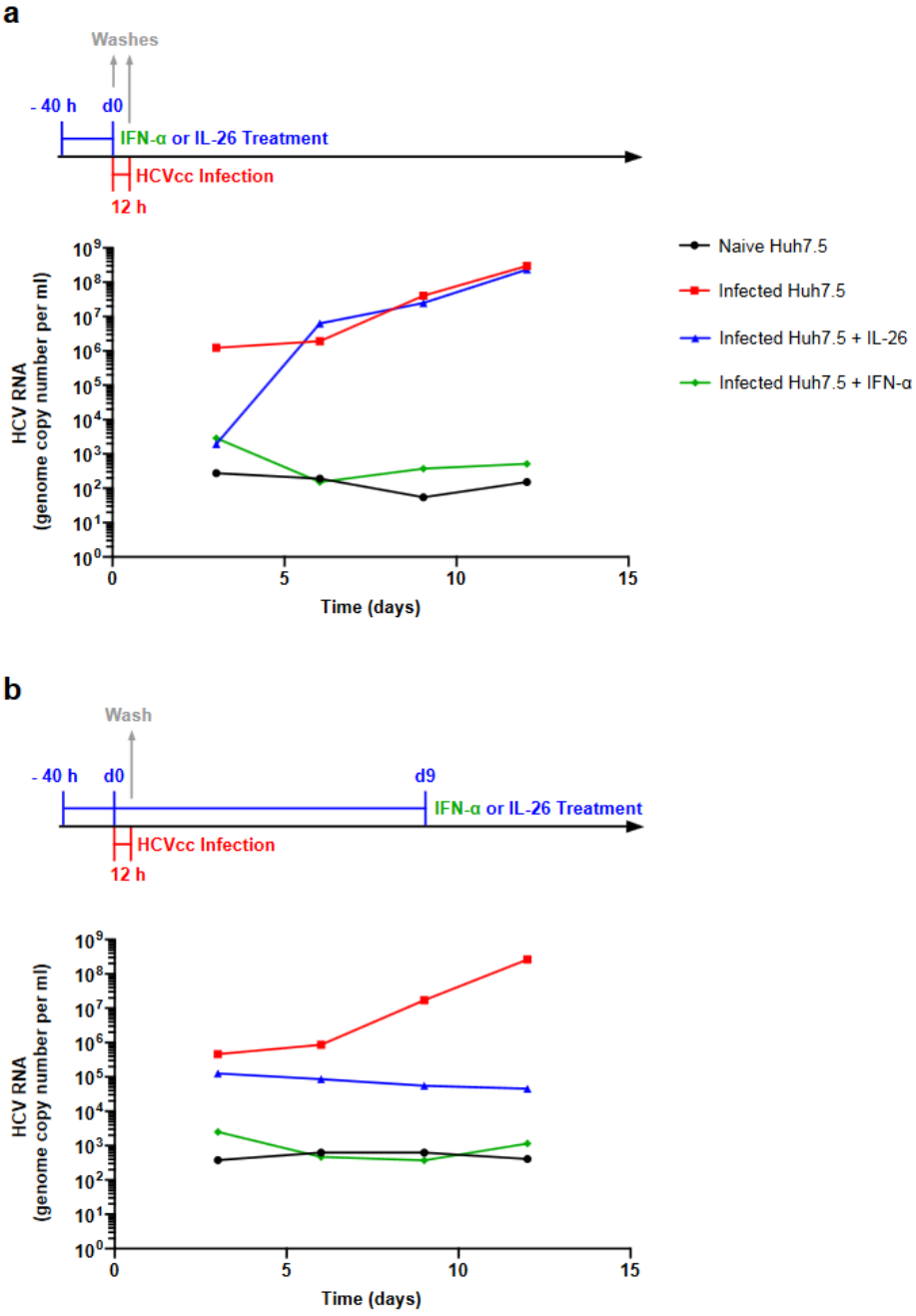


Fig. 1 | IL-26 reduces HCV replication in cell culture. Huh7.5 cells were left untreated or treated for 40 hours with IL-26 or IFN α (100 ng ml⁻¹). They were then infected by incubation for 12 hours with 2 \times 10⁴ FFU of an optimized HCV JFH-1 strain (MOI = 0.006). The inoculum was removed, and cells were washed and returned to the incubator at 37°C in fresh medium. IL-26 and IFN α treatments (100 ng ml⁻¹) were either stopped at the time of infection (a) or maintained until day 9 post-infection (b). Cells were treated with trypsin every 3 days and intracellular viral RNA was quantified by RT-qPCR at various time points (days 3, 6, 9 and 12). The results are expressed as absolute numbers of genome copies per ml (mean \pm SEM, n=2).

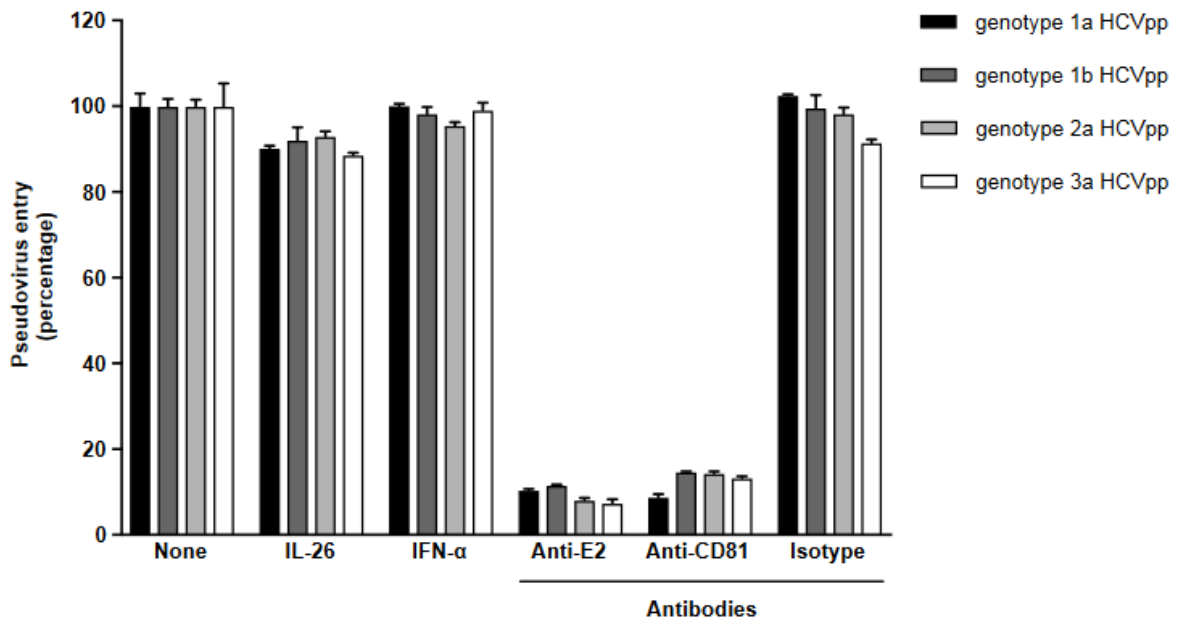


Fig. 2 | IL-26 does not prevent HCV pseudoparticle entry into Huh7 cells. HCV entry was evaluated with HCVpp generated with an HIV-1 luciferase reporter vector and harboring HCV envelope glycoproteins derived from genotype 1a (7a), 1b (UKN5.23), 2a (UKN2A.1.2) or 3 (UKN3A.1.28) isolates. HCVpp were incubated for 1 hour at 37°C with IFN α (100 ng ml⁻¹), IL-26 (100 ng ml⁻¹), neutralizing antibodies targeting HCV E2 envelope glycoprotein (clone AR3A) or CD81, or isotype controls; antibodies were used at a concentration of 5 μ g ml⁻¹. Pretreated HCVpp preparations were then used to infect Huh7 cells for 6 hours at 37°C. Infection levels were determined 72 hours post-infection, by measuring the luciferase activity of cell lysates. Results are expressed as mean percentage entry relative to mock conditions (mean \pm SEM, n=2).

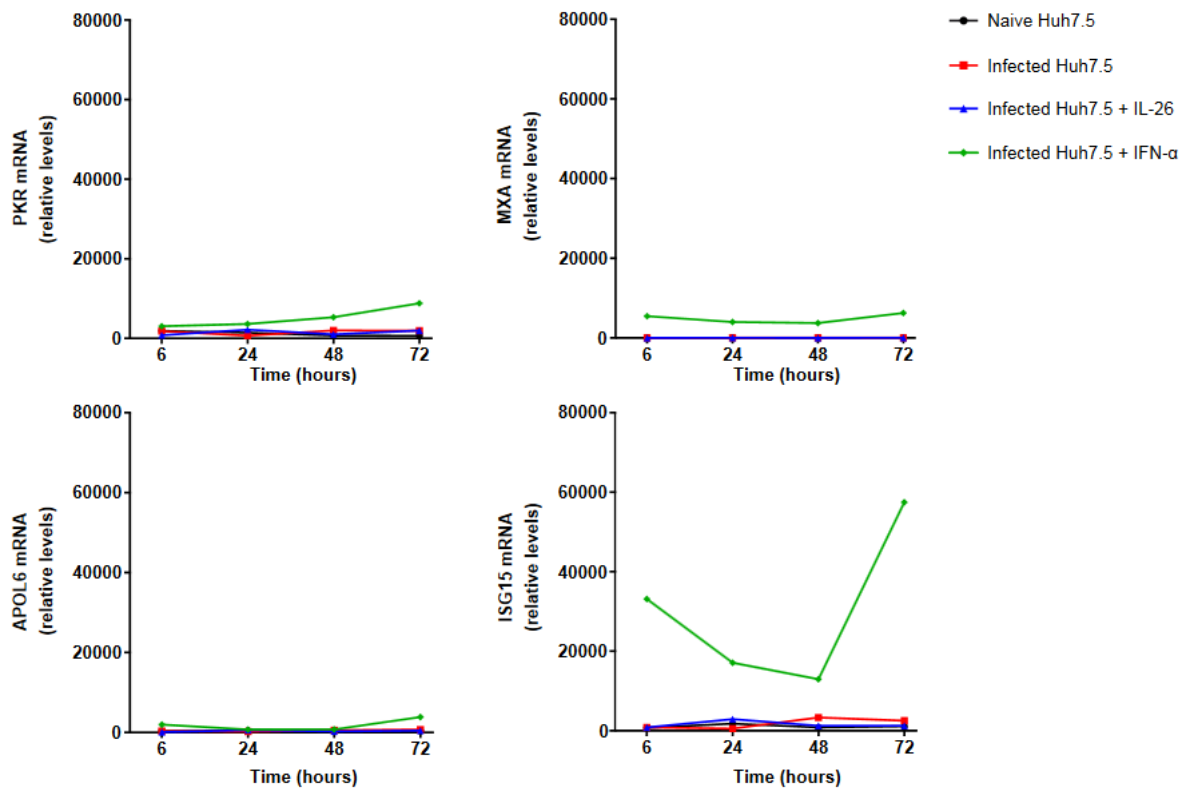


Fig. 3 | IL-26 does not increase the expression of antiviral genes. Huh7.5 cells were treated for 40 hours with 100 ng ml⁻¹ IL-26 or IFN α before infection with 2 \times 10⁴ FFU of an adapted HCV JFH-1 strain (MOI = 0.006); the treatment was maintained during the experiment. Levels of the mRNAs encoding MxA, PKR, ISG15 and APOL6 were evaluated by RT-qPCR at 6 hours and on days 1, 2, 3, and 6 post-infection. Results are expressed as mRNA levels relative to GAPDH mRNA levels (mean \pm SEM, n=2).

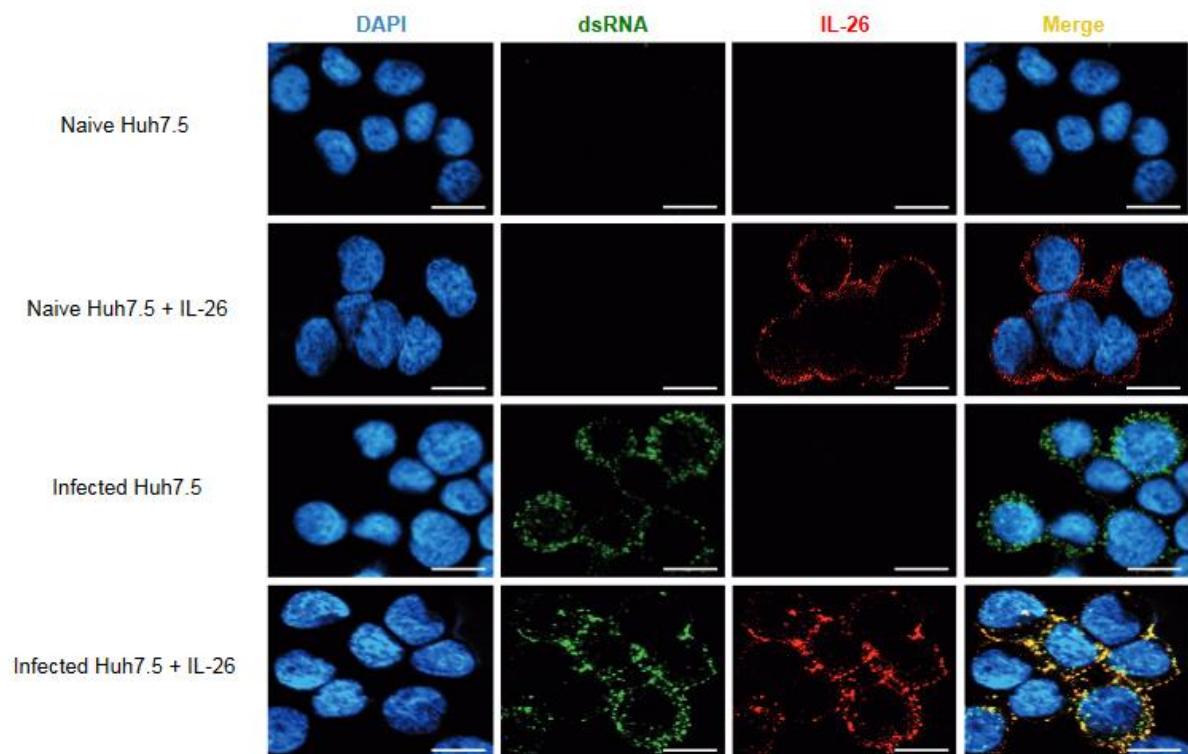


Fig. 4 | IL-26 colocalizes with dsRNA in HCV-infected Huh7.5 cells. Huh7.5 cells were left untreated or were treated for 40 hours with IL-26 (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and then infected by incubation for 12 hours with 2×10^4 FFU of an optimized HCV JFH-1 strain (MOI = 0.06). The inoculum was removed, and cells were washed and returned to the incubator at 37°C in fresh medium. After incubation for 72 hours, during which IL-26 treatment (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was maintained, the cells were fixed and processed for immunofluorescence analysis with DAPI, anti-dsRNA mAb or anti-IL-26 polyclonal Abs. The subcellular distribution of the protein was assessed by confocal microscopy. Scale bar, 20 μm .

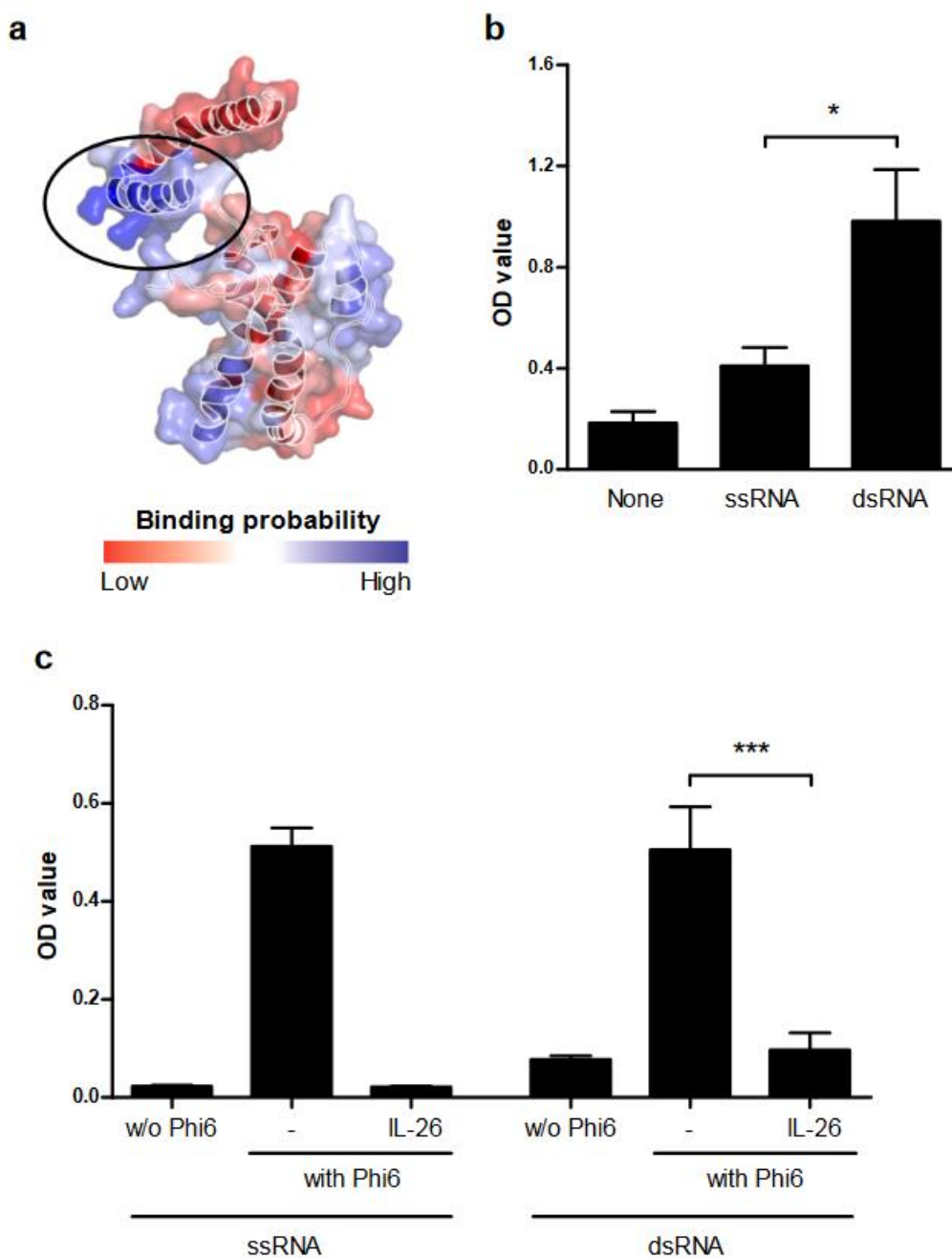


Fig. 5 | IL-26 interacts with HCV RNA and inhibits its replication. (a) A three-dimensional structural model of IL-26 was generated in silico, using the crystal structure of IL-10 as a template. An RNA-binding site (black circle) was predicted by KYG software. The bar below represents the RNA-IL-26 binding probability, colored from red (low probability) to blue (high probability). (b) For RNA binding assay, HCV-specific dsRNA and ssRNA molecules were immobilized before incubation with 20 ng of IL-26. Bound IL-26 was detected by incubation with a biotin-labeled anti-IL-26 mAb followed by HRP-conjugated streptavidin. Results are expressed as optical density values (mean \pm SEM, $n=7$; *: $p<0.05$). (c) HCV-specific ssRNA and dsRNA molecules (100 ng) were replicated in vitro with the Phi6 RdRp, in the presence or absence of 5 μ g of IL-26 or equal amount of BSA (marked with a dash). The replication was monitored by evaluating the incorporation of biotinylated CTP into the replication product; biotin-14-CTP was detected by incubation with HRP607 labeled streptavidin. Results are expressed as optical density values (mean \pm SEM, $n=7$; ***: $p<0.001$).

4 Discussion et perspectives

Cette étude a permis d'identifier une nouvelle fonction biologique de l'IL-26 ainsi qu'une approche du mécanisme impliqué, et étend son rôle de molécule cargo à l'ARN viral. Nous montrons que l'IL-26 agit comme un inhibiteur de l'infection virale, notamment grâce à sa capacité à inhiber l'activité d'une polymérase virale. Par ailleurs, ces données confirment que l'activité cargo de l'IL-26 permet de la classer parmi les PRM solubles, notamment en rendant l'ARN extracellulaire inducteur d'une réponse antivirale via l'expression d'interféron de type I.

Ces travaux étayent les connaissances sur l'IL-26 et ajoutent leur contribution à l'idée d'une fonction de kinocidine pour cette protéine, à savoir un double rôle de cytokine et de peptide antimicrobien.

4.1 L'IL-26 inhibe la réplication de l'ARN viral

4.1.1 L'IL-26 protège *in vitro* les cellules Huh7.5 de l'infection par HCV

Un traitement continu d'IL-26 permet de contrôler *in vitro* la charge virale dans un modèle d'infection de la lignée hépatocytaire Huh7.5 par la souche JFH-1 de HCV. Une précédente publication avait montré l'impact de l'IL-26 dans trois modèles *in vitro* d'infection virale (Braum, 2013). Dans cette étude, l'IL-26 présentait des effets opposés selon le virus utilisé (augmentation de la charge virale pour le VSV, inchangée pour HSV-1, ou diminution pour HCMV), mais la cytokine n'était utilisée qu'en prétraitement. Ici, nous montrons qu'un effet protecteur de l'IL-26 n'est observé que lorsque le traitement est maintenu tout au long de la culture cellulaire. Toutefois, la quantité d'ARN viral détectée ne diminue pas, ce qui suggère un mécanisme différent de celui induit par l'IFN α .

4.1.2 Mécanisme de protection

Aucun mécanisme d'action n'avait été proposé par le groupe de H. Fickenscher. Toutefois, l'indépendance entre l'effet sur l'infection virale et la présence du récepteur de l'IL-26 avait déjà été montrée. En raison de la forte charge positive de la cytokine, il avait été proposé que l'IL-26 puisse se fixer aux membranes cellulaires ou à la particule virale et limiter ainsi leur capacité d'infection. Avec les nouvelles publications et le rapprochement entre les caractéristiques physicochimiques de l'IL-26 et celles des peptides antimicrobiens, de nouvelles hypothèses ont pu être proposées. Dans cette présente étude, après avoir confirmé l'effet antiviral de l'IL-26 dans l'infection par HCV, nous avons pu évaluer différents mécanismes concernant les propriétés physiologiques de cette molécule, pertinents à la lumière des nouvelles données de la littérature.

Nous avons étudié l'induction des ISG par les cellules Huh7.5, ces gènes étant responsables de la protection antivirale innée. Cette hypothèse a également été évaluée dans un autre modèle en

raison des caractéristiques particulières de la lignée Huh7.5. Nous avons ensuite infirmé l'hypothèse d'une action sur la phase d'infection virale dans notre modèle, pour ensuite évaluer une activité directe sur les constituants viraux.

La première hypothèse testée a été l'induction de gènes antiviraux. Puisque les protections induites par l'IL-26 et l'IFN α semblaient différentes, nous les avons comparées en quantifiant par qPCR l'expression de quatre ISG (PKR, MXA, ISG15, APOL6) choisis en raison de leur implication dans la défense contre HCV (MacQuillan, 2003). Les cellules infectées et traitées par l'IFN α présentent des niveaux d'expression de ces ISG augmentés par rapport aux cellules non stimulées. Cette expression est exclusivement imputable au traitement, les cellules infectées non traitées n'exprimant pas d'ISG (ce qui les rend permissives à l'infection par HCV). Cela résulte des mutations sur TLR3 (Li, 2005) et RIG-I (Sumpter, 2005) des cellules Huh7.5, qui les rendent incapables de détecter les acides nucléiques viraux.

Le traitement par l'IL-26 n'induit pas l'expression des ISG. Ce résultat est cohérent avec le fait que l'IL-26 ne permet que de contrôler la charge virale tandis que l'IFN α l'élimine. Toutefois, la présence d'une protection implique qu'un autre mécanisme doit être mis en jeu par ailleurs. En revanche, l'IL-26 induisant l'expression d'interférons dans de nombreux types cellulaires, il est important de noter que la protection induite par les ISG pourrait être valable pour d'autres cellules que celles de la lignée Huh7.5 et que, *in vivo*, plusieurs mécanismes distincts puissent conférer une protection antivirale.

L'hypothèse suivante à avoir été évaluée était la possible inhibition de l'entrée des particules virales dans la cellule hôte. Suggérée par la charge globale de l'IL-26, cette hypothèse n'a pas été confirmée expérimentalement dans notre étude.

La troisième hypothèse, à savoir l'interaction avec le génome viral, a été posée en raison des propriétés que l'IL-26 partage avec les peptides antimicrobiens. La charge globalement positive de l'IL-26 et la répartition des charges au sein des hélices permettent à la molécule de se lier à l'ADN. Il a alors été envisagé que l'IL-26 pourrait également se lier à l'ARN viral. Nous avons réalisé une prédiction bio-informatique de sites de liaison à l'ARN à partir des données cristallographiques de l'IL-10. Un tel site a été prédit sur l'hélice E, déjà identifiée comme cationique et amphipathique (Poli, 2017), et capable de lier l'ADN. Il pourrait être intéressant de déterminer quels acides aminés sont nécessaires à cette fixation, et si des polymorphismes dans le gène codant pour l'IL-26 pourraient modifier les propriétés de la molécule, ou être associées à des pathologies.

Afin de s'assurer de la pertinence de cette hypothèse, nous avons recherché une co-localisation de l'IL-26 et des intermédiaires de réplication du virus dans les cellules Huh7.5 infectées par HCV. La co-

localisation entre l'IL-26 et le dsRNA révèle que la protéine se trouve effectivement au niveau des sites de réplication du virus, identifiables par leur distribution caractéristique dans le cytoplasme. Une expérience de fixation sur phase solide a confirmé que l'IL-26 pouvait se lier directement à l'ARN viral, confirmant la prédiction bio-informatique. Les résultats montrent que la liaison est plus forte avec la forme bicaténaire de l'ARN viral.

L'interaction entre l'IL-26 et l'ARN viral suggérait que l'effet protecteur pourrait être lié, du moins en partie, à une inhibition de la réplication du génome viral. Cette hypothèse reposait sur le fait que LL-37 avait déjà été montré comme inhibant la réplication du VIH (Bergman, 2007), notamment en diminuant l'activité de sa rétrotranscriptase (Wong, 2011). Un effet similaire a été recherché pour l'IL-26, en raison des similitudes entre le peptide LL-37 et les hélices E et F de l'IL-26.

L'expérience d'inhibition de l'activité des polymérases virales à ARN dépendantes de l'ARN a été effectuée avec l'enzyme du phage $\phi 6$, une forme biologiquement active de la polymérase du HCV n'étant pas commercialement disponible. La polymérase $\phi 6$ partage des similitudes avec la protéine NS5B (Butcher, 2001 ; Poranen, 2008), et constitue donc un modèle pertinent pour cette étude.

Les résultats montrent que l'incubation d'IL-26 avec le brin d'ARN matrice inhibe l'activité de la RdRP du phage $\phi 6$. Ce résultat a d'abord été obtenu en utilisant une matrice d'ARN simple brin. Cela indique que l'IL-26 est capable de bloquer la réplication du génome viral. Nous avons ensuite voulu déterminer si l'IL-26 inhibait la première étape de la réplication (la synthèse de l'intermédiaire double brin) ou la seconde étape (l'amplification du génome viral à partir de l'intermédiaire de réplication), ce deuxième cas étant suggéré par la liaison préférentielle de l'IL-26 à l'ARN double brin. Pour cela, nous avons utilisé un brin matrice d'ARN viral double brin, afin de se focaliser sur la seconde partie de la réplication, la transcription de l'intermédiaire ayant déjà été effectuée. Le résultat de cette deuxième série d'expériences nous montre que cette seconde étape est inhibée, ce qui n'exclut toutefois pas un effet sur la première étape également.

L'ensemble de ces résultats décrit une nouvelle activité biologique de l'IL-26, à savoir l'inhibition de l'activité d'une polymérase virale. Ce mécanisme de protection antivirale a pu être identifié grâce à l'utilisation de la lignée Huh7.5, pour laquelle la protection par les ISG est déficiente. Les expériences permettent de conclure que 1) l'IL-26 est capable de protéger les cellules Huh7.5 de l'infection *in vitro* par HCV, 2) que l'IL-26 peut se fixer à l'ARN viral et 3) que l'IL-26 permet d'inhiber la réplication du génome de HCV. Bien que les liens entre ces différentes observations restent encore à préciser, différentes hypothèses peuvent être posées sur la base des résultats obtenus. L'IL-26 ne se fixe pas à la RdRP du phage $\phi 6$ (données non présentées), ce qui suggère que l'inhibition de l'activité de la polymérase virale est dépendante de la fixation de l'IL-26 au génome viral. L'expérience de

réplication *in vitro* ayant été réalisée avec un minimum de molécules, la présence d'un intermédiaire nécessaire à la liaison semble à exclure. Toutefois, la participation d'autres partenaires (facultatifs) pourraient être envisagée *in vivo*.

Après la mise en évidence de l'inhibition de l'activité d'une polymérase à ARN dépendante de l'ARN par l'IL-26, il serait intéressant de déterminer si l'IL-26 est capable d'inhiber la réplication d'autres virus. Par exemple, il serait intéressant d'étudier la retro-transcriptase du virus VIH, son inhibition ayant été montrée par le peptide LL-37 (Wong, 2011), dont l'IL-26 est structurellement et fonctionnellement proche.

4.2 Les complexes d'IL-26 et d'ARN activent l'immunité innée

L'IL-26 ayant la capacité de se fixer à l'ARN viral, et les complexes formés d'IL-26 et d'ADN ayant des propriétés pro-inflammatoires et antivirales, nous avons ensuite évalué si une telle activité cargo pour les ARN était également portée par l'IL-26. L'expérience de fixation *in vitro* ayant montré que l'IL-26 se lie préférentiellement à l'ARN double brin, nous avons opté pour l'usage de complexes IL-26 et dsRNA viral synthétisés *in vitro*.

La première expérience montre que les complexes induisent la sécrétion d'IL-6 par les cellules mononucléées, notamment par les monocytes. Ce résultat suggère que le rôle de cargo de l'IL-26 permet aussi bien à l'ARN viral qu'à l'ADN d'entrer en contact avec les senseurs aux acides nucléiques. Par la suite, il serait intéressant de déterminer si l'IL-26 protège l'ARN auquel il est lié des RNAses. La durée de vie de l'ARN dans le milieu extracellulaire étant limitée, la complexation à l'IL-26 pourrait permettre de protéger ces molécules afin qu'elles soient détectées par le système immunitaire. Par ailleurs, il a déjà été montré que l'IL-26 induisait une protection partielle de l'ADN contre la dégradation par les DNAses (Poli, 2017).

Après l'aspect inflammatoire de l'immunité innée, nous avons évalué l'induction d'une réponse antivirale par les complexes. Les pDC sont la principale source d'IFN α , une cytokine centrale dans la réponse antivirale (Szabo, 2008). De plus, les pDC ont été montrées comme sensibles à la stimulation par les complexes formés d'IL-26 et d'ADN (Meller, 2015). Nous avons donc stimulé des pDC avec les complexes IL-26 / ARN et observé une forte induction d'IFN α , tant au niveau de l'ARNm que de la protéine. De façon intéressante, l'ARN viral seul n'induit pas d'IFN α , suggérant la nécessité d'une molécule cargo pour que l'ARN extracellulaire active les pDC.

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'IL-26 pouvait induire l'expression des ISG dans des cellules autres que celles de la lignée Huh7.5. Nous avons cherché un autre modèle dans lequel nous pourrions mettre en évidence la protection induite par l'IL-26, et où le mécanisme d'induction des

ISG serait fonctionnel. Nous avons choisi l'infection de mdDC par le virus influenza A (Yu, 2011). Cette infection virale nous semblait pertinente en raison des récentes études qui rapportent l'expression d'IL-26 dans le poumon. Ceci est cohérent avec le rôle d'AMP décrit pour l'IL-26, les AMP étant principalement produits aux portes d'entrée de l'organisme, telles que la peau et l'épithélium pulmonaire.

Les expériences visant à déterminer si l'IL-26 induit la protection des mdDC sont encore en cours, en raison de la grande variabilité due à l'utilisation de cellules de donneurs sains. Des résultats préliminaires montrent néanmoins que la stimulation de mdDC par les complexes d'IL-26 et d'ADN induit l'expression d'IL-6, tandis que les complexes formés avec l'ARN viral induisent également l'expression de MXA, ISG impliqué dans la réponse antivirale. Cette expérience serait à compléter par l'étude de l'expression de différents médiateurs pro-inflammatoires et d'autres ISG, ainsi que de la sécrétion des protéines associées.

Collectivement, ces premières données indiquent que l'IL-26 rendrait l'ARN extracellulaire apte à induire une réponse inflammatoire et/ou antivirale selon le type de cellule étudiée. L'IL-26 agirait donc comme un premier détecteur extracellulaire de la présence de virus, et permettrait aux cellules, immunitaires ou non, d'induire une réponse antivirale grâce à leurs PRR cytoplasmiques.

Un autre point qui nous paraît intéressant est l'existence de deux voies d'activation pour l'IL-26, à savoir le récepteur conventionnel et son activité cargo pour les acides nucléiques. À ce jour, aucune étude n'a cherché à évaluer les parts relatives du récepteur à l'IL-26 et des senseurs à l'ADN dans l'activation des cellules épithéliales. Afin d'isoler les responsabilités respectives de ces deux voies d'activation, une interférence par ARN dirigée contre une sous-unité du récepteur pourrait être effectuée sur une cellule épithéliale exprimant initialement IL-10R2 et IL-20R1. Par ailleurs, les cellules Huh7.5 expriment l'ARNm des deux chaînes du récepteur à l'IL-26, mais la présence des protéines reste à montrer. Il est donc possible que ce modèle puisse nous renseigner sur la réponse indépendante de la présence du récepteur. Alternativement, la réponse à l'IL-26 des cellules immunitaires pourrait être étudiée grâce à l'interférence par ARN d'un ou plusieurs récepteurs de l'immunité innée.

5 Conclusion

Les travaux menés durant cette thèse ont permis d'identifier une nouvelle propriété biologique de l'IL-26, à savoir la protection antivirale à travers l'inhibition de la réplication du génome viral. Cette étude permet de compléter notre compréhension des rôles physiologiques de l'IL-26, jusqu'ici majoritairement décrite dans des pathologies où sa présence est associée à un processus pathologique (ie inflammation chronique). À la lumière de ces résultats, nous pouvons jeter un regard nouveau sur les travaux mettant en relation l'IL-26 et les infections virales. D'une part, nous pouvons expliquer, grâce à l'effet cargo de l'ARN viral, l'activation des cellules NK (Miot, 2015), dont l'IL-26 induit l'effet cytotoxique en l'absence de récepteur, même s'il faudrait confirmer expérimentalement cette hypothèse. D'autre part, nous pouvons relativiser une partie des résultats obtenus par l'infection avec les virus enveloppés (Braum, 2013), où l'IL-26 n'induisait pas les mêmes effets : l'effet protecteur ne se met en place qu'en maintenant le traitement, et est indépendant de la phase d'infection du virus. Des études sont en cours pour analyser le rôle de l'IL-26 dans l'infection par d'autres virus.

6 Annexes

6.1 Annexe I : IL-26 confers pro-inflammatory properties to extracellular DNA.

Cet article démontre l'activité cargo de l'IL-26, qui permet à l'ADN extracellulaire d'entrer dans les monocytes humains et de les activer via les senseurs intracellulaires de l'immunité innée. Cette interaction induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Cette publication s'inscrit dans les thématiques du laboratoire sur l'immunité innée, notamment l'étude des molécules solubles telles que l'IL-26 et l'activation des cellules myéloïdes. L'achèvement de ce travail a coïncidé avec le début de ma thèse et les résultats ont servi de socle aux nouvelles hypothèses posées pour expliquer les observations faites par le laboratoire dans le contexte de l'infection par HCV.

Ma contribution a été de réaliser les expériences de fixation *in vitro* montrant la liaison directe de l'IL-26 à l'ADN (Figure 2.A) ainsi que la production, digestion, et le contrôle de la taille des fragments d'ADN utilisés par Caroline Poli pour stimuler les cellules.

IL-26 Confers Pro-inflammatory Properties to Extracellular DNA

Caroline Poli,^{*,†,1} Jean François Augusto,^{*,‡,1} Jonathan Dauvé,^x Clément Adam,^{*} Laurence Preisser,^{*} Vincent Larochette,^{*} Pascale Pignon,^{*} Ariel Savina, Simon Blanchard,^{*,†} Jean François Subra,^{*,‡} Alain Chevailler,^{*,†} Vincent Procaccio, Anne Croué,^{**} Christophe Créminon,^{††} Alain Morel,^{*,x} Yves Delneste,^{*,†,2} Helmut Fickenscher,^{‡‡,2} and Pascale Jeannin^{*,†,2}

*CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, LabEx IGO, 49000 Angers, France; †Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU Angers, 49000

Angers, France; ‡Service de Néphrologie-Dialyse-Transplantation, CHU Angers,

49000 Angers, France; xInstitut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, 49000 Angers, France; {Roche SAS Scientific Partnerships, 92100 Boulogne Billancourt, France; INSERM, CNRS, Université d'Angers, 49000 Angers, France; #Laboratoire de Biochimie et Génétique, CHU Angers, 49000 Angers, France; **Laboratoire d'Histopathologie-Cytopathologie, Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers, 49000 Angers, France; ††Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Commissariat à l'Énergie Atomique Saclay, iBiTec-S, 91190 Gif sur Yvette, France; and ‡‡Institute for Infection Medicine, Christian Albrecht University of Kiel and University Medical Center Schleswig-Holstein, 24000 Kiel, Germany

1

C.P. and J.F.A. contributed equally to this work.

2

Y.D., H.F., and P.J. equivalently supervised this study.

ORCID: 0000-0003-1170-5586 (C.P.); 0000-0003-1498-2132 (J.F.A.); 0000-00022565-8066 (J.D.).

This work was supported by institutional grants from INSERM and the University of Angers and by a grant from Roche SAS (France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Pascale Jeannin, CHU Angers, UMR INSERM 1232, Bâtiment IRIS, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France. E-mail address: pascale.jeannin@univ-angers.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AAV, anti-neutrophil cytoplasmic Ab-associated vasculitis; APBS, Adaptive Poisson-Boltzmann Solver; BVAS, Birmingham vasculitis activity score 2003; CPP, cell-penetrating peptide; IPM, in-plane membrane; ISG, IFNstimulated gene; mtDNA, mitochondrial DNA; NET, neutrophil extracellular trap; pDC, plasmacytoid dendritic cell; siRNA, short interfering RNA; SLE, systemic lupus erythematosus; SMC, smooth muscle cell; STING, stimulator of IFN gene.

