



HAL
open science

Réponse antivirale des cellules dendritiques plasmacytoïdes contre des cellules infectées via la formation d'une synapse interférogénique

Séverin Coléon

► **To cite this version:**

Séverin Coléon. Réponse antivirale des cellules dendritiques plasmacytoïdes contre des cellules infectées via la formation d'une synapse interférogénique. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSEN071 . tel-03592502

HAL Id: tel-03592502

<https://theses.hal.science/tel-03592502v1>

Submitted on 1 Mar 2022

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

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



Numéro National de Thèse : **2019LYSEN071**

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

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Immunologie, Virologie
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 19/12/2019, par :
Séverin COLEON

Réponse antivirale des cellules dendritiques
plasmacytoides contre des cellules infectées *via* la
formation d'une synapse interférogénique

Devant le jury composé de :

JOUVENET Nolwenn, Chargée de recherche HDR, Institut Pasteur, Paris, Rapporteur
VIEILLARD Vincent, Directeur de recherche, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses,
Paris, Rapporteur
LENNON-DUMENIL Ana-Maria, Directrice de recherche, Institut Curie, Paris, Examinatrice
HENRY Thomas, Directeur de recherche, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon,
Examineur
DREUX Marlène, Chargée de recherche HDR, Centre International de Recherche en Infectiologie,
Lyon, Directrice de thèse

Abstract

Type I interferon (IFN-I) is critical for antiviral defense, and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are a predominant source of IFN-I during virus infection. pDC-mediated antiviral responses are stimulated upon physical contact with infected cells, during which immunostimulatory viral RNA is transferred to pDCs, leading to IFN production *via* the nucleic acid sensor TLR7. Using dengue (DENV), hepatitis C (HCV), and zika (ZIKV) viruses, we demonstrate that the contact site of pDCs with infected cells is a specialized platform we term the interferogenic synapse, which enables viral RNA transfer and antiviral responses. This synapse is formed *via* α L β 2 integrin-ICAM-I adhesion complexes and the recruitment of the actin network and endocytic machinery. Moreover, TLR7 signaling in pDCs promotes interferogenic synapse establishment and we show that this feed-forward regulation of contacts between pDCs and infected cells is mediated by IFN-I signaling. We propose that the interferogenic synapse may allow pDCs to scan infected cells and locally secrete IFN-I, thereby confining a potentially deleterious response for the host.

Résumé

L'interféron de Type I (IFN-I) est un acteur crucial de la réponse antivirale. Dans le cas d'une infection virale, celui-ci est majoritairement produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Afin d'assurer leurs fonctions antivirales, les pDCs forment des contacts physiques avec les cellules infectées, une caractéristique observée pour un grand nombre de virus, même distant génétiquement. Cependant, comment et pourquoi ces contacts s'établissent reste énigmatiques. En utilisant les virus de la dengue (DENV), de l'hépatite C (HCV) et de zika (ZIKV), nous démontrons qu'une plateforme spécialisée dans le transfert d'ARN immuno-stimulateurs se met en place au niveau de l'interface de contact entre les pDCs et les cellules infectées. Cette structure que nous avons choisi d'appeler la synapse interférogénique est formée par le complexe d'adhésion constitué de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ et de son ligand ICAM-1, ainsi que de la polarisation du réseau d'actine et de la machinerie d'endocytose. De plus la voie de signalisation du senseur Toll-Like Récepteur 7 (TLR7) favorise l'établissement de la synapse interférogénique. Enfin, nous montrons que ce renforcement des contacts entre pDCs et cellules infectées est dépendant de la voie IFN-I. Nous proposons que la synapse interférogénique soit nécessaire quant au bon fonctionnement des pDCs et à leurs activations tout en favorisant une sécrétion localisée d'IFN-I au niveau du site d'infection, confinant une réponse potentiellement délétère pour l'hôte.

Table des matières

Introduction	8
I. L'immunité innée : première ligne de défense antivirale.....	9
I. i. Reconnaissance des agents viraux par les Toll-like récepteurs.....	9
I. i. i. Les Toll-like récepteurs.....	9
I. i. ii. Reconnaissance virale par les Toll-like récepteurs.....	10
I. i. iii. Voies de signalisation des Toll-like récepteurs.....	12
I. ii. Les récepteurs induits par l'acide rétinoïques.....	14
I. ii. i. Reconnaissance et voies de signalisation des récepteurs induits par l'acide rétinoïques.....	14
II. La réponse interféron de type I.....	16
II. i. Introduction sur les interférons de type I.....	16
II. i. i. Les interférons de type I et leur récepteur.....	16
II. i. ii. La voie de signalisation des interférons de type I.....	17
II. i. iii. Les mécanismes de protection antiviraux des interférons de type I.....	20
II. ii. Régulation de la réponse interféron de type I.....	21
II. ii. i. La régulation positive de la réponse interféron de type I.....	21
II. ii. ii. Régulation négative de la réponse interféron de type I.....	22
II. ii. iii. Les effets délétères de la réponse interféron de type I.....	23
III. Les cellules dendritiques plasmacytoides.....	24
III. i. Caractéristiques des cellules dendritiques plasmacytoides.....	24
III. i. i. Introduction sur les cellules dendritiques plasmacytoides.....	24
III. i. ii. Ontogénie et maturation des cellules dendritiques plasmacytoides.....	26
III. i. iii. Activation des cellules dendritiques plasmacytoides par reconnaissance de l'infection virale.....	27
III. ii. Les fonctions des cellules dendritiques plasmacytoides.....	29

III. ii. i. L'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes	29
III. ii. ii. La régulation négative des cellules dendritiques plasmacytoïdes	30
III. ii. iii. Dérèglement de la réponse des cellules dendritiques dans l'auto-immunité.....	31
IV. Les contacts cellulaires.....	32
IV. i. La synapse immunologique	32
IV. i. i. Structure et dynamique de la synapse immunologique	32
IV. i. ii. Importance de l'actine dans la synapse immunologique	33
IV. i. iii. Transfert polarisé au niveau de la synapse immunologique.....	35
IV. i. iv. Lien avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	36
IV. ii. Rôle fonctionnelle et régulation des intégrines dans la synapse immunologique	37
IV. ii. i. Activation et positionnement des intégrines.....	37
IV. ii. ii. Activation des intégrines dans la synapse immunologique	39
IV. ii. iii. Rôle des intégrines dans la migration et leurs régulations par les chémokines	41
V. Les modèles viraux	44
V. i. Le virus de la Dengue	44
V. ii. Le virus de l'hépatite C.....	45
V. iii. Les mécanismes d'évasion virale à la réponse interféron de type I	47
V. iii. i. Inhibition de la production d'IFN de type I par DENV.....	47
V. iii. ii. Inhibition de la voie de signalisation de l'interféron de type I par DENV	48
V. iii. iii. L'infection chronique par HCV.....	48
V. iii. iv. Les mécanismes d'évasions à la réponse interféron de type I par HCV.....	49
V. iv. Activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par les modèles viraux	50
V. iv. i. Activation par le transfert de particules immatures	50
V. iv. ii. Activation par le transfert d'exosomes	50
Objectifs de la thèse	52
Résultats	54

I. Paper N°1: Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected cells Form an Interferogenic synapse required for Antiviral Responses.....	55
II. Paper N°2: IFN-I signaling reinforces the interferogenic synapse-mediated sensing of infected cells by the plasmacytoides dendritics and antiviral response (in preparation)	94
Discussion.....	116
I. La synapse interferogenic : Une plateforme structurale polarisée	117
II. Modèle d'action antivirale des cellules dendritiques plasmacytoïdes	119
III. Une boucle de régulation IFN-I restreinte dans le temps ?	121
IV. La synapse interférogénique permet une réponse localisée	122
V. Caractériser d'avantage la synapse interférogénique	123
VI. Une lignée cellulaire déficiente pour ICAM-I, un nouvel outil	124
Bibliographie	128
Annexe.....	152

Table des figures

Introduction

Figure 1 : Activation et signalisation du Toll-like récepteur 7	13
Figure 2 : Voies de signalisations des RIG-like récepteurs	15
Figure 3 : Voie de signalisation canonique et non canoniques de la réponse IFN-I	19
Figure 4 : Les différentes fonctions des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	25
Figure 5 : Représentation des quatre réseaux d'actine présent à la synapse immunologique ...	33
Figure 6 : Les différentes conformations de l'intégrine αLβ2 ou LFA-1.....	37
Figure 7 : Modèle d'activation de l'intégrine αLβ2 ou LFA-1.....	40
Figure 8 : Modèles d'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le transfert de PAMPs viraux dans le cas d'une infection par HCV et DENV	51

Discussion

Figure 9 : Modèle d'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes	120
--	------------

Liste des abréviations

Abréviation (Eng.)	Signification (Eng.)	Traduction (FR)
CARD	Caspase activation and recruitment domains	Domaine d'activation et de recrutement des caspases
CDP	Common dendritic cell progenitor	Progéniteur commun des cellules dendritiques
CLP	Common lymphoid progenitor	Progéniteur commun lymphoïde
CMP	Common myeloid progenitor	Progéniteur commun myéloïde
cSMAC	Central supramolecular activation cluster	Cluster d'activation supramoléculaire central
DC	Dendritic cells	Cellules dendritiques
DENV	Dengue virus	Virus de la dengue
DNA	Deoxyribonucleic acid	Acide désoxyribonucléique
dSMAC	Distal supramolecular activation cluster	Cluster d'activation supramoléculaire distal
dsRNA	Double strand RNA	ARN double brin
ER	Endoplasmic reticulum	Réticulum endoplasmique
EXO	Exosome	Exosome
HCV	Hepatitis C virus	Virus de l'hépatite C
HEV	High Endotelial veinules	Veinule à endothélium épais
HIV	Human immunodeficiency virus	Virus de l'immunodéficience humaine
HSV	Herpes simplex virus	Virus de l'herpès simplex
ICAM-I	Intercellular adhesion molecule I	Molécule d'adhésion intercellulaire I
IFIT	Interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats	Protéines à répétition tetratricopeptide induites par l'interféron
IFITIM	Interferon induced transmembrane protein	Protéine transmembranaire induite par l'interféron
IFN	Interferon	Interféron
IFNAR	Interferon alpha receptor	Récepteur de l'interféron alpha
IFNAR1	Interpheron apha receptor, subunit I	Sous-unité I, du récepteur de l'interféron alpha
IFNAR2	Interpheron apha receptor, subunit 2	Sous-unité 2, du récepteur de l'interféron alpha
IFN-I	Type I interferon	Interféron de type I
IFN-III	Type III interferon	Interféron de type III
IRES	Internal ribosome entry site	Site d'entré interne ribosomal
IRF	Interferon regulatory factors	Facteur de régulation de l'interféron
ISGF3	Interferon Stimulated Gene Factor	Facteur génétique stimulé par l'interféron
ISRE	Interferon-sensitive response element	Élément de réponse sensible à l'interféron
iSYN	Interferogenic synapse	Synapse Interférogénique
JAK	Janus Kinase	Janus Kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen I	Antigène associé à la fonction du lymphocyte I

LG	Lytic granules	Granules lytiques
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2	Laboratoire de génétique et de physiologie 2
MAM	Mitochondria associated-membrane	Membrane associée à la mitochondrie
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein	Protéine de signalisation antiviral de la mitochondrie
MCMV	Murine cytomegalovirus	Cytomégalo virus murin
MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5	Gene associé à la différenciation du melanome 5
MHC	Major histocompatibility complex	Complexe majeur d'histocompatibilité
MOI	Multiplicity of infection	Multiplicité d'infection
MyD88	Myeloid Differentiation factor 88	Facteur de différenciation myéloïde 88
NFkB	Nuclear factor-kappa B	Facteur nucléaire kappa-B
NK	Natural killer cell	Cellule "tueuse"
NM-2	Non muscular myosin - 2	Myosine non musculaire 2
NS	Nonstructural protein	Protéine non-structurale
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	Motif moléculaire associé aux pathogènes
pDC	Plasmacytoid dendritic cell	Cellule dendritique plasmacytoïde
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	Kinase phosphoinositide 3
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP5K1	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I
PKC	Protein kinase C	Protéine kinase C
PRR	Pathogen Recognition receptor	Récepteur de reconnaissance des pathogènes
pSMAC	Peripheral supramolecular activation cluster	Cluster d'activation supramoléculaire périphérique
RAP1	Ras-related protein I	Protéine apparentée à Ras
RER	Rough endoplasmic reticulum	Reticulum endoplasmique Granuleux
RIAM	Rap1-GTP-interacting adaptor molecule	Molécule adaptatrice interagissant avec Rap1 GTP
RIG-I	Retinoic-acid-inductible protein I	Protéine inductible par l'acide rétinolique I
RLR	RIG-I like receptor	Récepteur semblable à RIG-I
RNA	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
SLE	Systemic Lupus Erythematosus	Lupus érythémateux disséminé
SMAC	Supramolecular activation cluster	Cluster d'activation supramoléculaire
SOCS	Suppressor of cytokine signalling	Cytokine de suppression du signal
ssRNA	Single strand RNA	ARN simple brin
STAT	Signals transducer and activator of transcription	Signaux de transduction et d'activation de la transcription
TCR	T cell receptor	Récepteur des cellules T
TLR	Toll-Like receptor	Récepteur Toll-like
TNF	Tumor necrosis factor	Facteur de nécrose tumorale

TRIF	TIR-domain-containing adaptator-inducing IFN β Factor	Domaine TIR contenant un facteur d'adaptation induit par l'IFN β
USP18	Ubiquitin hydrolase carboxy-terminal hydrolase 18	Ubiquitin hydrolase carboxyle-terminal hydrolase 18
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein	Protéine du syndrome de Wiskott–Aldrich
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein	Protéine homologue de verprolin de la famille WASP
WNV	West nile virus	Virus du Nile occidental
ZIKV	Zika virus	Virus Zika

Introduction

I. L'immunité innée : première ligne de défense antivirale

Les organismes vertébrés sont protégés des invasions des microorganismes par un système de défense immunitaire constitué de deux branches : L'immunité innée et l'immunité adaptative. Alors que l'immunité acquise met plusieurs jours à se mettre en place, l'immunité innée se met en place immédiatement après l'invasion par un pathogène (bactérie, champignon, parasite et virus). Elle représente la première ligne de défense de l'hôte et englobe à la fois les barrières anatomiques contre l'infection et les réponses cellulaires. Les barrières anatomiques sont les couches de cellules épithéliales de la peau, des glandes et des muqueuses associées aux orifices de l'organisme et recouvertes par un ensemble de substances solubles antimicrobiennes ainsi qu'un pH acide. L'invasion par un agent pathogène, qui réussit à franchir la barrière épithéliale, stimule les réponses cellulaires de l'immunité innée qui prennent le relais et interviennent dans les premières minutes suivant l'infection. Celles-ci vont être capables de différencier le soi du non-soi par l'utilisation des PRRs (Pathogen Recognition Receptor) situés à l'intérieur ou à la surface des cellules. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), généralement essentiels à la survie des microorganismes et par conséquent extrêmement conservés. Les PRRs sont exprimés de façons constitutives par l'hôte et sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires, notamment tous les types de cellules leucocytaires myéloïdes (monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, basophiles, cellules dendritiques) ainsi que par les sous populations de lymphocytes (B, T et NK). Tous les PRRs ne sont pas exprimés par une cellule donnée, les panels de récepteurs variant selon les différents types cellulaires.

I. i. Reconnaissance des agents viraux par les Toll-like récepteurs

I. i. i. Les Toll-like récepteurs

Les TLRs (Toll-like receptor) constituent la première famille de TLR à avoir été identifiées. A l'origine, les chercheurs avaient observé que le gène codant pour une protéine Toll, chez la drosophile, était essentiel au développement embryonnaire de la polarité dorso-ventrale. Plus tard, des études de mutants de la protéine Toll ont montrés que ces mutations rendaient les mouches très sensibles à des infections par des champignons auxquels elles sont normalement résistantes. Des protéines activant l'expression des gènes de la réponse de l'immunité innée dans les cellules humaines et similaires à Toll sont ensuite été découvertes et seront plus tard appelées récepteurs « Toll-like » (Medzhitov et

al., 1997). Chez les mammifères, la famille des TLRs regroupe 13 membres identifiés à ce jour. Les TLRs 1 à 10 sont homologues chez l'Homme et la souris alors que les TLRs 11 à 13 ne sont exprimés que chez la souris. Les TLRs sont des protéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire de répétition riche en leucine (LRR) capable d'interagir avec des ligands spécifiques, chaque TLR possédant un répertoire spécifique de PAMPs (**Tableau 1**). Dans la plupart des cas, la reconnaissance d'un PAMP par un TLR entraîne son homodimérisation. Néanmoins, TLR2 forme des hétérodimères en s'associant soit au TLR1 soit au TLR6. La localisation cellulaire des TLRs est en accord avec leurs ligands respectifs, afin d'y répondre de façon optimal. Par exemple les TLRs reconnaissant les PAMPs présents à la surface des pathogènes extracellulaires sont localisés au niveau des membranes plasmiques, alors que les TLRs reconnaissant les composants internes des pathogènes, exposés uniquement lors de leurs dégradations, se situent dans les endosomes et les lysosomes. Enfin, l'expression des TLRs n'est pas statique mais modulée en réponse à la présence de pathogènes ou de différentes cytokines.