Copyright 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

Abstract

In physiological conditions, self-DNA released by dying cells is not detected by intracellular DNA sensors. In chronic inflammatory disorders, unabated inflammation has been associated with a break in innate immune tolerance to self-DNA. However, extracellular DNA has to complex with DNA-binding molecules to gain access to intracellular DNA sensors. IL-26 is a member of the IL-10 cytokine family, overexpressed in numerous chronic inflammatory diseases, in which biological activity remains unclear. We demonstrate in this study that IL-26 binds to genomic DNA, mitochondrial DNA, and neutrophil extracellular traps, and shuttles them in the cytosol of human myeloid cells. As a consequence, IL-26 allows extracellular DNA to trigger pro-inflammatory cytokine secretion by monocytes, in a STING- and inflammasome-dependent manner. Supporting these biological properties, IL-10-based modeling predicts two DNA-binding domains, two amphipathic helices, and an in-plane membrane anchor in IL-26, which are structural features of cationic amphipathic cell-penetrating peptides. In line with these properties, patients with active autoantibody-associated vasculitis, a chronic relapsing autoimmune inflammatory disease associated with extensive cell death, exhibit high levels of both circulating IL-26 and IL-26–DNA complexes. Moreover, in patients with crescentic glomerulonephritis, IL-26 is expressed by renal arterial smooth muscle cells and deposits in necrotizing lesions. Accordingly, human primary smooth cells secrete IL-26 in response to pro-inflammatory cytokines. In conclusion, IL-26 is a unique cationic protein more similar to a soluble pattern recognition receptor than to conventional cytokines. IL-26 expressed in inflammatory lesions confers pro-inflammatory properties to DNA released by dying cells, setting up a positive amplification loop between extensive cell death and unabated inflammation.

Introduction

Nucleic acids, and especially DNA, constitute potent microbial moieties that activate innate immune cells. Their recognition by DNA sensors, such as TLR9 and stimulator of IFN genes (STING), which are sequestered in endosomes and cytosol, respectively, triggers type I IFN and pro-inflammatory cytokine secretion, thereby controlling host defense countermeasures (1). Mainly expressed by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in humans, TLR9 recognizes DNA containing unmethylated CpG motifs that are more prevalent in microbes (1). STING, expressed in numerous cell types including myeloid and lymphoid cells (2, 3), recognizes a wide variety of DNA (4). In physiological conditions, the localization of self-DNA in nucleus and mitochondria avoids its recognition by DNA

sensors. Extracellular and intracellular DNases, which rapidly degrade DNA released by dying cells (5) and aberrant self-DNA present in cytosol and endosomes (6, 7), respectively, also contribute to prevent cell activation by self-DNA. In pathological conditions such as systemic lupus erythematosus (SLE), chronic polyarthritis, and psoriasis, DNA sensor activation results in chronic inflammation and a type I IFN signature (8, 9). The *in vivo* break of innate immune tolerance to self-DNA observed in these pathologies has been associated to excessive cell death and defects in dying cell clearance or in DNase activity (10, 11). However, by itself, the accumulation of extracellular self-DNA could be not sufficient to trigger inflammation. Indeed, large amounts of extracellular DNA fail to stimulate immune cells, both *in vitro* (12–14) and *in vivo* (15). Neutrophil extracellular traps (NETs), which result from the ejection of chromatin into the extracellular space, do not promote inflammation *in vivo* (16). In support, cargo molecules, allowing extracellular DNA to gain access to intracellular DNA sensors, have been brought out in patients with SLE and psoriasis. In SLE, autoantibodies against nuclear Ags form immune complexes that favor DNA internalization via FcγR and induce type I IFN secretion by pDCs (17). HMGB1 and the cationic amphipathic antimicrobial peptide LL37 facilitate the uptake of NETs by pDCs (18). In psoriasis, LL37, secreted by activated keratinocytes, forms complexes with extracellular DNA and promotes TLR9-dependent pDCs and STING-dependent myeloid cell activation (13, 14). It is likely that still unidentified DNA cargo molecules exist in other sterile inflammatory disorders. Their identification will provide new insights in the physiopathology of chronic inflammatory diseases.

IL-26 is a member of the IL-10–related cytokine subfamily that includes IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, and IL-24. The amino acid identity between these cytokines is up to ~30%, whereby characteristic amino acid positions are conserved (19). Accordingly, despite the relatively low sequence identity, all members show a strikingly similar secondary structure, with six or seven α helices and connecting loops (20).

The IL-26 protein contains numerous positively charged amino acids, including 30 residues that are either lysine or arginine (21). Consequently, IL-26 has an isoelectric point of 10.4. IL-26 mRNA has been reported in activated T cells, mainly Th17 cells, and in activated NK cells (21, 22). Patients suffering from chronic inflammatory disorders (Crohn's disease, rheumatoid arthritis, and chronic hepatitis C virus infection) exhibit high levels of seric IL26, and the presence of IL-26 has been reported in inflammatory and destructive lesions (23–25).

To date, the biological roles of IL-26 and the identification of the IL-26–induced signaling pathways remain unclear. A recent study has reported that IL-26 interacts with DNA, leading to IFN α secretion by pDCs through TLR9 (26). Initially, IL-26 was reported to induce IL-8 and/or IL-10 by some human

epithelial cell lines through a receptor composed of IL-20R1 and IL-10R2 (24, 27, 28). IL-26 also triggers pro-inflammatory cytokine production by human myeloid cells and NK cells, in the absence of IL-20R1, suggesting that IL-26 is not a classical cytokine (23, 25, 29, 30).

Because IL-26 is overexpressed in chronic sterile inflammatory disorders, we investigated whether IL-26 may render monocytes and neutrophils, which are major contributors to chronic inflammation (31, 32), able to sense extracellular self-DNA. We analyzed the expression and role of IL-26 in anti-neutrophil cytoplasmic Ab-associated vasculitis (AAV), a chronic relapsing-remitting autoimmune disease associated with deleterious inflammation and massive local cell death in injured small vessels.

Materials and Methods

Patients

Sera from 69 AAV patients were collected before the initiation of immunosuppressive treatment, and it was stored in the immunology laboratories of the University Hospital of Angers (France), Le Mans General Hospital (France), and the National Reference center for necrotizing vasculitis and systemic sclerosis (Cochin University Hospital, Paris, France). Biological and clinical characteristics of AAV patients are summarized in Supplemental Table I. The protocol was in agreement with the local ethics committee (2011-06), and blood samples were collected after informed consent of patients was obtained. For 10 patients with active AAV, a second serum was available 6–12 mo after treatment initiation. Disease activity was determined using the Birmingham vasculitis activity score (BVAS) according to the European League Against Rheumatism recommendations (33, 34). Sera from 85 healthy donors were from the blood collection center of Angers (Angers, France; agreement ANG-2003-02).

Recombinant human cytokines

His6-tagged human IL-26 was expressed in *Escherichia coli* and purified as previously described (35). IL-26 did not contain detectable levels of endotoxin (23), and SDS-PAGE silver staining confirmed the absence of protein contaminants (Supplemental Fig. 1). IL-10, IL-22, IL-24, and IL-29 were purchased from ImmunoTools (Friesoythe, Germany), and IL-19 was from R&D Systems (Lille, France).

Construction of an *in silico* structural model of IL-26

Amino acid sequence analysis, using ClustalW software, showed better identity between IL-26 and IL-10 (26%) compared with IL-19 (20%) and IL-22 (21%). Structural hypothesis of IL-26 was thus built by

comparative modeling using the IL-10 x-ray crystal structure as a template for α -parallel bundles. Secondary structure assignments from the amino acid sequence analysis of IL-10 were used to model helices. Virtual 3D construction of the IL-26 model was performed using Modeller software and was validated by Procheck. Electrostatic surface charges were calculated using Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS). MetaDBsite was used to determine potential DNA-binding residues. Amphipathic helices were identified using AmphipaSeek.

Nucleic acid preparation and NETs isolation

Mammalian genomic DNA was extracted from the human cell line MM6 using a commercial kit (QIAamp DNA kit; Qiagen, Courtaboeuf, France) and partially digested with DNase I (Life Technologies, Saint-Aubin, France); fragmented DNA (200 bp) was purified by ethanol precipitation. Mitochondrial DNA (mtDNA) was amplified by long PCR (primers available upon request) and purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Villepinte, France). Long mtDNA amplicons were fragmented into 200-bp-long fragments using the IonXpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies). DNA concentration was measured using the Qubit fluorimeter (Life Technologies). NETs were generated by activating neutrophils from healthy donors for 3 h with 100 nM PMA. After washing in PBS, undigested NETs were collected by vigorous pipetting, and cellular debris was removed by centrifugation. Quantification of DNA in NETs was assessed using the PicoGreen dsDNA kit (Life Technologies). Total RNA was isolated from MM6 cells using the RNeasy micro kit (Qiagen). The concentration and purity of nucleic acids were determined by spectrophotometry.

Cell isolation and stimulation

PBMCs were isolated from healthy subjects by standard density gradient centrifugation on Lymphocyte Separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). CD14⁺ monocytes were purified from PBMCs by positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For neutrophil purification, leukocytes were first separated from erythrocytes by density sedimentation with 6% dextran (SigmaAldrich, St. Louis, MO), and neutrophils were further isolated from mononuclear cells by density-gradient centrifugation. Purity of monocytes and neutrophils (CD14⁺ and CD66b⁺ cells, respectively) was routinely .95%. CD62L expression was monitored to ensure that neutrophils did not undergo spontaneous activation. Monocytes and neutrophils were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10 or 2% FCS (GE Healthcare Life Sciences, Ve'lizy-Villacoublay, France), respectively, and containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES, and 100 U/ml penicillin and streptomycin (all from Lonza). Neutrophil culture medium was supplemented with 10 mg/ml heparin (Sigma-Aldrich) and 20 ng/ml GM-CSF (CellGenix, Freiburg, Germany).

IL-26 (50 ng/ml) was incubated or not with 0.1–10 mg/ml fragmented genomic DNA, 0.01–0.3 mg/ml NETs, 0.3 mg/ml mtDNA, or 0.1–10 mg/ml RNA for 30 min at 37°C before addition to monocytes. As control, monocytes were stimulated with 200 ng/ml LPS (from *E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich). In some experiments, a mix of IL-26 and DNA was treated with 10 IU/ml DNase I before addition to monocytes. In others, cells were treated for 2 h with 50 nM bafilomycin A, 5–20 mM Z-VADFMK, or 10–50 mM MCC950 (all from Sigma-Aldrich), before addition of DNA plus IL-26.

Human pulmonary artery smooth muscle cells (SMCs) were cultured following manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were differentiated for 15 d and stimulated or not for 24 h with 100 ng/ml IL-1b (Miltenyi Biotec) and 100 ng/ml TNF-a (ImmunoTools).

Cytokine quantification

IL-26 was quantified in the sera and cell culture supernatants by ELISA, as previously described (25). IL-1b, IL-6, and IL-8 were quantified in cell culture supernatants by ELISA (Diaclone, Dijon, France). IL-1b, IL-6, IL17, and TNF-a levels were assessed in the sera of AAV patients and healthy subjects using a Bio-Plex ELISA-based immunoassay (Bio-Rad, Hercules, CA).

Detection of circulating IL-26–DNA complexes

IL-26–DNA complexes were assayed in sera by ELISA. In brief, after coating with 5 mg/ml anti-IL-26 mAb (clone 13C9) and blocking with 1% BSA, plates were incubated with 40 ml sera before incubation with an HRP-labeled anti-DNA mAb (Roche, Penzberg, Germany). Bound Abs were detected using the peroxidase substrate ABTS (Sigma-Aldrich); results are expressed in OD450nm values.

Analysis of the interaction of IL-26 with nucleic acids

A solid-phase binding assay was performed to analyze the binding of IL-26 to DNA. In brief, 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 10 mg/ml DNA or IL-20R1-Fc (R&D Systems), used as positive control (27). After saturation with PBS containing 5% BSA (w/v), plates were successively incubated with 5 mg/ml IL-26, 0.2 mg/ml biotinylated anti-IL-26 mAb (clone 8G3), and then with streptavidin-HRP (BD Pharmingen). Bound mAbs were revealed with the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (Sigma-Aldrich); results are expressed in OD450nm values after subtraction of the values obtained in the absence of IL-26.

Immunohistological analysis

Paraffin-embedded kidney biopsies (Department of Tissue Pathology, University Hospital of Angers) were used to analyze IL-26 expression in kidney biopsies of AAV patients. Slides of normal kidney

biopsies from human adults (Biochain, Newark, CA) were used as control. After deparaffinization and Ag demasking, slides were incubated with 10% human serum before incubation with an anti-IL-26 mAb (clone 197505; R&D Systems) or an IgG2b control mAb (BD Biosciences). Bound Abs were detected with a Bond Polymer Refine Detection kit and Peroxidase detection system (both from Leica Microsystems, Newcastle, U.K.). To visualize the IL-26–NETs interaction, we seeded neutrophils on glass coverslips treated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for 1 h, allowed them to settle, and treated them with 100 nM PMA (SigmaAldrich) for 3 h. After fixation with 4% PFA and incubation with 10% mouse serum in PBS, slides were incubated with 5 mg/ml IL-26 for 1 h. IL26 was then detected with an anti-IL-26 mAb (clone 197505) labeled with Alexa Fluor 633 (protein labeling kit; Invitrogen) or with an IgG2b control mAb (BD Biosciences). After staining of nuclei with DAPI, slides were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen) and imaged with a Leica TCS SP8 confocal microscope.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA extraction and reverse transcription were performed as previously described (23). The expression of IL-1b, IL-6, IL-26, IFN β , and STING mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR using Maxima SYBR Green qPCR Mastermix (Thermo Scientific); primer sequences are available upon request. Specific gene expression was calculated using the 2^{-2DDCT} method using GAPDH as calibrator.

Reporter cell lines assay

The involvement of STING was evaluated by using STING-sufficient THP1-Blue IFNstimulated gene (ISG) cells, which contain an IFN regulatory factor–inducible SEAP reporter construct, and THP1-Blue KD ISG cells, in which the expression of STING is silenced. THP1-Blue ISG and THP1-Blue KD ISG cells, cultured according to the manufacturer’s instructions (InvivoGen, Toulouse, France), were stimulated with IL-26, DNA, IL-26–DNA complexes, or 10 mM 3939-cGAMP (InvivoGen); internalization of DNA using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies) was used as positive control. SEAP activity was detected using the QUANTI-Blue reporter assay (InvivoGen). Results are expressed as fold induction of reporter activity using PBS-treated samples as reference.

Silencing of TMEM173 expression in monocytes

Short interfering RNA (siRNA) targeting was used to decrease TMEM173 expression in primary monocytes. Human monocyte nucleofector kit and Nucleofector device were used for delivering siRNA into monocytes, following the manufacturer’s instructions (Lonza). In brief, 8.3 × 10⁶ monocytes were suspended in 100 μ l of human monocyte nucleofector solution and transfected with ON-

TARGETplus siRNA TMEM173 or control siRNA (GE Healthcare Dharmacon, Ve'lizy-Villacoublay, France) at a final concentration of 100 nM using the Y-001 program. The expression of TMEM173 was assessed by flow cytometry (using AF647labeled anti-TMEM173 and isotype control mAbs; BD Pharmingen) and by Western blotting using rabbit anti-TMEM173 (R&D Systems) and anti- β -actin (Cell Signaling, Danvers, MA) polyclonal Abs.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (version 5.02; GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences between two groups were assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test. When analysis included more than two groups, the nonparametric Kruskal–Wallis test or the two-way ANOVA was applied with the Bonferroni–Dunn's posttest comparison. Spearman correlation coefficient was used in univariate analysis. Significant differences are illustrated as * p , 0.05, ** p , 0.01, *** p , 0.001.

Results

IL-26 and extracellular DNA synergize to induce pro-inflammatory cytokine expression by myeloid cells

To evaluate whether IL-26 may render innate immune cells sensitive to extracellular DNA, we exposed monocytes to 0.1– 10 mg/ml fragmented genomic DNA, either alone or after preincubation with 50 ng/ml IL-26. As previously reported, IL-26 (23), but not extracellular DNA (13), induced IL-6 (Fig. 1A, left panel) and IL-1b production by monocytes (Fig. 1A, right panel). Interestingly, a preincubation of IL-26 with DNA significantly increased, in a dose-dependent manner, the production of IL-1b and IL-6 (Fig. 1A). The levels of IL-6 (Fig. 1A) and IL-1b (data not shown) were not affected when IL-26 plus DNA were treated with DNase I before addition to monocytes. As control, LPS induced IL-1b and IL-6 production by monocytes (Fig. 1A). IL-6 and IL-1b mRNA expression were also dramatically enhanced by IL-26 plus DNA, compared with IL-26 alone, but not by DNA alone (Fig. 1B).

This first set of experiments suggested that IL-26 may render DNA stimulatory. DNA sensing induces, in addition to pro-inflammatory cytokines, the secretion of type I IFNs (1). Accordingly, IL-26 plus DNA upregulated IFN β mRNA expression by monocytes (Fig. 1B).

The synergistic effect of IL-26 and DNA on pro-inflammatory cytokine production by monocytes was observed not only with genomic DNA but also with mtDNA (also released by dying cells [36]) and NETs. Whereas NETs alone (used at 10–300 ng/ml NETs-associated DNA content) did not induce

detectable IL-6 (Fig. 1A), addition of IL-26 resulted in a huge secretion of IL-6, dependent on the doses of NETs DNA (Fig. 1A). A similar dosedependent increase of IL-6 production was also observed with IL-26 mixed with RNA (Fig. 1A). None of the other IL-10 family members tested (IL-10, IL-19, IL-22, IL-24, and IL-29) enabled monocytes to sense extracellular DNA (Supplemental Fig. 2).

Myeloid cells are highly sensitive to danger signals. It was thus important to exclude that the activation of monocytes may result from the presence of contaminating molecules. As reported previously (23), IL-26 did not contain stimulatory levels of endotoxins. Moreover, we observed that: 1) the treatment of IL-26 plus DNA with proteinase K abolished their capacity to activate monocytes, and 2) that the treatment of DNA with DNase I or of RNA with RNase before incubation with IL-26 abolished their capacity to potentiate the IL-26–induced secretion of IL-6 by monocytes (data not shown). Collectively, these results suggest that the stimulatory activity of IL-26 and nucleic acids was not associated to the presence of contaminating danger signals.

Neutrophils also became responsive to extracellular DNA in the presence of IL-26. The exposure of neutrophils to IL-26 plus DNA, mtDNA, or NETs induced the production of CXCL8 (Fig. 1C). In contrast, IL-26, as reported previously (37), or DNA alone had a limited effect on CXCL8 secretion by neutrophils (Fig. 1C).

Based on these results, we hypothesized that the ability of IL-26 alone to activate primary myeloid cells (Fig. 1A–C) (23) could result from the presence of nucleic acids released by dying cells during in vitro culture. In support, the addition of DNase I into the monocyte cultures before stimulation with IL-26 significantly decreased IL-26–induced IL-6 secretion (Fig. 1D).

As it was detected earlier (as soon as 6 h) and at higher levels than the ones of IL-1b in response to IL-26 plus nucleic acids, the quantification of IL-6 in cell culture supernatants was used to monitor monocyte activation in the following experiments, unless otherwise stated.

Collectively, these results show that IL-26 synergizes with extracellular self-DNA to induce pro-inflammatory cytokine secretion by human myeloid cells.

IL-26 exhibits DNA-binding properties

Cell culture assays suggested that IL-26 may interact with nucleic acids. A solid-phase binding assay confirmed that IL-26 bound to immobilized DNA and to IL-20R1, used as a positive control (Fig. 2A). This result was in agreement with the capacity of IL-26 to complex to DNA in vitro (26). Immunofluorescence microscopy revealed that IL-26 also bound to the chromatin fibers of NETs (Fig. 2B); no binding of the anti-IL-26 mAb to NETs was observed in the absence of IL-26 (Fig. 2B).

We next explored the structural features of IL-26, which may explain its DNA-binding capacity. In the absence of IL-26 crystal structure, we set up a 3D structural model of IL-26 (Fig. 2C) based on the crystal structure of IL-10, which displays the closest identity with IL-26. This model, generated using the ClustalW software and validated using the Procheck software, showed that .90% of residues are located in allowed regions of the Ramachandran plot. Interestingly, analysis with APBS software (38) and with MetaDBsite (39) defined two regions rich in positively charged residues and with predicted DNA-binding properties, composed by helix E and by helix B plus the N terminus of helix C (Fig. 2D, 2E). As observed with the IL-22–based IL-26 model (26), the electrostatic potential on the molecular surface of IL-26 was globally positive.

These results show that IL-26 binds to DNA to form complexes, a property supported by its unconventional cytokine structure.

IL-26 is a cationic amphipathic protein that shuttles extracellular DNA into the cytosol of monocytes

We then investigated whether IL-26 may enable extracellular DNA to access the cytosol of myeloid cells. Monocytes were incubated with Alexa 488–labeled DNA, in the absence or presence of IL26, and the percentage of fluorescent monocytes was analyzed by flow cytometry. In the presence of IL-26, an important percentage of fluorescent monocytes was observed; this percentage was dependent on the concentration of DNA (Fig. 3A). Confocal microscopy confirmed the internalization of IL-26–DNA complexes, whereas DNA alone was not internalized (Fig. 3B). Finally, none of the other members of cytokines tested (IL-10, IL-19, IL-22) enabled the internalization of DNA in monocytes (Supplemental Fig. 2).

We then analyzed the biochemical characteristics of IL-26 supporting this property. Among the six α helices (A–F) of IL-26, helices E and F presented amphipathic properties (Fig. 3C), as determined by the AmphipaSeek web server. Their helical wheel representations evidenced typical amphipathic α helices with a hydrophobic face and a hydrophilic face composed of positively charged residues, such as three lysines in helix F (Fig. 3D). DNA-binding domains and amphipathic α helices are features of cationic cellpenetrating peptides (CPPs) designed for DNA delivery, such as the KALA peptide (40). Interestingly, helix F of IL-26 has similarities with the KALA peptide, including an α -helical conformation with a hydrophilic face including lysine residues and a hydrophobic face including leucine residues (Fig. 3D). Finally, helix F was also predicted to have an in-plane membrane (IPM) motif anchor, involved in the binding of proteins to cell membranes (41).

Collectively, these results show that IL-26 displays features of CPPs (large positive area, two amphipathic helices, and an IPM anchor), which may contribute to explaining its capacity to shuttle DNA within myeloid cells.

The activation of monocytes by IL-26–DNA complexes involves STING and the inflammasome

We next investigated by which mechanism IL-26–DNA complexes activate monocytes. Previous studies reported that the inflammasome-dependent production of IL-1b by DNA-stimulated myeloid cells involves caspase 1 and NLRP3 (42, 43), and that IL1b can induce the autocrine production of IL-6 (44). Accordingly, the production of IL-6 induced by IL-26–DNA complexes was reduced in the presence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (90.4 ± 4.3% inhibition with 20 mM Z-VAD-FMK; mean ± SEM, n = 4) and of the NLRP3 inhibitor MCC950 (57.4 ± 8.1% inhibition with 50 mM MCC950) (Fig. 4A).

However, IL-26–DNA complexes also induce, in addition to pro-inflammatory cytokines, the expression of IFN β , whose production is not dependent on inflammasome activation (45). We thus hypothesized that IL-26–DNA complexes may stimulate myeloid cells via DNA sensors and focused on those that induce both IFN β and pro-inflammatory cytokines synthesis, namely TLR9 and STING. In agreement with the fact that TLR9 is absent in human monocytes (46), bafilomycin A, a specific blocker of endosomal TLR signaling (47), did not reduce monocyte (Fig. 4B, left panel) and neutrophil (Fig. 4B, right panel) activation by IL26–DNA complexes. As control, bafilomycin A prevented the activation of monocytes and neutrophils by the endosomal TLR7/8 ligand CL097 (Fig. 4B).

STING was reported to be involved in DNA-induced inflammatory cytokine production by human myeloid cells (13, 48). We first compared the response of the cell line THP1-ISG, either or not silenced for STING (THP1-ISG-KD STING and THP1-ISG, respectively), with IL-26–DNA complexes. Results showed that, contrary to THP1-ISG cells, THP1-ISG-KD STING cells did not respond to IL-26–DNA complexes (Fig. 4C). As expected, THP1ISG-KD STING cells were also less sensitive to the STING ligand 3939-cGAMP and to transfected DNA, compared with THP1-ISG cells (Fig. 4C). Second, silencing STING using siRNA significantly decreased the production of IL-26 by monocytes in response to IL-26–DNA complexes, compared with control siRNA (Fig. 4D). As control, siRNA targeting STING decreased STING mRNA expression and protein expression, as assessed by flow cytometry (24.8 ± 4.0% decrease of MFI value; mean ± SEM, n = 6) and Western blotting (Supplemental Fig. 3); STING expression was not modulated in monocytes transfected with control siRNA (Supplemental Fig. 3). Finally, we observed that IL-26–DNA complexes and IL-26 induced the phosphorylation of IFN

regulatory factor 3 (Supplemental Fig. 3), which is involved in the signaling pathway downstream of STING.

These results demonstrate that IL-26 renders extracellular DNA able to signal via the inflammasome and the cytosolic STING pathway, a result in line with the capacity of IL-26 to shuttle extracellular DNA into myeloid cells.

In AAV patients with crescentic glomerulonephritis, vascular SMCs of renal arteries express IL-26

We have shown that IL-26 plus DNA induce pro-inflammatory cytokines via STING. A constitutive activation of STING in STING-associated vasculopathy with onset in infancy patients results in unabated systemic inflammation and vasculitis (49). AAV is a chronic and remitting autoimmune disease that targets microvessel walls and is associated with: 1) a systemic and local inflammation (50), 2) a massive cell death in injured tissues associated with elevated serum levels of nucleosomes (51), and 3) a type I IFN signature (elevated seric circulating type I IFN levels and tissue MxA expression in active AAV) (52). This last point suggests a break in innate immune tolerance to self-DNA. We thereby hypothesized that IL-26 could be present and involved, together with DNA released by dying cells, in AAV.

We first analyzed by immunohistochemistry the expression of IL-26 in kidney biopsies of active AAV patients. Kidney is one of the main target organs in AAV, with glomerulonephritis characterized by crescentic necrotizing lesions (53). Biopsies of active patients revealed an intense staining with an anti-IL-26 mAb of vascular SMCs from arteries (Fig. 5A) and from afferent glomerular arterioles (data not shown), whereas endothelial cells and fibroblasts were not stained (Fig. 5A). No staining of vascular SMCs was observed with a control mAb. Kidney arteries and afferent glomerular arterioles from healthy subjects were not stained by the anti-IL-26 mAb (Fig. 5A).

Confirming that SMCs may represent a novel source of IL-26, we observed that cultured human primary SMCs constitutively expressed IL-26 mRNA (Fig. 5B); moreover, intracellular IL-26 was detected by immunofluorescence in nonstimulated cells (Fig. 5C). Stimulation of SMCs with the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α upregulated IL-26 mRNA expression (Fig. 5B) and IL-26 production (Fig. 5C, 5D). Finally, IL-26 expression by arterial SMCs was associated with a diffuse IL26 labeling in crescentic glomeruli (Fig. 5E); glomeruli from healthy subjects were not stained by anti-IL-26 mAb (Fig. 5E).

These results show that, in active AAV patients, IL-26 is produced by renal arterial SMCs and is present in crescentic glomeruli, lesions characterized by massive cell infiltration and cell death (leukocytoclasia) (53).

IL-26–DNA complexes and high levels of IL-26 are detected in the sera of active AAV patients

The expression of IL-26 by arterial SMCs suggested the systemic presence of IL-26. Because circulating DNA is present in active AAV patients (51), we hypothesized that IL-26–DNA complexes remained undetectable in remitting AAV patients and healthy subjects (Fig. 6A). The concentrations of serum IL-26 were higher in AAV patients ($n = 69$) than in healthy subjects ($n = 85$) (6.2 ng/ml [0–140] versus 0.25 ng/ml [0–4.7], respectively) (Fig. 6C). Both active and remitted patients exhibited a higher concentration of IL-26 (9.3 ng/ml [0–140] and 1.6 ng/ml [0–8], respectively) than healthy subjects (Fig. 6D). The ELISA used in this study quantifies total IL-26 (complexed or not to DNA; data not shown). Although IL-26 levels were not statistically higher in active than in remitted patients, those with high IL-26 concentration (2.4 ng/ml, corresponding to mean + 2 SD of IL-26 level determined in healthy subjects) had a higher BVAS than patients with low IL-26 concentration (0.24 ng/ml) (8.2 ± 9.2 and 14.6 ± 10.9, respectively) (Fig. 6E). Interestingly, 9 of 10 patients, for whom blood samples were available at flare-up and 6–12 mo after the initiation of an immunosuppressive treatment, exhibited a decrease in circulating IL-26 after treatment (Fig. 6F).

In conclusion, active AAV patients exhibit IL-26 in necrotic lesions and circulating IL-26–DNA complexes (Fig. 7).

Discussion

IL-26 is a member of the IL-10 cytokine subfamily overexpressed in different chronic inflammatory diseases (e.g., Crohn's disease, rheumatoid arthritis, psoriasis, chronic hepatitis C virus infection, and graft-versus-host disease) for which biological activity remains unclear (23–26, 54). We report in this article that IL-26: 1) exhibits several features of CPPs designed for DNA transfection and, 2) allows myeloid cells to be activated by extracellular DNA in an inflammasome-dependent and STING-dependent manner. In support of these observations, AAV patients with glomerulonephritis display IL-26 deposits in injured kidneys and circulating IL-26–DNA complexes. IL-26 thus appears as a pro-inflammatory molecule that links extensive cell death and sustained inflammation.

We demonstrate in this study that IL-26 shuttles extracellular DNA into the cytosol of human myeloid cells. This property is supported by its unique biochemical and structural features (cationicity and amphipathicity), which are similar to the ones of cell-penetrating (40) and antimicrobial peptides (55), such as the cathelicidin LL-37 (13, 14). In this study, we propose an IL-26 structural model based on IL-10 because IL-10 displays the closest identity with IL-26 and both cytokines have an alkaline isoelectric point. The overall high cationic charge of IL-26 supports its DNA-binding properties; more precisely, we identify the helices B and E as the main DNA-binding motifs in IL-26. Moreover, the IL-10-based model predicts that the amphipathic helix F displays an accessible IPM anchor. IPM anchors are present in several proteins, especially antimicrobial and CPPs, and allow their insertion at the membrane interfaces. In support, although IL-10 and IL-19 are also fairly cationic (pHi 8 and pHi 7.6, respectively) and display amphipathic helices, IL-26 is the only one to enable monocytes to sense DNA.

In accordance with our findings, a recent study, using an IL-22-based model, showed that IL-26 exhibits some structural features of antimicrobial peptides (26). Contrary to IL-10, IL-22 has a global neutral charge (pHi 7.1). Overall, the IL-10- and IL-22-based models exhibit similarities, including the preservation of disulphide bonds and amphipathicity, but also differences. The IL-22-based model predicts that IL-26 may adopt a beads-on-string shape, supportive of its direct antimicrobial activity (26). However, contrary to the IL-10-based model, this model does not predict an accessible IPM anchor. Of note, the N terminus of IL-26, which may act as a noncovalent intermolecular linker to form multimeric IL-26, remains accessible in the IL-10-based IL-26 model. In accordance with our model, the IL-22-based model also suggested that IL-26 aggregates and condensates DNA to form insoluble particles that can be internalized by target cells.

IL-26 thus combines: 1) a high cationic charge, 2) the proximity of two amphipathic helices with an accessible IPM anchor, and 3) the capacity to shuttle extracellular DNA into myeloid cells. IL-26 thus appears as a unique endogenous DNA transfection protein with structural and biochemical properties similar to CPPs.

In agreement with our previous study reporting that IL-26 is pro-inflammatory (23), our results showed that IL-26-DNA complexes induce the production of IL-6 and IL-1 β by human monocytes. Interestingly, IL-1 β , whose secretion requires inflammasome activation, can induce, in an autocrine manner, the secretion of IL-6 (44). Accordingly, the production of IL-6 by monocytes stimulated with IL-26-DNA complexes was reduced upon inhibition of caspases and NLRP3. However, the fact that IL-26-DNA complexes also induced type I IFNs, the production of which is not dependent on NLRP3 or AIM-2 inflammasomes (56), was in favor of the involvement of an intracellular DNA sensor (such as

STING or IFI16), whose engagement can also induce inflammatory cytokines (1). In agreement with this hypothesis, results showed that the activation of human myeloid cells by IL-26–DNA complexes also involved STING, a cytosolic adapter that can be activated directly by DNA or by upstream DNA sensors, mainly cGAS (57). In support of this, and in agreement with others (48), the STING ligand 3939-cGAMP induced, in addition to IFN β , the expression of IL-1 β and IL-6 by human monocytes (data not shown). Collectively, our results show that the activation of human monocytes by IL-26–DNA complexes involves STING and the inflammasome, most probably caspases, although the relative roles of these pathways cannot be determined.

IL-26 confers immunostimulatory properties to the different types of DNA (i.e., genomic DNA, mtDNA, and NETs). Previous studies have evidenced that genomic and mtDNA, released upon cell injury (36), activate the STING pathway (4, 58, 59). NETs have been reported in AAV and SLE and are suspected to contribute to breaking innate tolerance to self-DNA (60, 61). Notably, in the presence of IL-26, myeloid cells are strongly activated by low concentrations of NETs, suggesting a major pro-inflammatory role of IL-26 at sites of neutrophil accumulation and death. Because STING expression is not restricted to myeloid cells (2), it remains to be evaluated whether other STING-expressing human cell types respond to IL-26 plus DNA.

Previous *in vitro* studies have shown that IL-26 stimulates pro-inflammatory cytokine secretion by monocytes (23) and NK (25) cells, in the absence of IL-20R1 expression. In line with these observations, DNase I significantly prevents IL-26–induced activation, showing that the activation induced by IL-26 alone is partly mediated by DNA released by dying cells in culture.

The observation that DNase I does not totally inhibit *in vitro* the effect of IL-26 on monocytes could be explained by the ability of IL-26 to protect extracellular DNA from DNase I (26), or to protect cytosolic self-DNA from intracellular DNases, leading to a cytosolic DNA accumulation that activates STING (6, 62, 63).

In contrast with human myeloid cells, pDCs express functional TLR9 and respond to IL-26 plus DNA via TLR9 (26). Surprisingly, this activation required ~700-fold higher levels of IL-26 than IL-26 plus DNA-induced myeloid cell activation, suggesting that IL-26–DNA complexes preferentially activate myeloid cells.

Finally, the use of transgenic IL-26 mice to assess *in vivo* the role of IL-26 in DNA-induced inflammation is precluded because murine myeloid cells are not sensitive to human IL-26 plus DNA (data not shown). In parallel, murine myeloid cells do not sense DNA-CPP (LL37 or KALA) complexes, whereas they are responsive to the STING activator 3939-cGAMP (data not shown). The efficiency of

CPP on murine cells has hitherto not been reported and seems to be cell lineage (64–66) and species dependent (67).

Collectively, these data show that IL-26 acts as a self-DNA cargo molecule that triggers pro-inflammatory cytokine secretion by human myeloid cells.

In line with these results, we were interested in AAV patients, especially during acute flare-ups. Indeed, the acute lesions begin as a neutrophil-rich necrotizing inflammation, with admixed monocytes producing destructive necrotizing vascular and extravascular inflammation (53). We show in this study that active AAV patients exhibit high levels of circulating IL-26 and, interestingly, of IL-26–DNA complexes. Immunohistochemistry revealed that vascular SMCs from kidney biopsies of active AAV patients express IL-26. Moreover, we observed that, *in vitro*, a combination of IL-1 β and TNF- α , which are overexpressed in vasculitis (68), induce IL-26 expression by differentiated vascular SMCs. We provide evidence in this article of activated SMCs as an IL-26–producing cell type. In line with this observation, SMCs are known to produce pro-inflammatory cytokines and to participate in immune cell extravasation (69). This result does not exclude that Th17 cells, which are present in AAV lesions (68), may also contribute to IL-26 expression. In conclusion, in active AAV lesions, IL-26 seems produced locally, especially by vascular SMCs, and accumulates in necrotizing crescentic lesions, characterized by accumulation of dead cells and leukocytoclasia. IL-26 may therefore contribute to boost local pro-inflammatory cytokine secretion, thereby amplifying not only cell recruitment and death but also IL-26 secretion, as a positive feedback loop (Fig. 7). It would be of interest to assess IL-26 implication in the pathophysiology of other chronic inflammatory disorders associated with cell death, sustained inflammation, and an overexpression of IL-26, such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease (23–26).

In conclusion, IL-26 appears as a unique cationic and amphipathic protein, more similar to a soluble pattern recognition receptor than to a conventional cytokine, that links dying cell DNA and uncontrolled inflammation. IL-26 thereby constitutes a promising target to dampen sustained inflammation.

Acknowledgments

We thank members of the cellular and molecular (PACeM) and microscopy (SCIAM) facilities of the University of Angers and members of the histopathology laboratory of the University Hospital of Angers for expert technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Paludan, S. R. 2015. Activation and regulation of DNA-driven immune responses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79: 225–241.
2. Ishikawa, H., and G. N. Barber. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674–678.
3. Barber, G. N. 2015. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 760–770.
4. Ishikawa, H., Z. Ma, and G. N. Barber. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461: 788–792.
5. Napirei, M., H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, and T. Mo¨ro¨y. 2000. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat. Genet.* 25: 177–181.
6. Stetson, D. B., J. S. Ko, T. Heidmann, and R. Medzhitov. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134: 587–598.
7. Yoshida, H., Y. Okabe, K. Kawane, H. Fukuyama, and S. Nagata. 2005. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6: 49–56.
8. Demaria, O., J. Di Domizio, and M. Gilliet. 2014. Immune sensing of nucleic acids in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunopathol.* 36: 519–529.
9. Kawane, K., M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa, and S. Nagata. 2006. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443: 998–1002.
10. Ahn, J., D. Gutman, S. Saijo, and G. N. Barber. 2012. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 19386–19391.
11. Yang, Y. G., T. Lindahl, and D. E. Barnes. 2007. Trex1 exonuclease degrades self DNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 131: 873–886.
12. Barton, G. M., J. C. Kagan, and R. Medzhitov. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 7: 49–56.