I. i. ii. Reconnaissance virale par les Toll-like récepteurs

Les génomes viraux, composés à la fois d'ADN ou d'ARN sous sa forme double brin (dsRNA) et simple brin (ssRNA), ainsi que les glycoprotéines de surfaces, sont reconnus comme des PAMPs par les TLRs (**Tableau 1**). Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont spécifiquement impliqués dans la reconnaissance des nucléotides viraux, entraînant notamment la production d'interféron de type I (IFN-I) un acteur essentiel de la lutte antivirale. Par exemple, l'ADN viral généralement enrichi en motif CpG va stimuler le TLR9 situé dans le compartiment endosomal et induire la production d'IFN-I et de cytokines pro-inflammatoires (Akira et al., 2006). Dans le cas du virus de l'herpès simplexe (HSV), un virus à ADN, cette réponse est limitée aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) (Krug et al., 2001). Le ssRNA viral est reconnu par le TLR7 et 8, exprimés au niveau de la membrane endo-lysosomale. Ces deux TLRs possèdent une forte homologie et peuvent être stimulés suite à un traitement par un agoniste comme l'imiquimod (R837) ou encore le resiquimod (R848). Beaucoup de virus enveloppés étant internalisés dans le compartiment endosomal, la fusion des endosomes avec les lysosomes entraîne la formation d'endo-lysosomes au pH hautement acide et riches en enzymes de dégradation. Dans ces conditions, les particules virales vont être digérées, rendant possible la détection du génome viral ainsi libéré par les TLR7 ou 8. La phagocytose de cellules infectées apoptotiques peut également donner lieu à la reconnaissance des génomes viraux, transférés de la cellule infectée au phagocyte. Dans le cas d'ARNs cellulaires relargués dans le milieu extracellulaire, contrairement aux

génomés viraux protégés par une capsid, ces derniers sont la cible de nombreuses RNAses et se retrouvent généralement dégradés avant de pouvoir être potentiellement reconnus. Le dsRNA viral est reconnu par le TLR3. Un analogue synthétique utilisé est l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C) (Alexopoulou et al., 2001). Les dsRNA viraux peuvent être générés durant la réplication virale, soit sous la forme d'un intermédiaire de réplication pour les virus à ssARN ou comme un produit dérivé de la transcription des virus à ADN. Bien que TLR3 soit exprimé par un grand nombre de cellules, comme notamment les cellules dendritiques dites « conventionnelles » (cDC), il n'est pas retrouvé dans les pDCs. Son expression est rapidement augmentée par traitement au poly I:C ou à l'interféron (IFN) de type I (IFN-I), et son rôle dans la réponse antivirale a été illustré par un grand nombre d'études *in vivo* et *in vitro*. En effet il a été montré que des souris déficientes pour TLR3 montraient une sensibilité accrue à MCMV (Murine Cytomegalovirus) (Hardarson et al., 2007; Tabeta et al., 2004), HSV-2 (Type 2 Herpes Simplex Virus) (Reinert et al., 2012). De plus son rôle de protection antivirale a également été démontré contre un certain nombre de *flavivirus* comme WNV (West Nile Virus), DENV (Dengue Virus) ou encore ZIKV (Zika Virus) (Daffis et al., 2008; Hamel et al., 2015; Liang et al., 2011). Certaines protéines virales peuvent être reconnues par TLR4 et TLR, leurs détections entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires mais pas ou peu d'IFN-I, à l'origine d'une réponse préférentiellement inflammatoire mais pas antivirale (Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Table 1: Toll-like récepteurs et leurs ligands (Akira and Takeda, 2004)

TLR	Ligands	Pathogènes	Localisation	Dimères	Signalisation
TLR1	Lipopeptides triacylés	Mycobactéries et bactéries à Gram négatif	Membrane plasmique	TLR1/TLR2	MyD88/TIRAP
	Peptidoglycanes	Bactéries à Gram positif			
	Protéines à ancre GPI	Trypanosomes			
TLR2	Lipoprotéines	Mycobactéries et autres bactéries	Membrane plasmique	TLR1/TLR2 TLR2/TLR6	Myd88/TIRAP
	Zymosan	Levures et champignons			
	Phosphatidylsérine	Schistosomes			
TLR3	ARN double brin (dsRNA)	Virus	Endosomes/lysosomes	TLR3/TLR3	TRIF/TRAM
	LPS	Bactéries à Gram négatif	Membrane plasmique		
TLR4	Protéine-F	Virus syncytial respiratoire (RSV)	Endosomes/lysosomes	TLR4/TLR4	TRIF/TRAM
	Mannanes	Champignons			
TLR5	Flagelline	Bactéries	Membrane plasmique	TLR5/TLR5	MyD88
TLR6	Lipopetides diacylés	Mycobactéries et bactéries à Gram positif	Membrane plasmique	TLR2/TLR6	Myd88/TIRAP
	Zymosan	Levures et autres champignons			
TLR7	ARN simple brin (ssRNA)	Virus	Endosomes/lysosomes	TLR7/TLR7	MyD88
TLR8	ARN simple brin (ssRNA)	Virus	Endosomes/lysosomes	TLR8/TLR8	MyD88
TLR9	Dinucleotides non méthylés CpG	ADN bactérien	Endosomes/lysosomes	TLR9/TLR9	MyD88
	Dinucleotides				
TLR10	Inconnu	Inconnu	inconnu	Inconnu	Inconnu
TLR11	Inconnu	Bactéries uropathogènes	Membrane plasmique	TLR11/TLR11	MyD88
	Profiline	Toxoplasme			
TLR12	Inconnu	Inconnu	inconnu	Inconnu	Inconnu
TLR13	Inconnu	Virus de la stomatite vésiculeuse	Endosomes/lysosomes	TLR13/TLR13	MyD88

I. i. iii. Voies de signalisation des Toll-like récepteurs

L'engagement des TLRs par la reconnaissance des PAMPs entraîne une cascade de signalisation induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans les défenses de l'hôte. Les voies de signalisations activées par un dimère de TLR sont essentiellement déterminées par la protéine adaptatrice recrutée au niveau de leur domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1 Récepteur). Il existe quatre protéines adaptatrices dont MyD88 (Myéloid Différenciation factor 88), et TRIF (TIR-domain-containing adaptator-inducing IFN β Factor) qui seront plus particulièrement détaillées. Celles-ci amorcent deux voies de signalisation distinctes responsables respectivement de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I. MyD88 est critique pour les voies de signalisation induites par tous les TLRs à l'exception du TLR3. Une voie de signalisation des TLRs indépendante de MyD88, induite par les TLRs 3 et 4, est médiée par TRIF. Dans le cas particulier de l'activation des pDCs, la production d'IFN-I par les TLR7 et 9 dépend de MyD88 (**Tableau 1**). Celle-ci conduit au recrutement à la membrane des endosomes, et à l'assemblage du complexe multi protéique regroupant IRAK4, TRAF6, BTK et IRF7. IRF7 est activé par son ubiquitylation par TRAF6 et sa phosphorylation par IRAK4. Une fois activé, IRF7 interagit avec TRAF3, IKK α , IRAK1, l'ostéopontine (OPN) et PI3K pour être transloqué dans le noyau (Gilliet et al., 2008). IRF7 est essentiel pour la transcription des gènes des IFN-I comprenant l'IFN α et l'IFN β (**Figure 1**).

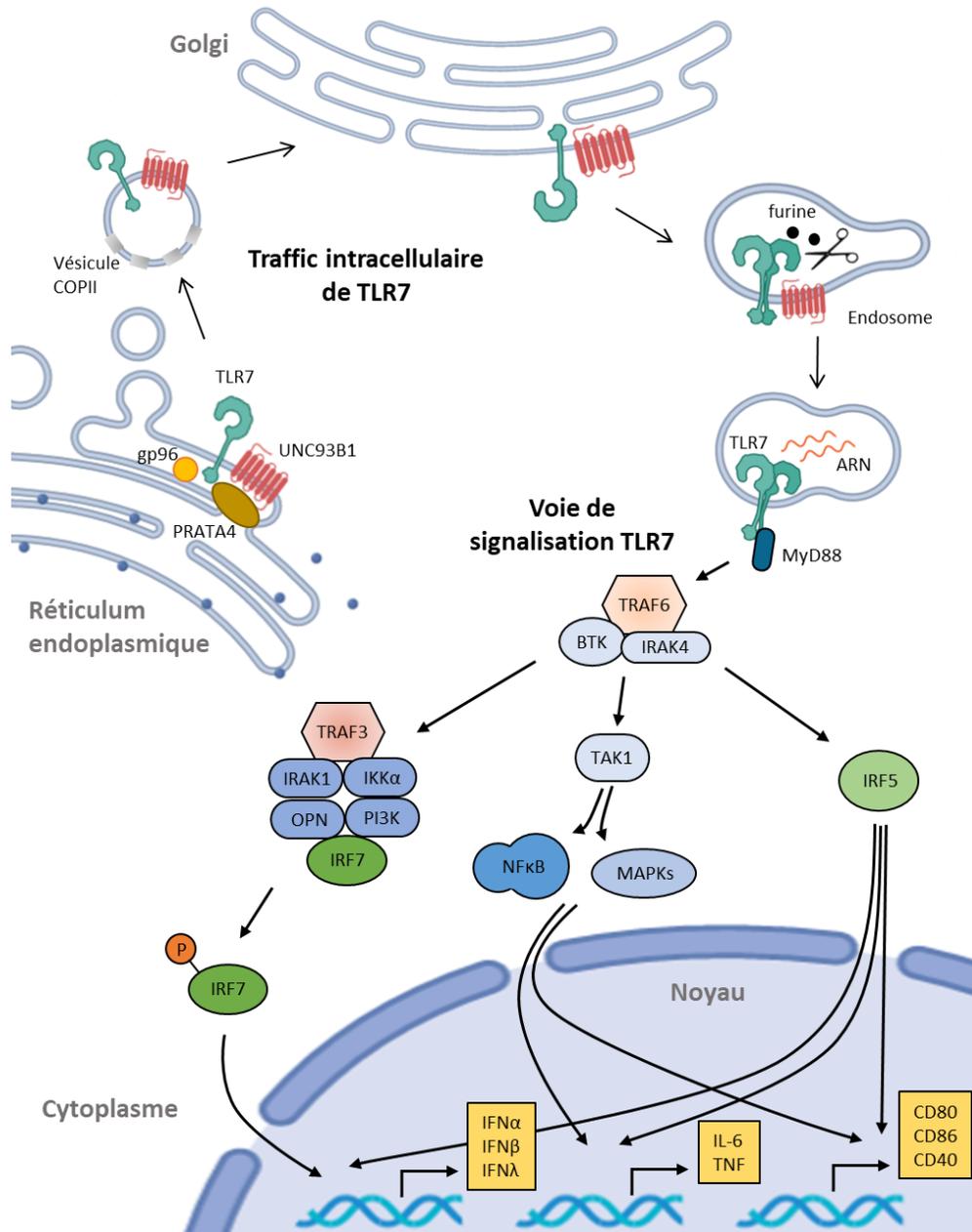


Figure 1 : Activation et signalisation du Toll-like récepteur 7

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) expriment principalement les TLRs (Toll-like receptor) 7 et 9, qui migrent du réticulum endoplasmique (ER) vers les endosomes. TLR7 est synthétisé dans le ER ou il est associé aux protéines gp96 et UNC93B1 nécessaires à sa conformation. TLR7 est relocalisé au niveau du golgi dans une vésicule recouverte de la protéine COPII (coat protein complexe II). Dans le Golgi, UNC93B1 ubiquitine TLR7 qui est transporté dans les endosomes. L'acidification présente dans les endosomes entraîne le clivage protéolytique de TLR7 par la furine. La reconnaissance d'acides nucléiques par TLR7 provoque des changements de conformation dans sa structure moléculaire conduisant à l'activation de MyD88 et à son association avec TRAF6 (tumeur-necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6) et IRAK4 (interleukin-1-receptor-associated kinase 4). Le complexe MyD88-TRAF6-IRAK4 active la kinase TAK1, et IRF5 pour activer des molécules en aval de la voie de signalisation. IRF7 est activée par ubiquitylation et phosphorylation par TRAF3, IRAK1, IKK α (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase α), OPN (ostéoponine) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Après activation, IRF7 est transloquée vers le noyau et initie la transcription des interférons de type I et III. TAK1 entraîne l'activation de NF- κ B et des MAPKs (mitogen-activated protein kinases) et, avec l'IRF5, conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (Gilliet et al., 2008; Petes et al., 2017).

I. ii. Les récepteurs induits par l'acide rétinoïque

I. ii. i. Reconnaissance et voies de signalisation des récepteurs induits par l'acide rétinoïque

Les récepteurs induits par l'acide rétinoïque (RLR) sont des PRRs solubles résidant dans le cytosol de nombreux types cellulaires où ils jouent un rôle crucial contre les infections virales. Les RLRs incluent RIG-I (retinoic-acid-inductible protein I), MDA5 (Melanoma differentiation associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) (**Figure 2**). Ils sont composés d'une hélicase virale permettant la reconnaissance de l'ARN, d'un domaine CTD (zinc-binding C-terminal domain) et d'un domaine CARD (caspase activation and recrutement domain) à l'extrémité N-terminal impliqué dans la transmission du signal. Contrairement à RIG-I et MDA5, LGP2 ne possède pas de domaine CARD, mais est capable de se lier au dsRNA de façon similaire à ses homologues. Il serait d'ailleurs impliqué dans la régulation de la signalisation de RIG-I et MDA5. En dépit de leur homologie de séquence et de structure, RIG-I et MDA5 lient préférentiellement des ligands différents. RIG-I lie principalement des dsRNA ou ssRNA de courte taille (10-300pb), incluant les ARNs possédant une extrémité 5'triphosphate et des régions enrichies en poly-U/UC, comme le génome du virus de l'hépatite C (HCV) (Saito et al., 2008). MDA5 reconnaît plus particulièrement les longs fragments de dsRNA. LGP2 a été montré comme interagissant avec l'extrémité des dsRNA de différentes tailles avec une affinité élevée (Li et al., 2009). L'expression des RLRs est ubiquitaire, quoi qu'une infection virale ou la stimulation IFN-I n'induisse rapidement sa sur-expression (Yoneyama et al., 2005). La cascade de signalisation des RLRs se fait *via* MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein), situé au niveau de la membrane extérieure de la mitochondrie, et de MAM (mitochondria associated-membrane) ce qui suggère l'implication des mitochondries dans les réponses IFN, en plus de leurs rôles dans le métabolisme cellulaire (**Figure 2**).

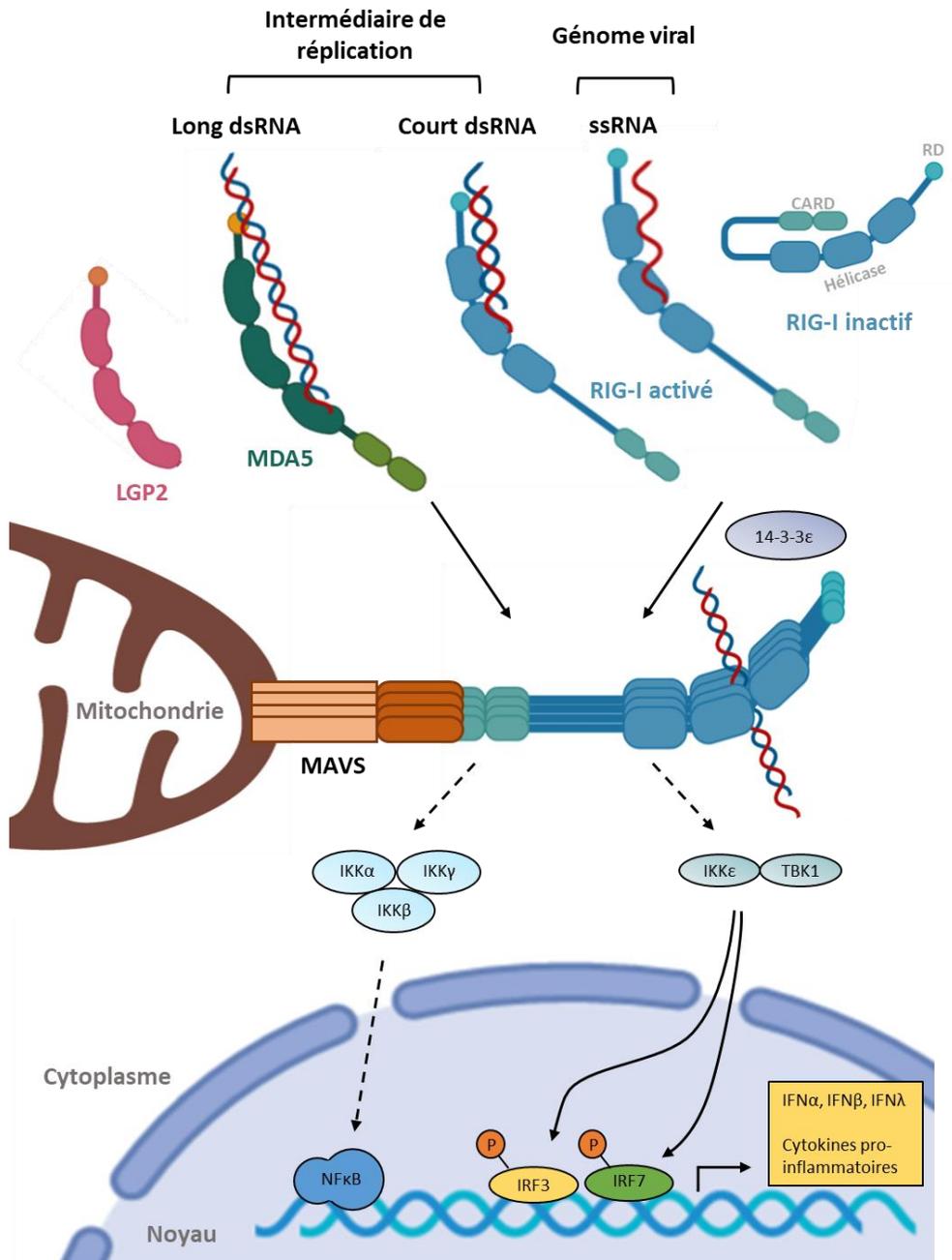


Figure 2 : Voies de signalisations des RIG-like récepteurs

Dans le cas d'absence de ligand, RIG-I et MDA5 existent dans une conformation auto inhibitrice dû à la phosphorylation de leurs domaines CARD et RD. De plus RIG-I adopte une conformation repliée auto inhibitrice. Après engagement du PAMP approprié au niveau du domaine hélicase, MDA5 et RIG-I sont déphosphorylées, activant leur domaine CARD, qui s'associe avec la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial antiviral signaling protein). La protéine chaperonne 14-3-3ε est essentielle pour la translocation de RIG-I aux MAVS. MAVS, aussi connu sous le nom de VISA, IPS-1 ou CARDIF, possède un domaine CARD à son extrémité N-terminale permettant sa liaison avec MDA5 ou RIG-I par des interactions CARD-CARD. MAVS s'assemble en agrégats pour former un complexe de signalisation capable d'activer IKKε et TBK1 à l'origine de la phosphorylation et la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 nécessaires à l'expression des IFN-I et III. L'activation des RLRs va également induire la voie de signalisation NFκB, induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme la famille des interleukines pro-inflammatoires-1 (IL-1) par le biais de l'IL-1β et de l'IL-18 (Chan and Gack, 2016a).