13. Chamilos, G., J. Gregorio, S. Meller, R. Lande, D. P. Kontoyiannis, R. L. Modlin, and M. Gilliet. 2012. Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood* 120: 3699–3707.
14. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y. H. Wang, B. Su, F. O. Nestle, et al. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564–569.
15. Yasuda, K., P. Yu, C. J. Kirschning, B. Schlatter, F. Schmitz, A. Heit, S. Bauer, H. Hochrein, and H. Wagner. 2005. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 174: 6129–6136.
16. Schauer, C., C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhöfer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, et al. 2014. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* 20: 511–517.
17. Means, T. K., E. Latz, F. Hayashi, M. R. Murali, D. T. Golenbock, and A. D. Luster. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* 115: 407–417.
18. Garcia-Romo, G. S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R. L. Coffman, et al. 2011. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3: 73ra20.
19. Wolk, K., S. Kunz, K. Asadullah, and R. Sabat. 2002. Cutting edge: immunecells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.* 168: 5397–5402.
20. Trivella, D. B., J. R. Ferreira-Ju´nior, L. Dumoutier, J. C. Renauld, and I. Polikarpov. 2010. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 2909–2935.
21. Donnelly, R. P., F. Sheikh, H. Dickensheets, R. Savan, H. A. Young, and M. R. Walter. 2010. Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21: 393–401.
22. Braum, O., H. Pirzer, and H. Fickenscher. 2012. Interleukin-26, a highly cationic T-cell cytokine targeting epithelial cells. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 11: 221–229.
23. Corvaisier, M., Y. Delneste, H. Jeanvoine, L. Preisser, S. Blanchard, E. Garo, E. Hoppe, B. Barre´, M. Audran, B. Bouvard, et al. 2012. IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces pro-inflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol.* 10: e1001395.

24. Dambacher, J., F. Beigel, K. Zitzmann, E. N. De Toni, B. Goëke, H. M. Diepolder, C. J. Auernhammer, and S. Brand. 2009. The role of the novel Th17 cytokine IL26 in intestinal inflammation. *Gut* 58: 1207–1217.
25. Miot, C., E. Beaumont, D. Duluc, H. Le Guillou-Guillemette, L. Preisser, E. Garo, S. Blanchard, I. Hubert Fouchard, C. Creminon, P. Lamourette, et al. 2015. IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* 64: 1466–1475.
26. Meller, S., J. Di Domizio, K. S. Voo, H. C. Friedrich, G. Chamilos, D. Ganguly, C. Conrad, J. Gregorio, D. Le Roy, T. Roger, et al. 2015. T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* 16: 970–979.
27. Hoër, S., H. Pirzer, L. Dumoutier, F. Bauer, S. Wittmann, H. Sticht, J. C. Renauld, R. de Waal Malefyt, and H. Fickenscher. 2004. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.* 279: 33343–33351.
28. Sheikh, F., V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, N. K. Shah, S. V. Smirnov, S. Anantha, H. Dickensheets, L. Dumoutier, J. C. Renauld, A. Zdanov, et al. 2004. Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J. Immunol.* 172: 2006–2010.
29. Nagalakshmi, M. L., E. Murphy, T. McClanahan, and R. de Waal Malefyt. 2004. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int. Immunopharmacol.* 4: 577–592.
30. Wolk, K., K. Witte, E. Witte, S. Proesch, G. Schulze-Tanzil, K. Nasilowska, J. Thilo, K. Asadullah, W. Sterry, H. D. Volk, and R. Sabat. 2008. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1181–1193.
31. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 762–774.
32. Kolaczkowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 159–175.
33. Stone, J. H., G. S. Hoffman, P. A. Merkel, Y. I. Min, M. L. Uhlfelder, D. B. Hellmann, U. Specks, N. B. Allen, J. C. Davis, R. F. Spiera, et al; International Network for the Study of the Systemic

Vasculitides (INSSYS). 2001. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. *Arthritis Rheum.* 44: 912–920.

34. Mukhtyar, C., L. Guillevin, M. C. Cid, B. Dasgupta, K. de Groot, W. Gross, T. Hauser, B. Hellmich, D. Jayne, C. G. Kallenberg, et al; European Vasculitis Study Group. 2009. EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 310–317.

35. Knappe, A., S. Hörr, S. Wittmann, and H. Fickenscher. 2000. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 74: 3881–3887.

36. Zhang, Q., M. Raouf, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki, and C. J. Hauser. 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464: 104–107.

37. Che, K. F., S. Tengvall, B. Levaänen, E. Silverpil, M. E. Smith, M. Awad, M. Vikström, L. Palmberg, I. Qvarfordt, M. Sköld, and A. Lindén. 2014. Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190: 1022–1031.

38. Baker, N. A., D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10037–10041.

39. Si, J., Z. Zhang, B. Lin, M. Schroeder, and B. Huang. 2011. MetaDBSite: a metaapproach to improve protein DNA-binding sites prediction. *BMC Syst. Biol.* 5 (Suppl. 1): S7.

40. Copolovici, D. M., K. Langel, E. Eriste, and U. Langel. 2014. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano* 8: 1972–1994.

41. Sapay, N., Y. Guermeur, and G. Deleage. 2006. Prediction of amphipathic inplane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics* 7: 255.

42. Coward, W. R., A. Marei, A. Yang, M. M. Vasa-Nicotera, and S. C. Chow. 2006. Statin-induced pro-inflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J. Immunol.* 176: 5284–5292.

43. Shin, M. S., Y. Kang, N. Lee, E. R. Wahl, S. H. Kim, K. S. Kang, R. Lazova, and I. Kang. 2013. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J. Immunol.* 190: 1407–1415.

44. Tosato, G., and K. D. Jones. 1990. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 75: 1305–1310.
45. Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz, and K. A. Fitzgerald. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458: 514–518.
46. Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdörfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168: 4531–4537.
47. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 513–520.
48. Ahn, J., P. Ruiz, and G. N. Barber. 2014. Intrinsic self-DNA triggers inflammatory disease dependent on STING. *J. Immunol.* 193: 4634–4642.
49. Liu, Y., A. A. Jesus, B. Marrero, D. Yang, S. E. Ramsey, G. A. Montealegre Sanchez, K. Tenbrock, H. Wittkowski, O. Y. Jones, H. S. Kuehn, et al. 2014. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 371: 507–518.
50. Ohlsson, S., J. Wieslander, and M. Segelmark. 2004. Circulating cytokine profile in anti-neutrophilic cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: prediction of outcome? *Mediators Inflamm.* 13: 275–283.
51. Holdenrieder, S., P. Eichhorn, U. Beuers, W. Samtleben, U. Schoenermarck, R. Zchoval, D. Nagel, and P. Stieber. 2006. Nucleosomal DNA fragments in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075: 318–327.
52. Kessenbrock, K., M. Krumbholz, U. Schönnermarck, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, H. J. Gröne, V. Brinkmann, and D. E. Jenne. 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15: 623–625.
53. Jennette, J. C., and R. J. Falk. 2014. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10: 463–473.
54. Ohnuma, K., R. Hatano, T. M. Aune, H. Otsuka, S. Iwata, N. H. Dang, T. Yamada, and C. Morimoto. 2015. Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 194: 3697–3712.

55. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395.
56. Gray, E. E., D. Winship, J. M. Snyder, S. J. Child, A. P. Geballe, and D. B. Stetson. 2016. The AIM2-like receptors are dispensable for the interferon response to intracellular DNA. *Immunity* 45: 255–266.
57. Paludan, S. R., and A. G. Bowie. 2013. Immune sensing of DNA. *Immunity* 38: 870–880.
58. White, M. J., K. McArthur, D. Metcalf, R. M. Lane, J. C. Cambier, M. J. Herold, M. F. van Delft, S. Bedoui, G. Lessene, M. E. Ritchie, et al. 2014. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 159: 1549–1562.
59. Rongvaux, A., R. Jackson, C. C. Harman, T. Li, A. P. West, M. R. de Zoete, Y. Wu, B. Yordy, S. A. Lakhani, C. Y. Kuan, et al. 2014. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 159: 1563–1577.
60. Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Ricciari, et al. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 3: 73ra19.
61. Knight, J. S., W. Zhao, W. Luo, V. Subramanian, A. A. O’Dell, S. Yalavarthi, J. B. Hodgins, D. T. Eitzman, P. R. Thompson, and M. J. Kaplan. 2013. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 123: 2981–2993.
62. Hařrtlova, A., S. F. Erttmann, F. A. Raffi, A. M. Schmalz, U. Resch, S. Anugula, S. Lienenklaus, L. M. Nilsson, A. Krořger, J. A. Nilsson, et al. 2015. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity* 42: 332–343.
63. Volkman, H. E., and D. B. Stetson. 2014. The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15: 415–422.
64. Hurtado, P., and C. A. Peh. 2010. LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 184: 1425–1435.
65. Hasan, M., C. Ruksznis, Y. Wang, and C. A. Leifer. 2011. Antimicrobial peptides inhibit polyinosinic-polycytidylic acid-induced immune responses. *J. Immunol.* 187: 5653–5659.
66. Merkle, M., J. Pircher, H. Mannell, F. Krořtz, P. Bl€um, T. Czermak, E. Gaitzsch, C. Schneider, S. Kořppel, A. Ribeiro, and M. Wořrnle. 2015. LL37 inhibits the inflammatory endothelial response induced by viral or endogenous DNA. *J. Autoimmun.* 65: 19–29.

67. Nakagawa, Y., and R. L. Gallo. 2015. Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 194: 1274–1284.

68. Nogueira, E., S. Hamour, D. Sawant, S. Henderson, N. Mansfield, K. M. Chavele, C. D. Pusey, and A. D. Salama. 2010. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25: 2209–2217.

69. Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li, and J. B. Michel. 2012. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* 95: 194–204.

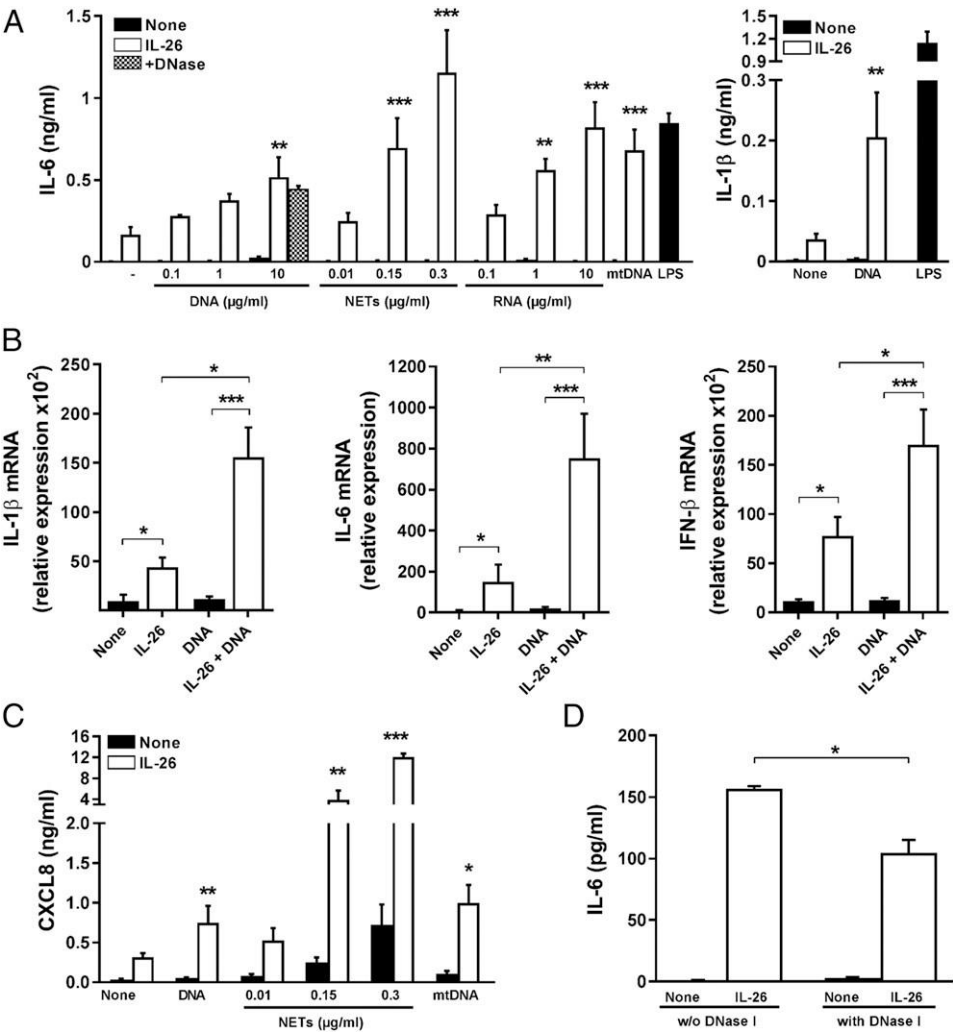


FIGURE 1. IL-26 synergizes with DNA in inducing pro-inflammatory cytokines and IFNβ expression by myeloid cells. (A) Human monocytes were stimulated or not with 50 ng/ml IL-26, in the presence or absence of 0.1–10 mg/ml genomic DNA, 0.01–0.3 mg/ml NETs, 0.1–10 mg/ml RNA, or 0.1 mg/ml

mtDNA. Stimulation with 200 ng/ml LPS was used as a control. IL-6 (left panel) and IL-1b (right panel) were quantified by ELISA in the 24-h cell culture supernatants. (B) Monocytes were stimulated or not for 2 h with 50 ng/ml IL-26 in the presence or absence of 10 mg/ml genomic DNA. The expression of IL-1b, IL-6, and IFN β mRNA was evaluated by quantitative RT-PCR. Results are expressed as a level of mRNA expression relative to GAPDH. (C) Human neutrophils were stimulated or not with 50 ng/ml IL-26, in the presence or absence of 10 mg/ml genomic DNA, 0.01–0.3 mg/ml NETs, or 0.1 mg/ml mtDNA. CXCL8 was quantified in the 24-h culture supernatants. (D) Monocytes were incubated or not with 10 IU/ml DNase I for 2 h before exposure to 50 ng/ml IL-26. IL-6 was quantified by ELISA in the 24-h culture supernatants. (A–D) Results are expressed as mean \pm SEM of four independent experiments. * p , 0.05, ** p , 0.005, *** p , 0.001. (A, C, and D) Two-way ANOVA with Bonferroni posttest, p value: comparison between IL-26 alone and IL-26 plus DNA. (B) one-way ANOVA.

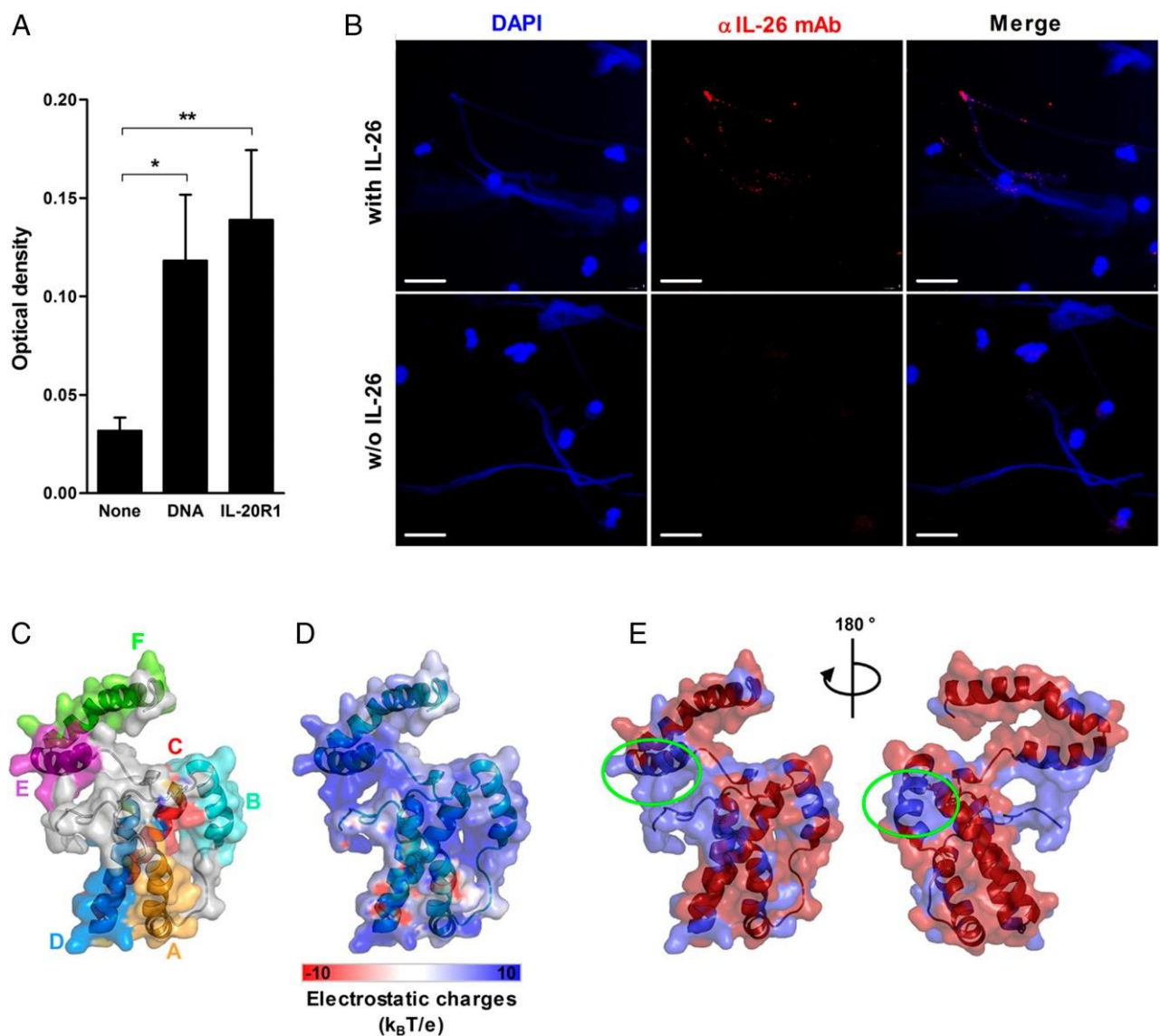


FIGURE 2. IL-26 binds to DNA. (A) The binding of IL-26 to immobilized DNA was assessed in a solid-phase binding assay. IL-26 was added to plates coated with 10 mg/ml DNA or IL-20R1-Fc. Bound IL-26 was detected using biotinylated anti-IL-26 mAb revealed with streptavidin-HRP and TMB substrate. Results are expressed in OD450nm values after subtraction of the background (mean 6 SEM, n = 6). *p , 0.05, **p , 0.01, Mann-Whitney U test. (B) NETs were incubated with 5 mg/ml IL-26 (upper panels) or not (lower panels). Bound IL-26 was detected with an Alexa Fluor 633-labeled anti-IL-26 mAb, and DNA was visualized with DAPI. Images are representative of one of two independent experiments. Scale bars, 20 mm. (C) A 3D model of IL-26 was generated using the IL-10 x-ray crystal structure as a template and the software Modeler 9v2; this model depicts the six (A-F) α helices. (D) Electrostatic potential on the molecular surface of IL-26, calculated using APBS, is colored from red (210 kbT/ec) to blue (+10 kbT/ec). (E) The bluecolored patches on the molecule surface correspond to DNA-binding domains (green circles), as determined using MetaDBsite.

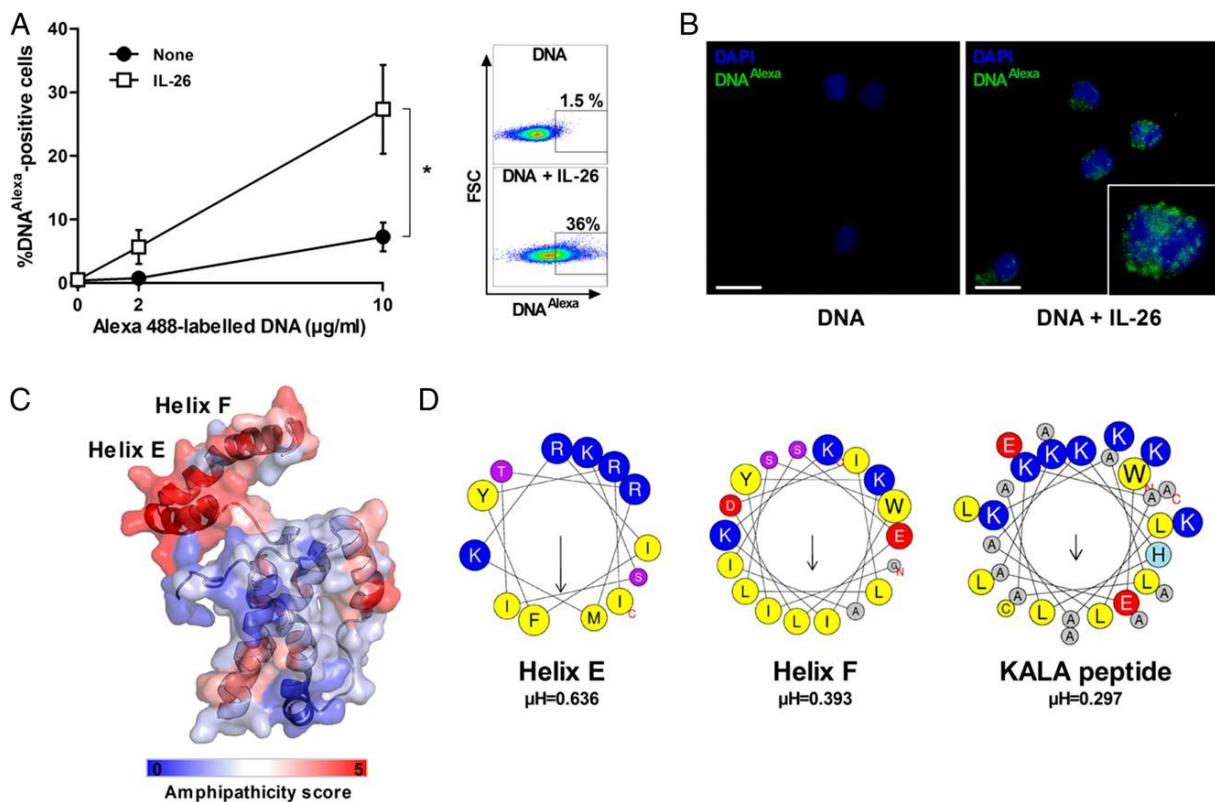


FIGURE 3. IL-26 mediates the internalization of DNA into the cytosol of monocytes. (A) The internalization by monocytes of IL-26 complexed with Alexa 488-labeled DNA was assessed by flow cytometry (left panel). Results are expressed as a percentage of fluorescent cells (mean 6 SEM, n = 7). Representative dot plots are shown (right panel). *p , 0.05, two-way ANOVA. (B) The intracellular localization of Alexa 488-labeled DNA within human monocytes after 24-h incubation with or without IL-26 was analyzed by confocal microscopy. Green indicates Alexa 488-labeled DNA; blue indicates DAPI. Scale bars, 10 mm; insert, higher magnification. (C) Surface representation of IL-26 colored according to the amphipathic score, from blue (low) to red (high), using the Amphipaseek web server. (D) Helical wheel representation of helices E (left panel) and F (middle panel) of IL-26, compared with the CPP KALA (right panel), using HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>). The magnitude and direction of the hydrophobic moment (mH) is indicated with a vector arrow.

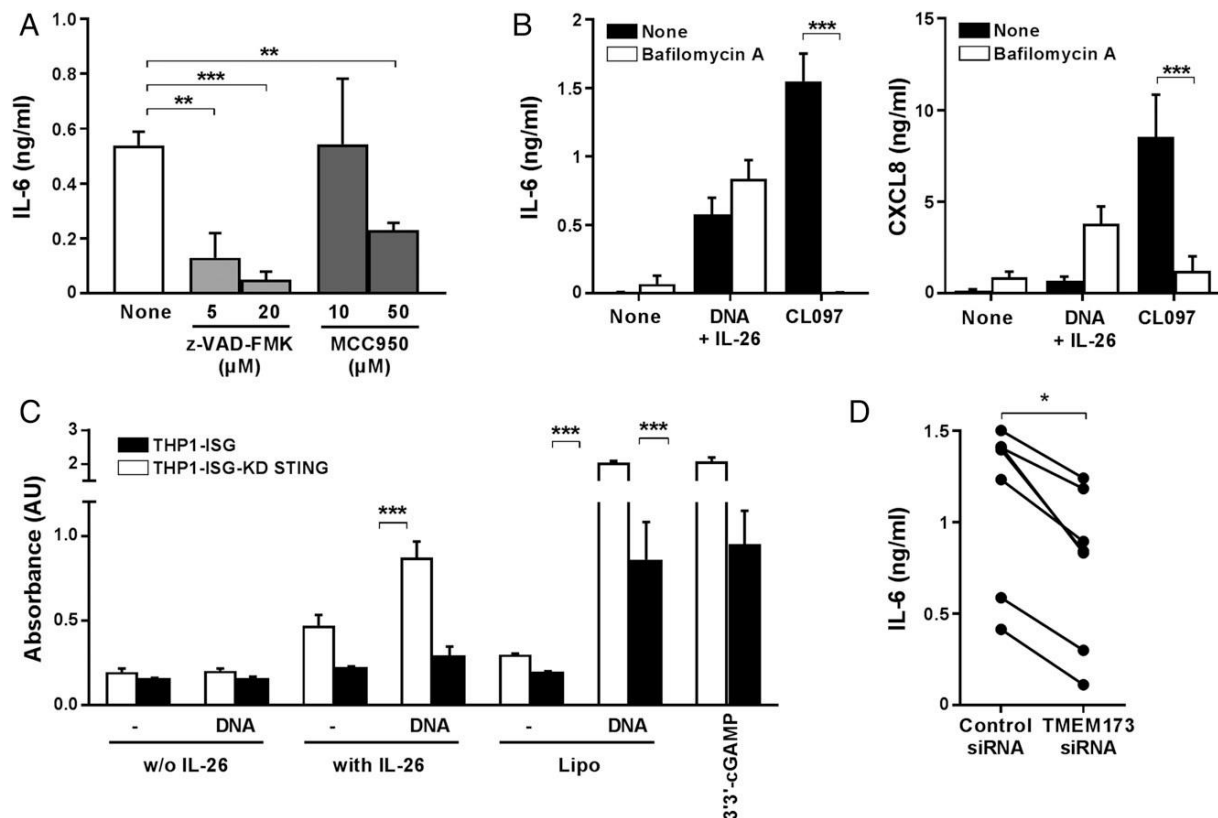


FIGURE 4. The activation of monocytes with IL-26–DNA complexes is dependent on inflammasome and STING activation. (A) Human monocytes were stimulated with 50 ng/ml IL-26 in the presence of 10 mg/ml DNA without or with 5–20 mM Z-VAD-FMK or 10–50 mM MCC950. IL-6 was quantified in the 24-h cell culture supernatants by ELISA. (B) Monocytes (left panel) or neutrophils (right panel) were incubated or not with 50 nM bafilomycin A for 2 h before exposure to 50 ng/ml IL-26 plus 10 mg/ml genomic DNA, or to 250 ng/ml CL097, a synthetic TLR7/8 agonist. IL-6 and CXCL8 were quantified by ELISA in the 24-h culture supernatants. (C) The human myeloid cell line THP1-ISG, either knocked down or not for STING (THP1-ISG-KD STING and THP1-ISG, respectively), used at 5×10^5 cells/ml, was stimulated for 24 h with 400 ng/ml IL-26, 10 mg/ml DNA, 400 ng/ml IL-26 plus 10 mg/ml DNA, or 10 mM 3939-cGAMP (a synthetic STING agonist), or was transfected with 10 mg/ml genomic DNA using the Lipofectamine 2000 reagent (Lipo). ISG5A promoter activity was measured by a chromogenic (SEAP substrate) assay. (D) Monocytes were transfected for 48 h with siRNA targeting TMEM173 (STING) mRNA or control siRNA before stimulation with 50 ng/ml IL-26 plus 10 mg/ml genomic DNA. IL-6 was quantified in the 24-h cell culture supernatants by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM of six independent experiments (**p*, 0.05, Wilcoxon test). (A–C) Data are shown as mean \pm SEM of four independent experiments. **p*, 0.05, ***p*, 0.01, ****p*, 0.001. (A) one-way ANOVA; (B and C) two-way ANOVA.

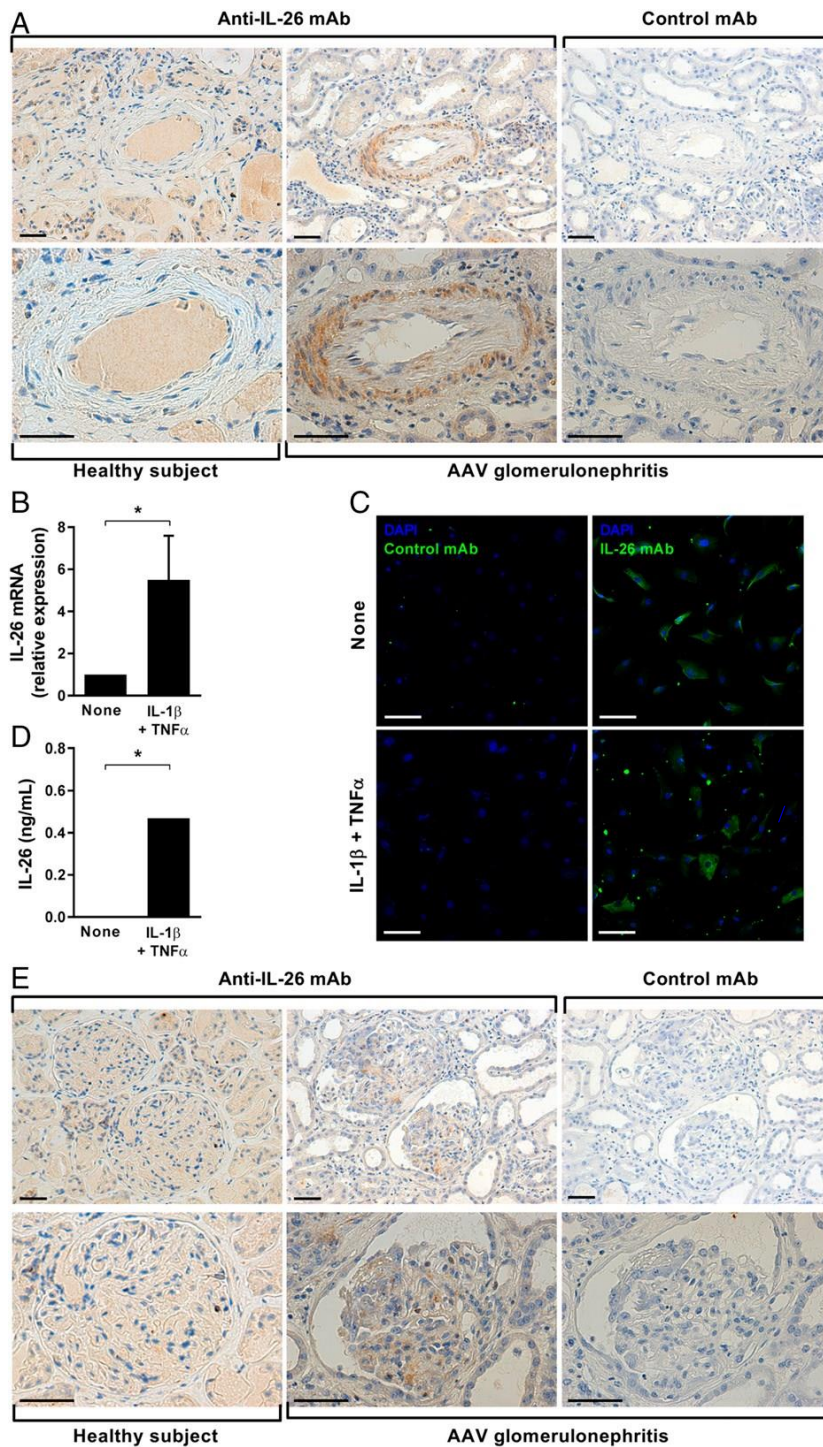


FIGURE 5. IL-26 expression in vascular SMCs in the kidney of patients with AAV glomerulonephritis. (A) The expression of IL-26 was evaluated by immunohistochemistry in kidney biopsies from AAV

patients or healthy subjects. Slides were incubated with an anti-IL-26 mAb or an isotype control mAb; bound Abs were detected with a Bond Polymer Refine Detection kit and peroxidase detection system. (Left) Staining with anti-IL-26 mAb; (right) staining with the isotype control mAb. Sale bars, 50 mm. (B) IL-26 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR in differentiated vascular SMCs, stimulated or not for 24 h with 100 ng/ml IL-1b and 100 ng/ml TNF-a; results are expressed as the level of mRNA expression relative to GAPDH. (C) The expression of IL-26 by differentiated vascular SMCs stimulated or not for 24 h with 100 ng/ml IL-1b and 100 ng/ml TNF-a was analyzed by immunofluorescence, using Alexa Fluor 633-labeled anti-IL-26 mAb. Scale bars, 100 mm. Results are representative of one out of three independent experiments. (D) Quantification by ELISA of IL-26 in the supernatants of differentiated vascular SMCs stimulated for 24 h with 100 ng/ml IL-1b and 100 ng/ml TNF-a. (E) The expression of IL-26 was evaluated by immunohistochemistry in kidney biopsies from AAV patients with crescentic glomerulonephritis (as in A). (Left panels) Staining with anti-IL-26 mAb; (right panels) staining with isotype control mAb. Scale bars, 50 mm. (B and C) Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). *p < 0.05, Mann-Whitney U test. (A and E) Results are representative of one of four independent experiments.

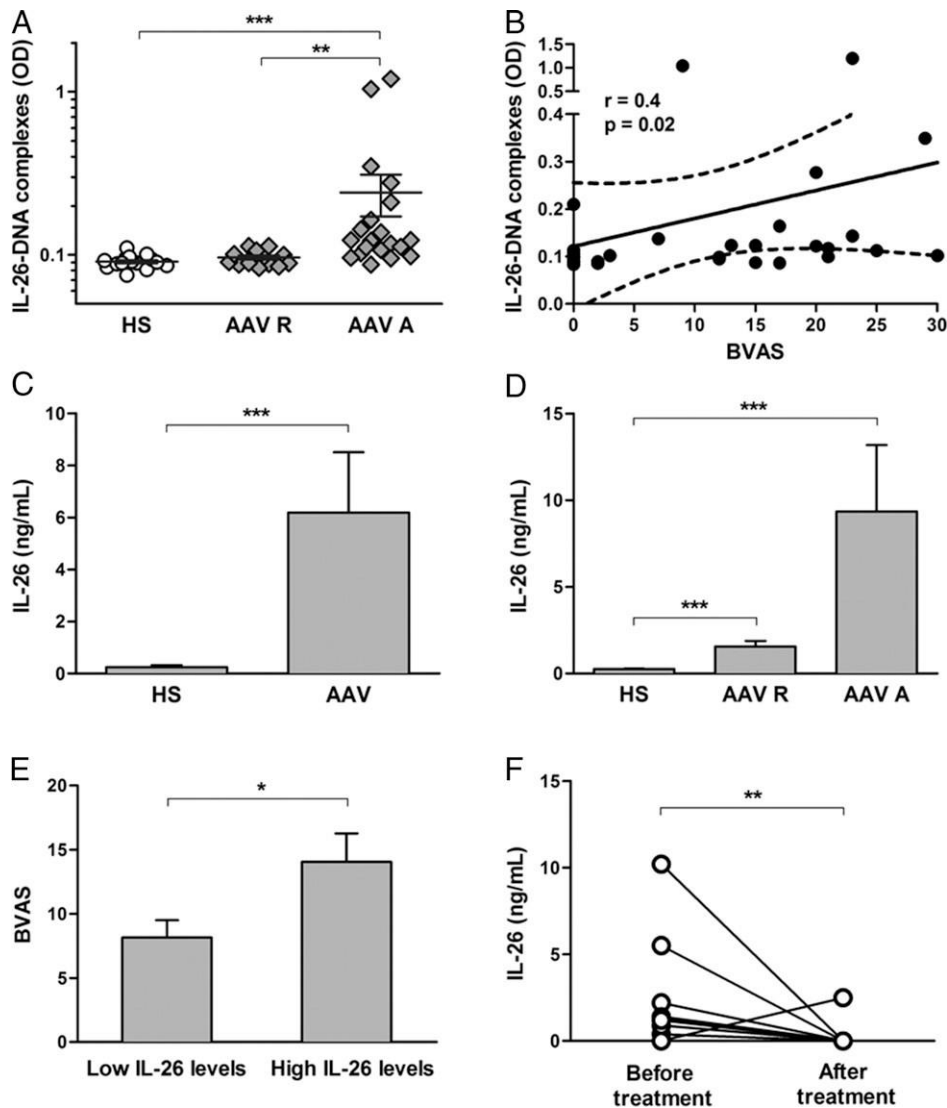


FIGURE 6. Analysis of IL-26 and IL-26–DNA complexes in AAV patients. (A) IL-26–DNA complexes were assessed by ELISA in the sera of AAV patients ($n = 35$; acute disease: AAV A, $n = 20$; remission disease: AAV R, $n = 15$) and healthy subjects (HS) ($n = 16$). (B) Circulating IL-26–DNA complexes were correlated to BVAS in AAV patients ($n = 32$) (Spearman correlation coefficient). (C) IL-26 was quantified by ELISA in the sera of healthy subjects (HS) ($n = 85$) and AAV patients ($n = 69$). (D) IL-26 levels were analyzed according to disease activity status: AAV patients in remission (AAV R; $n = 28$) and AAV patients with active disease (AAV A; $n = 41$). (E) BVAS value according to serum IL-26 levels (low: <2.4 ng/ml, $n = 45$; high: ≥ 2.4 ng/ml, $n = 24$). The cutoff value of IL26 was determined as the mean value + 2 SD determined in healthy subjects. (F) IL-26 was quantified in the sera of 10 AAV patients at the disease onset and 6–12 mo of follow-up. (A and C–E) Data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. (A and D) Kruskal–Wallis test; (C) t test; (E and F) Mann–Whitney U test

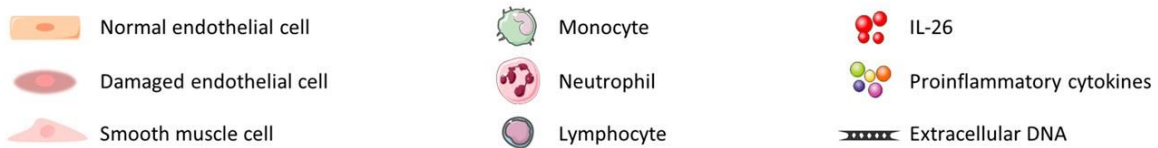
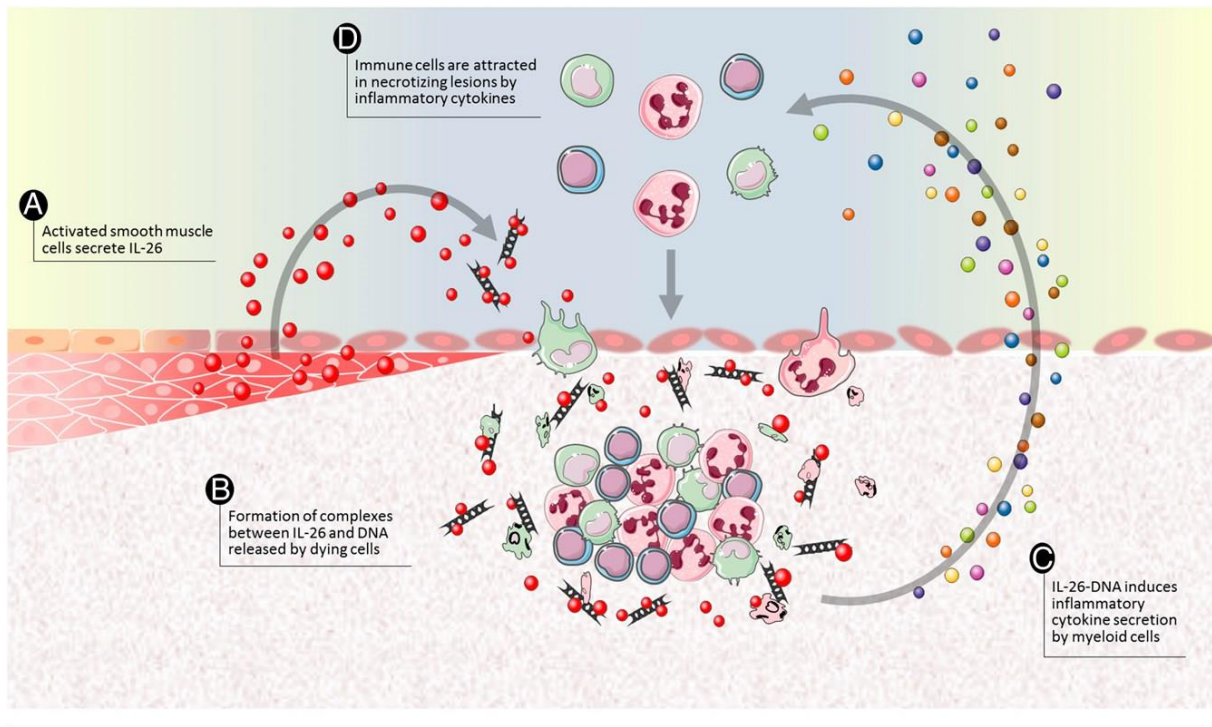


FIGURE 7. Schematic representation of the role of IL-26 in active AAV. Vascular kidney SMCs of patients with crescentic necrotizing lesions produce IL-26 (A). As a consequence of its unique cationic and amphipathic properties, IL-26 binds to self-DNA released by dying cells (B). IL-26 sustains the inflammatory process by enabling myeloid cells to sense dying cell DNA (C), thereby establishing a harmful positive amplification loop that may potentiate the inflammation process (recruitment of neutrophils, production of IL-26–induced cytokines in necrotizing lesions) (D). This scheme was drawn using modified pictures from Servier Medical Art under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

6.2 Annexe II : IL-26, an intriguing member of the IL-20 cytokine family.

Cette revue a été écrite sur invitation par *Frontiers in immunology* dans le cadre d'une mise à jour des connaissances sur les cytokines de la famille de l'IL-20. L'importance de cet article, précédé de peu par deux autres revues sur l'IL-26, est de résumer pour la première fois en détail les propriétés de peptide antimicrobien de l'IL-26. Nous présentons les multiples activités de la protéine, à savoir son rôle de cytokine via son récepteur, son action antibactérienne directe, ainsi que son activité de PRM soluble permettant de détecter l'ADN extracellulaire. Nous concluons par la proposition d'intégrer l'IL-26 à la famille des kinocidines, groupe de molécules présentant à la fois un rôle de cytokine et d'AMP.

Les résultats de cette thèse étendent les activités de l'IL-26 présentées dans cette revue. Au rôle antibactérien porté par l'IL-26 grâce à ses caractéristiques physicochimiques, nous pouvons ajouter son rôle antiviral direct. Ceci a déjà été observé pour le LL37, peptide antimicrobien capable d'inhiber l'activité de la polymérase de HIV. Dans un second temps, nous montrons que l'activité de PRM soluble de l'IL-26 peut être étendue à tous les acides nucléiques, les résultats de cette thèse montrant que l'ARN viral est rendu activateur des cellules immunitaires, comme l'est l'ADN.

IL-26, an intriguing member of the IL-20 cytokine family

Vincent Larochette¹, Charline Miot^{1,2}, Caroline Poli^{1,2}, Philippe Roingeard³, Helmut Fickenscher⁴,
Pascale Jeannin^{1,2}, Yves Delneste^{1,2}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

² CHU Angers, Département d'Immunologie et Allergologie, Angers, France

³ Inserm unit 966, Medical school of the University of Tours, Tours, France

⁴ Institute for Infection Medicine, Christian-Albrecht University of Kiel and University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

All the authors equivalently contributed to this manuscript

Correspondance : Pr Pascale Jeannin or Dr Yves Delneste, CHU Angers, Bâtiment IBS-IRIS, UMR
Inserm 1232, Equipe Immunité innée et Immunothérapie, 4 rue Larrey, F-49933 Angers

pascale.jeannin@univ-angers.fr, yves.delneste@inserm.fr

Abbreviations

AAV, ANCA-associated vasculitis; Ab, antibody; ACD, allergy contact dermatitis; AMP, antimicrobial peptide; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; CMV, cytomegalovirus; CPP, cell-penetrating peptide; CRF, cytokine receptor family; CTCL, cutaneous T cell lymphoma; DC, dendritic cells; GVHD, graft-versus-host disease; HSV-1, herpes simplex virus 1; HVS, herpesvirus saimiri; IBD, inflammatory bowel disease; IFN, interferon; IL, interleukin ; ILC, innate lymphoid cell; IPM, in-plane membrane; Jak, janus kinase; MS, multiple sclerosis; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid dendritic cells; RA, rheumatoid arthritis; SMC, smooth muscle cell; STAT, signal transducer and activator of transcription; STING, stimulator of interferon genes; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; Treg, regulatory T lymphocytes; Tyk, tyrosine kinase; VSV, vesicular stomatitis virus.

Abstract

Interleukin 26 (IL-26) is the most recently identified member of the IL-20 family cytokine. IL-26 has been initially identified as novel mediator of inflammation overexpressed in chronic inflammatory disorders. More recently, novel properties have been assigned to IL-26, thanks to its non-conventional biochemical features for a cytokine (cationic and amphipatic characteristics). IL-26 binds to DNA and acts as a cargo molecule rendering extracellular DNA, released by damaged cells, pro-inflammatory. This observation suggests that IL-26 may act both as a driver and an effector of inflammation, leading to the establishment of a deleterious amplification loop and, ultimately, sustained inflammation. IL-26 thus emerges as an important mediator in local immunity, which dysregulated expression and DNA shuttling capacities may have profound consequences on inflammation chronicity. IL-26 also exhibits direct antimicrobial properties. This review summarizes the recent advances on the biology of IL-26 and discusses its roles as a novel kinocidin.

Cytokines are a class of soluble signaling molecules secreted by many cell types, and especially those of the immune system. Although exhibiting pleiotropic properties, they are mainly involved in the activation of and communication between immune cells. These molecules are pivotal rheostats in innate and adaptive immune defenses, inflammation and hematopoiesis. Cytokines are classified in families, namely interferons, chemokines and interleukins.

Interleukins (IL) are defined as cytokines expressed by leukocytes. This family of soluble mediators can be divided into four major groups based on genomic and structural characteristics and on the receptor complexes used. The interleukin 10 (IL-10) cytokine family consists of nine members: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, and the more distantly related IL-28A, IL-28B, and IL-29 (also named type III interferons) (1). Except IL-10 which exhibits regulatory properties, most members of the IL-10 cytokine family are involved in mucosal immunity (i.e. local immunity, maintenance/restoration of tissue homeostasis, tissue repair), such as IL-22 involved in gut homeostasis and local immunity (2).

Interleukin 26 (IL-26) is the most recently identified member of the IL-10 cytokine family (3). Initial studies reported an elevated expression in human chronic inflammatory diseases, leading to propose that it may constitute a novel inflammatory mediator. Although the absence of IL-26 in rat and mouse has strongly impacted our understanding of its biology, recent reports have shed new light on the functions of IL-26 which exhibits conventional and non-conventional cytokine properties. This review summarizes recent data on the biology of IL-26 and its potential physiopathological roles in inflammatory disorders.

I. The IL-26 protein and signaling elements

1. Gene organization

Firstly named AK155, IL-26 was identified by the group of H. Fickenscher as a transcript over-expressed in *Herpesvirus saimiri* (HVS)-infected human T-cells (3). Due to sequences (\approx 25% homology and 47% similarity) and predicted secondary structure similarities with IL-10, AK155 was categorized in the IL-10 cytokine family, a subgroup of the class II helical cytokine family (4).

The *IL26* gene is located on chromosome 12 (12q15) (5, 6), between the genes encoding IL-22 and interferon gamma (IFN γ), and consists in 5 exons. *IL26* and *IFNG* genes have the same orientation and share a common enhancer sequence located between the two genes. The *IL26* gene is conserved in various vertebrates (ranging from fish to great apes) and human IL-26 orthologs have been identified in 137 organisms, with the notable exception of mouse and rat (7).

2. Protein characteristics

IL-26 exhibits characteristics of cytokines, i.e. 6 alpha helices (A-F) connected by loops and 4 conserved cysteines (Fig. 1A). The protein is 171-amino acid long, with a calculated molecular weight of 19,843 Da. Western blotting revealed that recombinant IL-26 has an apparent molecular weight of 19 kDa and that endogenous IL-26 (present in T cell culture supernatants and in human serum) is expressed as a 36 kDa homodimer (3). S. Meller *et al.* also predicted a multimeric form of IL-26 (8), but this remains to be confirmed *in vivo*.

IL-26 contains 30 positively charged amino acids (lysine or arginine), conferring to IL-26 unusual physicochemical properties, including a high isoelectric point of 10.77 (3). 3-D modeling reveals the distribution of positively charged residues on the surface of the molecule, providing to IL-26 particular features: the electrostatic potential on the molecular surface of IL-26 is globally positive (3, 9) and, more importantly, that helices E and F exhibit amphipathic properties (8, 9), with a hydrophobic face and a hydrophilic face composed of positively charged residues (Fig. 1B). Consequently, helices E and F, and part of helix C, are enriched in positively charged residues, conferring to IL-26 DNA-binding properties (8, 9). Interestingly, amphipathic α helices containing DNA-binding domains are hallmarks of cationic cell-penetrating peptides (CPP), a family of molecules sharing nucleic acid cargo properties (10, 11). In agreement, helix F has similarities with the KALA peptide, a synthetic CPP designed for intracellular DNA delivery (10). Consequences of these physicochemical features were only recently understood.

3. IL-26-signaling elements

a. The conventional IL-26 receptor

Biological activities of the IL-10 family cytokines are mediated by specific cell surface receptor complexes of the cytokine receptor family 2 (CRF2) composed of heterodimeric combinations of receptors 1 (IL-10R1, IL-20R1 or IL-22R1) and receptors 2 (IL-10R2 or IL-20R2) (12).

Two independent laboratories identified a conventional receptor for IL-26, consisting in IL-10R2 and IL-20R1 chains (13, 14). The IL-26-binding site is located within the IL-20R1 subunit and both chains are required for signaling. IL-26 triggers Janus kinase 1 (Jak1) and tyrosine kinase 2 (Tyk2) signaling, resulting in the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3 (13, 14). Interestingly, although IL-10R2 is ubiquitously expressed, IL-20R1 is restricted to epithelial cells (12); IL-20R1 has been also reported expressed by some myeloid cells (15, 16).

b. Other IL-26-signaling molecules

Different studies have reported that IL-26 activates innate (17) and adaptive lymphoid cells (18), myeloid cells (19) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) (8). However, and except alveolar macrophages (15) and non-stimulated neutrophils (16, 20), immune cells do not express IL-20R1,

suggesting the existence of alternative IL-26-signaling pathway(s) in the activation of IL-20R1-negative cells.

A major breakthrough in the biology of IL-26 comes from the demonstration that it acts as a shuttling molecule allowing DNA to be internalized by pDC, leading to their activation via the intracellular DNA sensor toll-like receptor 9 (TLR9) (8). We confirmed this unique property by showing that IL-26/DNA complexes activate human monocytes via the inflammasome and the cytosolic stimulator of interferon genes (STING) pathways (9).

Different hypotheses have been proposed to explain how IL-26 may enter into the cytoplasm and activate innate immune cells in the absence of a conventional membrane receptor. First, IL-26 can bind to glycosaminoglycans (heparin and heparan sulfate) on the plasma membrane (3, 8, 21). Second, helix F was predicted to have an in-plane membrane (IPM) motif anchor (9), a domain involved in the binding of proteins to cell membranes and their subsequent internalization (22). Third, IL-26 exhibits several features of cell-penetrating peptides (CPP) that may translocate through membranes in a non-specific manner (23).

The existence of different signaling pathways is reinforced by the fact that (i) monomeric and dimeric IL-26 differ in their ability to stimulate IL-26 receptor-expressing epithelial cells *versus* IL-20R1-deficient immune cells (19) and (ii) that the IL-26/IL-20R1/IL-20R2 complex model, described for monomeric IL-26, does not apply for dimeric IL-26 (24).

Nevertheless, whether IL-26 may activate cells via the conventional IL-26 receptor and intracellular nucleic acids sensors remains undetermined, especially as these pathways induce similar activation profiles.

4. Expression of IL-26

As reported in recent reviews (25, 26), the source of IL-26 as well as the nature of IL-26-inducing signals remain largely unknown.

a. Expression by innate and adaptive lymphoid cells

Since the initial discovery of IL-26 expression in human *HVS*-transformed T cells (3), several studies have confirmed that lymphoid cells, and especially activated T helper 1 (Th1) and Th17 memory CD4⁺ cells constitute the major source of IL-26. More precisely, IL-26 is expressed in infiltrating pro-inflammatory IL-17-producing T cells present in chronically inflamed tissues from patients suffering from intestinal bowel diseases (IBD) (27) or from joint (19), skin (28, 29), liver (17) or lung inflammation (15, 30, 31). Activated memory CD146⁺ CD45RO⁺ CD4⁺ T cells strongly express IL-26

mRNA compared to CD146⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ T cells (32). Moreover, K. Ohnuma *et al.* have reported that CD26⁺ CD4⁺ T cells are a major source of IL-26 in a model of graft-versus-host disease (GVHD) (31). IL-26 has also been reported expressed by CD8⁺ T cells (15, 33). In contrast, CD4⁺ T cells polarized toward a regulatory phenotype (Treg) and Th2 lymphocytes have low or no expression of IL-26 (34). Finally, naive CD4⁺ T cells also express IL-26, but at a lower level compared to memory CD4⁺ T cells (34).

The nature of the signals required for IL-26 expression by human T cells remains largely unknown. IL-1 β and IL-23, two cytokines crucial for the generation of human Th17 cells (35), induce IL-26 production by CD4⁺ T lymphocytes (36, 37) and, conversely, IL-26-stimulated CD4⁺ T cells secrete IL-17 and IL-23 (38). This loop of cytokine induction may participate to the maintenance of the pro-inflammatory phenotype of infiltrating memory T cells within inflamed tissues. Interestingly, the expression of IL-26 by CD4⁺ T cells can be induced via signaling pathways other than CD3 and CD28 ((34) and personal unpublished data). Accordingly, cord blood human CD4⁺ T cells acquire IL-26 expression upon interaction of CD26 with its ligand caveolin-1 (31, 39). However, and contrary to activated memory CD4⁺ T cells, CD26-induced IL-26⁺ CD4⁺ T cells do not express IL-2, IFN γ and IL-17A. To date, a role for CD26 in the expression of IL-26 by effector memory T cells has not been reported.

IL-22-expressing natural killer (NK) cells, also called NK22 or innate lymphoid cell 3 (ILC3), are a NK cell subset present in mucosa-associated lymphoid tissues and involved in immune surveillance at mucosal surfaces (40). Mature NK22 cells as well as stage 3 human immature CD34⁻ CD117⁺ CD161⁺ CD94⁻ CD56⁻ NKp44⁻ NK cells, which may constitute precursors of mature NK22 cells (41), constitutively express IL-26 mRNA (42-44) In line with this observation, IL-22-expressing CD4⁺ T cells and producing IL-26 have been detected within skin chronic wounds due to *Staphylococcus aureus* (45).

IL-26 has thus emerged as a marker of highly differentiated Th17 cells (28).

b. Expression by monocytes/macrophages

Contradictory results are reported in the literature concerning the expression of IL-26 by monocytes. Although K. Wolk *et al.* showed that IL-26 is not expressed by monocytes (34, 46), other authors reported that monocytes constitutively express IL-26 mRNA, although at a low level compared to memory T lymphocytes (47). Similar contrasting results are reported on its expression by activated monocytes. IL-26 mRNA expression appears down-regulated in monocytes infected by *Mycobacterium tuberculosis* (47) while, in contrast, a stimulation with LPS plus IFN γ , in the presence of a neutralizing anti-IL-10 Ab, induces its secretion (48). Furthermore, lung alveolar macrophages from healthy volunteers secrete IL-26 after local exposure to endotoxin (15).

c. Expression by non-immune cells

Whereas IL-26 emerges as a mediator potentially involved in the control of local homeostasis, only few studies have reported its expression by epithelial cells. It has been reported that the synthetic TLR3 agonist poly[I:C] acts synergistically with IL-17A to induce IL-26 expression in primary bronchial epithelial cells (49). The expression of IL-26 was confirmed on bronchial brush biopsies from healthy subjects (49).

IL-26 has been also detected in the joints of patients suffering from rheumatoid arthritis (RA) (19) and spondyloarthritis (50). More precisely, IL-26 is expressed by fibroblast-like synoviocytes and, to a lower extent, by CD68⁺ macrophage-like synoviocytes present in inflamed joints from RA patients. The expression of IL-26 by fibroblast-like synoviocytes is potentiated by the inflammatory cytokines IL-1 β and IL-17A (19). A recent study confirms the expression of IL-26 by α smooth muscle actin-expressing myofibroblasts in spondyloarthritis patients (50). We also reported the *in vitro* expression of IL-26 by primary smooth muscular cells (SMC), which is enhanced upon stimulation with IL-1 β and TNF α (9). IL-26 is also detected in renal arterial SMC in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitis (AAV) (9).

II. Biological properties of IL-26

Due to its absence in mice and rat, most of the biological properties of IL-26 have been described *ex vivo* using human cells, mainly in inflammatory backgrounds (17, 19, 27, 51). Recent important studies have demonstrated that IL-26 is not strictly a cytokine but can also act as a cargo molecule for DNA (8, 9) and as an antimicrobial molecule (8), thanks to its particular biochemical properties. These properties (Fig. 2) suggest that IL-26 can be categorized as a kinocidin, a family of proteins involved in intercellular dialog and sharing bactericidal properties.

1. Effects on non-immune cells

Based on the original observation of an elevated expression of IL-26 in Crohn's disease (27), In line with an expression in an inflammatory context, the authors reported that IL-26 induces the production of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF α as well as of the regulatory cytokine IL-10 by human gut epithelial cells (27). This activation of epithelial cells is mediated via the IL-26 conventional receptor and involves STAT1 and/or STAT3 (14, 27). The capacity of IL-26 to stimulate epithelial cells was confirmed in a study reporting that IL-26 induces the secretion of inflammatory cytokines by the keratinocyte cell line HaCat and, to a lower extent, by human primary keratinocytes (14). In contrast to other members of the IL-10 family cytokine, IL-26 does not induce the

proliferation of primary human keratinocytes, whereas it induces STAT3 phosphorylation in these IL-26 receptor-expressing cells (16); however, the expression of inflammatory molecules was not monitored in this study.

In response to soluble mediators secreted by IL-26-expressing ILC3 cells, epithelial cells produce IL-10 and express a variety of mitogenic and anti-apoptotic molecules (42); however, and although suspected by the authors, the role of IL-26 in this process remains to be elucidated.

Nevertheless, it is important to note that most of these results were obtained using transformed cell lines and that a variety of other cell types, originating from pancreas, colon, cervix, skin, bone marrow or liver, do not respond to IL-26 (14). Moreover, contrasting results have been reported using primary epithelial cells. As an example, IL-26 inhibits the production of IL-1 β , TNF α , IL-8 and GM-CSF by primary bronchial epithelial cells (15) and a recent study reports that IL-26, as well as the inflammatory cytokines IL-17 and IL-22, affect the paracellular permeability in an *in vitro* model of respiratory epithelial barrier using primary human nasal epithelial cells (52). Similarly, IL-26 inhibits the proliferation of intestinal epithelial cells (27), while, in contrast, it promotes the growth of gastric tumor cells (53).

2. Effects on immune cells

IL-26 has been shown to induce the production of pro-inflammatory cytokines by innate immune cells.

a. Myeloid cells

IL-26 induces the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF α by human monocytes (19). In agreement with the fact that IL-1 β is pivotal in the generation of human Th17 cells (55), IL-26-treated monocytes induce the differentiation of non-committed memory CD4⁺ T cells into Th17 lymphocytes (19). Interestingly, IL-26-induced Th17 cells express IL-26, allowing initiating an amplification loop between Th17 cell polarization and inflammatory cytokine secretion that could participate to the maintenance of a pool of Th17 cells. IL-26 also induces the production by human monocytes of numerous chemokines involved in the recruitment of innate and adaptive immune cells (19). K.F. Che *et al.* confirmed these results by showing that IL-26 induces the release of the neutrophil-mobilizing cytokines IL-1 β , TNF α and GM-CSF by primary immune cells isolated from endotoxin-primed human airways (15).

Monocytes are precursors of macrophages, dendritic cells and osteoblasts, highly specialized tissue-resident cells which generation is driven by local signals. Osteoblasts and osteoclasts, which are involved in bone remodeling, are responsive to IL-26. IL-26 inhibits the bone-resorbing activity of mature osteoclasts (56) and increases bone mineralization by human osteoblasts (50).

IL-26 also primes neutrophils to IL-8- and fMLP-induced chemotaxis (but not chemokinesis) and to anti-bacterial activity (15). The capacity of neutrophils to respond to IL-26 has been confirmed *in vivo*. Indeed, an intranasal instillation of recombinant human IL-26 facilitates the recruitment of innate immune cells towards the bronchoalveolar space after a local stimulation with LPS (15, 49).

b. Lymphoid cells

IL-26 induces the activation of NK cells, as evidenced by the induction of the inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α . Importantly, IL-26 also promotes the production of type I (IFN β) and type II (IFN γ) interferons (17), that induce and orchestrate innate and adaptive antiviral responses. Consistent with this observation, IL-26-treated human NK cells also express elevated levels of membrane TRAIL, allowing them to kill hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes (17). Whether the activation of IL-26 receptor-negative NK cells by IL-26 is also dependent on its DNA cargo properties remains to be determined.

The capacity of IL-26 to act on adaptive immune cells remains to be clarified. L. Hummelshoj et al. have reported that IL-26 inhibits the production of IgA and IgG by B lymphocytes induced by a stimulation with an anti-CD40 Ab and of the production of IgG4 induced by anti-CD40 Ab plus IL-4 (18). To date, no direct effect of IL-26 on naive and memory human T cells has been reported.

c. Other immune cells

Plasmacytoid DC have a central role in the antiviral arsenal, thanks to its capacity to produce important amounts of IFN α (54). IL-26 induces the production of IFN α by human pDC when combined with DNA (8).

3. Antimicrobial properties

IL-26 exhibits direct antimicrobial properties, probably due to its biochemical features similar to antimicrobial peptides (AMP) (8, 9).

d. Antiviral activity

O. Braum *et al.* reported for the first time a biological activity of IL-26 not dependent on cell activation, by showing that IL-26 modulates the rate of cell infection by enveloped virus (21). More precisely, the authors showed that a pre-incubation of vesicular stomatitis virus (VSV) with IL-26 increases the rate of infection of the epithelial cell line Colo-205, whereas an opposite effect was observed with the human *Cytomegalovirus* (CMV); in contrast, IL-26 does not modulate the infection of the fibroblast cell line Vero by *Herpes virus simplex 1* (HSV-1). Interestingly, the capacity of IL-26

to modulate viral infectivity appears not dependent on the expression of the IL-26 receptor (21). Even though the mechanism involved has not been elucidated, the authors suspected that the biochemical properties of IL-26 may be responsible, at least in part, for the protective activity of IL-26 (i.e. via its capacity to interfere with the binding of virus to attachment sites at the surface of target cells). A role for IL-26 in the antiviral defense is supported by its overexpression in the embryonic zebra fish cell line ZF4 infected by the aquatic *Birnavirus Infectious pancreatic necrosis virus* (57).

AMP can also kill some enveloped virus (58, 59). Whether IL-26 may also directly kill enveloped virus, in a way similar to AMP, remains unknown.

e. *Antibacterial activity*

In 2015, the group of M. Gilliet reported that IL-26 acts as an antibacterial molecule (8). The initial hypothesis was based on the particular distribution of charges at the surface of IL-26, similar to AMP. The authors showed that IL-26 kills or inhibits the growth of a variety of Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) at concentrations similar to the antimicrobial molecule LL-37. The antimicrobial activity of IL-26 relies on its capacity to form pores and to disrupt bacteria membranes, as indicated by the presence of membrane blebs on the surface of the bacteria and cytosolic leakage pores in bacteria walls (60).

The antibacterial activity of IL-26 was also suspected to rely on its capacity to organize into multimers, thanks to the absence of a conserved proline residue (P113) which is involved in the formation of arm-exchange dimers in the other members of the IL-10 family cytokine. The authors also identified lipopolysaccharide and lipoteichoic acid as IL-26-binding elements at the surface of bacteria (8). Interestingly, the biological activity of IL-26 present in T cell culture supernatants was superior to the one of recombinant proteins produced in prokaryotes (8). Post-translational modifications and/or multimer organization are proposed to explain the superior activity of natural IL-26 compared to recombinant IL-26. Interestingly, the authors confirmed the antimicrobial activity of IL-26 in an *in vivo* model of sepsis (8).

The antimicrobial activity of IL-26 has been recently confirmed by A. Woetmann *et al.* showing that it triggers *Staphylococcus aureus* death and inhibits biofilm formation (45). In contrast, IL-26 does not affect the growth of *Propionibacterium acnes* (61).

IL-26 has also an indirect antimicrobial activity via the production of type I and type II interferons by pDC, monocytes and NK cells (8, 9, 17). Interestingly, IL-26 seems to be necessary for pDC activation, as killed *Pseudomonas aeruginosa* alone is unable to induce IFN α production (8).

III. Interleukin-26 in human diseases

Deciphering the biology of IL-26 was hampered by the absence of the IL26 gene in mice and rat. As initial studies revealed that activated memory Th17 cells are the main producers of IL-26 (27, 37), its functions were mostly elucidated in chronic inflammatory and infectious diseases.

These studies identified IL-26 as a master regulator of inflammation. Even though IL-26 can signal via the heteroduplex IL-20R1 – IL-10R2, accumulating data suspect that the pro-inflammatory activity of IL-26 relies on its capacity to form complexes with extracellular DNA (8, 9). Indeed, extracellular nucleic acids, released by damaged cells, have emerged in the recent past as major inflammation driving signals (62). It is important to note that extracellular DNA has to complex with shuttling molecules to get access to intracellular DNA sensors, underlining the role of cargo molecules in rendering DNA pro-inflammatory.

Importantly, recent studies also suggest that IL-26 may act as a dangerous catalyst that could contribute to the establishment of chronic inflammation. Indeed, the production of IL-26 is induced by inflammatory cytokines which, conversely, induces the production of inflammatory mediators. This mechanism may establish a deleterious positive feedback loop (i.e. production of IL-26 by activated Th17 cells and release of DNA by dying cells as a result of chronic tissue damage) leading to unabated inflammation after elimination of the initiating signal (Fig. 3).

1. Chronic viral infection

The levels of circulating IL-26 are increased in HCV-infected patients and are correlated to the liver inflammation stage (17). IL-26 is expressed by circulating CD4⁺ T cells and infiltrating liver T cells. It also accumulates in hepatocytes from chronically infected HCV-infected patients, although the mechanism involved remains undetermined as infected hepatocytes do not express IL-26 mRNA. Inflammation is part of the antiviral immune response; the pro-inflammatory and NK cell-stimulatory activities of IL-26 may also contribute to the control and/or elimination of virus-infected cells (17).

2. Inflammatory disorders

Several genetic studies have suggested a potential role for IL-26 in the pathophysiology of chronic inflammatory and autoimmune disorders. *IL26* gene polymorphisms are associated with an increased risk for developing multiple sclerosis (MS) (63) or RA (5). Moreover, elevated levels of circulating and tissue-associated IL-26 are reported in Th17 cell-mediated autoimmune diseases, such as Crohn's disease, RA, psoriasis and AAV.

a. Inflammatory bowel diseases

The role of IL-26 in inflammatory bowel diseases (IBD) was first suggested by a genetic association study which identified rs2870946 polymorphism as a strong predictive factor (64).

The levels of circulating IL-26 are elevated in patients with Crohn's disease and an increased expression of IL-26 mRNA is observed within inflammatory colonic lesions (14, 27, 65). The expression of the transcript encoding IL-26 is also increased in the colonic lesions of pediatric-onset ulcerative colitis (66). Expression of Th17 pathway-associated genes, including IL-26, is enhanced in inflamed colonic samples from IBD patients compared to controls, and their levels are correlated to disease severity (67). More specifically, in Crohn's disease, ROR γ ⁺ Th17 cells infiltrating inflamed mucosa secrete IL-26 which can, in turn, induce inflammatory cytokines by epithelial cells (27).

In patients with common variable immune deficiency associated with inflammatory complications, IL-22⁺ IL-26⁺ NK22 cells are expanded in the blood and infiltrate gastrointestinal and lung tissues (43).

b. Rheumatoid arthritis

The levels of IL-26 are increased in the serums and synovial fluids of RA patients, compared to healthy subjects. Moreover, in RA patients, the levels of IL-26 are higher in synovial fluids than in the serums, suggesting a local production in inflamed joints (19).

The role of IL-26 in inflammatory articular diseases has been recently confirmed in a study showing that the levels of IL-26 are increased in the synovial fluids of patients suffering from spondyloarthritis (50). However, IL-26 does not appear directly involved in bone destruction process, as it suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis (56).

c. Vasculitis

ANCA-associated vasculitis is a chronic relapsing autoimmune inflammatory disease associated with extensive cell death. Acute flares are characterized by necrotic lesions in microvessels where the massive accumulation of dying neutrophils induces the subsequent recruitment and activation of immune cells, especially in granulomatous lesions (68, 69). The inflammatory process is suspected to be consecutive to the release, by dying neutrophils, of self DNA in the extracellular milieu (70).

Patients with active AAV exhibit high levels of both circulating IL-26 and IL-26-DNA complexes, especially during acute flares (9). Moreover, in patients with crescentic glomerulonephritis, IL-26 deposits in necrotizing lesions (9). These data support our hypothesis that IL-26-DNA complexes expressed in inflammatory lesions, may initiate a positive amplification loop between extensive cell death and chronic inflammation.

Increased levels of IL-26 are also detected in the serums of patients suffering from Behçet's disease, a rare auto-inflammatory disorder with manifestations of vasculitis and its levels correlate with disease severity. The authors also show that IL-26 accumulates in inflammatory lesions (38, 71).

d. Other chronic inflammatory diseases

An accumulation of IL-26 has been reported in psoriasis lesions (8, 37). IL-26 mRNA and protein were also evidenced in early primary systemic sclerosis skin lesions and its expression was positively correlated with the disease activity score (29). However, the role of IL-26 in the pathophysiology of this disease remains to be investigated.

Although the levels of IL-26 were reported elevated in MS patients treated with IFN β (72), a recent study did not find any statistically significant modulation of IL-26 mRNA expression between healthy controls and stable or relapsing MS patients (73).

3. Graft versus host disease

Chronic inflammation can lead to fibrosis (74). However, the potential role of IL-26 in this process has been only evoked in a study using a mouse model of pulmonary chronic GVHD (75). The authors showed that sublethally irradiated NOD/Shi-scidIL2rg^{null} mice transplanted with human umbilical cord blood develop symptoms of chronic GVHD, such as bronchiolitis obliterans, scleroderma and primary biliary cirrhosis-like lesions. IL-26 increases collagen synthesis by fibroblasts, promoting lung fibrosis during GVHD induced after adoptive transfer of IL-26⁺ CD4⁺ T cells in IL-26-transgenic mice. The key role of IL-26 was reinforced by the fact that a neutralizing anti-IL-26 Ab decreases collagen deposition in pulmonary chronic GVHD in mice.

In human, immunohistochemistry reveals an infiltration of IL-26⁺ CD26⁺ CD4⁺ T cells within bronchial fibrotic lesions in a patient suffering from bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (31, 39).

4. Allergy

A single nucleotide polymorphism (rs3741809) in the *IL26* gene is associated with susceptibility to allergic rhinitis (76). Moreover, the levels of IL-26 in sputums are positively correlated with pediatric asthma severity (17). More recently, the role of IL-26 in allergic contact dermatitis (ACD) has been investigated. In this disease, skin injuries have been assumed to be related to T cell-mediated cytotoxicity against keratinocytes. The expression of IL-26 is increased in the serums and in the skin of ACD patients (elevated IL-26 mRNA expression and infiltration of IL-26-expressing cells in skin lesions), compared to healthy subjects. *In vitro*, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated

from ACD patients have a higher cytotoxic activity against the keratinocyte cell line HaCat compared to PBMC from healthy subjects. Interestingly, the cytotoxic activity was strongly decreased after silencing IL-26 mRNA expression (77).

5. Cancer

IL-26 mRNA is highly expressed in cutaneous biopsies of patients with primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL), at levels similar to patients with psoriasis (78). Many cancers may arise from sites of infection and/or chronic irritation and inflammation. Moreover, inflammation modulates neoplastic processes, proliferation and migration of tumor cells. As IL-26 is a pro-inflammatory cytokine, one can suspect that it may also participate to tumor initiation and/or progression. Studies are needed to clarify this important question.

Conclusion

IL-26 has emerged as an inflammatory mediator acting upstream the inflammation cascade. Nevertheless, and contrary to other members of the IL-10 family cytokines, the pro-inflammatory properties of IL-26 appear mainly related to its DNA cargo activity, a property that would be more important during chronic inflammation which is associated with tissue damage. This unique property identifies IL-26 as a master driver of inflammation chronicity.

IL-26 also exhibits antibacterial properties, thanks to its particular structural similarities to AMP.

Importantly, most of the biological functions of IL-26 were identified in pathological situations (*i.e.* chronic inflammation). To date, the physiological roles of IL-26 remain largely unknown. One can hypothesize that IL-26 could be involved in mucosal innate immunity, as suggested by its expression in colon, ileum, Payer's patches and tonsils. Deciphering its physiological properties is of importance, notably since neutralizing IL-26 has been proposed as a novel therapeutic strategy for some Th17-associated disorders.

In light of the recent studies, it becomes evident that IL-26 is more than a cytokine. The dual ability to act as a cytokine and as an AMP allows classifying IL-26 in the family of kinocidin. Nevertheless, our knowledge of the biology of IL-26 remains fragmentary and future studies are required to decipher the biology of this amazing molecule.

Acknowledgments

We sincerely acknowledge Dr Elodie Beaumont (Inserm unit 966 and University of Tours, Tours, France) and Pr Helmut Fickenscher (Institute for Infection Medicine, Christian Albrecht University of Kiel and University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany) for helpful discussions and fruitful collaboration. We acknowledge former members of the team involved in the projects on the biology of IL-26. We also thank Pr Alain Morel and Jonathan Dauvé (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers, France) for designing a 3-D model of IL-26.

This manuscript was prepared in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program (ANR-11-LABEX-0016-01).

Author contribution

VL, CM, CP, PR, PJ and YD defined the content of the manuscript and contributed to manuscript writing. VL and YD created graphical illustrations. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

The projects of the team on the biology of IL-26 are supported by institutional grants from Inserm and University of Angers.

Conflict of interest statement

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* (2011) 29:71-109. Epub 2010/12/21. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312. PubMed PMID: 21166540.
2. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* (2013) 252(1):116-32. Epub 2013/02/15. doi: 10.1111/imr.12027. PubMed PMID: 23405899.
3. Knappe A, Hor S, Wittmann S, Fickenscher H. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol* (2000) 74(8):3881-7. Epub 2000/03/23. PubMed PMID: 10729163; PubMed Central PMCID: PMC111897.
4. Lutfalla G, Roest Crollius H, Stange-Thomann N, Jaillon O, Mogensen K, Monneron D. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* (2003) 4(1):29. Epub 2003/07/19. doi: 10.1186/1471-2164-4-29. PubMed PMID: 12869211; PubMed Central PMCID: PMC179897.
5. Vandenbroeck K, Cunningham S, Goris A, Alloza I, Heggarty S, Graham C, et al. Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2003) 48(10):2773-8. Epub 2003/10/15. doi: 10.1002/art.11236. PubMed PMID: 14558082.
6. Goris A, Marrosu MG, Vandenbroeck K. Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15). *Genes Immun* (2001) 2(5):284-6. Epub 2001/08/31. doi: 10.1038/sj.gene.6363772. PubMed PMID: 11528524.
7. Collins PL, Henderson MA, Aune TM. Lineage-specific adjacent IFNG and IL26 genes share a common distal enhancer element. *Genes Immun* (2012) 13(6):481-8. Epub 2012/05/25. doi: 10.1038/gene.2012.22
gene201222 [pii]. PubMed PMID: 22622197; PubMed Central PMCID: PMC4180225.
8. Meller S, Di Domizio J, Voo KS, Friedrich HC, Chamilos G, Ganguly D, et al. T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol* (2015) 16(9):970-9. Epub 2015/07/15. doi: 10.1038/ni.3211
ni.3211 [pii]. PubMed PMID: 26168081; PubMed Central PMCID: PMC4776746.
9. Poli C, Augusto JF, Dauve J, Adam C, Preisser L, Larochette V, et al. IL-26 Confers Pro-inflammatory Properties to Extracellular DNA. *J Immunol* (2017) 198(9):3650-61. Epub 2017/03/31. doi: 10.4049/jimmunol.1600594
jimmunol.1600594 [pii]. PubMed PMID: 28356384.
10. Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel U. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano* (2014) 8(3):1972-94. Epub 2014/02/25. doi: 10.1021/nn4057269. PubMed PMID: 24559246.
11. Choi YS, David AE. Cell penetrating peptides and the mechanisms for intracellular entry. *Curr Pharm Biotechnol* (2014) 15(3):192-9. Epub 2014/06/19. doi: CPB-EPUB-61003 [pii]. PubMed PMID: 24938895.
12. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* (2010) 21(5):315-24. Epub 2010/11/30. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.11.001
S1359-6101(10)00079-1 [pii]. PubMed PMID: 21112807.
13. Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shah NK, Smirnov SV, Anantha S, et al. Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* (2004) 172(4):2006-10. Epub 2004/02/07. PubMed PMID: 14764663.
14. Hor S, Pirzer H, Dumoutier L, Bauer F, Wittmann S, Sticht H, et al. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10

receptor 2 chains. *J Biol Chem* (2004) 279(32):33343-51. Epub 2004/06/05. doi: 10.1074/jbc.M405000200

M405000200 [pii]. PubMed PMID: 15178681.