II. La réponse interféron de type I

II. i. Introduction sur les interférons de type I

II. i. i. Les interférons de type I et leur récepteur

La réponse interféron de type I (IFN-I) est largement impliquée dans la protection contre les infections virales et bactériennes. Chez l'humain, le système IFN-I est constitué de 17 ligands différents se liant à un même récepteur. Les IFN-I les mieux définis sont l'IFN α , regroupant un ensemble de 13 sous-types et l'IFN β . La plupart des types cellulaires sont capables de produire de l'IFN β , mais la principale source connue d'IFN-I est la cellule dendritique plasmacytoïde (pDC). Il existe également d'autres IFN-I comme l'IFN ω , IFN κ et IFN ϵ , mais qui ne seront pas détaillés dans ce rapport. Les IFN-I sont des polypeptides sécrétés en réponse à une infection avec 3 fonctions principales :

- (1) Introduire un état de résistance intrinsèque dans la cellule infectée, ainsi que chez les cellules avoisinantes afin de limiter l'infection, en particulier dans le cas de virus en bloquant les différentes étapes de la réplication.
- (2) Moduler la réponse immunitaire innée en promouvant la présentation des antigènes et la production de cytokines ainsi que l'activation des cellules Natural Killers (NK).
- (3) Activer le système immunitaire adaptatif par le développement des réponses T et B hautement spécifiques aux antigènes ainsi que la mémoire immunitaire.

Les IFN-I se lient à un même récepteur, appelé le récepteur à l'IFN α (IFNAR). Il est constitué de 2 sous-unités IFNAR1/IFNAR2 et qui, malgré son nom est bien commun à tous les IFN-I. Bien que le site de liaison des IFN-I à leur récepteur soit similaire, leur affinité pour IFNAR2 est en général plus élevée que celle d'IFNAR1. La liaison de l'IFN-I à la surface des cellules serait donc initiée par leur liaison à IFNAR2, suivis d'IFNAR1 alors recruté à la membrane plasmique pour finaliser le complexe tertiaire de signalisation. Celui-ci est ensuite endocyté par la voie dépendante de la clathrine, et acheminé au niveau des endosomes précoces où IFNAR1 sera ubiquitinylé pour être dégradé par les lysosomes, et IFNAR2 sera recyclé au niveau de la membrane plasmique (Chmiest et al., 2016). De plus, comparé aux autres sous types, l'IFN β semble avoir une affinité plus importante avec IFNAR. Comme pour un grand nombre de récepteurs aux cytokines, le niveau d'expression physiologique basal d'IFNAR1 et d'IFNAR2 est faible et sa distribution aléatoire à la surface des cellules le rend difficile à détecter (You et al., 2014).

II. i. ii. La voie de signalisation des interférons de type I

Seulement les acteurs majeurs de la réponse à l'IFN-I, STAT (signals transducer and activator of transcription) 1 et 2, et leurs voies de signalisation seront détaillés dans ce manuscrit (**Figure 3**). Néanmoins il est important de préciser que les complexes induits par l'IFN-I comprennent également des homodimères constitués des STAT1 à STAT6, ainsi que des hétérodimères (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

La grande majorité des types cellulaires sont capables d'enclencher des réponses à l'IFN-I. Cette réponse est induite par une voie de signalisation canonique, constituée de nombreux composants que sont IFNAR, JAK1, TYK2, STAT1, STAT2 et IRF9. Après fixation de l'IFN-I à son récepteur, le domaine cytoplasmique des sous-unités d'IFNAR s'associe avec différentes protéines adaptatrices *via* la voie de signalisation JAK/STAT. Les protéines clés appartenant à la famille des Janus Kinases (JAK), comme JAK1 et TYK2, s'associent respectivement avec IFNAR2 et IFNAR1 pour phosphoryler les formes cytoplasmiques latentes des protéines STAT1 et STAT2. Ces molécules forment ensuite des hétérodimères pSTAT1/pSTAT2 pour être transloqué au noyau où ils s'associent avec IRF9 (interferon regulatory factor 9) pour créer le complexe de transcription ISGF3 (Interferon Stimulated Gene Factor). ISGF3 reconnaît alors des séquences d'ADN apparentées que sont les ISRE (Interferon-sensitive response element), permettant la transcription des ISGs (Interferon-stimulated genes) (**Figure 3**). Une dimérisation des sous-unités d'IFNAR permet également une interaction entre JAK1 et TYK2 à l'origine d'une phosphorylation croisée des kinases amplifiant leur activité. La voie de signalisation canonique de l'IFN-I induit des centaines d'ISGs différents (MacMicking, 2014; Schoggins et al., 2012; Stark and Darnell, 2012). Ces ISGs sont des molécules effectrices de l'état antiviral, en inhibant la transcription, traduction et réplication virale ainsi qu'en favorisant la dégradation d'acides nucléiques et en altérant le métabolisme lipidique cellulaire (MacMicking, 2014).

Des chercheurs ont observé que l'augmentation de l'expression de certains ISGs chez des fibroblastes humains, stimulés par de l'IFN β , se faisait dans les 24 heures suivants le traitement et qu'elle était soutenue à des niveaux importants pendant près de 72 heures (Cheon et al., 2013). En revanche, bien que l'expression des protéines STAT1, STAT2 et IRF9 suivait une cinétique similaire aux ISGs induits, leurs phosphorylations n'étaient que transitoires et disparaissaient après 48H (Cheon et al., 2013). Ces observations illustrent l'existence des voies de signalisation non canoniques, différentes de celles préalablement décrites et capables de maintenir la réponse IFN-I en absence de nouvelle

stimulation. Notamment, les protéines STATs sont capables de continuer leur fonction de navigation entre le compartiment cytosolique et nucléaire, indépendamment de leur phosphorylation (Begitt et al., 2000; Meyer et al., 2002). Les formes non phosphorylées des STATs (U-STATs) participent également à la voie de signalisation de l'IFN-I. Ces dernières existent pour toutes les STATs et possèdent des fonctions distinctes de leur forme phosphorylée. U-STAT1 et U-STAT2, forment avec IRF9 un complexe ISGF3 non phosphorylé (U-ISGF3) (**Figure 3**). Sa formation requiert un niveau d'expression élevé de STAT1 et STAT2 ainsi que d'IRF9. Alors que la forme phosphorylée d'ISGF3 induit une réponse rapide par sa liaison au ISRE canonique, U-ISGF3 conduirait une seconde réponse, plus longue, en se liant à un ISRE distinct (Cheon and Stark, 2009). Ainsi une exposition prolongée des cellules à l'IFN-I et l'accumulation de STAT1, STAT2 et IRF9 pourraient favoriser la formation du complexe U-ISGF3, qui maintiendrait à son tour l'expression d'ISGs impliqués dans la résistance antivirale et les dommages à l'ADN (Cheon et al., 2013). La forme phosphorylée de STAT2 peut également interagir avec IRF9, indépendamment de STAT1, pour former un complexe similaire à ISGF3 et permettre une activité antivirale en absence de STAT1 (**Figure 3**) (Abdul-Sater et al., 2015; Platanitis et al., 2019). Cette stimulation d'ISG par les complexes STAT2-IRF9 pourrait servir de soutien contre des pathogènes capables d'inhiber la voie de signalisation de STAT1. En effet, des souris STAT1^{-/-}, en dépit de leur capacité à former le complexe ISGF3, étaient toujours capables d'induire une réponse ISG à une infection par DENV (Perry et al., 2011).

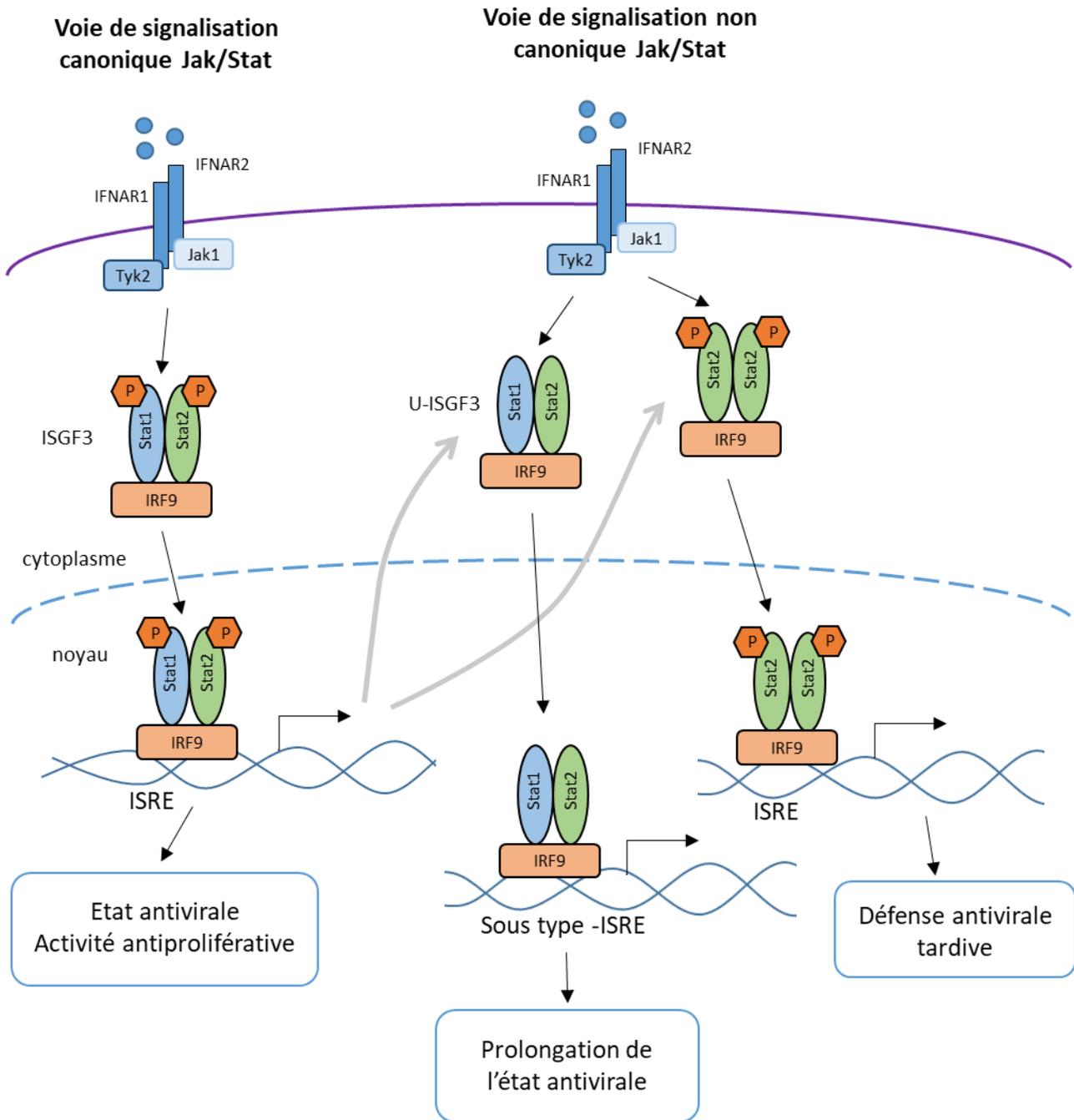


Figure 3 : Voie de signalisation canonique et non canoniques de la réponse IFN-I

La voie de signalisation canonique consiste en la phosphorylation de STAT1 et STAT2 par les kinases TYK2 et JAK1. Les formes phosphorylées de STAT1 et STAT2 se regroupent pour former un hétérodimère s'associant avec IRF9 pour former le complexe ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) qui contrôle l'expression des ISGs (IFN-stimulated genes) en se liant à des ISRE (IFN- sensitive response element). La voie de signalisation canonique entraîne la régulation positive des composants du complexe ISGF3 incluant des protéines STATs ainsi que IRF9. Cette stimulation va favoriser la formation du complexe ISGF3 en absence de phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 capable de stimuler des ISGs et de prolonger la réponse IFN-I. Une phosphorylation importante de STAT2 entraîne la formation d'un complexe actif constitué d'un homodimère STAT2 phosphorylé associé avec IRF9 à l'origine d'une réponse tardive de la transcription d'ISG (Majoros et al., 2017).

II. i. iii. Les mécanismes de protection antiviraux des interférons de type I

Comme indiqué précédemment, la fonction antivirale de l'IFN-I est largement attribuable à l'induction de l'expression des ISGs. Parmi ces ISGs certains sont notamment impliqués dans les réponses aux virus à ARN et à l'origine d'une variété importante de protéines antivirales comme les protéines IFITs et IFITMs, la GTPase MxA, la kinase PKR ou encore la RNase L qui seront détaillés dans ce chapitre (McNab et al., 2011; Yan and Chen, 2012).

L'IFN-I promeut l'expression d'ISGs aux actions antivirales directes définies comme des mécanismes de défense généraux. On y retrouve chez l'homme la famille des protéines IFITs (Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats) induites par l'IFN. Ces protéines cytoplasmiques, sont au nombre de 4 : IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) et IFIT5 (ISG58). La majorité des ARNs cellulaires possèdent une coiffe 5' contenant une région 2'-O-méthylée qui stabilise l'ARN afin de permettre sa traduction. Néanmoins, certains ARNs viraux tel que le génome de HCV (Hépatite C virus), traduits par un IRES (internal ribosome entry site), sont dépourvus de coiffe en 5'. D'autres, comme celui du virus de la grippe possèdent une coiffe en 5' contenant une région 2'-O-méthylée mais associée à un groupe triphosphate. Ces différences permettent à ces protéines de discriminer l'ARN viral de l'ARN cellulaire en se liant aux ARNs contenant un segment triphosphate au niveau de leur coiffe 5' ou ne possédant pas de région 2'-O-méthylée (Pichlmair et al., 2011; Züst et al., 2011). La fixation des protéines IFITs aux ARNs viraux inhibe leurs répliquons et leurs traductions. De nombreux virus répliquant dans le cytoplasme des cellules eucaryotes ont d'ailleurs évolués en développant leur propre 2'-O-méthyltransférases afin de modifier leur ARNm.

Les gènes IFITMs (interferon induced transmembrane protein), codant pour des protéines de même nom, sont une autre famille d'ISGs incluant IFITM1, IFITM2, IFITM3. L'essentiel des travaux sur les mécanismes de l'action antivirale des protéines IFITMs ont été réalisés sur le virus influenza, contre lequel elles inhibent l'entrée du virus dans la cellule cible (Tartour and Cimarelli, 2015). Néanmoins leur action antivirale a également été reportée dans le cas du virus de la DENV ou de WNV (Schoggins et al., 2011).

MxA (Myxovirus Resistance Protein A) est une GTPase humaine possédant un large spectre d'action antiviral. Les virus sont inhibés à un stage précoce de leur cycle de vie, rapidement après leur entrée dans la cellule hôte et avant l'amplification de leur génome. La protéine MxA humaine s'accumule dans le cytoplasme et au niveau du réticulum endoplasmique où elle forme une plateforme facilitant la reconnaissance et piégeant les structures de type nucléocapside (Gao et al., 2011). A la fois la

protéine kinase dépendante de l'ARN double brin (PKR) et la 2',5'-oligoadenylate synthétase (OAS) vont inhiber le cycle de réplication viral en bloquant la traduction de l'ARN viral ou en favorisant sa dégradation. Leur implication a notamment été démontrée dans le contrôle d'une infection par DENV (Warke et al., 2003). PKR est présente à l'état inactif dans le cytoplasme de cellules non infectées. Son activation repose sur son interaction avec le dsRNA généré lors de la réplication du génome viral. Cette interaction permet la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation eucaryote-2 entraînant une inhibition généralisée de la traduction cellulaire et par conséquent la synthèse des protéines virales (Zhang et al., 2014). La présence des dsRNA dans le cytoplasme des cellules infectées active également la 2',5'-oligoadenylate synthétase (OAS), qui activera à son tour la RNase L, impliquée dans la dégradation des ssRNA riches en séquences uridines.

II. ii. Régulation de la réponse interféron de type I

II. ii. i. La régulation positive de la réponse interféron de type I

Les protéines STAT1 et IRF9 étant des ISGs, leur expression est induite par l'IFN. Ainsi on comprend qu'une première boucle d'amplification est mise en place par l'augmentation de l'expression de ces molécules de signalisation suite à une réponse IFN-I. En effet un niveau plus important d'expression de STAT1 entraîne une meilleure interaction et activation par IFNAR et, concernant IRF9, favorise l'ancrage d'ISGF3 aux gènes cibles. Il est intéressant de noter que de très faibles concentrations d'IFN-I sont suffisantes pour augmenter l'expression de STAT1. De plus une expression importante de STATs et d'IRF9 peut entraîner une expression soutenue de différents ISGs même en absence de phosphorylation des JAKs et STATs (Cheon et al., 2013). L'amplification de la réponse implique également une augmentation de la phosphorylation des protéines STATs, *via* les tyrosines kinases comme SYK et PYK2. La phosphorylation des sérines sur STAT1 permet également une augmentation de son activité transcriptionnelle. D'autres cytokines comme l'interféron de type II (IFN-II) et l'interleukine 6 (IL-6) sont également capables d'activer les protéines STATs (Hu et al., 2002, 2005; Levy et al.; Tassiulas et al., 2004). Il a également été observé une coopération entre les protéines STATs et d'autres facteurs de transcription, notamment ceux appartenant à la famille des IRFs (Tamura et al., 2008). Les protéines STATs, ISGF3 et IRFs coopèrent entre elles pour induire de nombreux ISGs en se liant de façon coordonnée à des motifs apparentés de séquence situés dans les régions promotrices des gènes. En effet les séquences d'ADN reconnues par la plupart des IRFs chevauchent des ISRE. Ainsi les IRFs peuvent reconnaître et activer des cibles identiques à ISGF3.