15. Che KF, Tengvall S, Levanen B, Silverpil E, Smith ME, Awad M, et al. Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization. *Am J Respir Crit Care Med* (2014) 190(9):1022-31. Epub 2014/10/08. doi: 10.1164/rccm.201404-0689OC. PubMed PMID: 25291379.

16. Gough P, Ganesan S, Datta SK. IL-20 Signaling in Activated Human Neutrophils Inhibits Neutrophil Migration and Function. *J Immunol* (2017) 198(11):4373-82. Epub 2017/04/21. doi: 10.4049/jimmunol.1700253

jimmunol.1700253 [pii]. PubMed PMID: 28424238; PubMed Central PMCID: PMC5476316.

17. Miot C, Beaumont E, Duluc D, Le Guillou-Guillemette H, Preisser L, Garo E, et al. IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* (2015) 64(9):1466-75. Epub 2014/09/04. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306604

gutjnl-2013-306604 [pii]. PubMed PMID: 25183206.

18. Hummelshoj L, Ryder LP, Poulsen LK. The role of the interleukin-10 subfamily members in immunoglobulin production by human B cells. *Scand J Immunol* (2006) 64(1):40-7. Epub 2006/06/21. doi: SJI1773 [pii]

10.1111/j.1365-3083.2006.01773.x. PubMed PMID: 16784489.

19. Corvaisier M, Delneste Y, Jeanvoine H, Preisser L, Blanchard S, Garo E, et al. IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces pro-inflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol* (2012) 10(9):e1001395. Epub 2012/10/12. doi: 10.1371/journal.pbio.1001395

PBIOLOGY-D-12-01786 [pii]. PubMed PMID: 23055831; PubMed Central PMCID: PMC3463509.

20. Che KF, Tufvesson E, Tengvall S, Lappi-Blanco E, Kaarteenaho R, Levanen B, et al. The neutrophil-mobilizing cytokine interleukin-26 in the airways of long-term tobacco smokers. *Clin Sci (Lond)* (2018) 132(9):959-83. Epub 2018/05/22. doi: 10.1042/CS20180057

CS20180057 [pii]. PubMed PMID: 29780024.

21. Braum O, Klages M, Fickenscher H. The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. *PLoS One* (2013) 8(7):e70281. Epub 2013/07/23. doi: 10.1371/journal.pone.0070281

PONE-D-13-15308 [pii]. PubMed PMID: 23875025; PubMed Central PMCID: PMC3707906.

22. Sapay N, Guermeur Y, Deleage G. Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics* (2006) 7:255. Epub 2006/05/18. doi: 1471-2105-7-255 [pii]

10.1186/1471-2105-7-255. PubMed PMID: 16704727; PubMed Central PMCID: PMC1564421.

23. Avci FG, Akbulut BS, Ozkirimli E. Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization. *Biomolecules* (2018) 8(3). Epub 2018/08/24. doi: E77 [pii]

10.3390/biom8030077

biom8030077 [pii]. PubMed PMID: 30135402.

24. Donnelly RP, Sheikh F, Dickensheets H, Savan R, Young HA, Walter MR. Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. *Cytokine Growth Factor Rev* (2010) 21(5):393-401. Epub 2010/10/16. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.001

S1359-6101(10)00064-X [pii]. PubMed PMID: 20947410; PubMed Central PMCID: PMC2997847.

25. Stephen-Victor E, Fickenscher H, Bayry J. IL-26: An Emerging Pro-inflammatory Member of the IL-10 Cytokine Family with Multifaceted Actions in Antiviral, Antimicrobial, and Autoimmune Responses. *PLoS Pathog* (2016) 12(6):e1005624. Epub 2016/06/24. doi: 10.1371/journal.ppat.1005624
- PPATHOGENS-D-16-00129 [pii]. PubMed PMID: 27337042; PubMed Central PMCID: PMC4919036.
26. Tengvall S, Che KF, Linden A. Interleukin-26: An Emerging Player in Host Defense and Inflammation. *J Innate Immun* (2016) 8(1):15-22. Epub 2015/07/24. doi: 10.1159/000434646
- 000434646 [pii]. PubMed PMID: 26202572.
27. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Goke B, Diepolder HM, et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* (2009) 58(9):1207-17. Epub 2008/05/17. doi: 10.1136/gut.2007.130112
- gut.2007.130112 [pii]. PubMed PMID: 18483078.
28. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* (2008) 180(11):7423-30. Epub 2008/05/21. doi: 180/11/7423 [pii]. PubMed PMID: 18490742.
29. Zhou Y, Hou W, Xu K, Han D, Jiang C, Mou K, et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Hum Immunol* (2015) 76(1):22-9. Epub 2014/12/17. doi: 10.1016/j.humimm.2014.12.008
- S0198-8859(14)00508-4 [pii]. PubMed PMID: 25500255.
30. Konradsen JR, Nordlund B, Levanen B, Hedlin G, Linden A. The cytokine interleukin-26 as a biomarker in pediatric asthma. *Respir Res* (2016) 17:32. Epub 2016/04/01. doi: 10.1186/s12931-016-0351-6
- 10.1186/s12931-016-0351-6 [pii]. PubMed PMID: 27029915; PubMed Central PMCID: PMC4815075.
31. Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, et al. Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes. *J Immunol* (2015) 194(8):3697-712. Epub 2015/03/20. doi: 10.4049/jimmunol.1402785
- jimmunol.1402785 [pii]. PubMed PMID: 25786689; PubMed Central PMCID: PMC4568737.
32. Dagur PK, Biancotto A, Wei L, Sen HN, Yao M, Strober W, et al. MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J Autoimmun* (2011) 37(4):319-27. Epub 2011/10/01. doi: 10.1016/j.jaut.2011.09.003
- S0896-8411(11)00091-6 [pii]. PubMed PMID: 21959269; PubMed Central PMCID: PMC3223259.
33. Anuradha R, George PJ, Hanna LE, Kumaran P, Chandrasekaran V, Nutman TB, et al. Expansion of parasite-specific CD4+ and CD8+ T cells expressing IL-10 superfamily cytokine members and their regulation in human lymphatic filariasis. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(4):e2762. Epub 2014/04/05. doi: 10.1371/journal.pntd.0002762
- PNTD-D-13-01225 [pii]. PubMed PMID: 24699268; PubMed Central PMCID: PMC3974669.
34. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* (2002) 168(11):5397-402. Epub 2002/05/23. PubMed PMID: 12023331.
35. Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* (2008) 41(2):71-8. Epub 2007/11/06. doi: S1043-4666(07)00413-9 [pii]
- 10.1016/j.cyto.2007.09.009. PubMed PMID: 17981475.
36. Volpe E, Touzot M, Servant N, Marloie-Provost MA, Hupe P, Barillot E, et al. Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* (2009) 114(17):3610-4. Epub 2009/08/26. doi: 10.1182/blood-2009-05-223768

blood-2009-05-223768 [pii]. PubMed PMID: 19704117.

37. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* (2007) 8(9):950-7. Epub 2007/08/07. doi: ni1497 [pii]

10.1038/ni1497. PubMed PMID: 17676044.

38. Kaabachi W, Bouali E, Berraies A, Dhifallah IB, Hamdi B, Hamzaoui K, et al. Interleukin-26 is overexpressed in Behcet's disease and enhances Th17 related -cytokines. *Immunol Lett* (2017) 190:177-84. Epub 2017/08/16. doi: S0165-2478(17)30257-2 [pii]

10.1016/j.imlet.2017.08.008. PubMed PMID: 28811236.

39. Ohnuma K, Hatano R, Itoh T, Iwao N, Dang NH, Morimoto C. Role of IL-26+CD26+CD4 T Cells in Pulmonary Chronic Graft-Versus-Host Disease and Treatment with Caveolin-1-Ig Fc Conjugate. *Crit Rev Immunol* (2016) 36(3):239-67. Epub 2016/12/23. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016018772

23b03448175d4330,290d61a0332e54cd [pii]. PubMed PMID: 28008806.

40. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:747-85. Epub 2015/02/24. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112123. PubMed PMID: 25706098; PubMed Central PMCID: PMC4407497.

41. Tang Q, Ahn YO, Southern P, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Development of IL-22-producing NK lineage cells from umbilical cord blood hematopoietic stem cells in the absence of secondary lymphoid tissue. *Blood* (2011) 117(15):4052-5. Epub 2011/02/12. doi: 10.1182/blood-2010-09-303081

blood-2010-09-303081 [pii]. PubMed PMID: 21310921; PubMed Central PMCID: PMC3087531.

42. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* (2009) 457(7230):722-5. Epub 2008/11/04. doi: 10.1038/nature07537

nature07537 [pii]. PubMed PMID: 18978771; PubMed Central PMCID: PMC3772687.

43. Cols M, Rahman A, Maglione PJ, Garcia-Carmona Y, Simchoni N, Ko HM, et al. Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137(4):1206-15 e6. Epub 2015/11/07. doi: S0091-6749(15)01351-2 [pii]

10.1016/j.jaci.2015.09.013. PubMed PMID: 26542033; PubMed Central PMCID: PMC4866594.

44. Hughes T, Becknell B, McClory S, Briercheck E, Freud AG, Zhang X, et al. Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22. *Blood* (2009) 113(17):4008-10. Epub 2009/02/27. doi: 10.1182/blood-2008-12-192443

blood-2008-12-192443 [pii]. PubMed PMID: 19244159; PubMed Central PMCID: PMC2673127.

45. Woetmann A, Alhede M, Dabelsteen S, Bjarnsholt T, Rybtke M, Nastasi C, et al. Interleukin-26 (IL-26) is a novel anti-microbial peptide produced by T cells in response to staphylococcal enterotoxin. *Oncotarget* (2018) 9(28):19481-9. Epub 2018/05/08. doi: 10.18632/oncotarget.24603

24603 [pii]. PubMed PMID: 29731960; PubMed Central PMCID: PMC5929403.

46. Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, et al. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* (2008) 83(5):1181-93. Epub 2008/02/19. doi: 10.1189/jlb.0807525

jlb.0807525 [pii]. PubMed PMID: 18281438.

47. Guerra-Laso JM, Raposo-Garcia S, Garcia-Garcia S, Diez-Tascon C, Rivero-Lezcano OM. Microarray analysis of Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes reveals IL26 as a new candidate gene for tuberculosis susceptibility. *Immunology* (2015) 144(2):291-301. Epub 2014/08/27. doi: 10.1111/imm.12371. PubMed PMID: 25157980; PubMed Central PMCID: PMC4298423.

48. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* (2004) 4(5):577-92. Epub 2004/05/04. doi: 10.1016/j.intimp.2004.01.007
S1567-5769(04)00005-0 [pii]. PubMed PMID: 15120644.
49. Che KF, Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E, Levanen B, Sun J, Wheelock A, et al. Interleukin-26 Production in Human Primary Bronchial Epithelial Cells in Response to Viral Stimulation: Modulation by Th17 cytokines. *Mol Med* (2017) 23. Epub 2017/08/31. doi: 10.2119/molmed.2016.00064
molmed.2016.00064 [pii]. PubMed PMID: 28853490; PubMed Central PMCID: PMC5653736.
50. Heftdal LD, Andersen T, Jaehger D, Woetmann A, Ostgard R, Kenngott EE, et al. Synovial cell production of IL-26 induces bone mineralization in spondyloarthritis. *J Mol Med (Berl)* (2017) 95(7):779-87. Epub 2017/04/04. doi: 10.1007/s00109-017-1528-2
10.1007/s00109-017-1528-2 [pii]. PubMed PMID: 28365787.
51. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* (2004) 10(5):620-5. Epub 2004/03/03. PubMed PMID: 14991925; PubMed Central PMCID: PMC4716896.
52. Fan K, Ritter C, Nghiem P, Blom A, Verhaegen ME, Dlugosz A, et al. Circulating cell-free miR-375 as surrogate marker of tumor burden in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (2018). Epub 2018/08/01. doi: clincanres.1184.2018 [pii]
10.1158/1078-0432.CCR-18-1184
1078-0432.CCR-18-1184 [pii]. PubMed PMID: 30061360.
53. Harris PA, Berger SB, Jeong JU, Nagilla R, Bandyopadhyay D, Campobasso N, et al. Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J Med Chem* (2017) 60(4):1247-61. Epub 2017/02/06. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01751. PubMed PMID: 28151659.
54. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* (2008) 19(1):3-19. Epub 2008/02/06. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.006
S1359-6101(07)00106-2 [pii]. PubMed PMID: 18248767; PubMed Central PMCID: PMC2277216.
55. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* (2012) 484(7395):514-8. Epub 2012/04/03. doi: 10.1038/nature10957
nature10957 [pii]. PubMed PMID: 22466287.
56. Peng YJ, Wang CY, Lin YH, Lin GJ, Huang SH, Shyu JF, et al. Interleukin 26 suppresses receptor activator of nuclear factor kappaB ligand induced osteoclastogenesis via down-regulation of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 and nuclear factor kappaB activity. *Rheumatology (Oxford)* (2016) 55(11):2074-83. Epub 2016/08/24. doi: kew302 [pii]
10.1093/rheumatology/kew302. PubMed PMID: 27550297.
57. Wang WL, Liu W, Gong HY, Hong JR, Lin CC, Wu JL. Activation of cytokine expression occurs through the TNF α /NF-kappaB-mediated pathway in birnavirus-infected cells. *Fish Shellfish Immunol* (2011) 31(1):10-21. Epub 2011/01/29. doi: 10.1016/j.fsi.2011.01.015
S1050-4648(11)00023-4 [pii]. PubMed PMID: 21272652.
58. Cruz J, Ortiz C, Guzman F, Fernandez-Lafuente R, Torres R. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem* (2014) 21(20):2299-321. Epub 2014/02/19. doi: CMC-EPUB-59215 [pii]. PubMed PMID: 24533812.
59. Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzalkowska N, Jozwik A, Horbanczuk J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* (2012) 39(12):10957-70. Epub

2012/10/16. doi: 10.1007/s11033-012-1997-x. PubMed PMID: 23065264; PubMed Central PMCID: PMC3487008.

60. Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1462(1-2):157-83. Epub 1999/12/11. doi: S0005-2736(99)00205-9 [pii]. PubMed PMID: 10590307.

61. Agak GW, Kao S, Ouyang K, Qin M, Moon D, Butt A, et al. Phenotype and Antimicrobial Activity of Th17 Cells Induced by Propionibacterium acnes Strains Associated with Healthy and Acne Skin. *J Invest Dermatol* (2017). PubMed PMID: 28864077.

62. Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* (2017) 35:313-36. Epub 2017/02/02. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052331. PubMed PMID: 28142323.

63. Goris A, Heggarty S, Marrosu MG, Graham C, Billiau A, Vandembroeck K. Linkage disequilibrium analysis of chromosome 12q14-15 in multiple sclerosis: delineation of a 118-kb interval around interferon-gamma (IFNG) that is involved in male versus female differential susceptibility. *Genes Immun* (2002) 3(8):470-6. Epub 2002/12/18. doi: 10.1038/sj.gene.6363913. PubMed PMID: 12486605.

64. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DP, Wu J, Annese V, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* (2009) 41(2):216-20. Epub 2009/01/06. doi: 10.1038/ng.275

ng.275 [pii]. PubMed PMID: 19122664; PubMed Central PMCID: PMC2652837.

65. Fujii M, Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Nishino K, Sakai S, et al. Expression of Interleukin-26 is upregulated in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* (2017) 23(30):5519-29. Epub 2017/08/31. doi: 10.3748/wjg.v23.i30.5519. PubMed PMID: 28852311; PubMed Central PMCID: PMC5558115.

66. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, Guthery SL, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* (2008) 40(10):1211-5. Epub 2008/09/02. doi: 10.1038/ng.203

ng.203 [pii]. PubMed PMID: 18758464; PubMed Central PMCID: PMC2770437.

67. Bogaert S, Laukens D, Peeters H, Melis L, Olievier K, Boon N, et al. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunol* (2010) 11:61. Epub 2010/12/15. doi: 10.1186/1471-2172-11-61

1471-2172-11-61 [pii]. PubMed PMID: 21144017; PubMed Central PMCID: PMC3016394.

68. Pagnoux C. Updates in ANCA-associated vasculitis. *Eur J Rheumatol* (2016) 3(3):122-33. Epub 2016/10/14. doi: 10.5152/eurjrheum.2015.0043

ejr-3-3-122 [pii]. PubMed PMID: 27733943; PubMed Central PMCID: PMC5058451.

69. Jarrot PA, Kaplanski G. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis: An update. *Autoimmun Rev* (2016) 15(7):704-13. Epub 2016/03/13. doi: 10.1016/j.autrev.2016.03.007

S1568-9972(16)30055-6 [pii]. PubMed PMID: 26970490.

70. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol* (2014) 10(8):463-73. Epub 2014/07/09. doi: 10.1038/nrrheum.2014.103

nrrheum.2014.103 [pii]. PubMed PMID: 25003769.

71. Lopalco G, Lucherini OM, Lopalco A, Venerito V, Fabiani C, Frediani B, et al. Cytokine Signatures in Mucocutaneous and Ocular Behcet's Disease. *Front Immunol* (2017) 8:200. Epub 2017/03/16. doi: 10.3389/fimmu.2017.00200. PubMed PMID: 28289419; PubMed Central PMCID: PMC5327443.

72. Esendagli G, Kurne AT, Sayat G, Kilic AK, Guc D, Karabudak R. Evaluation of Th17-related cytokines and receptors in multiple sclerosis patients under interferon beta-1 therapy. *J Neuroimmunol* (2013) 255(1-2):81-4. Epub 2012/11/28. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.10.009
S0165-5728(12)00312-8 [pii]. PubMed PMID: 23177721.
73. Muls N, Nasr Z, Dang HA, Sindic C, van Pesch V. IL-22, GM-CSF and IL-17 in peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy. *PLoS One* (2017) 12(3):e0173780. Epub 2017/03/17. doi: 10.1371/journal.pone.0173780
PONE-D-16-36348 [pii]. PubMed PMID: 28301515; PubMed Central PMCID: PMC5354390.
74. Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol* (2012) 3:71. Epub 2012/05/09. doi: 10.3389/fimmu.2012.00071. PubMed PMID: 22566952; PubMed Central PMCID: PMC3342381.
75. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm* (2015) 2015:764641. Epub 2015/07/23. doi: 10.1155/2015/764641. PubMed PMID: 26199463; PubMed Central PMCID: PMC4495231.
76. Zhang Y, Li J, Wang C, Zhang L. Association between the Interaction of Key Genes Involved in Effector T-Cell Pathways and Susceptibility to Develop allergic Rhinitis: A Population-Based Case-Control Association Study. *PLoS One* (2015) 10(7):e0131248. Epub 2015/07/22. doi: 10.1371/journal.pone.0131248
PONE-D-14-54455 [pii]. PubMed PMID: 26196693; PubMed Central PMCID: PMC4510440.
77. Caiazza G, Di Caprio R, Lembo S, Raimondo A, Scala E, Patruno C, et al. IL-26 in allergic contact dermatitis: Resource in a state of readiness. *Exp Dermatol* (2018). Epub 2018/03/03. doi: 10.1111/exd.13521. PubMed PMID: 29498775.
78. Wolk K, Mitsui H, Witte K, Gellrich S, Gulati N, Humme D, et al. Deficient cutaneous antibacterial competence in cutaneous T-cell lymphomas: role of Th2-mediated biased Th17 function. *Clin Cancer Res* (2014) 20(21):5507-16. Epub 2014/09/13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0707
1078-0432.CCR-14-0707 [pii]. PubMed PMID: 25212608.

Figures

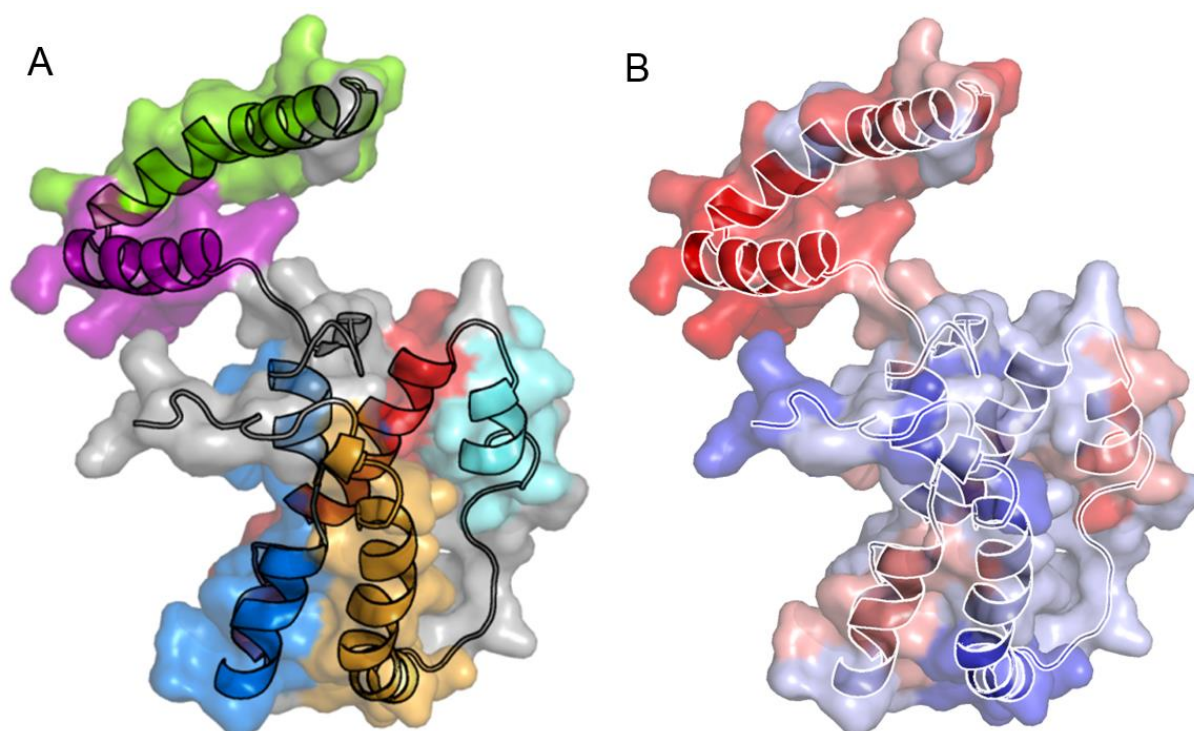


Figure 1. 3-D structural models of IL-26. 3-D structure of IL-26 has been modelled using the crystal structure of IL-10 as a template. (A) Three dimensional structure of IL-26 determined by using homology modelling with IL-10 crystal. The 6 alpha-helices are colored. (B) Electrostatic potential on the molecular surface of IL-26 is colored from red (210 kbT/ec) to blue (+10 kbT/ec). The alpha-helices are shown.

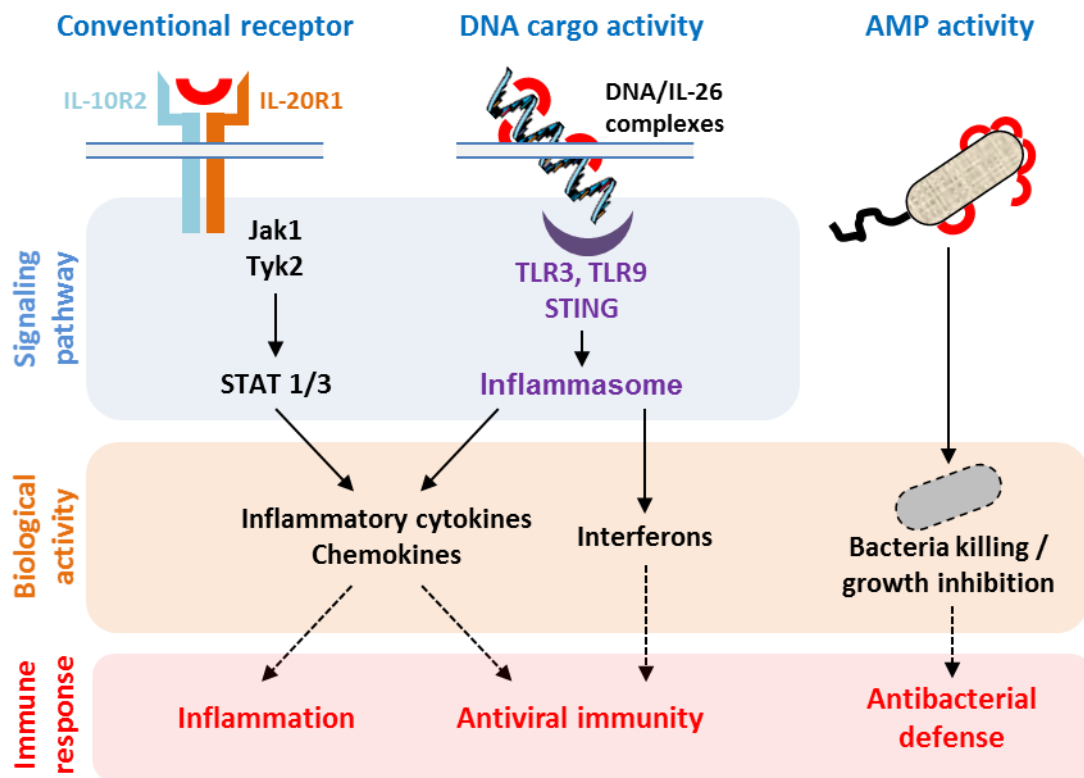


Figure 2. Biological properties of IL-26. IL-26 exhibits features of kinocidins, ie acting both as a cytokine and an antimicrobial molecule. The binding of IL-26 to the conventional receptor composed of the IL-20R1 and IL-10R2 chains induces the production of inflammatory cytokines. IL-26 can also act as a shuttling molecule allowing extracellular DNA to get access to intracellular nucleic sensors. This pathway induces the production of inflammatory cytokines, chemokines and type I and type II interferons by innate immune cells. IL-26 also acts as an antimicrobial protein (AMP) through its capacity to form pores in bacterial membranes.

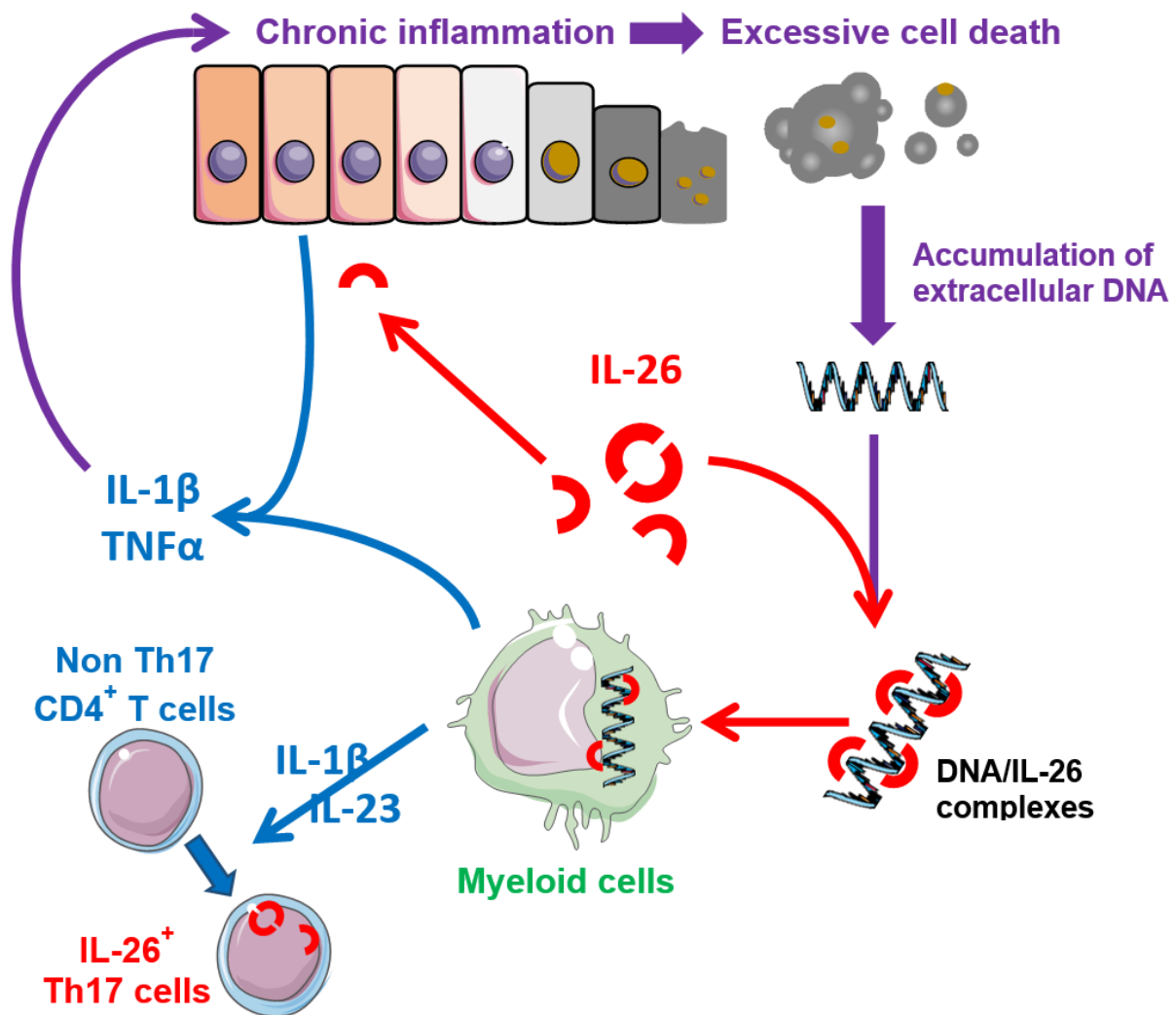


Figure 3. Schematic representation of the pro-inflammatory properties of IL-26. IL-26, produced by activated memory Th17 cells and NK22 cells, induces the production of inflammatory mediators by epithelial cells and favours the generation of inflammatory Th17 cells (induction of IL-1 β and IL-23 by monocytes). In case of chronic inflammation, IL-26 can bind to extracellular DNA released by dying cells into the extracellular milieu (at sites of extensive tissue damaged). The IL-26-DNA complexes can then activate innate immune cells (such as monocytes), initiating a deleterious amplification loop leading to chronic inflammation and tissue damages.

6.3 Annexe III : Immune properties of HSP70.

Cette revue sur les propriétés immunitaires de HSP70 s'inscrit dans la thématique de l'étude de la détection des signaux de danger par l'immunité innée. Il s'agit d'un chapitre inclus dans le livre *HSP70 in human diseases and disorders*. Le laboratoire a été invité à écrire ce chapitre en raison de son expertise dans les molécules solubles de l'immunité.

HSP70 agirait comme un DAMP, dont la détection par de nombreux récepteurs de signalisation ou d'endocytose induit l'activation des cellules immunitaires innées, myéloïdes comme lymphoïdes, ainsi que la présentation antigénique (classique et croisée). Cette revue a pour objectif de résumer les connaissances actuelles sur le rôle immunitaire de HSP70, qui sont contradictoires au sujet des récepteurs impliqués et des conséquences fonctionnelles, pouvant induire une réponse activatrice ou régulatrice. Le paradigme actuel sur l'activation du système immunitaire suggérerait un rôle régulateur, HSP70 permettant de rendre les cellules myéloïdes tolérantes après l'élimination de cellules apoptotiques précoces, identifiées comme provenant du soi.

Immune Properties of HSP70

Yves Delneste, Vincent Larochette, and Pascale Jeannin

Abstract In addition to their conventional chaperon activity, numerous studies have reported that heat shock protein 70 (HSP70) exhibit immune properties and especially the capacity (i) to induce the presentation and cross-presentation of associated or client proteins and, (ii) to control myeloid cell activation. Several studies were focused on the identification of HSP70-binding elements that contribute to their immune properties. A general consensus was reached on the nature of the endocytic receptors involved in the internalization of extracellular HSP70 which belong, for most of them, to the innate immunity receptor family. However, the nature of signaling receptors recruited by HSP70 remains unclear, because the stimulatory versus regulatory properties of HSP70 remains a subject of debate. Nevertheless, these unique immune properties allowed developing innovative prophylactic and therapeutic vaccines, especially in the treatment of cancers and chronic viral infections. Although HSP70 constitute potent vaccine vehicles in different preclinical models, clinical studies remain disappointing. The fact that the immune properties of HSP70 have not been totally clarified may explain their relative efficacy in human. In this review are presented the main immune properties of HSP70 related to the HSP70-binding elements identified to date, and discuss our current knowledge on their intrinsic immune properties.

Keywords Adaptive immunity · Hsp70 · Immune regulation · Innate immune receptors · Innate immunity · Myeloid cell · Vaccine

Y. Delneste (*) · P. Jeannin

Laboratory of Immunology and Allergology, University Hospital of Angers, Angers, France

CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

LabEx ImmunoGraftOnco, Angers, France e-mail: yves.delneste@inserm.fr

V. Larochette

CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

LabEx ImmunoGraftOnco, Angers, France

© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

A. A. A. Asea, P. Kaur (eds.), *HSP70 in Human Diseases and Disorders*, Heat Shock Proteins 14, https://doi.org/10.1007/978-3-319-89551-2_9

173

Abbreviations

A2M	alpha2 macroglobulin
Ac-LDL	acetylated low-density lipoprotein
ADP	adenosine dipohosphate
AGE	advanced glycation end product
AIF	apoptosis inducing factor
APAF-1	apoptotic peptidase activating factor 1
APC	antigen-presenting cell
APOER	apolipoprotein E receptor
ATP	adenosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCR	B cell receptor
BiP	binding immunoglobulin protein
CCL	C-C motif ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CLEC8A	C-type lectin domain family 8 member A
CLEVER-1	common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1
CTL	cytotoxic T cell
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC-SIGN	dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
EBV	Epstein-Barr virus
EGF-like	and link domain-containing scavenger receptor-1
ER	endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAT	fatty acid translocase
FEEL-1	fasciclin EGF-like laminin-type
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
Her2/Neu	human epidermal growth factor receptor 2/proto-oncogene Neu
HLA	human leukocyte antigen
HMGB1	high-mobility group box 1

HPV	human papilloma virus
HSP	heat shock protein
IFN	interferon
IL	interleukin
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRE1 α	inositol requiring enzyme 1 α
JAK	Janus kinase
LBP	LPS-binding protein
LDL	low-density lipoprotein
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
MAGE-1	melanoma-associated antigen 1
Mart-1	melanoma antigen recognized by T-cells 1
MD2	myeloid differentiation factor 2
MDSC	myeloid-derived suppressive cells
MHC	major histocompatibility complex
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NBD	nucleotide-binding domain
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
Ox-LDL	oxidized low-density lipoprotein
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PDZK	PDZ domain-containing protein 1
PRM	pattern recognition molecule
PRR	pattern recognition receptor
PSA	prostate-specific antigen
PTX3	pentraxin 3
RAP	receptor-associated protein
SBD	substrate-binding domain
SIGLEC	sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins
SP-D	surfactant protein D
SREC	scavenger receptor expressed by endothelial cells
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAB1	TAK1-binding protein 1
TAK1	TGF β -activated kinase

TAM	tumor-associated macrophages
TCR	T cell receptor
Th	helper T cell
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFSF	TNF superfamily
TRAF	TNF receptor-associated factor
Trp2	tyrosinase-related protein 2
TSP-1	thrombospondin 1

Introduction

Heat shock proteins (HSP) are involved in 3D-folding of newly synthesized proteins and protect them against endogenous and exogenous assaults. Besides their classical biochemical properties, several studies have demonstrated that HSP70, one of the largest and highly conserved family of HSP, exhibit intrinsic immune properties. The potential immune properties of HSP70 were first hypothesized in the 1970s by showing that proteins with an apparent molecular weight of 70 kDa and isolated from tumor cells may induce a protective immune response *in vivo*, in the absence of adjuvant. Thereafter, a huge quantity of studies aimed at deciphering, *in vivo* and *in vitro*, the biological mechanisms involved in the immune properties of HSP. Most of the immune properties of HSP were first elucidated for gp96 (HSP90B1), a member of the HSP90 family, and thereafter for HSP70. One of the most remarkable immune properties of HSP70 is their ability to mediate the cross-presentation of exogenous antigens and to initiate protective antitumor immune responses. In agreement with the cross-presentation process, HSP70 have been shown to interact with different immune receptors, especially innate receptors. However, the exact nature of the endocytic and signaling receptors engaged by HSP70, as well as whether HSP70 exhibit stimulatory or regulatory immune properties, remain a subject of debate. Nevertheless, and whatever the mechanism involved, HSP70 constitute interesting vehicles to induce, *in vivo*, antigen-specific cytotoxic responses. This review thus addresses the immune properties of HSP70, with a focus on the innate immune receptors engaged, and the consequences on vaccine strategies.

HSP70 Family of Chaperones

Common Features of HSP70

The 70 kDa heat shock proteins (HSP70s) constitute a family of highly conserved [proteins that are](#) ubiquitously expressed in prokaryotes and eukaryotes. Prokaryotes express three HSP70 proteins (DnaK, HscA (Hsc66), and HscC (Hsc62)) whereas eukaryotes express several HSP70s. As an example, the human family comprises 13 proteins, that differ from each other by their amino acid sequence, their levels of expression and their localization (Radons [2016](#)). The mostly expressed inducible human HSP70s are Hsp70–1 (encoded by the *HSPA1A* gene) and Hsp70–2 (*HSPA1B*); these two genes are closely located in the genome (Brocchieri et al. [2008](#)). In line with the topic of this review, it is important to mention human HSP70–14 (also referred to as Hsp70L1), a stress-induced HSP

identified in dendritic cells, exhibits potent immunostimulatory properties by favoring Th1 responses (Wan et al. 2004). Interestingly, the levels of HSP70 are elevated in some tumors (Yang et al. 2015).

HSP70s display a common functional domain structure: (i) a 44 kDa **N-terminal** nucleotide binding domain (NBD) that binds and hydrolyzes ATP, (ii) a middle protease-sensitive domain and, (iii) a 28 kDa **C-terminal** substrate-binding domain (SBD) that can interact with 6–9 amino acid-long peptides; SBD has preferential affinity for neutral and hydrophobic **amino acids**. HSP70s are monomeric chaperons that participate, in physiological situations, to the folding of neo-synthesized proteins, to their transport and to the assembly of multi-protein complexes. The binding/release of polypeptides is dependent on the ATPase activity: the ADP- and ATP-bound states favor peptide binding and release, respectively. HSP70s also regulate the activity of proteins and prevent their aggregation. Indeed, HSP70s exhibit an « unfoldase » activity, meaning that they recognize unfolded or aggregated proteins and unfold them before native refolding (Radons 2016). The expression of HSP70s is strongly upregulated by cellular stress, such as heat, **toxic** chemicals (such as heavy metals), ischemia, irradiations, infection, inflammation and nutrient deprivation. In stressed cells (induced by endogenous or exogenous challenges), HSP70s promote cell survival and allow cells to restore cellular homeostasis.

HSP70s act as anti-apoptotic proteins via their capacity to prevent mitochondrial translocation and activation of Bax (Yang et al. 2012) and to inhibit assembly of the death-inducing signaling complexes (Guo et al. 2005). HSP70s also inhibit the activity of different pro-apoptotic molecules (such as Apaf-1, AIF and caspase 3) (Beere et al. 2000; Ravagnan et al. 2001). HSP70s can protect cells against apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress via their interaction with the ER stress sensor protein IRE1 α (Wei et al. 2013).

Intracellular, Membrane and Extracellular HSP70

As the other HSP, members of the HSP70 family are mainly expressed in intracellular compartments, including cytosol, endoplasmic reticulum (such as **binding immunoglobulin protein** (BiP) or Grp78) and mitochondria (**mtHsp70** or Grp75), to exert their chaperon activities. Nevertheless, HSP70s can be expressed at the membrane surface or present, in a soluble form, in different biological fluids. Membrane HSP70s (mHSP70) accumulate at the surface of infected and tumor cells but not living cells (Multhoff et al. 1995; Multhoff and Hightower 1996; Poccia et al. 1996). Different mechanisms have been proposed to explain the membrane relocalization of proteins devoid of secretion signals, such as the release of secretory granules (Evdonin et al. 2004; Mambula and Calderwood 2006a, b)

and of exosomes (Gastpar et al. 2005; Lancaster and Febbraio 2005). The apparently « passive » accumulation of HSP70 at the cell membrane appears similar to the one reported for other intracellular molecules, such as PTX3 (Jaillon et al. 2009), or danger molecules, such as histones and nucleic acids (Cunin et al. 2016) that have also been reported to accumulate at the surface of stressed cells. Accordingly, mHSP70 may have an important role in the recognition of stressed and tumor cells by innate immune cells (Multhoff 2007; Radons and Multhoff 2005). Based on their biochemical properties, one can suspect that mHSP70 are associated to membrane proteins; however, to date, the nature of these putative mHSP70-associated molecules remains unknown.

Another explanation should be that extracellular HSP70s may bind to altered molecules, such as oxidized proteins, that are present at the surface of stressed cells, in a way similar to the one of bridging molecules (Henson 2017). HSP70s can be released by numerous cell types in response to various stimuli (Campisi and Fleshner 2003). Different ways of secretion of HSP70 have been described:

- A passive release by necrotic cells (Fleshner and Johnson 2005),
- The disruption of HSP70-containing secretory vesicles/exosomes released via a non-classical secretion pathway (MacKenzie et al. 2001) and,
- A release via the secretion of lysosomal endosomes (Baraldi et al. 2004; Mambula and Calderwood 2006b).

HSP70s can be used as biomarkers. As an example, mHSP70s are considered as selective markers of aggressive tumors. Circulating HSP70 have been proposed as biomarkers of inflammation in healthy subjects (Gehrmann et al. 2014a; Marotta et al. 2007). HSP70s have been detected in the serum of patients suffering from cancer or chronic infection (Pockley et al. 2014) and are proposed as biomarkers of tumor outcome after treatment (Gehrmann et al. 2014a, b). These data suggest that the immune properties of HSP70s may depend not only on the nature of the chaperoned peptides but also on their localization. Indeed, membrane and extracellular HSP70 may influence the nature and amplitude of signals delivered to immune cells present in the close vicinity or at distance.

HSP70 Induce Protective Immune Responses Against Tumors and Microbial Pathogens

Most of the studies on the use of HSP70s as vaccine vehicles have been performed in preclinical models of tumor growth. Nevertheless, and based on their vaccine potential, HSP70 have been also

used for the induction of protective immune responses against microbes. In this paragraph, we focus on the antitumor immune responses induced by HSP70s.

HSP70s Mediate Antigen Presentation and Cross Presentation

The pioneering studies by the group of PK Srivastava demonstrated that tumor- derived gp96 initiate protective tumor-specific CTL responses, suggesting that HSP may act as major tumor-rejection antigens (Suto and Srivastava 1995; Tamura et al. 1997). This capacity to induce protective antitumor immune responses has been extended to other HSP families, especially HSP60 and HSP70 families (Castellino et al. 2000). The capacity of HSP70s to induce protective antitumor immune responses was mainly reported in both prophylactic and therapeutic murine models of tumor development (reviewed in (Srivastava 2002). Moreover, HSP70s also induce cross-presentation of human tumor antigens (Castelli et al. 2001; Milani et al. 2002; Noessner 2006; Noessner et al. 2002), the rationale for their use in tumor vaccines in humans. In fact, numerous studies have clearly demonstrated that the specificity of the anti-tumor immune response was determined by the chaperoned peptides (Binder and Srivastava 2005; Ishii et al. 1999; Suto and Srivastava 1995). Biochemical analysis have shown that peptides associated to HSP70 are very diverse, deriving from self-proteins, tumor, microbial or minor histocompatibility antigens (Srivastava 2002). As an example, HSP70s isolated from melanoma cell lines can chaperon peptides derived from the tumor antigens Mart-1, gp100, Trp2 and gp100 (Castelli et al. 2001; Noessner et al. 2002).

According to the classical view of antigen presentation, antigen-derived peptides are presented into the MHC class I (MHC-I) and MHC class II (MHC-II) molecules of antigen-presenting cells (APC) to epitope-specific T cell receptors (TCR) expressed by CD8+ and CD4+ T cells, respectively. This interaction is the basis of the antigen-specificity of the adaptive immunity. Although different myeloid cells are able to present antigens to T cells (such as macrophages and neutrophils), dendritic cells are the only APC able to prime naive T cells and to initiate immune responses (Banchereau et al. 2000; Cella et al. 1997).

The process by which some exogenous antigens are endocytosed by APCs, gain access to the MHC class I pathway, and stimulate CD8+ T cells is called cross- presentation (Heath and Carbone 2001; Yewdell et al. 1999). Indeed, the classical view of antigen presentation claimed that exogenous antigens endocytosed by APC are mainly loaded into the MHC-II molecules for recognition by CD4+ T cells, while, in contrast, endogenous antigens (self and viral proteins) are loaded in the MHC-I molecules for recognition by CD8+ T cells. Antigen cross-presentation has revolutionized our view of the induction of antigen-specific immune responses and allowed to propose « conventional » vaccine

approaches for the treatment of cancers. The HSP-mediated antigen cross-presentation is dependent on three essential mechanisms:

- A receptor-mediated internalization of the antigens by professional APCs, especially dendritic cells,
- The functional maturation and activation of professional APC, rendering them able to prime naive T cells and,
- An intracellular trafficking allowing exogenous antigens/peptides to get access to the MHC-I presentation pathway.

One of the most important, and also most debated immune property of HSP, is their capacity to activate APCs. Indeed, the priming of CD8+ T cells by exogenous antigens requires that APC are fully activated (Banchereau et al. 2000), a status that may require CD4+ T cell help (Heath and Carbone 1999). The cross-presentation of an antigen by non-activated dendritic cells maintains or induces antigen-specific tolerance; this process is referred to as cross-tolerance. Ideally, the induction of functional CD8+ T cell responses against exogenous antigens may require both antigen cross-presentation in MHC-I molecules to CD8+ T cells and presentation in MHC-II molecules to CD4+ T cells. In agreement with the classical view of antigen presentation, HSP70 also induce antigen-specific CD4+ T cell activation, as evidenced by the induction of humoral immune responses and the interaction of microbial HSP70 with HLA-DR and their peptide fragments (Haug et al. 2007). Moreover, HSP70 chaperon both MHC-I and MHC-II epitopes (Stocki et al. 2010; 2011).

Potential Immunomodulatory Roles of Extracellular HSP70

The fact that (i) HSP70s mediate the cross-presentation of chaperoned peptides and (ii) that the cross-presentation requires receptor-mediated internalization of the peptide/chaperone complex, suggest that HSP70s have to be released in the extracellular milieu (Stocki and Dickinson 2012). According to their capacity to induce effective immune response, several studies reported that HSP70s are immunostimulatory molecules and, more interestingly, can induce the maturation and activation of dendritic cells, rendering them fully functional (reviewed in (Kuppner et al. 2001; Milani et al. 2002; Srivastava 2002). The term chaperokine was attributed to HSP to define this unique capacity of chaperons to activate immune cells (Asea et al. 2000). However, the intrinsic potential of HSP70s to activate APC remains a subject of debate (Borges et al. 2012) (see paragraph 5).

HSP70-Binding Elements

Antigen cross-presentation requires that exogenous antigens are internalized via endocytic receptors [3, 4]. Accordingly, HSP70s bind to dendritic cells and macrophages (Arnold-Schild et al. 1999; Todryk

et al. 1999; Wassenberg et al. 1999) before being internalized in a receptor-dependent manner (Arnold-Schild et al. 1999; Basu et al. 2001; Binder et al. 2000; Castellino et al. 2000; Singh-Jasuja et al. 2000; Sondermann et al. 2000; Wassenberg et al. 1999). Most if not all HSP70-binding elements identified are innate immune receptors. These results are in agreement with the fact that, in an immunological point of view, extracellular HSP70 can be viewed (or detected) as a danger signal (modified self) released by altered/dying cells. These motifs are detected by the innate immune system.

By opposition to the adaptive immunity, innate immunity is defined as a non-antigen specific system. It is involved in numerous processes, such as antimicrobial activity, induction and resolution of inflammation, maintenance of tissue homeostasis and wound healing. The innate immune system includes a large variety of molecular and cellular actors, such as epithelial barriers, numerous soluble molecules (including the complement system) and innate lymphoid and myeloid cells. The most remarkable characteristic of innate immune cells is their capacity to discriminate self from non self (microbes) and altered or modified self (such as the detection of biochemical modification of cell surface molecules). The recognition of non self and modified self is mediated by a restricted number of molecules (compared to the TCR and BCR repertoires) called pattern recognition molecules (PRM); this term is now preferred to the ancient nomenclature pattern-recognition receptor (PRR). PRM recognize microbial moieties called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and motifs expressed by altered self and called danger-associated molecular patterns (DAMPs). Remarkably, a same PRM can detect different PAMPs and DAMPs and exhibiting diverse biochemical characteristics (such as nucleic acids, lipids, proteins or glucids). Innate immune cells also orchestrate the adaptive immune response via the production of soluble immune mediators (cytokines and chemokines) and the priming/activation of antigen-specific lymphocytes, thanks to the antigen-presenting functions of myeloid cells.

PRM can be classified into three families, based on their functions: (i) endocytic receptors, involved in ligand recognition and internalization, (ii) signaling receptors, involved in ligand-induced cell activation and (iii) bridging molecules (also called opsonins), that bind to and favor the recognition of extracellular ligands by innate cells. To date, and except some individual cases, most of the HSP70-binding elements are endocytic and/or signaling PRM.

Endocytic Receptors

CD91

CD91 was the first HSP-binding element identified, initially as a gp96 receptor (Binder et al. 2000). CD91 was then reported as a receptor for human HSP70s on macrophages (Basu et al. 2001). CD91, also known as the $\alpha 2$ macroglobulin (A2M) receptor, low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) or apolipoprotein E receptor (APOER), is an endocytic and signaling receptor belonging to the lipoprotein receptor family. CD91 is expressed by numerous cell types, including hepatocytes, fibroblasts, keratinocytes, smooth muscle cells and myeloid cells (Herz and Strickland 2001). CD91 is a multimeric receptor consisting of a 420 kDa α subunit, a 85 kDa β subunit and a 39-kDa associated molecule. CD91 binds to the activated form of $\alpha 2$ M, a soluble molecule that binds to and inhibits a wide variety of proteinases and growth factors. CD91 is also suspected involved in lipid metabolism and can bind, in addition to activated A2M, tissue-specific plasminogen- activator–inhibitor complex and urokinase-PAI1 complex.

The identification of CD91 as an HSP-binding structure was mainly based on competitive binding assays with the CD91 ligand A2M and with a neutralizing anti CD91 mAb. The role of CD91 in HSP70-mediated antigen presentation to CD4+ and CD8+ T cells was confirmed by several independent studies (Fischer et al.

2010; Salimu et al. 2015; Tobian et al. 2004a).

Scavenger Receptors

Scavenger receptors represent a family of non-related cell-surface glycoproteins that recognize a large repertoire of ligands, ranging from bacteria and yeast to self (native proteins) and modified-self such as oxidized LDL (Ox-LDL) and apoptotic cells (reviewed in (Yamada et al. 1998; Yu et al. 2015)). Some scavenger receptors can also bind chemically modified LDL (acetylated LDL) that constitutes reliable tools in identifying HSP-binding elements, especially as binding competitors. Scavenger receptors thus represent an important family of endocytic PRM through their ability to bind endogenous and exogenous danger molecules (Jeannin et al. 2008). Different studies reported that scavenger receptor-binding molecules, such as modified LDL (OxLDL or AcLDL), apolipoprotein B, fucoidan and poly[IC], inhibited the binding of HSP70 to human APCs, suggesting that these PRM are the main cell surface HSP70 binding elements on human APCs (Delneste et al. 2002; Facciponte et al. 2007; Theriault et al. 2006; Theriault et al. 2005).

The first identified HSP70-binding scavenger receptors was SR-E1. Initially identified as an Ox-LDL receptor expressed by endothelial cells; this molecule, also known as LOX-1 or CLEC8A (C-type lectin domain family 8 member A), binds multiple ligands, including advanced glycation end products (AGE), activated platelets, and apoptotic cells. SR-E1 also binds exogenous ligands, such as virus and bacteria. In addition to endothelial cells, SR-E1 is constitutively expressed by macrophages and

dendritic cells (Delneste et al. 2002). By using a collection of scavenger receptor-expressing CHO cells, we have identified SR-E1 as one of the main HSP70-binding element on human macrophages and dendritic cells. Interestingly, the in vitro and in vivo cross-presentation of an antigen coupled to HSP70 is dependent on SR-E1 internalization (Delneste et al. 2002). Finally, the in vivo targeting of an exogenous antigen to SR-E1, by coupling to an anti-SR-E1 antibody, induced an antigen-specific CD8+ T cell response (Delneste et al. 2002).

SR-E1 also exhibits features of C-type lectins (Sawamura et al. 1997) which represent another important family of highly conserved PRM. Several studies have underlined the important role played by C-type lectins in mediating antigen cross- presentation, both in vitro and in vivo. Among these PRM, one can mention CD205 (DEC205) (Bozzacco et al. 2007) and CD209 (DC-SIGN) (Garcia-Vallejo et al. 2013). However, no binding of HSP70s to some other C-type lectins, such as CD209 (Theriault et al. 2005) and CLEC7A (dectin-1), was reported so far. A binding of HSP70 family members was also reported to other scavenger receptors:

- SR-A1 (Facciponte et al. 2007); SR-A1 (CD204) is a 220–250 kDa trimeric molecule that shares a collagen-like domain, essential for ligand binding. SR-A1 binds numerous endogenous and exogenous ligands, such as AGE products, as well as microbes and microbial moieties.
- SR-B1 (Fischer et al. 2010). Also known as CD36, platelet glycoprotein 4, fatty acid translocase (FAT) or glycoproteins 88 (GP88), IIIb (GPIIIB), or IV (GPIV), SR-B1 preferentially accumulates in caveolae. SR-B1 bind modified LDL (OxLDL and AcLDL), unmodified low density lipoproteins (LDL), very low density lipoproteins (VLDL) and apoptotic cells. SR-B1 is a heavily N- glycosylated protein with the C-terminal cytoplasmic tail that interacts with the multisubunit adaptor protein PDZK.
- SR-F1 (Facciponte et al. 2007; Gong et al. 2010; Theriault et al. 2006). Also known as SREC-I, SR-F1 mediates the internalization of OxLDL (as well as AcLDL). SR-F1 can also interact with SREC-2, a homologous of SR-F1, via its extracellular domain; although the role played by this heterophilic interaction remains unclear, it is suppressed by SR-F1 ligands.
- SR-H1 (Theriault et al. 2006). Also known as FEEL-1, CLEVER-1 or stabilin-1 (STAB1), SR-H1 binds AcLDL, AGEs as well as Gram-negative and Gram- positive bacteria (Adachi and Tsujimoto 2002; Tamura et al. 2003).

These endocytic receptors are involved in the internalization and presentation of associated antigens to CD4+ and CD8+ T cells (Facciponte et al. 2007; Gong et al. 2010).

CD40

In 2001, the group of T Lehner reported a very elegant study showing that CD40 is a binding and uptake receptor for *Mycobacterium tuberculosis* HSP70 (MtbHSP70), but not human HSP70 (Binder 2009; Wang et al. 2001). CD40, a membrane molecule belonging to the TNF receptor superfamily (TNFRSF5), is constitutively expressed by APCs, including macrophages, dendritic cells and B lymphocytes. Triggering CD40 on myeloid cells induces the production of inflammatory cytokines.

The engagement of CD40 on B cells induces their maturation, [antibody isotype switching](#), and their differentiation into [plasma cells](#). The ligand of CD40 is a member of the TNF superfamily, TNFSF5, also called CD40 ligand (CD40L) or CD154. CD154 is mainly expressed by activated CD4+ T cells and acts as a costimulatory molecule for B cells and myeloid cells; the engagement of CD154 participates to the T cell priming process.

A subsequent study by the same group showed that the binding of MtbHSP70 to the extracellular domain of CD40 was localized in the N-terminal nucleotide-binding domain in its ADP (peptide-binding) state (Becker et al. [2002](#)). To date, CD40 has been mainly reported as a signaling receptor (reviewed in (Banchereau et al. [1994](#)); its role in myeloid cell activation by HSP70 is discussed in the paragraph “Signaling receptors”.

C-type Lectins

As mentioned above, HSP70 can bind to the C-type lectin/scavenger receptor SR-E1 which is constitutively expressed on myeloid cells. Studies have also reported that HSP70 can bind to the C-type lectin CD94 (Gross et al. [2003a](#); Moser et al. [2002](#)). CD94/NKG2 is a family of receptors mainly expressed on natural killer (NK) cells and a subset of CD8+ T cells. The consequences of HSP70 binding to CD94 on the biology of NK cells is detailed in the paragraph 4.

Signaling Receptors

HSP70 can efficiently cross-prime naive T cells, a process that required an optimal activation of APCs. However, some of the endocytic receptors identified are not signaling molecules, such as SR-E1, suggesting that signaling receptors are recruited by HSP70s. Numerous studies were thus focused on identifying HSP70 signaling receptors.

TLRs

Through their pivotal role in the activation of myeloid APCs, members of the Toll-like receptor (TLR) family are crucial in the initiation of innate and adaptive immune responses. The induction of in vivo immune responses by HSP70 suggested that they can activate myeloid cells and members of the TLR family rapidly emerged as candidate molecules. TLRs are type I integral membrane glycoproteins belonging to the IL-1 receptor (IL-1R) superfamily. TLR and IL-1R have a conserved region of ≈ 200 amino acids in their cytoplasmic domain, known as Toll/IL-1R (TIR) domain. The TIR domain is required for the intracellular signaling induced by TLR ligands. TLR can sense a large variety of

microbes and microbial moieties, as well as host motifs. They are localized either at the cell surface or in endosomes where there are specialized in detecting microbes or nucleic acids, respectively. After ligand binding, TLRs dimerize and undergo a conformational change required for the recruitment of downstream signaling molecules that include the adaptor molecule myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88), IL-1R-associated kinases (IRAKs), TGF β -activated kinase (TAK1), TAK1-binding protein 1 (TAB1), TAB2 and TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6). The engagement of TLRs generates potent activation signals for myeloid cells, as evidenced by the production of numerous pro-inflammatory cytokines, chemokines and interferons (IFNs). TLR agonists also induce the maturation of dendritic cells, a process required for naïve T cell priming. TLR agonists may also participate to the activation of innate and conventional lymphoid cells.

Asea et al. reported that TLR2/TLR4 are involved in the activation of myeloid cells by HSP70 (Asea et al. 2000, 2002), as evidenced by the production of the inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α and IL-12, and an elevated expression of the costimulatory molecule CD86. The HSP70-induced signaling was mediated via the MyD88/IRAK/NF- κ B signaling pathway. The role played by TLR4 in the activation of dendritic cells and in the induction of a Th1 response by HSP70s was confirmed by others (Fang et al. 2011).

TLR4 was initially described as an element of the multimeric LPS receptor which includes, in addition to TLR4, the binding elements CD14 and LBP and the accessory molecule MD2. Accordingly, the activation of APCs induced by HSP70 requires CD14, in addition to TLR4; however, no data supported a direct binding of HSP70 to CD14 (Asea et al. 2000; Moroi et al. 2000). In line with the capacity of HSP70 to signal via TLR2/TLR4, several endogenous ligands have reported to bind to these molecules, including, in addition to other HSP (HSP60, HSP96), HMGB1, surfactant protein D (SP-D), fibrinogen, fibronectin, and hyaluronic acid (Bryant et al. 2015).

CD91

CD91 is phosphorylated in response to HSP, triggering signaling cascades that ultimately lead to the activation of NF- κ B (Pawaria and Binder 2011). The stimulatory function of CD91 was confirmed in another study showing that the proliferation and cytokine production by CD4⁺ T cells in response to APC pulsed with complexes between HSP70 and antigenic peptides was inhibited by CD91 siRNA (Fischer et al. 2010). Accordingly, the CD91 ligand A2M acts as an adjuvant to prime CD8⁺ T cells in vivo (Kropp et al. 2010).

CD40

MtbHSP70 induced a CD40-mediated production of numerous cytokines and chemokines, such as CCL3 (MIP1 α) involved in the recruitment and activation of polymorphonuclear cells, CCL4 (MIP1 β) chemotactic for numerous immune cells and, CCL5 (RANTES), chemotactic for T cells. This property can be explained by the adjuvanticity of MtbHSP70 (Wang et al. 2001). The binding of MtbHSP70 to CD40 induces an intracellular signaling via p38, associated with the internalization of the complex HSP70-CD40. P38 is a transduction molecule involved in the signaling cascade downstream CD40 that is involved in the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF α and IFN γ (Pullen et al. 1999).

CCR5

C-C chemokine receptor type 5 (CCR5), also known as CD195, acts as a receptor for the C-C chemokines CCL3, CCL4, and CCL5, three chemokines induced by MtbHSP70. CCR5 is mainly involved in the attraction of T cells in specific tissues and organs. The signaling via CCR5 induces dendritic cell activation and aggregation and participates to the formation of the immune synapse between dendritic cells and T lymphocytes (Floto et al. 2006). The binding of MtbHSP70 to CCR5 induces a Ca²⁺ signaling and the engagement of CCR5 participates in the generation effector immune responses (MacAry et al. 2004). In this study, the authors showed that the activation by MtbHSP70 was not dependent on TLR signaling.

Cooperation Between Endocytic and Signaling Receptors

Except some HSP70-binding elements, such as CD91 and CD40 which can act as both endocytic and signaling receptors, several studies suggest that the activation of innate immune cells by HSP70 requires cooperation between an endocytic receptor and a signaling receptor. This mechanism of interaction is observed in several examples of innate immune cell activation by non self and altered self. Nevertheless, in most cases, this model is supported by indirect in vivo experiments using HSP70 as a vaccine carrier molecule. As an example, Gong et al have demonstrated that the induction of antitumor immunity by HSP70 isolated from tumor-dendritic cell fusions is dependent on functional SR-F1 and TLR2/TLR4 expression by dendritic cells (Gong et al. 2009). In a similar manner, we have reported that targeting in vivo a vaccine antigen to SR-E1 is not sufficient to induce a protective antitumor response and that protection was only observed when antigen targeting was associated with the use of a TLR-activating adjuvant (Delneste et al. 2002). Interestingly, Mizukami et al showed

that the cross-priming capacity of HSP70s was mediated by a TLR- independent mechanism, while the MyD88/IRAK signaling was required to induce tumor rejection (Mizukami et al. [2012](#)).

Hsp70 in the Regulation of Innate Immune Cell Activation

HSP70s, as other members of the HSP superfamily, induce antigen-specific immune responses, in vitro and in vivo, a process that requires activation of APCs. As a consequence, several studies have reported that HSP70 induce the activation of innate immune cells, and especially myeloid cells.

Activation of Myeloid Cells

In addition to their role as sentinels of the innate immune system, macrophages and dendritic cells also act as professional antigen-presenting cells. Although macrophages are only able to present antigens to memory T cells, dendritic cells have the unique capacity to prime naive T cells. HSP70s can induce not only the cross- presentation but also the presentation of chaperoned peptides and coupled antigens to CD4+ and CD8+ T cells. The fact that HSP70s induce protective immune CD4+ and CD8+ T cell responses suggests that they are able to activate APCs. It is important to mention that antigen presentation and cross-presentation induced by HSP70s involve the same endocytic and signaling receptors. As an example, CD91 and scavenger receptors are involved in the activation of antigen-specific memory CD4+ T cells (Fischer et al. [2010](#)). The role of HSP70 in the induction of CD4+ T cells has been also reported by other studies (Mycko et al. [2004](#); Tobian et al. [2004a, b](#); Wang et al. [2006](#)).

As mentioned above, extracellular HSP70s induce the production of pro- inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6) and C-C chemokines by myeloid cells (Asea et al. [2000, 2002](#); Redzovic et al. [2015](#); Wang et al. [2001](#)). HSP70s also induce the production of IL-12 (Vabulas et al. [2002](#)), a pro-Th1 cytokine, and of IL-15 (Redzovic et al. [2015](#)), a cytokine involved in the activation of innate and adaptive cytotoxic lymphoid cells, as well as type I IFNs by plasmacytoid cells (Jacquemin et al. [2017](#)). The activation of myeloid cells is also associated with an increase of expression of MHC-II and of the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 (Asea et al. [2002](#); Fang et al. [2011](#); Wang et al. [2002](#)) which provide stimulatory signals required for optimal T cell activation.

Interestingly, HSP70s were reported to induce dendritic cell maturation (Kuppner et al. [2001](#); Vabulas et al. [2002](#); Wang et al. [2002](#)), a process required to prime naive T cells against neo-antigens. Importantly, the capacity of HSP70 to activate and induce the maturation of dendritic cells supports

their ability to generate immune responses *in vivo*, in the absence of adjuvant (Srivastava et al. 1998). As a consequence of their dendritic cell-stimulatory activity, HSP70s have been reported able to convert T cell tolerance to autoimmunity *in vivo*, in a murine model of model of autoimmune diabetes (Millar et al. 2003). Studies also reported that an intratumoral infusion of HSP70 increase the infiltration of cytotoxic lymphoid and the production of IFN γ (Shevtsov et al. 2014).

Activation of Innate Lymphoid Cells

NK cells are innate lymphoid cells that play a pivotal role in the destruction of virus-infected cells and tumoral cells. Their activation is dictated by a delicate balance between stimulatory and regulatory signals (Narni-Mancinelli et al. 2013). The overexpression of HSP70 by tumor cells has been reported as a marker of tumor immunogenicity (Clark and Menoret 2001) and *in vivo* studies showed that tumors secreting HSP70s display increased immunogenicity, with induction of strong and specific CTL responses (Massa et al. 2004). Interestingly, CD94⁺ CD3⁻ NK cells can recognize and kill membrane HSP70-positive tumor cells in a granzyme- dependent manner (Moser et al. 2002; Multhoff et al. 1995). The interaction of HSP70 with CD94 was demonstrated by competitive binding experiments (Gross et al. 2003a, b).

Moreover, in the absence of HLA-E expression, the activation of NK cells with the HSP70 peptide TKD render them cytotoxic against target cells (Bottger et al. 2012; Gross et al. 2008). More intriguingly, Massa et al reported that the interaction of HSP70 with NK cells may also participate in the initiation of antigen-specific T cell responses. More precisely, the authors demonstrated that the adjuvant activity of HSP70 requires NK cells at the site of dendritic cell-HSP70 interaction whereas its ability to induce antigen cross-presentation of chaperoned peptides is independent of NK cells (Massa et al. 2005). A recent study reported that HSP70-positive exosomes derived from genotoxic drug-treated tumor cells induce the production of cytokines by CD56^{high} NK cells in a TLR2-dependent manner (Vulpis et al. 2017).

The Immune Properties of HSP70: An Unsolved Mystery

Innate immunity receptors act as immune sensors able to discriminate self from non-self and modified self. In most cases, the elimination of modified self does not activate immune cells, maintaining tissue homeostasis and preventing the initiation of a potentially harmful autoimmune response. Internalization without recruitment of a signaling receptor may lead to tolerance, as

reported for the internalization of apoptotic cells. As an example, the interaction of TSP-1 with CD91 and CD36, two HSP70-binding elements, may participate to the tolerogenic status of dendritic cells after apoptotic cell phagocytosis (Poon et al. 2014). In agreement with these studies, the presentation of apoptotic-cell-derived antigens requires the presence of a TLR agonist in the same cargo as that of apoptotic cells (Blander and Medzhitov 2006).

However, most of innate endocytic receptors also recognize non self (microbes and microbial moieties) that induce a huge activation of immune cells. The concept of cooperation between endocytic and signaling receptors has thus emerged to explain this dichotomy. Innate cell activation induces the recruitment of signaling PRM after the binding of ligands to the endocytic receptor. In a similar manner, HSP70 endocytosis precedes signaling in myeloid cells (Kuppner et al. 2001; Moroi et al. 2000). In contrast to early apoptotic cells, necrotic cells induce a pro-inflammatory response, thanks to the release of stimulatory endogenous molecules called alarmins. These alarmins, such as HMGB1, IL-33 and ATP, activate immune cells and participate in the initiation of antigen-specific immune responses. Based on the studies showing that HSP70s activate APCs, it has been proposed that HSP70 may be considered as a danger signal. However, other authors refute to classify HSP70 as a DAMP (van Eden et al. 2012). Indeed, circulating HSP70 are detected in the serum of healthy subjects, without signs of inflammation. Moreover, different studies argue that the stimulatory activities of HSP70s are associated to the presence of contaminating molecules in HSP70 preparation.

Do HSP70 Interact with a Limited Number of Receptors?

To date, HSP70s have been reported to interact with a large variety of immune receptors. However, and even though most studies concur to recognize that HSP70 are able to induce antigen (cross) presentation, different studies refuted the HSP70-binding capacity to some receptors. Although this initial study was confirmed by subsequent studies (Binder and Srivastava 2004; Salimu et al. 2015), authors contested the fact that CD91 may be considered as an HSP-binding structure, either by using CD91^{null} cells or by demonstrating that the binding of HSP to CD91 was not altered by the conventional CD91 ligand activated α 2 macroglobulin (A2M*) or the CD91 antagonist molecule, receptor-associated protein (RAP) (Berwin et al. 2002). Moreover, although highly expressed on macrophages, the expression of CD91 is very low on dendritic cells, suggesting that its role in *in vivo* T cell priming should be marginal. Moreover, Theriault et al. reported that scavenger receptors, but not CD40 and CD91, are the main HSP70-binding elements (Theriault et al. 2005). In a similar manner, Bendz et al have shown that the cross-presentation capacity of different dendritic cell subsets was equivalent, irrespective of the level of CCR5 expression (Bendz et al. 2008).

HSP70 are endogenous molecules that, theoretically, cannot activate APCs. Nevertheless, several studies reported that HSP70s can directly activate myeloid cells (and, at a lower extent, lymphoid cells) via innate receptors, such as TLR4. All the studies reporting a direct stimulatory activity of HSP70 claimed that this process was independent of contaminating molecules, especially endotoxins (Wang et al. 2010). However, independent studies reported that contaminating endotoxins were responsible for the activation of myeloid cells (Bausinger et al. 2002; Gao and Tsan 2003, 2004). Another study reported that calcium signaling induced by human HSP70 and MtbHSP70 may be caused by contaminating nucleotides (Bendz et al.

2008).

The Immunoregulatory Properties of HSP70

HSP70s are highly conserved molecules which can be released in the extracellular milieu. Consequently, the initiation of HSP70-specific immune responses remains exceptional. Contrary to the vast majority of studies, some authors have reported that HSP70 exhibit regulatory properties (reviewed in (Borges et al. 2012; van Eden et al. 2005)). The initial study on a potential regulatory role for HSP70s was the demonstration that MtbHSP70 has an anti-inflammatory role in an in vivo model of autoimmune arthritis model (van Eden et al. 1998). The anti-inflammatory and protective roles of HSP70s and of selected HSP70 peptides have been thereafter reported in different models of severe or chronic inflammation (Vinokurov et al. 2012; Yurinskaya et al. 2009), infection (Kimura et al. 1998) and skin allografts (Borges et al. 2010). Extracellular HSP70s also induce endotoxin tolerance in macrophages (Aneja et al. 2006).

At the cellular level, HSP70 have been also reported to inhibit the maturation of dendritic cells, to induce the differentiation of monocyte-derived dendritic cells into tolerogenic cells (Motta et al. 2007; Stocki and Dickinson 2012) and to potentiate the suppressive activity of myeloid derived suppressive cells (MDSC) (Diao et al. 2015). By inducing suppressive myeloid cells, HSP70s increase the immunosuppressive activity of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells (Wachstein et al. 2012); regulatory T cells (Treg) have the unique capacity to dampen inflammation and to maintain an immunoregulatory environment (Josefowicz et al. 2012). HSP70s also favor the production of immunosuppressive Th2 cytokines by CD4⁺ T cells (Tsan and Gao 2004).

Macrophages are involved in numerous processes, such as immune surveillance and wound healing. A binary classification has thus been proposed to define their functional polarization with M1 and M2 cells representing the extremes of a continuum of polarization profiles. M1 cells exhibit

antimicrobial and antitumor properties while M2 cells, mainly involved in tissue homeostasis and repair, exhibit immunoregulatory and protumoral properties. In established solid tumors, tumor-associated macrophages (TAM) exhibit a M2 phenotype (Mantovani et al. 2017). As examples, SR-A1 promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer (Neyen et al. 2013a, b). HSP70s favor the polarization of macrophages into regulatory M2 cells (Lopes et al. 2014). An intriguing study recently reported that HSP70 regulates the M2-like polarization of tumor-associated macrophages in a SR-A1-dependent manner, favoring in vivo glioma regression (Zhang et al. 2016). However, whether this mechanism can be extended to other HSP70-binding elements, and especially scavenger receptors and C-type lectins, remains unknown.

The immunoregulatory activity of HSP70 was demonstrated to be dependent on the induction of the suppressive cytokine IL-10 by myeloid cells ((Detanico et al. 2004; Kimura et al. 1998; van Eden et al. 2005; Wendling et al. 2000). HSP70-induced IL-10 may then favor the generation of regulatory cells (Treg) as Treg cell depletion completely abolished this effect (Hauet-Broere et al. 2006). The capacity of HSP70 to favor a M2 polarization was also suspected dependent on the induction of IL-10 (Lopes et al. 2016). More recent studies have shown that the capacity of HSP70 to inhibit the production of IL-10 is driven by a down-regulation of the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ (Borges et al. 2013); this inhibition was correlated with a decreased production of pro-inflammatory cytokines and abrogated upon pretreatment of cells with ERK and JAK2/STAT3 inhibitors. These results are in agreement with studies reporting the pivotal role played by STAT3 in the establishment of an immunoregulatory environment (Yu et al. 2007). More intriguingly, Chandawakar et al reported that the regulatory versus stimulatory activity of HSP was dependent on their concentrations with low doses being efficient to initiate antitumor immune responses and high doses being inefficient or even immunosuppressive (Chandawakar et al. 1999).

Can SIGLEC4/15 Reconciliate Stimulatory and Regulatory Immune Properties of HSP70?

In 2015, Fong et al reported that the immune properties of extracellular HSP70s are mediated via the receptors Siglec-5 and Siglec-14 (Fong et al. 2015). Siglecs are transmembrane sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins mainly expressed on leukocytes (Macauley and Paulson 2014; Schwarz et al. 2015). Siglec-5 and Siglec-14 belong to the rapidly evolving CD33-related Siglecs (CD33rSiglecs) family (Angata 2006). Siglec-5 and Siglec-14 are immune-suppressive and immune-activating paired receptors. This study reported that HSP70s bind Siglec-5 and Siglec-14 in a sialic-acid independent manner and that Hsp70 suppresses inflammation through Siglec-5 while, in contrast, it augments inflammation through Siglec-14. Interestingly, Siglec-5 and Siglec-14 can interact with other HSP70-

binding elements, such as TLR and scavenger receptors/C-type lectins which have been defined as HSP70-binding elements. In addition to shed new light on the complexity of the biology of extracellular HSP70, this study provides an elegant molecular demonstration of the dichotomous immune properties of HSP70s and may help clarifying contradictory studies on the immune properties of HSP70s.

HSP70-Based Strategies to Induce Protective Immune Responses

Even though the intrinsic immune properties of HSP70 remain unclear, most authors agree on the fact that HSP70s represent unique vehicles to induce protective antitumoral and antimicrobial CD8+ and CD4+ T cell responses in vivo (Blachere et al. 1997; SenGupta et al. 2004; Udono et al. 1994; Udono and Srivastava 1993), thanks to their capacity to carry exogenous antigens into MHC-I and MHC-II antigen presentation pathways in professional APCs (Castellino et al. 2000; Srivastava 2002). Accordingly, different vaccine strategies have been proposed based on these unique immune properties. A recent review summarized some ongoing antitumoral vaccine clinical trials using HSP (Shevtsov and Multhoff 2016). In this paragraph are only mentioned the different HSP70-based vaccine strategies to induce protective antitumor and antiviral immune responses.