De plus un nombre important de protéines IRFs sont des ISGs comme IRF1, IRF7, IRF8 et IRF9 formant alors une nouvelle boucle d'expression de gènes induits par l'IFN. Ainsi l'activation de certains ISGs par les protéines STATs et ISGF3 va pouvoir activer un second groupe d'ISGs dont l'induction est elle-même dépendante de la synthèse de nouvelles protéines (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

II. ii. ii. Régulation négative de la réponse interféron de type I

Une action prolongée ou trop importante des IFN-I peut être délétère pour l'organisme, il est donc important que celle-ci soit régulée. La suppression de la voie de signalisation de l'IFN-I par les cellules peut se faire à la fois *via* la diminution de l'expression membranaire d'IFNAR, par l'induction de régulateurs négatifs comme les protéines SOCS (suppressor of cytokine signalling) ou USP18 (Ubiquitin hydrolase carboxy-terminal hydrolase 18) ainsi que l'induction de miRNAs. Un défaut dans l'un de ces trois systèmes, ainsi qu'une expression importante et constante d'IFN-I est associée avec de nombreuses maladies auto-immunes (Crow and Ronnblom, 2019). L'internalisation d'IFNAR peut être induite par de nombreuses voies de signalisation (Fuchs, 2013; de Weerd and Nguyen, 2012). Parmi ces voies, celles induites par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, les TLRs, les récepteurs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ainsi que les voies du stress métabolique ou oxydatif (Bhattacharya et al., 2013; Fuchs, 2013; HuangFu et al., 2012; Huynh et al., 2012). Un exemple connu est la phosphorylation du récepteur IFNAR1 par la kinase p38, qui induit sa phosphorylation *de novo* par la kinase caséine II (CK-2) entraînant alors son ubiquitylation suivit de son internalisation et de sa dégradation par les lysosomes (Fuchs, 2013). De manière intéressante, l'endocytose du récepteur n'abroge pas immédiatement sa signalisation et dans certains cas, son endocytose après activation par de l'IFN-I a même été démontré comme nécessaire à la voie de signalisation dépendante des STATs (Marchetti et al., 2006). En effet, alors que les sous-unités du récepteur sont hautement diluées au niveau de la membrane plasmique, son internalisation par les endosomes précoces concentrerait localement l'IFN et son récepteur. En plus de la dégradation d'IFNAR, des voies de signalisation croisées entre les TLRs et des récepteurs possédant le motif ITAM, sont également capables de supprimer la signalisation induite par IFNAR en recrutant PKC β et PKC δ (Du et al., 2005; Huynh et al., 2012; Wang et al., 2010). La réponse IFN-I induit également les ISGs de la famille SOCS (SOCS1, SOCS3) et USP18 (Yoshimura et al., 2007) (Sarasin-Filipowicz et al., 2009) qui agissent comme boucle de rétrocontrôle négative pour limiter sa réponse dans l'espace

et dans le temps. Les protéines SOCS rentrent en compétition avec les protéines STATs dans leurs liaisons à la forme phosphorylée de Tyk2 et suppriment ainsi l'activité des JAKs. USP18 se lie spécifiquement à IFNAR2 empêchant son interaction avec JAK1. Alors que l'endocytose du récepteur se déroule immédiatement après l'activation du récepteur, la régulation par SOCS1 et USP18, qui sont des ISGs, apparaît quelques heures suivant l'activation du récepteur.

II. ii. iii. Les effets délétères de la réponse interféron de type I

Une réponse IFN-I mal régulée peut à la fois induire une réponse inflammatoire exacerbée qui va amplifier la maladie (Davidson et al., 2014) mais également des effets immunosuppresseurs capables d'entraver la réponse antivirale (Biron, 2001). Ainsi, l'implication des réponses IFN-I dans les infections virales chroniques ou encore dans l'auto-immunité, sont infiniment plus complexe. Dans le cas d'infection par HIV, il a été observé que l'expression du couple de récepteur ligand DR5-TRAIL était accrue par de hauts niveaux d'IFN-I et capables d'entraîner la mort des lymphocytes (Hardy et al., 2007). En effet, dans une étude s'intéressant à des patients atteints par HIV, les patients « progresseurs » avaient une production plus importante d'IFN-I par leurs pDCs, ainsi qu'une expression accrue de DR5-TRAIL comparés aux « non progresseurs à long terme » (Herbeuval et al., 2006). Une apoptose dépendante de DR5 ou TRAIL en réponse à l'IFN-I exogène a également été reporté *in vitro* dans le cas d'une infection par le virus de l'hépatite C (HCV) (Liedtke et al., 2006; Shigeno et al., 2003; Toomey et al., 2001), même si l'effet immunosuppresseur de l'IFN-I en lien avec la pathologie de HCV n'a pas été déterminé. Un effet délétère de l'IFN-I est aujourd'hui avéré dans certaines maladies auto-immunes. Par exemple, les cas de lupus érythémateux disséminé (SLE) sont généralement associés avec un niveau d'expression accru de STAT1 par les cellules myéloïdes, à l'origine d'une expression élevée d'ISG (appelée signature IFN) (Hall and Rosen, 2010). De plus des études ont montré qu'une signalisation IFN-I de longue durée, dans le cas d'une infection persistante par LCMV, était associée avec un effet immunosuppresseur *in vivo*. L'utilisation d'anticorps anti-IFNAR1 chez des souris chroniquement infectées accélèrent le contrôle de l'infection par LCMV *via* un mécanisme dépendant des cellules T CD4+ (Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). Néanmoins il également été observé des cas de développement accrus de maladies auto immunes chez des humains et des souris qui avaient une réponse IFN-I détériorée (Ivashkiv, 2013; Wang et al., 2013).

III. Les cellules dendritiques plasmacytoides

III. i. Caractéristiques des cellules dendritiques plasmacytoides

III. i. i. Introduction sur les cellules dendritiques plasmacytoides

L'identification des cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) comme un seul et unique type cellulaire remonte aux travaux de Liu et Colonna en 1999 (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Cette description est basée sur des recherches antérieures qui ont mené à définir la notion de pDCs sur leur propriété essentielle qu'est la sécrétion d'IFN-I en réponse aux infections virales, mais également sur leur capacité à se différencier en cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) *in vitro*. Les pDCs sont produites en continu dans la moelle osseuse, où elles mûrissent avant de rejoindre la périphérie. Incapables de se diviser et possédant une durée de vie réduite à quelques jours (Zhan et al., 2016), les pDCs résident et circulent essentiellement au travers des organes lymphoïdes qu'elles rejoignent *via* le sang où elles représentent entre 0.2 et 0.5% des cellules nucléées. A l'état basal, elles possèdent la morphologie ronde des lymphocytes circulants et expriment un faible niveau de CMH-II. Elles expriment également une quantité importante de TLR7 et TLR9, les récepteurs endosomaux aux acides nucléiques. La détection des acides nucléiques par ces récepteurs conduit à une sécrétion massive et rapide d'IFN-I. Une fois activées, en plus de leur fonction importante de production d'IFN-I, les pDCs sont capables de produire de l'IFN λ ou IFN de type III (IFN-III) aussi appelé IL-28/29 par la voie de signalisation IRF7, ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α induit par la signalisation NF κ B (**Figure 4**) (Gilliet et al., 2008; Reizis et al., 2011). Elles peuvent également exercer des fonctions de présentation d'antigène et de cross présentation même si cette dernière a été récemment controversée (**Figure 4**) (Embgenbroich and Burgdorf, 2018; See et al., 2017). Néanmoins il n'est pas clair si ces procédés ont lieu en parallèle dans une même cellule ou s'ils représentent des fonctions distinctes de pDCs. En effet la question de l'hétérogénéité au sein des pDCs se pose car il a été observé que seulement une fraction des pDCs étaient capables de produire de l'IFN-I (Bauer et al., 2016; Tomasello et al., 2018a). En accord, de récentes études ont ainsi montrées qu'après activation, les pDCs humaines étaient capables de générer des populations distinctes axées soit sur la production d'IFN-I soit sur la présentation antigénique, *via* l'expression de co-facteurs de stimulation incluant CD80 (Alcumbre et al., 2018). Les pDCs sont également extrêmement résistantes aux infections virales. Bien qu'encore à éclaircir, cet attribut serait dû à l'expression importante d'IRF7 à l'état basal, permettant aux pDCs une réponse rapide et de forte intensité. Récemment l'implication de la protéine

Rab15 dans la résistance des pDCs, et plus largement des cellule dendritiques humaine CD141+, aux infections contre le virus influenza et HIV a également été rapporté (Silvin et al., 2017).