The initial HSP70-based vaccine strategies relied on the peptide-binding capacity of HSP. Vaccines contained HSP70 isolated from tumor (or virus infected) cells (Noessner et al. 2002). In this approach, the antigen specificity is determined by the chaperone-assisted peptides, allowing proposing individual vaccines irrespective of the nature of the vaccine antigens and of the MHC restriction (Suto and Srivastava 1995). HSP70s can be also isolated from the supernatants of apoptotic or stressed tumor cells (Chen et al. 2009; Masse et al. 2004) or from HSP70-transfected tumor cells (Massa et al. 2004). An original approach was the use of HSP70 isolated from dendritic/tumor cell fusion which induce potent antigen-specific antitumor immune responses, superior to the one of HSP70 isolated from tumor cells. (Enomoto et al. 2006). Another peptide-based approach is to reconstitute HSP-peptides complexes with immunodominant tumor antigen peptides (Blachere et al. 1997). Vaccinations with dendritic cells pulsed with tumor-derived HSP70 can also induce protective immune responses (Toomey et al. 2008).

Other strategies are based on the capacity of HSP70 to target dendritic cells in vivo, allowing the antigen to get access to the antigen presentation pathways. In this case, HSP70, coupled to the vaccine antigen, is used as a vaccine vehicle. Vaccine antigens can be chemically coupled to HSP70 (Delneste et al. 2002) or produced as a recombinant fusion molecule (Zhang and Huang 2006). Fusion

proteins, consisting in HSP70 coupled to a vaccine antigen, have been validated using several different tumor antigens, such as mesothelin, MAGE-1, PSA, carcinoembryonic antigen and Her2/neu (Ge et al. 2009; Yuan et al. 2014; Dong et al. 2013; Jiang et al. 2013; Pakravan et al. 2010; Wu et al. 2005) as well as viral antigens, such as the HPV16 E7 antigen and a dominant epitope of the EBV latent protein 2A (Zong et al. 2009, 2013).

Based on its immunostimulatory properties, other strategies use HSP70s as an adjuvant molecule for vaccines using tumor cell lysates (Wang et al. 2010; Li et al. 2010) or DNA vaccines as a source of antigens (Li et al. 2007; Zhang et al. 2007; Farzanehpour et al. 2013; Garrod et al. 2014) or in classical subunit vaccines (Lewis et al. 2014; Li et al. 2010; Shevtsov et al. 2014) to initiate effective immune responses. Nevertheless, in order to ameliorate the efficacy of the vaccine or to overcome the tumor immunosuppressive environment, several studies associated HSP70 vaccines with an adjuvant. In most cases, combining HSP70 vaccine with adjuvant (Delneste et al. 2002) or CD40L (Gao et al. 2012) induced more potent protective immune responses.

Conclusions

The identification of tumor-associated antigens and the presence of circulating tumor specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in tumor-bearing patients suggested that initiating a protective antitumor immune response is feasible. A lot of work was thus done to propose antitumor vaccine strategies, such as the use of recombinant virus encoding human tumor antigens, tumor cell-derived exosomes or nucleic acid-based vaccines. Following the identification of the antigen cross-presentation process, numerous studies aimed at identifying carrier proteins that may selectively target and activate immature dendritic cells in vivo. HSP70s have thus emerged in the 1990s as powerful vaccine vehicles to initiate potent and protective antitumoral (and antiviral) CD8+ T cell immune responses. This remarkable property is related to the ability of extracellular HSP70s to interact with innate immune receptors involved in antigen cross-presentation. The initiation of an antigen-specific CD8+ T cells response against a neo-antigen requires that dendritic cells are fully activated. In agreement with their vaccine potentials, the initial studies suggested that HSP70s are intrinsically able to activate APCs. However, the exact nature of PRM involved in the immune properties of HSP70s remains, to date, controversial. Members of the scavenger receptor family appear as the less discussed endocytic receptors. Contrastingly, whether HSP70s are suppressive or stimulatory molecules remain debated. Based on the current view of the capacity of the innate immune system to maintain immune homeostasis in response to modified self, one could hypothesize that HSP70s are not stimulating molecules. Nevertheless, to precisely determine the

immune status of HSP70s remains a big challenge that would allow reevaluating their therapeutic use.

Acknowledgements Studies in our laboratory are supported by institutional grants from Inserm and the University of Angers and by grants from the Ligue contre le Cancer and the Cancéropole Grand Ouest. Vincent Larochette is supported by a grant fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education. This manuscript was prepared in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program (ANR-11-LABEX-0016-01).

References

- Adachi, H., & Tsujimoto, M. (2002). FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria- binding and angiogenesis-modulating activities. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 34264–34270.
- Aneja, R., Odoms, K., Dunsmore, K., Shanley, T. P., & Wong, H. R. (2006). Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *Journal of Immunology*, *177*, 7184–7192.
- Angata, T. (2006). Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins. *Molecular Diversity*, *10*, 555–566.
- Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., et al. (1999). Cutting edge: Receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *Journal of Immunology*, *162*, 3757–3760.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., et al. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine*, *6*, 435–442.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., et al. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 15028–15034.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., et al. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology*, *12*, 881–922.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *18*, 767–811.
- Baraldi, P. G., Di Virgilio, F., & Romagnoli, R. (2004). Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *4*, 1707–1717.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., & Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, *14*, 303–313.
- Batra, L., Verma, S. K., Nagar, D. P., et al. (2014). HSP70 domain II of Mycobacterium tuberculosis modulates immune response and protective potential of F1 and LcrV antigens of Yersinia pestis in a mouse model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*, e3322.
- Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., et al. (2002). Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *European Journal of Immunology*, *32*, 3708–3713.
- Becker, T., Hartl, F. U., & Wieland, F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *The Journal of Cell Biology*, *158*, 1277–1285.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., et al. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*, *2*, 469–475.
- Bendz, H., Marincek, B. C., Momburg, F., et al. (2008). Calcium signaling in dendritic cells by human or mycobacterial Hsp70 is caused by contamination and is not required for Hsp70-mediated enhancement of cross-presentation. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*, 26477–26483.
- Berwin, B., Hart, J. P., Pizzo, S. V., & Nicchitta, C. V. (2002). Cutting edge: CD91-independent cross-presentation of GRP94(gp96)-associated peptides. *Journal of Immunology*, *168*, 4282–4286.
- Binder, R. J. (2009). CD40-independent engagement of mammalian hsp70 by antigen-presenting cells. *Journal of Immunology*, *182*, 6844–6850.
- Binder, R. J., & Srivastava, P. K. (2004). Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 6128–6133.

- Binder, R. J., & Srivastava, P. K. (2005). Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *6*, 593–599.
- Binder, R. J., Harris, M. L., Menoret, A., & Srivastava, P. K. (2000). Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells. *Journal of Immunology*, *165*, 2582–2587.
- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., et al. (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*, 1315–1322.
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, *440*, 808–812.
- Borges, T. J., Porto, B. N., Teixeira, C. A., et al. (2010). Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS One*, *5*, e14264.
- Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J., et al. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology*, *3*, 95.
- Borges, T. J., Lopes, R. L., Pinho, N. G., Machado, F. D., Souza, A. P., & Bonorino, C. (2013). Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBPbeta and C/EBPdelta. *International Journal of Hyperthermia*, *29*, 455–463.
- Bottger, E., Multhoff, G., Kun, J. F., & Esen, M. (2012). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70. *PLoS One*, *7*, e33774.
- Bozzacco, L., Trumfpheller, C., Siegal, F. P., et al. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 1289–1294.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E., & Macario, A. J. (2008). hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 19.
- Bryant, C. E., Gay, N. J., Heymans, S., Sacre, S., Schaefer, L., & Midwood, K. S. (2015). Advances in toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *50*, 359–379.
- Campisi, J., & Fleshner, M. (2003). Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *Journal of Applied Physiology (1985)*, *94*, 43–52.
- Castelli, C., Ciupitu, A. M., Rini, F., et al. (2001). Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Research*, *61*, 222–227.
- Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., et al. (2000). Receptor-mediated uptake of antigen/ heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*, 1957–1964.
- Cella, M., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, *9*, 10–16.
- Chandawarkar, R. Y., Wagh, M. S., & Srivastava, P. K. (1999). The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *The Journal of Experimental Medicine*, *189*, 1437–1442.
- Chen, T., Guo, J., Han, C., Yang, M., & Cao, X. (2009). Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *Journal of Immunology*, *182*, 1449–1459.
- Clark, P. R., & Menoret, A. (2001). The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. *Cell Stress & Chaperones*, *6*, 121–125.
- Cunin, P., Beauvillain, C., Miot, C., et al. (2016). Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death & Disease*, *7*, e2215.
- Dabaghian, M., Latifi, A. M., Tebianian, M., Dabaghian, F., & Ebrahimi, S. M. (2015). A truncated C-terminal fragment of Mycobacterium tuberculosis HSP70 enhances cell-mediated immune response and longevity of the total IgG to influenza A virus M2e protein in mice. *Antiviral Research*, *120*, 23–31.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., et al. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*, *17*, 353–362.

- Detanico, T., Rodrigues, L., Sabritto, A. C., et al. (2004). Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: Immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clinical and Experimental Immunology*, 135, 336–342.
- Diao, J., Yang, X., Song, X., et al. (2015). Exosomal Hsp70 mediates immunosuppressive activity of the myeloid-derived suppressor cells via phosphorylation of Stat3. *Medical Oncology*, 32, 453.
- Dong, L., Zhang, X., Ren, J., et al. (2013). Human prostate stem cell antigen and HSP70 fusion protein vaccine inhibits prostate stem cell antigen-expressing tumor growth in mice. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 28, 391–397.
- Enomoto, Y., Bharti, A., Khaleque, A. A., et al. (2006). Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *Journal of Immunology*, 177, 5946–5955.
- Evdonin, A. L., Guzhova, I. V., Margulis, B. A., & Medvedeva, N. D. (2004). Phospholipase c inhibitor, u73122, stimulates release of hsp-70 stress protein from A431 human carcinoma cells. *Cancer Cell International*, 4, 2.
- Facciponte, J. G., Wang, X. Y., & Subjeck, J. R. (2007). Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. *European Journal of Immunology*, 37, 2268–2279.
- Fang, H., Wu, Y., Huang, X., et al. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 30393–30400.
- Farzanehpour, M., Soleimanjahi, H., Hassan, Z. M., Amanzadeh, A., Ghaemi, A., & Fazeli, M. (2013). HSP70 modified response against HPV based tumor. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17, 228–234.
- Fischer, N., Haug, M., Kwok, W. W., et al. (2010). Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4+ memory T cells. *European Journal of Immunology*, 40, 986–997.
- Fleshner, M., & Johnson, J. D. (2005). Endogenous extra-cellular heat shock protein 72: Releasing signal(s) and function. *International Journal of Hyperthermia*, 21, 457–471.
- Floto, R. A., MacAry, P. A., Boname, J. M., et al. (2006). Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5. *Science*, 314, 454–458.
- Fong, J. J., Sreedhara, K., Deng, L., et al. (2015). Immunomodulatory activity of extracellular Hsp70 mediated via paired receptors Siglec-5 and Siglec-14. *The EMBO Journal*, 34, 2775–2788.
- Gao, B., & Tsan, M. F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 174–179.
- Gao, B., & Tsan, M. F. (2004). Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 1149–1154.
- Gao, J., Luo, S. M., Peng, M. L., & Deng, T. (2012). Enhanced immunity against hepatoma induced by dendritic cells pulsed with Hsp70-H22 peptide complexes and CD40L. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138, 917–926.
- Garcia-Vallejo, J. J., Unger, W. W., Kalay, H., & van Kooyk, Y. (2013). Glycan-based DC-SIGN targeting to enhance antigen cross-presentation in anticancer vaccines. *Oncoimmunology*, 2, e23040.
- Garrod, T., Grubor-Bauk, B., Yu, S., Gargett, T., & Gowans, E. J. (2014). Encoded novel forms of HSP70 or a cytolytic protein increase DNA vaccine potency. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10, 2679–2683.
- Gastpar, R., Gehrmann, M., Bausero, M. A., et al. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Research*, 65, 5238–5247.
- Ge, W., Hu, P. Z., Huang, Y., et al. (2009). The antitumor immune responses induced by nanoemulsion-encapsulated MAGE1-HSP70/SEA complex protein vaccine following different administration routes. *Oncology Reports*, 22, 915–920.
- Gehrmann, M., Cervello, M., Montalto, G., et al. (2014a). Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 5, 307.
- Gehrmann, M., Specht, H. M., Bayer, C., et al. (2014b). Hsp70 – A biomarker for tumor detection and monitoring of outcome of radiation therapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiation Oncology*, 9, 131.
- Gong, J., Zhu, B., Murshid, A., et al. (2009). T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. *Journal of Immunology*, 183, 3092–3098.
- Gong, J., Zhang, Y., Durfee, J., et al. (2010). A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. *Journal of Immunology*, 184, 488–496.

- Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispe, N., & Multhoff, G. (2003a). Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 41173–41181.
- Gross, C., Schmidt-Wolf, I. G., Nagaraj, S., et al. (2003b). Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress & Chaperones*, *8*, 348–360.
- Gross, C., Holler, E., Stangl, S., et al. (2008). An Hsp70 peptide initiates NK cell killing of leukemic blasts after stem cell transplantation. *Leukemia Research*, *32*, 527–534.
- Guo, F., Sigua, C., Bali, P., et al. (2005). Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl- mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*, *105*, 1246–1255.
- Hauet-Broere, F., Wieten, L., Guichelaar, T., Berlo, S., van der Zee, R., & Van Eden, W. (2006). Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *65*(Suppl 3), iii65–iii68.
- Haug, M., Schepp, C. P., Kalbacher, H., Dannecker, G. E., & Holzer, U. (2007). 70-kDa heat shock proteins: Specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments. *European Journal of Immunology*, *37*, 1053–1063.
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Current Opinion in Immunology*, *11*, 314–318.
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews. Immunology*, *1*, 126–134.
- Henson, P. M. (2017). Cell removal: Efferocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *33*, 127–144.
- Herz, J., & Strickland, D. K. (2001). LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, *108*, 779–784.
- Ishii, T., Udono, H., Yamano, T., et al. (1999). Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *Journal of Immunology*, *162*, 1303–1309.
- Jacquemin, C., Rambert, J., Guillet, S., et al. (2017). HSP70 potentiates interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells: Relevance for cutaneous lupus and vitiligo pathogenesis. *British Journal of Dermatology*, *177*(5), 1367–1375.
- Jaillon, S., Jeannin, P., Hamon, Y., et al. (2009). Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. *Cell Death and Differentiation*, *16*, 465–474.
- Jeannin, P., Jaillon, S., & Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*, *20*, 530–537.
- Jiang, J., Xie, D., Zhang, W., Xiao, G., & Wen, J. (2013). Fusion of Hsp70 to Mage-a1 enhances the potency of vaccine-specific immune responses. *Journal of Translational Medicine*, *11*, 300.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, *30*, 531–564.
- Karyampudi, L., & Ghosh, S. K. (2008). Mycobacterial HSP70 as an adjuvant in the design of an idiotypic vaccine against a murine lymphoma. *Cellular Immunology*, *254*, 74–80.
- Kimura, Y., Yamada, K., Sakai, T., et al. (1998). The regulatory role of heat shock protein 70- reactive CD4+ T cells during rat listeriosis. *International Immunology*, *10*, 117–130.
- Kropp, L. E., Garg, M., & Binder, R. J. (2010). Ovalbumin-derived precursor peptides are transferred sequentially from gp96 and calreticulin to MHC class I in the endoplasmic reticulum. *Journal of Immunology*, *184*, 5619–5627.
- Krupka, M., Zachova, K., Cahlikova, R., et al. (2015). Endotoxin-minimized HIV-1 p24 fused to murine hsp70 activates dendritic cells, facilitates endocytosis and p24-specific Th1 response in mice. *Immunology Letters*, *166*, 36–44.
- Kuppner, M. C., Gastpar, R., Gelwer, S., et al. (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *European Journal of Immunology*, *31*, 1602–1609.
- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005). Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 23349–23355.
- Lewis, D. J., Wang, Y., Huo, Z., et al. (2014). Effect of vaginal immunization with HIVgp140 and HSP70 on HIV-1 replication and innate and T cell adaptive immunity in women. *Journal of Virology*, *88*, 11648–11657.

- Li, H., Ou, X., & Xiong, J. (2007). Modified HPV16 E7/HSP70 DNA vaccine with high safety and enhanced cellular immunity represses murine lung metastatic tumors with downregulated expression of MHC class I molecules. *Gynecologic Oncology*, *104*, 564–571.
- Li, H., Yu, Y., Sun, L., et al. (2010). Vaccination with B16 tumor cell lysate plus recombinant Mycobacterium tuberculosis Hsp70 induces antimelanoma effect in mice. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, *25*, 185–191.
- Li, J., Xing, Y., Zhou, Z., et al. (2016). Microbial HSP70 peptide epitope 407-426 as adjuvant in tumor-derived autophagosome vaccine therapy of mouse lung cancer. *Tumour Biology*, *37*, 15097–15105.
- Liu, G., Yao, K., Wang, B., et al. (2009). Immunotherapy of Epstein-Barr virus associated malignancies using mycobacterial HSP70 and LMP2A356-364 epitope fusion protein. *Cellular & Molecular Immunology*, *6*, 423–431.
- Liu, G., Yao, K., Wang, B., et al. (2011). Reconstituted complexes of mycobacterial HSP70 and EBV LMP2A-derived peptides elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte responses and anti-tumor immunity. *Vaccine*, *29*, 7414–7423.
- Lopes, R. L., Borges, T. J., Araujo, J. F., et al. (2014). Extracellular mycobacterial DnaK polarizes macrophages to the M2-like phenotype. *PLoS One*, *9*, e113441.
- Lopes, R. L., Borges, T. J., Zanin, R. F., & Bonorino, C. (2016). IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). *Cytokine*, *85*, 123–129.
- MacAry, P. A., Javid, B., Floto, R. A., et al. (2004). HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation. *Immunity*, *20*, 95–106.
- Macauley, M. S., & Paulson, J. C. (2014). Siglecs induce tolerance to cell surface antigens by BIM- dependent deletion of the antigen-reactive B cells. *Journal of Immunology*, *193*, 4312–4321.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, *15*, 825–835.
- Mambula, S. S., & Calderwood, S. K. (2006a). Heat induced release of Hsp70 from prostate carcinoma cells involves both active secretion and passive release from necrotic cells. *International Journal of Hyperthermia*, *22*, 575–585.
- Mambula, S. S., & Calderwood, S. K. (2006b). Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *Journal of Immunology*, *177*, 7849–7857.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *14*, 399–416.
- Marotta, F., Koike, K., Lorenzetti, A., et al. (2007). Nutraceutical strategy in aging: Targeting heat shock protein and inflammatory profile through understanding interleukin-6 polymorphism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1119*, 196–202.
- Massa, C., Guiducci, C., Arioli, I., Parenza, M., Colombo, M. P., & Melani, C. (2004). Enhanced efficacy of tumor cell vaccines transfected with secretable hsp70. *Cancer Research*, *64*, 1502–1508.
- Massa, C., Melani, C., & Colombo, M. P. (2005). Chaperon and adjuvant activity of hsp70: Different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Research*, *65*, 7942–7949.
- Masse, D., Ebstein, F., Bougras, G., Harb, J., Meflah, K., & Gregoire, M. (2004). Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *International Journal of Cancer*, *111*, 575–583.
- Milani, V., Noessner, E., Ghose, S., et al. (2002). Heat shock protein 70: Role in antigen presentation and immune stimulation. *International Journal of Hyperthermia*, *18*, 563–575.
- Millar, D. G., Garza, K. M., Odermatt, B., et al. (2003). Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature Medicine*, *9*, 1469–1476.
- Mizukami, S., Kajiwara, C., Tanaka, M., Kaisho, T., & Udono, H. (2012). Differential MyD88/ IRAK4 requirements for cross-priming and tumor rejection induced by heat shock protein 70-model antigen fusion protein. *Cancer Science*, *103*, 851–859.
- Moroi, Y., Mayhew, M., Trcka, J., et al. (2000). Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 3485–3490.
- Moser, C., Schmidbauer, C., Gurtler, U., et al. (2002). Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide- activated, CD94 positive natural killer cells. *Cell Stress & Chaperones*, *7*, 365–373.

- Motta, A., Schmitz, C., Rodrigues, L., et al. (2007). Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin 10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology*, *121*, 462–472.
- Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, *43*, 229–237.
- Multhoff, G., & Hightower, L. E. (1996). Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress & Chaperones*, *1*, 167–176.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., et al. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer*, *61*, 272–279.
- Mycko, M. P., Cwiklinska, H., Szymanski, J., et al. (2004). Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *Journal of Immunology*, *172*, 202–213.
- Narni-Mancinelli, E., Ugolini, S., & Vivier, E. (2013). Tuning the threshold of natural killer cell responses. *Current Opinion in Immunology*, *25*, 53–58.
- Neyen, C., Mukhopadhyay, S., Gordon, S., & Hagemann, T. (2013a). An apolipoprotein A-I mimetic targets scavenger receptor A on tumor-associated macrophages: A prospective anticancer treatment? *Oncoimmunology*, *2*, e24461.
- Neyen, C., Pluddemann, A., Mukhopadhyay, S., et al. (2013b). Macrophage scavenger receptor a promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer. *Journal of Immunology*, *190*, 3798–3805.
- Noessner, E. (2006). Thermal stress-related modulation of tumor cell physiology and immune responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *55*, 289–291.
- Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., et al. (2002). Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *Journal of Immunology*, *169*, 5424–5432.
- Pakravan, N., Langroudi, L., Hajimoradi, M., & Hassan, Z. M. (2010). Co-administration of GP96 and Her2/neu DNA vaccine in a Her2 breast cancer model. *Cell Stress & Chaperones*, *15*, 977–984.
- Paliwal, P. K., Bansal, A., Sagi, S. S., & Sairam, M. (2011). Intraperitoneal immunization of recombinant HSP70 (DnaK) of Salmonella Typhi induces a predominant Th2 response and protective immunity in mice against lethal Salmonella infection. *Vaccine*, *29*, 6532–6539.
- Pawaria, S., & Binder, R. J. (2011). CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nature Communications*, *2*, 521.
- Pocchia, F., Piselli, P., Vendetti, S., et al. (1996). Heat-shock protein expression on the membrane of T cells undergoing apoptosis. *Immunology*, *88*, 6–12.
- Pockley, A. G., Henderson, B., & Multhoff, G. (2014). Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochemical Society Transactions*, *42*, 1744–1751.
- Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews. Immunology*, *14*, 166–180.
- Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J., & Kehry, M. R. (1999). CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 14246–14254.
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: Where do we stand? *Cell Stress & Chaperones*, *21*, 379–404.
- Radons, J., & Multhoff, G. (2005). Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exercise Immunology Review*, *11*, 17–33.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., et al. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biology*, *3*, 839–843.
- Redzovic, A., Gulic, T., Laskarin, G., Eminovic, S., Haller, H., & Rukavina, D. (2015). Heat-shock proteins 70 induce pro-inflammatory maturation program in decidual CD1a(+) dendritic cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, *74*, 38–53.
- Salimu, J., Spary, L. K., Al-Taei, S., et al. (2015). Cross-presentation of the oncofetal tumor antigen 5T4 from irradiated prostate cancer cells – A key role for heat-shock protein 70 and receptor CD91. *Cancer Immunology Research*, *3*, 678–688.

- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., et al. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, *386*, 73–77.
- Schwarz, F., Pearce, O. M., Wang, X., et al. (2015). Siglec receptors impact mammalian lifespan by modulating oxidative stress. *eLife*, *4*, e06184.
- SenGupta, D., Norris, P. J., Suscovich, T. J., et al. (2004). Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *Journal of Immunology*, *173*, 1987–1993.
- Shevtsov, M., & Multhoff, G. (2016). Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Frontiers in Immunology*, *7*, 171.
- Shevtsov, M. A., Pozdnyakov, A. V., Mikhrina, A. L., et al. (2014). Effective immunotherapy of rat glioblastoma with prolonged intratumoral delivery of exogenous heat shock protein Hsp70. *International Journal of Cancer*, *135*, 2118–2128.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., et al. (2000). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*, 1965–1974.
- Sondermann, H., Becker, T., Mayhew, M., Wieland, F., & Hartl, F. U. (2000). Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes. *Biological Chemistry*, *381*, 1165–1174.
- Srivastava, P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual Review of Immunology*, *20*, 395–425.
- Srivastava, P. K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R. J., & McQuade, K. L. (1998). Heat shock proteins come of age: Primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity*, *8*, 657–665.
- Stocki, P., & Dickinson, A. M. (2012). The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Diseases*, *2012*, 617213.
- Stocki, P., Morris, N. J., Preisinger, C., et al. (2010). Identification of potential HLA class I and class II epitope precursors associated with heat shock protein 70 (HSPA). *Cell Stress & Chaperones*, *15*, 729–741.
- Stocki, P., Wang, X. N., Morris, N. J., & Dickinson, A. M. (2011). HSP70 natively and specifically associates with an N-terminal dermcidin-derived peptide that contains an HLA-A*03 antigenic epitope. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*, 12803–12811.
- Suto, R., & Srivastava, P. K. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, *269*, 1585–1588.
- Suzue, K., & Young, R. A. (1996). Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *Journal of Immunology*, *156*, 873–879.
- Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M., & Srivastava, P. K. (1997). Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*, *278*, 117–120.
- Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., et al. (2003). FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 12613–12617.
- Theriault, J. R., Mambula, S. S., Sawamura, T., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2005). Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Letters*, *579*, 1951–1960.
- Theriault, J. R., Adachi, H., & Calderwood, S. K. (2006). Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *Journal of Immunology*, *177*, 8604–8611.
- Tobian, A. A., Canaday, D. H., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2004a). Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *Journal of Immunology*, *172*, 5277–5286.
- Tobian, A. A., Canaday, D. H., & Harding, C. V. (2004b). Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, *173*, 5130–5137.
- Todryk, S., Melcher, A. A., Hardwick, N., et al. (1999). Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *Journal of Immunology*, *163*, 1398–1408.
- Toomey, D., Conroy, H., Jarnicki, A. G., Higgins, S. C., Sutton, C., & Mills, K. H. (2008). Therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor-derived Hsp70 and a COX-2 inhibitor induces protective immunity against B16 melanoma. *Vaccine*, *26*, 3540–3549.

- Tsan, M. F., & Gao, B. (2004). Heat shock protein and innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *1*, 274–279.
- Udono, H., & Srivastava, P. K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *178*, 1391–1396.
- Udono, H., Levey, D. L., & Srivastava, P. K. (1994). Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: Tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*, 3077–3081.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., & Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 15107–15112.
- van Eden, W., van der Zee, R., Taams, L. S., Prakken, A. B., van Roon, J., & Wauben, M. H. (1998). Heat-shock protein T-cell epitopes trigger a spreading regulatory control in a diversified arthritogenic T-cell response. *Immunological Reviews*, *164*, 169–174.
- van Eden, W., van der Zee, R., & Prakken, B. (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *5*, 318–330. van Eden, W., Spiering, R., Broere, F., & van der Zee, R. (2012). A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs. *Cell Stress & Chaperones*, *17*, 281–292.
- Verma, S. K., Batra, L., & Tuteja, U. (2016). A recombinant trivalent fusion protein F1-LcrV- HSP70(II) augments humoral and cellular immune responses and imparts full protection against *Yersinia pestis*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1053.
- Vinokurov, M., Ostrov, V., Yurinskaya, M., et al. (2012). Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal levels. *Cell Stress & Chaperones*, *17*, 89–101.
- Vulpis, E., Cecere, F., Molfetta, R., et al. (2017). Genotoxic stress modulates the release of exosomes from multiple myeloma cells capable of activating NK cell cytokine production: Role of HSP70/TLR2/NF- κ B axis. *Oncoimmunology*, *6*, e1279372.
- Wachstein, J., Tischer, S., Figueiredo, C., et al. (2012). HSP70 enhances immunosuppressive function of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T regulatory cells and cytotoxicity in CD4(+)CD25(-) T cells. *PLoS One*, *7*, e51747.
- Wan, T., Zhou, X., Chen, G., et al. (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood*, *103*, 1747–1754.
- Wang, Y., Kelly, C. G., Karttunen, J. T., et al. (2001). CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity*, *15*, 971–983.
- Wang, Y., Kelly, C. G., Singh, M., et al. (2002). Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *Journal of Immunology*, *169*, 2422–2429.
- Wang, R., Kovalchin, J. T., Muhlenkamp, P., & Chandawarkar, R. Y. (2006). Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. *Blood*, *107*, 1636–1642.
- Wang, Y., Seidl, T., Whittall, T., Babaahmady, K., & Lehner, T. (2010). Stress-activated dendritic cells interact with CD4+ T cells to elicit homeostatic memory. *European Journal of Immunology*, *40*, 1628–1638.
- Wang, H., Feng, F., Wang, X. P., et al. (2016). Dendritic cells pulsed with Hsp70 and HBxAg induce specific antitumor immune responses in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, *13*, 1077–1082.
- Wassenberg, J. J., Dezfulian, C., & Nicchitta, C. V. (1999). Receptor mediated and fluid phase pathways for internalization of the ER Hsp90 chaperone GRP94 in murine macrophages. *Journal of Cell Science*, *112*(Pt 13), 2167–2175.
- Wei, Y., Xu, Y., Han, X., et al. (2013). Anti-cancer effects of dioscin on three kinds of human lung cancer cell lines through inducing DNA damage and activating mitochondrial signal pathway. *Food and Chemical Toxicology*, *59*, 118–128.
- Wendling, U., Paul, L., van der Zee, R., Prakken, B., Singh, M., & van Eden, W. (2000). A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *Journal of Immunology*, *164*, 2711–2717.
- Wu, Y., Wan, T., Zhou, X., et al. (2005). Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8+ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Research*, *65*, 4947–4954.
- Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., & Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: Roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *54*, 628–640.
- Yang, X., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, S., & Zhang, W. (2012). Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Letters*, *321*, 137–143.

- Yang, Z., Zhuang, L., Szatmary, P., et al. (2015). Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, *12*, 256–263.
- Yewdell, J. W., Norbury, C. C., & Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: Implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Advances in Immunology*, *73*, 1–77.
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Immunology*, *7*, 41–51.
- Yu, X., Guo, C., Fisher, P. B., Subjeck, J. R., & Wang, X. Y. (2015). Scavenger receptors: Emerging roles in cancer biology and immunology. *Advances in Cancer Research*, *128*, 309–364.
- Yuan, J., Kashiwagi, S., Reeves, P., et al. (2014). A novel mycobacterial Hsp70-containing fusion protein targeting mesothelin augments antitumor immunity and prolongs survival in murine models of ovarian cancer and mesothelioma. *Journal of Hematology & Oncology*, *7*, 15.
- Yurinskaya, M. M., Vinokurov, M. G., Zatssepina, O. G., et al. (2009). Exogenous heat shock proteins (HSP70) significantly inhibit endotoxin-induced activation of human neutrophils. *Doklady Biological Sciences*, *426*, 298–301.
- Zhang, H., & Huang, W. (2006). Fusion proteins of Hsp70 with tumor-associated antigen acting as a potent tumor vaccine and the C-terminal peptide-binding domain of Hsp70 being essential in inducing antigen-independent anti-tumor response in vivo. *Cell Stress & Chaperones*, *11*, 216–226.
- Zhang, X., Yu, C., Zhao, J., et al. (2007). Vaccination with a DNA vaccine based on human PSCA and HSP70 adjuvant enhances the antigen-specific CD8+ T-cell response and inhibits the PSCA+ tumors growth in mice. *The Journal of Gene Medicine*, *9*, 715–726.
- Zhang, H., Zhang, W., Sun, X., et al. (2016). Class A1 scavenger receptor modulates glioma progression by regulating M2-like tumor-associated macrophage polarization. *Oncotarget*, *7*, 50099–50116.
- Zong, J., Peng, Q., Wang, Q., Zhang, T., Fan, D., & Xu, X. (2009). Human HSP70 and modified HPV16 E7 fusion DNA vaccine induces enhanced specific CD8+ T cell responses and anti-tumor effects. *Oncology Reports*, *22*, 953–961.
- Zong, J., Wang, C., Wang, Q., et al. (2013). HSP70 and modified HPV 16 E7 fusion gene without the addition of a signal peptide gene sequence as a candidate therapeutic tumor vaccine. *Oncology Reports*, *30*, 3020–3026.

7 Références bibliographiques

Abe, T., Harashima, A., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Morales, A., Ahn, J., Gutman, D., and Barber, G.N. (2013). STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell* 50, 5-15.

Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10, 1065-1072.

Ablasser, A., Poeck, H., Anz, D., Berger, M., Schlee, M., Kim, S., Bourquin, C., Goutagny, N., Jiang, Z., Fitzgerald, K.A., *et al.* (2009). Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol* 182, 6824-6833.

Ablasser, A., Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E., and Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* 503, 530-534.

Adachi, H., and Tsujimoto, M. (2002). FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J Biol Chem* 277, 34264-34270.

Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H.G., and Gudmundsson, G.H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 195-199.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319-325.

Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M., *et al.* (2000). Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 172-177.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.

Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., and Ting, J.P. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30, 556-565.

Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A.L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 76, 6841-6844.

Andersen, O., Vilsgaard Ravn, K., Juul Sorensen, I., Jonson, G., Holm Nielsen, E., and Svehag, S.E. (1997). Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection in vitro. *Scand J Immunol* 46, 331-337.

- Aoyagi, Y., Adderson, E.E., Rubens, C.E., Bohnsack, J.F., Min, J.G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y., and Takahashi, S. (2008). L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect Immun* 76, 179-188.
- Ashwell, G., and Steer, C.J. (1981). Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *JAMA* 246, 2358-2364.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.
- Bao, A., Che, K.F., Bozinovski, S., Ji, J., Gregory, J.A., Kumlien Georen, S., Adner, M., Cardell, L.O., and Linden, A. (2017). Recombinant human IL-26 facilitates the innate immune response to endotoxin in the bronchoalveolar space of mice in vivo. *PLoS One* 12, e0188909.
- Bao, J., Lv, Z., and Wang, S. (2018). Anti-angiogenic effect of Interleukin-26 in oxygen-induced retinopathy mice via inhibiting NFATc1-VEGF pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 499, 849-855.
- Barlow, P.G., Li, Y., Wilkinson, T.S., Bowdish, D.M., Lau, Y.E., Cosseau, C., Haslett, C., Simpson, A.J., Hancock, R.E., and Davidson, D.J. (2006). The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 80, 509-520.
- Benne, C.A., Kraaijeveld, C.A., van Strijp, J.A., Brouwer, E., Harmsen, M., Verhoef, J., van Golde, L.M., and van Iwaarden, J.F. (1995). Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis* 171, 335-341.
- Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B., and Soderlund, J. (2007). The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res* 5, 410-415.
- Bijl, M., Bootsma, H., Van Der Geld, Y., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Van Rijswijk, M.H. (2004). Serum amyloid P component levels are not decreased in patients with systemic lupus erythematosus and do not rise during an acute phase reaction. *Ann Rheum Dis* 63, 831-835.
- Biswas, A., Meissner, T.B., Kawai, T., and Kobayashi, K.S. (2012). Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlr5/class I transactivator. *J Immunol* 189, 516-520.
- Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2010). An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* 28, 157-183.
- Bottazzi, B., Vouret-Craviari, V., Bastone, A., De Gioia, L., Matteucci, C., Peri, G., Spreafico, F., Pausa, M., D'Ettoire, C., Gianazza, E., *et al.* (1997). Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 272, 32817-32823.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., and Walport, M.J. (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19, 56-59.
- Braum, O., Klages, M., and Fickenscher, H. (2013). The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. *PLoS One* 8, e70281.

- Braum, O., Pirzer, H., and Fickenscher, H. (2012). Interleukin-26, a highly cationic T-cell cytokine targeting epithelial cells. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* *11*, 221-229.
- Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., Fujita, T., Hiscott, J., and Meurs, E.F. (2005). Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* *79*, 3969-3978.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* *3*, 238-250.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D.H., and Stuart, D.I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* *410*, 235-240.
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* *167*, 416-423.
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* *13*, 621-634.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* *68*, 7010-7017.
- Che, K.F., Kaarteenaho, R., Lappi-Blanco, E., Levanen, B., Sun, J., Wheelock, A., Palmberg, L., Skold, C.M., and Linden, A. (2017). Interleukin-26 Production in Human Primary Bronchial Epithelial Cells in Response to Viral Stimulation: Modulation by Th17 cytokines. *Mol Med* *23*.
- Che, K.F., Tengvall, S., Levanen, B., Silverpil, E., Smith, M.E., Awad, M., Vikstrom, M., Palmberg, L., Qvarfordt, I., Skold, M., *et al.* (2014). Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization. *Am J Respir Crit Care Med* *190*, 1022-1031.
- Che, K.F., Tufvesson, E., Tengvall, S., Lappi-Blanco, E., Kaarteenaho, R., Levanen, B., Ekberg, M., Brauner, A., Wheelock, A.M., Bjermer, L., *et al.* (2018). The neutrophil-mobilizing cytokine interleukin-26 in the airways of long-term tobacco smokers. *Clin Sci (Lond)* *132*, 959-983.
- Chen, X., Takai, T., Xie, Y., Niyonsaba, F., Okumura, K., and Ogawa, H. (2013). Human antimicrobial peptide LL-37 modulates pro-inflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *433*, 532-537.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359-362.
- Chow, J., Franz, K.M., and Kagan, J.C. (2015). PRRs are watching you: Localization of innate sensing and signaling regulators. *Virology* *479-480*, 104-109.
- Clark, H., and Reid, K. (2003). The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema. *Arch Dis Child* *88*, 981-984.
- Cole, A.M., Kim, Y.H., Tahk, S., Hong, T., Weis, P., Waring, A.J., and Ganz, T. (2001). Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. *FEBS Lett* *504*, 5-10.

- Collaborators, T.P.O.H. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2, 161-176.
- Collins, P.L., Henderson, M.A., and Aune, T.M. (2012). Lineage-specific adjacent IFNG and IL26 genes share a common distal enhancer element. *Genes Immun* 13, 481-488.
- Cols, M., Rahman, A., Maglione, P.J., Garcia-Carmona, Y., Simchoni, N., Ko, H.M., Radigan, L., Cerutti, A., Blankenship, D., Pascual, V., *et al.* (2016). Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 137, 1206-1215 e1206.
- Constantin, D., Brotons, G., Jarre, A., Li, C., and Salditt, T. (2007). Interaction of alamethicin pores in DMPC bilayers. *Biophys J* 92, 3978-3987.
- Corrales, L., Woo, S.R., Williams, J.B., McWhirter, S.M., Dubensky, T.W., Jr., and Gajewski, T.F. (2016). Antagonism of the STING Pathway via Activation of the AIM2 Inflammasome by Intracellular DNA. *J Immunol* 196, 3191-3198.
- Corvaisier, M., Delneste, Y., Jeanvoine, H., Preisser, L., Blanchard, S., Garo, E., Hoppe, E., Barre, B., Audran, M., Bouvard, B., *et al.* (2012). IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces pro-inflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol* 10, e1001395.
- Cowland, J.B., Johnsen, A.H., and Borregaard, N. (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368, 173-176.
- Crouch, E., Persson, A., Chang, D., and Heuser, J. (1994). Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J Biol Chem* 269, 17311-17319.
- Cywes, C., and Wessels, M.R. (2001). Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* 414, 648-652.
- da Silva, R.P., and Gordon, S. (1999). Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrofialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J* 338 (Pt 3), 687-694.
- Daigo, K., Inforzato, A., Barajon, I., Garlanda, C., Bottazzi, B., Meri, S., and Mantovani, A. (2016). Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. *Immunol Rev* 274, 202-217.
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., De Toni, E.N., Goke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., and Brand, S. (2009). The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58, 1207-1217.
- de Weerd, N.A., Samarajiwa, S.A., and Hertzog, P.J. (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 282, 20053-20057.
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., and Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192, 1069-1074.
- Diaz, M.O., Pomykala, H.M., Bohlander, S.K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B., and Olopade, O.I. (1994). Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 22, 540-552.

- Dieckmann, M., Dietrich, M.F., and Herz, J. (2010). Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem* 391, 1341-1363.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., *et al.* (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928.
- Dini, L., Autuori, F., Lentini, A., Oliverio, S., and Piacentini, M. (1992). The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor. *FEBS Lett* 296, 174-178.
- Diniz, S.N., Nomizo, R., Cisalpino, P.S., Teixeira, M.M., Brown, G.D., Mantovani, A., Gordon, S., Reis, L.F., and Dias, A.A. (2004). PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol* 75, 649-656.
- Dolganovic, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D.T., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E., and Szabo, G. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 127, 1513-1524.
- Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Bonville, C.A., and Rosenberg, H.F. (1998). Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 177, 1458-1464.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674-677.
- Downey, J., Pernet, E., Coulombe, F., Allard, B., Meunier, I., Jaworska, J., Qureshi, S., Vinh, D.C., Martin, J.G., Joubert, P., *et al.* (2017). RIPK3 interacts with MAVS to regulate type I IFN-mediated immunity to Influenza A virus infection. *PLoS Pathog* 13, e1006326.
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R., *et al.* (2002). IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17, 251-263.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263, 9557-9560.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76, 5974-5984.
- Fabriek, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., Ligtenberg, A.J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R.P., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113, 887-892.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J.C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 25, 713-724.
- Ferguson, B.J., Mansur, D.S., Peters, N.E., Ren, H., and Smith, G.L. (2012). DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife* 1, e00047.

- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *The royal society* 93, 306-317.
- Fogelman, A.M., Haberland, M.E., Seager, J., Hokom, M., and Edwards, P.A. (1981). Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J Lipid Res* 22, 1131-1141.
- Frankenberger, M., Schwaeble, W., and Ziegler-Heitbrock, L. (2008). Expression of M-Ficolin in human monocytes and macrophages. *Mol Immunol* 45, 1424-1430.
- Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76, 5326-5338.
- Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8555-8559.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 206, 1983-1994.
- Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502-506.
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., and Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 23, 337-366.
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., *et al.* (2002). Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420, 182-186.
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F.V. (2010). Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* 84, 10999-11009.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 11479-11488.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., *et al.* (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399-401.
- Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197, 7-17.
- Gilliet, M., and Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20, 401-407.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.

Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872.

Glaser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6, 57-64.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.

Goris, A., Marrosu, M.G., and Vandembroek, K. (2001). Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15). *Genes Immun* 2, 284-286.

Gowen, B.B., Borg, T.K., Ghaffar, A., and Mayer, E.P. (2001). The collagenous domain of class A scavenger receptors is involved in macrophage adhesion to collagens. *J Leukoc Biol* 69, 575-582.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Griebel, P., Mutwiri, G., and Singh, B. (2011). Innate immunity: complex specificity. *Cell Tissue Res* 343, 1-4.

Gringhuis, S.I., Wevers, B.A., Kaptein, T.M., van Capel, T.M., Theelen, B., Boekhout, T., de Jong, E.C., and Geijtenbeek, T.B. (2011). Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. *PLoS Pathog* 7, e1001259.

Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., and Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 238, 325-332.

Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O., and Sambhara, S. (2007). NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 263-269.

Hamann, K.J., Gleich, G.J., Checkel, J.L., Loegering, D.A., McCall, J.W., and Barker, R.L. (1990). In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol* 144, 3166-3173.

Hansen, S., Holm, D., Moeller, V., Vitved, L., Bendixen, C., Skjoedt, K., and Holmskov, U. (2003). Genomic and molecular characterization of CL-43 and its proximal promoter. *Biochim Biophys Acta* 1625, 1-10.

Hansen, S.W., Ohtani, K., Roy, N., and Wakamiya, N. (2016). The collectins CL-L1, CL-K1 and CL-P1, and their roles in complement and innate immunity. *Immunobiology* 221, 1058-1067.

- Hardison, S.E., and Brown, G.D. (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* *13*, 817-822.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Heftdal, L.D., Andersen, T., Jaehger, D., Woetmann, A., Ostgard, R., Kenngott, E.E., Syrbe, U., Sieper, J., Hvid, M., Deleuran, B., *et al.* (2017). Synovial cell production of IL-26 induces bone mineralization in spondyloarthritis. *J Mol Med (Berl)* *95*, 779-787.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Heim, M.H., and Thimme, R. (2014). Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol* *61*, S14-25.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Henzler-Wildman, K.A., Martinez, G.V., Brown, M.F., and Ramamoorthy, A. (2004). Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* *43*, 8459-8469.
- Hoffmann, H.H., Schneider, W.M., and Rice, C.M. (2015). Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol* *36*, 124-138.
- Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B., and Jensenius, J.C. (1994). Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* *15*, 67-74.
- Holness, C.L., da Silva, R.P., Fawcett, J., Gordon, S., and Simmons, D.L. (1993). Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp family. *J Biol Chem* *268*, 9661-9666.
- Holness, C.L., and Simmons, D.L. (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* *81*, 1607-1613.
- Honore, C., Hummelshoj, T., Hansen, B.E., Madsen, H.O., Eggleton, P., and Garred, P. (2007). The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* *56*, 1598-1607.
- Hor, S., Pirzer, H., Dumoutier, L., Bauer, F., Wittmann, S., Sticht, H., Renaud, J.C., de Waal Malefyt, R., and Fickenscher, H. (2004). The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* *279*, 33343-33351.
- Horner, S.M., and Gale, M., Jr. (2009). Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res* *29*, 489-498.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994-997.

- Hovanessian, A.G. (1989). The double stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon: dsRNA-PK. *J Interferon Res* 9, 641-647.
- Hurtado, P., and Peh, C.A. (2010). LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 184, 1425-1435.
- Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* 283, 16693-16701.
- Ichijo, H., Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, L.J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1993). Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J Biol Chem* 268, 14505-14513.
- Ifrim, D.C., Bain, J.M., Reid, D.M., Oosting, M., Verschuere, I., Gow, N.A., van Krieken, J.H., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Joosten, L.A., *et al.* (2014). Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. *Infect Immun* 82, 1064-1073.
- Ikushima, H., Negishi, H., and Taniguchi, T. (2013). The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 78, 105-116.
- Inforzato, A., Riviello, V., Morreale, A.P., Bastone, A., Salustri, A., Scarchilli, L., Verdoliva, A., Vincenti, S., Gallo, G., Chiapparino, C., *et al.* (2008). Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. *J Biol Chem* 283, 10147-10161.
- Iram, T., Ramirez-Ortiz, Z., Byrne, M.H., Coleman, U.A., Kingery, N.D., Means, T.K., Frenkel, D., and El Khoury, J. (2016). Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic Cells by Astrocytes. *J Neurosci* 36, 5185-5192.
- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. (2009). Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 206, 2879-2888.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.
- Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788-792.
- Jabbari, K., and Bernardi, G. (2004). Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene* 333, 143-149.
- Jacobs, T., and Leippe, M. (1995). Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *Eur J Biochem* 231, 831-838.
- Jaillon, S., Jeannin, P., Hamon, Y., Fremaux, I., Doni, A., Bottazzi, B., Blanchard, S., Subra, J.F., Chevailler, A., Mantovani, A., *et al.* (2009). Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. *Cell Death Differ* 16, 465-474.

Jaillon, S., Mancuso, G., Hamon, Y., Beauvillain, C., Cotici, V., Midiri, A., Bottazzi, B., Nebuloni, M., Garlanda, C., Fremaux, I., *et al.* (2013). Prototypic long pentraxin PTX3 is present in breast milk, spreads in tissues, and protects neonate mice from *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Immunol* *191*, 1873-1882.

Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Fremaux, I., Doni, A., Moalli, F., Garlanda, C., Romani, L., Gascan, H., Bellocchio, S., *et al.* (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* *204*, 793-804.

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *54 Pt 1*, 1-13.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 3388-3393.

Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J.F., Hoeffel, G., *et al.* (2005). Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* *22*, 551-560.

Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K.E., and Platt, N. (2006). Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem* *281*, 11834-11845.

Kaabachi, W., Bouali, E., Berraies, A., Dhifallah, I.B., Hamdi, B., Hamzaoui, K., and Hamzaoui, A. (2017). Interleukin-26 is overexpressed in Behcet's disease and enhances Th17 related -cytokines. *Immunol Lett* *190*, 177-184.

Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., and Fisher, P.B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 637-642.

Kaplan, A., Lee, M.W., Wolf, A.J., Limon, J.J., Becker, C.A., Ding, M., Murali, R., Lee, E.Y., Liu, G.Y., Wong, G.C.L., *et al.* (2017). Direct Antimicrobial Activity of IFN β . *J Immunol* *198*, 4036-4045.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* *205*, 1601-1610.

Kawana, H., Karaki, H., Higashi, M., Miyazaki, M., Hilberg, F., Kitagawa, M., and Harigaya, K. (2008). CD44 suppresses TLR-mediated inflammation. *J Immunol* *180*, 4235-4245.

Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., and Nishijima, M. (2000). Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* *275*, 2251-2254.

Kim, Y.K., Shin, J.S., and Nahm, M.H. (2016). NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J* *57*, 5-14.

- Knappe, A., Hor, S., Wittmann, S., and Fickenscher, H. (2000). Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol* 74, 3881-3887.
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P., and Kurt-Jones, E.A. (2000). Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164, 13-17.
- Konradsen, J.R., Nordlund, B., Levanen, B., Hedlin, G., and Linden, A. (2016). The cytokine interleukin-26 as a biomarker in pediatric asthma. *Respir Res* 17, 32.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.
- Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480, 147-150.
- Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 8, 275-280.
- Krijgsveld, J., Zaat, S.A., Meeldijk, J., van Veelen, P.A., Fang, G., Poolman, B., Brandt, E., Ehlert, J.E., Kuijpers, A.J., Engbers, G.H., *et al.* (2000). Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 275, 20374-20381.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.
- Kumar, D.K., Choi, S.H., Washicosky, K.J., Eimer, W.A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L.E., Tanzi, R.E., *et al.* (2016). Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 8, 340ra372.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., *et al.* (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.
- Lai, Y., Adhikarakunnathu, S., Bhardwaj, K., Ranjith-Kumar, C.T., Wen, Y., Jordan, J.L., Wu, L.H., Dragnea, B., San Mateo, L., and Kao, C.C. (2011). LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One* 6, e26632.
- Lande, R., Chamilos, G., Ganguly, D., Demaria, O., Frasca, L., Durr, S., Conrad, C., Schroder, J., and Gilliet, M. (2015). Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur J Immunol* 45, 203-213.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., *et al.* (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-569.
- Larrick, J.W., Hirata, M., Balint, R.F., Lee, J., Zhong, J., and Wright, S.C. (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63, 1291-1297.

- Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2007). Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol* *178*, 3368-3372.
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* *416*, 603-607.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* *304*, 93-96.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T., and Selsted, M.E. (1989). Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* *84*, 553-561.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N.V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., Garcia-Sastre, A., *et al.* (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 1371-1376.
- Leth-Larsen, R., Zhong, F., Chow, V.T., Holmskov, U., and Lu, J. (2007). The SARS coronavirus spike glycoprotein is selectively recognized by lung surfactant protein D and activates macrophages. *Immunobiology* *212*, 201-211.
- Li, J., and Schmidt, A.M. (1997). Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* *272*, 16498-16506.
- Li, J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Qiu, A., Viltard, M., Leete, T., Drexler, I.R., Chen, X., Sanna-Cherchi, S., Mohammed, F., *et al.* (2009). Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell* *16*, 35-46.
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr., and Lemon, S.M. (2005). Distinct poly(I:C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* *280*, 16739-16747.
- Li, P., Chan, H.C., He, B., So, S.C., Chung, Y.W., Shang, Q., Zhang, Y.D., and Zhang, Y.L. (2001). An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* *291*, 1783-1785.
- Li, X., Ranjith-Kumar, C.T., Brooks, M.T., Dharmiah, S., Herr, A.B., Kao, C., and Li, P. (2009). The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *J Biol Chem* *284*, 13881-13891.
- Linde, C.M., Grundstrom, S., Nordling, E., Refai, E., Brennan, P.J., and Andersson, M. (2005). Conserved structure and function in the granulysin and NK-lysin peptide family. *Infect Immun* *73*, 6332-6339.
- Liu, Z., Lu, H., Jiang, Z., Pastuszyn, A., and Hu, C.A. (2005). Apolipoprotein I6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Res* *3*, 21-31.

- Loeb, J.A., and Drickamer, K. (1988). Conformational changes in the chicken receptor for endocytosis of glycoproteins. Modulation of ligand-binding activity by Ca²⁺ and pH. *J Biol Chem* 263, 9752-9760.
- Loo, Y.M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., *et al.* (2006). Viral and therapeutic control of IFN β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6001-6006.
- Loos, M., Martin, H., and Petry, F. (1989). The biosynthesis of C1q, the collagen-like and Fc-recognizing molecule of the complement system. *Behring Inst Mitt*, 32-41.
- Lopalco, G., Lucherini, O.M., Lopalco, A., Venerito, V., Fabiani, C., Frediani, B., Galeazzi, M., Lapadula, G., Cantarini, L., and Iannone, F. (2017). Cytokine Signatures in Mucocutaneous and Ocular Behcet's Disease. *Front Immunol* 8, 200.
- Lopez-Garcia, B., Lee, P.H., Yamasaki, K., and Gallo, R.L. (2005). Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J Invest Dermatol* 125, 108-115.
- Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D.A. (1990). Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 5, 1095-1097.
- Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M.H. (2000). Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 275, 10745-10753.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603.
- Lutfalla, G., Roeckel, N., Mogensen, K.E., Mattei, M.G., and Uze, G. (1990). Assignment of the human interferon-alpha receptor gene to chromosome 21q22.1 by in situ hybridization. *J Interferon Res* 10, 515-517.
- Lutfalla, G., Roest Crollius, H., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K., and Monneron, D. (2003). Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4, 29.
- MacQuillan, G.C., Mamotte, C., Reed, W.D., Jeffrey, G.P., and Allan, J.E. (2003). Upregulation of endogenous intrahepatic interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 70, 219-227.
- Manns, M.P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.M., Razavi, H., Terrault, N., and Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17006.
- Marsche, G., Weigle, B., Sattler, W., and Malle, E. (2007). Soluble RAGE blocks scavenger receptor CD36-mediated uptake of hypochlorite-modified low-density lipoprotein. *FASEB J* 21, 3075-3082.
- Marshall, A.S., Willment, J.A., Lin, H.H., Williams, D.L., Gordon, S., and Brown, G.D. (2004). Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *J Biol Chem* 279, 14792-14802.

- Martinon, F., Hofmann, K., and Tschopp, J. (2001). The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* *11*, R118-120.
- Matsumura, T., Sugiyama, N., Murayama, A., Yamada, N., Shiina, M., Asabe, S., Wakita, T., Imawari, M., and Kato, T. (2016). Antimicrobial peptide LL-37 attenuates infection of hepatitis C virus. *Hepatol Res* *46*, 924-932.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.
- McRae, S., Iqbal, J., Sarkar-Dutta, M., Lane, S., Nagaraj, A., Ali, N., and Waris, G. (2016). The Hepatitis C Virus-induced NLRP3 Inflammasome Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) and Regulates Lipid Metabolism. *J Biol Chem* *291*, 3254-3267.
- McVicker, B.L., Thiele, G.M., Casey, C.A., Osna, N.A., and Tuma, D.J. (2013). Susceptibility to T cell-mediated liver injury is enhanced in asialoglycoprotein receptor-deficient mice. *Int Immunopharmacol* *16*, 17-26.
- Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* *30*, 766-775.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* *91*, 295-298.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K.S., Friedrich, H.C., Chamilos, G., Ganguly, D., Conrad, C., Gregorio, J., Le Roy, D., Roger, T., *et al.* (2015). T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol* *16*, 970-979.
- Mellow, T.E., Halberg, D., and Drickamer, K. (1988). Endocytosis of N-acetylglucosamine-containing glycoproteins by rat fibroblasts expressing a single species of chicken liver glycoprotein receptor. *J Biol Chem* *263*, 5468-5473.
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M., and Ganz, T. (1992). Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol* *51*, 634-639.
- Mietus-Snyder, M., Frieria, A., Glass, C.K., and Pitas, R.E. (1997). Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *17*, 969-978.
- Miot, C., Beaumont, E., Duluc, D., Le Guillou-Guillemette, H., Preisser, L., Garo, E., Blanchard, S., Hubert Fouchard, I., Creminon, C., Lamourette, P., *et al.* (2015). IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* *64*, 1466-1475.
- Miyazaki, Y., Hijikata, M., Yamaji, M., Hosaka, M., Takahashi, H., and Shimotohno, K. (2003). Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* *278*, 50301-50308.

Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., Bagga, R., Kircheisen, R., Ao, A., Ratti, B., *et al.* (2006). Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 38, 300-302.

Nakagawa, Y., and Gallo, R.L. (2015). Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 194, 1274-1284.

Nauta, A.J., Daha, M.R., van Kooten, C., and Roos, A. (2003). Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol* 24, 148-154.

Nishiya, T., and DeFranco, A.L. (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 279, 19008-19017.

Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., and Tabata, S. (1994). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1, 27-35.

Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194, 781-795.

Ohnuma, K., Hatano, R., Aune, T.M., Otsuka, H., Iwata, S., Dang, N.H., Yamada, T., and Morimoto, C. (2015). Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 194, 3697-3712.

Ohnuma, K., Hatano, R., Itoh, T., Iwao, N., Dang, N.H., and Morimoto, C. (2016). Role of IL-26+CD26+CD4 T Cells in Pulmonary Chronic Graft-Versus-Host Disease and Treatment with Caveolin-1-Ig Fc Conjugate. *Crit Rev Immunol* 36, 239-267.

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., *et al.* (2001). The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 44222-44228.

Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., and Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9535-9540.

Oudhoff, M.J., Blaauboer, M.E., Nazmi, K., Scheres, N., Bolscher, J.G., and Veerman, E.C. (2010). The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Biol Chem* 391, 541-548.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.

Park, S.Y., Jung, M.Y., Kim, H.J., Lee, S.J., Kim, S.Y., Lee, B.H., Kwon, T.H., Park, R.W., and Kim, I.S. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* 15, 192-201.

- Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R.M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S.S., Zaver, S.A., Schenk, M., Zeng, S., Zhong, W., *et al.* (2012). The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol* *13*, 1155-1161.
- Peng, Y., Akmentin, W., Connelly, M.A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell* *15*, 384-396.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997-1001.
- Pinheiro da Silva, F.M., MC. (2017). The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunology letters*.
- Poli, C., Augusto, J.F., Dauve, J., Adam, C., Preisser, L., Larochette, V., Pignon, P., Savina, A., Blanchard, S., Subra, J.F., *et al.* (2017). IL-26 Confers Pro-inflammatory Properties to Extracellular DNA. *J Immunol* *198*, 3650-3661.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085-2088.
- Poranen, M.M., Koivunen, M.R., and Bamford, D.H. (2008). Nontemplated terminal nucleotidyltransferase activity of double-stranded RNA bacteriophage phi6 RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* *82*, 9254-9264.
- PrabhuDas, M.R., Baldwin, C.L., Bollyky, P.L., Bowdish, D.M.E., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., *et al.* (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol* *198*, 3775-3789.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mummy, A., Kohaar, I., *et al.* (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* *45*, 164-171.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R.A. (2001). Drosophila scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* *15*, 1027-1038.
- Ramirez-Ortiz, Z.G., Pendergraft, W.F., 3rd, Prasad, A., Byrne, M.H., Iram, T., Blanchette, C.J., Luster, A.D., Hacohen, N., El Khoury, J., and Means, T.K. (2013). The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* *14*, 917-926.
- Ramprasad, M.P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., and Steinberg, D. (1996). Cell surface expression of mouse macrophage mannose receptor and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 14833-14838.
- Reading, P.C., Bozza, S., Gilbertson, B., Tate, M., Moretti, S., Job, E.R., Crouch, E.C., Brooks, A.G., Brown, L.E., Bottazzi, B., *et al.* (2008). Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol* *180*, 3391-3398.

- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* *181*, 1857-1862.
- Renedo, M., Arce, I., Rodriguez, A., Carretero, M., Lanier, L.L., Lopez-Botet, M., and Fernandez-Ruiz, E. (1997). The human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13. *Immunogenetics* *46*, 307-311.
- Rico-Mata, R., De Leon-Rodriguez, L.M., and Avila, E.E. (2013). Effect of antimicrobial peptides derived from human cathelicidin LL-37 on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Exp Parasitol* *133*, 300-306.
- Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H., and Schitteck, B. (2004). Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br J Dermatol* *151*, 534-539.
- Roth, S., Rottach, A., Lotz-Havla, A.S., Laux, V., Muschwackh, A., Gersting, S.W., Muntau, A.C., Hopfner, K.P., Jin, L., Vanness, K., *et al.* (2014). Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1beta production. *Nat Immunol* *15*, 538-545.
- Roumenina, L.T., Ruseva, M.M., Zlatarova, A., Ghai, R., Kolev, M., Olova, N., Gadjeva, M., Agrawal, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., *et al.* (2006). Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry* *45*, 4093-4104.
- Sagar, D., Singh, N.P., Ginwala, R., Huang, X., Philip, R., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., Neumann, K., Ruland, J., Andrews, A.M., *et al.* (2017). Antibody blockade of CLEC12A delays EAE onset and attenuates disease severity by impairing myeloid cell CNS infiltration and restoring positive immunity. *Sci Rep* *7*, 2707.
- Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* *1*, 519-525.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* *472*, 481-485.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* *75*, 163-189.
- Schulz, O., Pichlmair, A., Rehwinkel, J., Rogers, N.C., Scheuner, D., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Kaufman, R.J., and Reis e Sousa, C. (2010). Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* *7*, 354-361.
- Scott, M.G., Yan, H., and Hancock, R.E. (1999). Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Infect Immun* *67*, 2005-2009.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S., Ganz, T., Schilling, J.W., and Lehrer, R.I. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* *76*, 1436-1439.
- Shaw, N., and Liu, Z.J. (2014). Role of the HIN domain in regulation of innate immune responses. *Mol Cell Biol* *34*, 2-15.

- Sheikh, F., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shah, N.K., Smirnov, S.V., Anantha, S., Dickensheets, H., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Zdanov, A., *et al.* (2004). Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* *172*, 2006-2010.
- Shepardson, K.M., Schwarz, B., Larson, K., Morton, R.V., Avera, J., McCoy, K., Caffrey, A., Harmsen, A., Douglas, T., and Rynda-Applé, A. (2017). Induction of Antiviral Immune Response through Recognition of the Repeating Subunit Pattern of Viral Capsids Is Toll-Like Receptor 2 Dependent. *MBio* *8*.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., *et al.* (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* *4*, 63-68.
- Shetty, S., Weston, C.J., Oo, Y.H., Westerlund, N., Stamataki, Z., Youster, J., Hubscher, S.G., Salmi, M., Jalkanen, S., Lalor, P.F., *et al.* (2011). Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *J Immunol* *186*, 4147-4155.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T., and Yonehara, S. (2001). LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol* *166*, 5108-5114.
- Shimaoka, T., Nakayama, T., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., Yoshie, O., *et al.* (2003). Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol* *171*, 1647-1651.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* *189*, 1777-1782.
- Shimizu, M., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yoshikawa, S., and Yumoto, N. (1998). Enhancement of antimicrobial activity of neuropeptide Y by N-terminal truncation. *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 2745-2746.
- Shine, B., de Beer, F.C., and Pepys, M.B. (1981). Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta* *117*, 13-23.
- Smed-Sorensen, A., Chalouni, C., Chatterjee, B., Cohn, L., Blattmann, P., Nakamura, N., Delamarre, L., and Mellman, I. (2012). Influenza A virus infection of human primary dendritic cells impairs their ability to cross-present antigen to CD8 T cells. *PLoS Pathog* *8*, e1002572.
- Sommerey, C., Paul, S., Staeheli, P., and Michiels, T. (2008). IFN λ (IFN λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* *4*, e1000017.
- Son, K.N., Liang, Z., and Lipton, H.L. (2015). Double-Stranded RNA Is Detected by Immunofluorescence Analysis in RNA and DNA Virus Infections, Including Those by Negative-Stranded RNA Viruses. *J Virol* *89*, 9383-9392.
- Stambach, N.S., and Taylor, M.E. (2003). Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* *13*, 401-410.

- Stichling, N., Suomalainen, M., Flatt, J.W., Schmid, M., Pacesa, M., Hemmi, S., Jungraithmayr, W., Maler, M.D., Freudenberg, M.A., Pluckthun, A., *et al.* (2018). Lung macrophage scavenger receptor SR-A6 (MARCO) is an adenovirus type-specific virus entry receptor. *PLoS Pathog* *14*, e1006914.
- Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A., and Moore, K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* *170*, 477-485.
- Su, G.L., Klein, R.D., Aminlari, A., Zhang, H.Y., Steinstraesser, L., Alarcon, W.H., Remick, D.G., and Wang, S.C. (2000). Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* *31*, 932-936.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* *79*, 2689-2699.
- Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L., Garcia, A., Eble, J.A., Pohlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., *et al.* (2006). A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* *107*, 542-549.
- Svensson, D., Westman, J., Wickstrom, C., Jonsson, D., Herwald, H., and Nilsson, B.O. (2015). Human endogenous peptide p33 inhibits detrimental effects of LL-37 on osteoblast viability. *J Periodontal Res* *50*, 80-88.
- Szabo, G., and Dolganiuc, A. (2008). The role of plasmacytoid dendritic cell-derived IFN alpha in antiviral immunity. *Crit Rev Immunol* *28*, 61-94.
- Szalai, A.J., VanCott, J.L., McGhee, J.R., Volanakis, J.E., and Benjamin, W.H., Jr. (2000). Human C-reactive protein is protective against fatal *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in transgenic mice. *Infect Immun* *68*, 5652-5656.
- Taylor, R.H., Acland, D.P., Attenborough, S., Cammue, B.P., Evans, I.J., Osborn, R.W., Ray, J.A., Rees, S.B., and Broekaert, W.F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem* *272*, 24480-24487.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* *448*, 501-505.
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., and Akira, S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* *12*, 113-117.
- Tan, R.S., Ho, B., Leung, B.P., and Ding, J.L. (2014). TLR cross-talk confers specificity to innate immunity. *Int Rev Immunol* *33*, 443-453.
- Taylor, S.S., Haste, N.M., and Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* *122*, 823-825.
- Tengvall, S., Che, K.F., and Linden, A. (2016). Interleukin-26: An Emerging Player in Host Defense and Inflammation. *J Innate Immun* *8*, 15-22.

Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* *194*, 1395-1406.

Thomas, P.G., Dash, P., Aldridge, J.R., Jr., Ellebedy, A.H., Reynolds, C., Funk, A.J., Martin, W.J., Lamkanfi, M., Webby, R.J., Boyd, K.L., *et al.* (2009). The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* *30*, 566-575.

Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., *et al.* (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* *28*, 285-287.

Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., *et al.* (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* *11*, 55-62.

Turley, E., and Moore, D. (1984). Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochem Biophys Res Commun* *121*, 808-814.

Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., *et al.* (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* *11*, 997-1004.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* *12*, 71-81.

van der Laan, L.J., Dopp, E.A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C.D., Gordon, S., Tryggvason, K., and Kraal, G. (1999). Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol* *162*, 939-947.

van Schaarenburg, R.A., Suurmond, J., Habets, K.L., Brouwer, M.C., Wouters, D., Kurreeman, F.A., Huizinga, T.W., Toes, R.E., and Trouw, L.A. (2016). The production and secretion of complement component C1q by human mast cells. *Mol Immunol* *78*, 164-170.

Vandenbroeck, K., Cunningham, S., Goris, A., Alloza, I., Heggarty, S., Graham, C., Bell, A., and Rooney, M. (2003). Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* *48*, 2773-2778.

Wakita, T. (2009). Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol* *510*, 305-327.

Wang, G., Mishra, B., Epand, R.F., and Epand, R.M. (2014). High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta* *1838*, 2160-2172.

Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S.M., and Li, K. (2009). Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol* *83*, 9824-9834.

- Ward, P.P., and Conneely, O.M. (2004). Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* *17*, 203-208.
- Watson, R.O., Bell, S.L., MacDuff, D.A., Kimmey, J.M., Diner, E.J., Olivas, J., Vance, R.E., Stallings, C.L., Virgin, H.W., and Cox, J.S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* *17*, 811-819.
- Wells, C.A., Salvage-Jones, J.A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R.Z., Beckhouse, A.G., Lo, Y.L., Manzanero, S., Cobbold, C., *et al.* (2008). The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* *180*, 7404-7413.
- Wilson, L.A., and Spitznagel, J.K. (1968). Molecular and structural damage to *Escherichia coli* produced by antibody, complement, and lysozyme systems. *J Bacteriol* *96*, 1339-1348.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* *8*, 950-957.
- Wisskirchen, C., Ludersdorfer, T.H., Muller, D.A., Moritz, E., and Pavlovic, J. (2011). The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. *J Virol* *85*, 8646-8655.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* *168*, 5397-5402.
- Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E.M., Gunther, S., and Moderer, M. (2002). Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* *118*, 327-334.
- Wong, J.H., Legowska, A., Rolka, K., Ng, T.B., Hui, M., Cho, C.H., Lam, W.W., Au, S.W., Gu, O.W., and Wan, D.C. (2011). Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides* *32*, 1117-1122.
- Wright, S.D. (1995). CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol* *155*, 6-8.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* *339*, 826-830.
- Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T., *et al.* (2012). Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol* *86*, 5686-5696.
- Yang, D., Chen, Q., Hoover, D.M., Staley, P., Tucker, K.D., Lubkowski, J., and Oppenheim, J.J. (2003). Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* *74*, 448-455.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., *et al.* (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* *175*, 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* *5*, 730-737.

Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M., Pistolic, J., Li, Y., Rehaume, L., and Hancock, R.E. (2007). Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* *179*, 7684-7691.

Yu, W.C., Chan, R.W., Wang, J., Travanty, E.A., Nicholls, J.M., Peiris, J.S., Mason, R.J., and Chan, M.C. (2011). Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J Virol* *85*, 6844-6855.

Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* *122*, 1615-1627.

Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Mancinelli, R., Xu, X.P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., and Arditi, M. (1999). Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* *274*, 7611-7614.

Zhang, J.G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., Wan, S.S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., van Delft, M.F., *et al.* (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* *36*, 646-657.

Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., and Liu, Y.J. (2011). The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol* *12*, 959-965.

Table des matières

1	Introduction.....	9
1.1	L'immunité innée.....	9
1.1.1	Les récepteurs cellulaires	9
1.1.2	Les récepteurs extracellulaires de l'immunité innée	21
1.1.3	Les récepteurs non conventionnels	24
1.2	L'interleukine 26.....	28
1.2.1	Découverte et généralités	29
1.2.2	Le gène IL26.....	29
1.2.3	Le récepteur IL-20R1 / IL-10R2.....	30
1.2.4	Expression et sécrétion	31
1.2.5	Fonctions biologiques.....	32
1.3	Le virus de l'hépatite C et la réponse antivirale	37
1.3.1	Le virus de l'hépatite C	37
1.3.2	L'hépatite C.....	39
1.3.3	La réponse antivirale	42
2	Contexte et objectifs	49
3	Résumé des résultats	51
3.1	L'IL-26 protège les hépatocytes de l'infection <i>in vitro</i> par HCV	51
3.2	L'IL-26 n'induit pas l'expression des ISG par les cellules de la lignée Huh7.5.....	52
3.3	L'IL-26 n'inhibe pas l'entrée des virions dans les hépatocytes	53
3.4	L'IL-26 se fixe à l'ARN viral.....	54
3.5	L'IL-26 inhibe <i>in vitro</i> la réplication de l'ARN viral	56
3.6	L'IL-26 rend l'ARN pro-inflammatoire	57
3.7	L'IL-26 induit l'expression d'IFN α par les pDC.....	58
3.8	La réponse des mdDC dépend du type d'acide nucléique complexé à l'IL-26.....	59
3.9	Manuscrit en préparation	60
4	Discussion et perspectives	83
4.1	L'IL-26 inhibe la réplication de l'ARN viral.....	83
4.1.1	L'IL-26 protège <i>in vitro</i> les cellules Huh7.5 de l'infection par HCV	83
4.1.2	Mécanisme de protection	83
4.2	Les complexes d'IL-26 et d'ARN activent l'immunité innée	86
5	Conclusion	89
6	Annexes	91

6.1	Annexe I : IL-26 confers pro-inflammatory properties to extracellular DNA.	91
6.2	Annexe II : IL-26, an intriguing member of the IL-20 cytokine family.	122
6.3	Annexe III : Immune properties of HSP70.	148
7	Références bibliographiques	181

Table des illustrations

Figure 1. Structure des récepteurs d'épuration.	10
Figure 2. Détection des acides nucléiques chez l'humain.	20
Figure 3. Schéma d'association des sous-unités constituant les collectines.	21
Figure 4. Schéma d'action des peptides antimicrobiens.	27
Figure 5. Sous-unités des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-10.	29
Figure 6. Distribution des acides aminés au sein des hélices α du LL-37 et de l'IL-26.	34
Figure 7. Cycle de réplication de HCV.	38
Figure 8. Incidence de l'hépatite C dans le monde.	40
Figure 9. Arbre phylogénétique des interférons.	44
Figure 10. Mise en place de la réponse antivirale par les interférons.	46
Figure 11. Accumulation d'IL-26 dans les hépatocytes infectés.	48
Figure 12. IL-26 réduit la charge virale dans les hépatocytes Huh7.5 infectés par HCV.	50
Figure 13. IL-26 n'induit pas l'expression de gènes antiviraux.	52
Figure 14. IL-26 n'inhibe pas l'entrée des pseudoparticules virales.	53
Figure 15. Co-localisation de l'IL-26 avec le dsRNA viral dans les hépatocytes infectés <i>in vitro</i> .	54
Figure 16. IL-26 se lie à l'ARN viral.	55
Figure 17. IL-26 inhibe <i>in vitro</i> l'activité de la polymérase du phage $\phi 6$.	56
Figure 18. Les complexes composés d'ARN viral double brin et d'IL-26 induisent la production d'IL-6.	57
Figure 19. Les complexes d'ARN viral double brin et d'IL-26 induisent la production d'IFN α par les pDC.	58
Figure 20. Les complexes induisent l'expression de protéines inflammatoires et antivirales par les mdDC.	59

Table des tableaux

Table 1. Les différentes familles de senseurs de l'immunité innée et les principaux membres. 8

Table 2. Nomenclature révisée des récepteurs d'épuration. _____ 14

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Larochette Vincent
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **17 / 10 / 2018**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Analyse des propriétés antivirales de l'interleukine-26.

Mots clés : IL-26, antiviral, réplication, HCV

Résumé : L'interleukine 26 (IL-26) a initialement été décrite comme une molécule surexprimée par des lymphocytes humains transformés par un virus. L'IL-26 a ensuite été classée comme cytokine pro-inflammatoire en raison de sa capacité à induire la production de cytokines par les cellules myéloïdes et épithéliales. Toutefois, ses fonctions biologiques restent méconnues, notamment en raison de l'absence d'orthologue chez le rat et la souris. Le laboratoire avait précédemment rapporté que l'IL-26 est surexprimée chez les patients présentant une inflammation hépatique associée à une infection chronique par le virus de l'hépatite C (HCV) et qu'elle participe à l'immunité antivirale, notamment en conférant aux cellules NK la capacité de tuer des hépatocytes infectés par le virus. Les résultats

montraient également que l'IL-26 s'accumule dans les hépatocytes infectés en l'absence d'expression du transcrit. Cette observation, suggérant un rôle non conventionnel pour une cytokine associé à une localisation inhabituelle, a constitué la base de ce projet de recherche. Utilisant un modèle original de réplication du virus HCV in vitro, nos travaux montrent que l'IL-26 protège les hépatocytes de l'infection par HCV en inhibant la réplication de l'ARN viral. Cette propriété repose notamment sur la capacité de l'IL-26 à se lier à l'ARN viral. Ces données identifient l'IL-26 comme un nouvel acteur de l'arsenal antiviral, agissant notamment en inhibant la réplication du virus HCV, et suggèrent que cette molécule peut être classée dans la famille des kinocidines.

Title : Analysis of the antiviral properties of the interleukin-26

Keywords: IL-26, antiviral, replication, HCV

Abstract: Initially identified as a molecule overexpressed in virus-transformed human T cells, IL-26 has been classified as a proinflammatory cytokine due to its capacity to induce inflammatory cytokines production by myeloid and epithelial cells. Nevertheless, its biological functions remain largely unknown, in part because of its absence of orthologs in rat and mouse.

Our team has previously reported that IL-26, overexpressed in HCV-infected patients, activates NK cells, rendering them able to kill HCV-infected hepatocytes. Results also showed that IL-26 accumulates in hepatocytes of HCV-infected patients, a localization that is not usual for a cytokine. This observation led us to evaluate whether IL-26 may exhibit non-conventional properties.

In this study, we demonstrate that IL-26 protects in vitro hepatocytes from HCV infection. Confocal microscopy revealed that IL-26 colocalizes with viral dsRNA. This direct antiviral activity appears to rely on the capacity of IL-26 to bind to viral RNA and to inhibit its replication. Moreover, we investigated the capacity that IL-26 complexed to viral RNA could trigger an antiviral response by immune cells.

Collectively, results show that IL-26 may have a manifold protective role during HCV infection: (i) an indirect role via its capacity to confer NK cell the capacity to kill HCV-infected cells, (ii) a direct role through its ability to inhibit viral replication, and (iii) a stimulatory role by rendering viral DNA inflammatory.