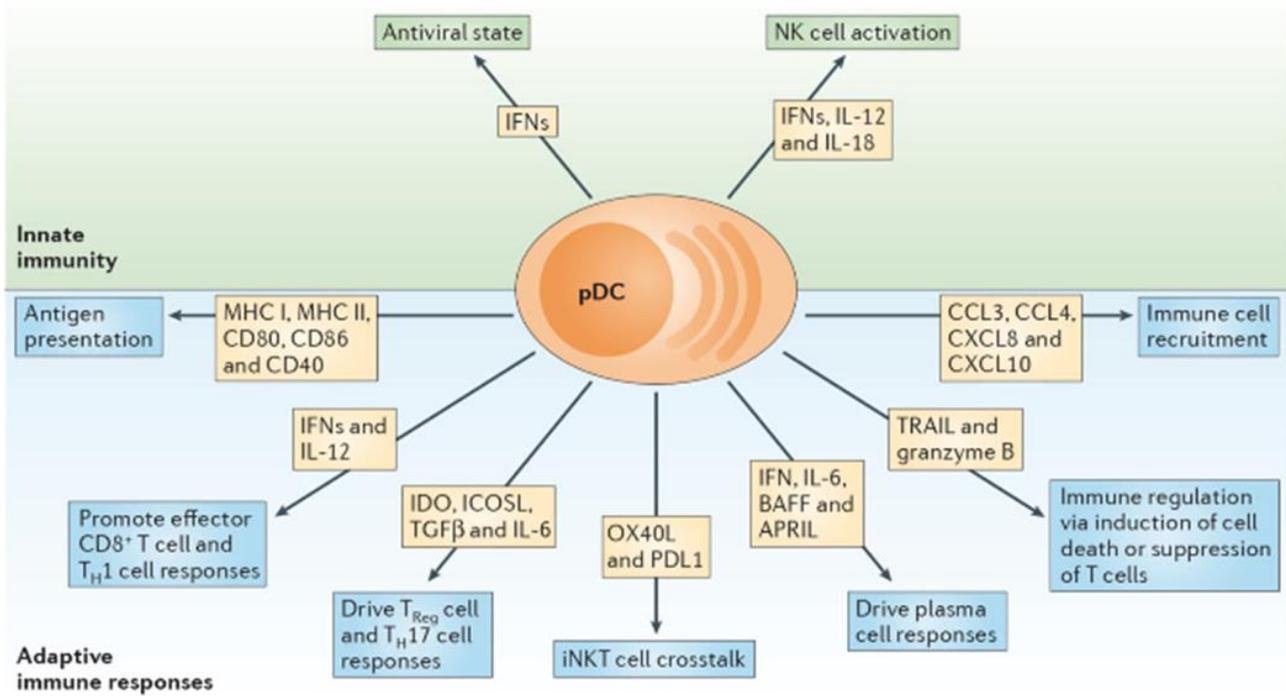


Figure 4 : Les différentes fonctions des cellules dendritiques plasmacytoides

Les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) produisent de l’interféron de type I (IFN-I) en réponse à des infections virales et promeuvent l’expression d’ISGs (interferon stimulated genes) induisant la mise en place d’un état antiviral et l’apoptose des cellules infectées. L’IFN-I, l’interleukine (IL)-12 et 18 augmentent l’activation et les fonctions effectrices des cellules NK (Natural killer). L’expression du complexe majeur d’histocompatibilité (MHC) de type I et II, accompagné des marqueurs de costimulation comprenant CD80, CD86 et CD40 permettent aux pDCs d’activer les cellules T CD8+ et de présenter des antigènes aux cellules T CD4+. L’IFN-I et l’IL-12 vont supporter la fonction effectrice des cellules T CD8+ ainsi que la différenciation des cellules T CD4+ en cellules Th1 (T helper 1 cells). La sécrétion de chémokines pro-inflammatoires comprenant CXCL8, CXCL10, CCL3 et CCL4 attirent les cellules immunitaires aux sites d’infection ou d’inflammation (Swiecki and Colonna, 2015).

III. i. ii. Ontogénie et maturation des cellules dendritiques plasmacytoides

Il n'existe pas de consensus établi sur la capacité des pDCs à dériver de progéniteurs myéloïdes (CMP) ou lymphoïdes (CLP), l'implication et l'importance de chacune de ces deux voies de différenciation dans le développement des pDCs faisant aujourd'hui débat. Il existerait également des différences fonctionnelles et transcriptomiques entre les pDCs dérivées de CMP ou de CLP (Rodrigues et al., 2018). De manière similaire aux cellules dendritiques communes (cDCs), les pDCs expriment le récepteur aux chémokines Flt3 (CD135) et son extrêmement dépendantes de son ligand Flt3L pour leurs développements. En effet, la présence de Flt3L seul, est suffisant pour permettre le développement de pDCs à partir des CMPs et des CLPs (Sathe et al., 2013). La principale voie de différenciation reconnue était celle des CMP, donnant naissance aux progéniteurs communs des cellules dendritiques (CDP), à l'origine de pDCs et de cDCs (Onai et al., 2013). Des chercheurs avaient observés, *in vivo*, qu'en marquant spécifiquement les CDPs, la majorité des pDCs produites l'étaient également (Loschko et al., 2016). De plus, il a été observé que la cinétique de développement des pDCs à partir des cellules souches *in vivo* était proche de celle des cellules myéloïdes (Upadhaya et al., 2018). Néanmoins les pDCs expriment plusieurs gènes spécifiques de la lignée lymphoïde comme les gènes Rag1 et Rag2 impliqués dans la recombinaison V(D)J à l'origine du répertoire considérable d'anticorps et de TCR retrouvé chez les lymphocytes B et T. De plus les pDCs partagent plusieurs gènes très spécifiques avec les lymphocytes B, comme le facteur de transcription SpiB (Sasaki et al., 2012). Il avait ainsi été ainsi proposé que les pDCs, pouvaient également appartenir à la lignée lymphoïde. Ces observations ont récemment été soutenue par l'identification de progéniteurs *in vivo* possédant un potentiel majeur de différenciation en pDC, bien plus élevé que celui des CMP (Rodrigues et al., 2018). De plus l'équipe de Florent Ginhoux a récemment confirmé que les pDCs étaient capables de se développer à partir de progéniteurs lymphoïdes IL-7R α ⁺LyD6D⁺SiglecH⁺, indépendamment de la lignée myéloïde des cDCs (Dress et al., 2019). Ainsi il existe plusieurs arguments en faveur d'une origine myéloïde ou lymphoïdes des pDCs suggérant plusieurs voies de différenciation, mais toutes régulées par un programme de différenciation élaboré qui assure *in fine* leur fonctionnalité.

La bifurcation entre les DCs et les pDCs à partir des CDP est permise par l'expression de facteurs de transcriptions différents, le programme de développement des DCs étant contrôlé par PU.1, alors que celui menant aux pDCs étant dirigé par TCF4 (E2-2) (Ghosh et al., 2010; Nagasawa et al., 2008). L'expression du programme de différenciation des pDCs semble également être initié chez les

progéniteurs exprimant IRF8 (Upadhaya et al., 2018). TCF4 est exprimé dans tous les progéniteurs hématopoïétiques et peut amplifier sa propre expression, soulignant une potentielle boucle de régulation positive dans le développement des pDCs (Grajkowska et al., 2017). Celui-ci exerce sa fonction à l'aide de son cofacteur MTG16, mais également en présence d'autres facteurs comme BCL11A (Ghosh et al., 2014). TCF4 se lie directement à différents acteurs responsables de la différenciation en cDCs que sont ITGAX (CD11C) ou ID2, pour les inhiber. En effet la protéine ID2 est capable de perturber le programme transcriptionnel dirigé par TCF4 pour favoriser le développement de cDCs. Ainsi la répression transcriptionnelle d'ID2 par TCF4 et l'inhibition post traductionnelle de TCF4 par ID2 suggère que ces deux facteurs antagonistes jouent un rôle déterminant quant à la différenciation des progéniteurs (Ghosh et al., 2010). TCF4 est un homologue aux facteurs de transcription TCF3 et TCF12, qui sont des régulateurs clés du développement des lymphocytes. Tous ces facteurs de transcription reconnaissent la même séquence et partagent les mêmes gènes cibles (Ghosh et al., 2014). De manière intéressante, la délétion de TCF4 dans des pDCs matures induit un changement vers une morphologie dendritique accompagnée d'une signature génétique des cDCs (Ghosh et al., 2010). Ce control transcriptionnel permet de distinguer les pDCs des cDCs et serait impliqué dans les similarités transcriptomiques, retrouvées entre les pDCs et les CLP.

III. i. iii. Activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par reconnaissance de l'infection virale

Chez l'homme les pDCs expriment les TLR7 et TLR9 (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001a; Liu, 2004). Comme indiqué précédemment, TLR7 permet aux pDCs de répondre suite à une infection par des virus à ssRNA (e.g., Influenza, VSV, DENV, HCV...) et TLR9 dans le cas d'une infection par des virus à ADN (e.g., MCMV, HSV-1, HSV-2...). Les pDCs n'expriment pas RIG-I à l'état basal, mais il a été montré que son expression pouvait être induite après une stimulation des TLRs. Des chercheurs ont ainsi proposé un modèle dans lequel la réponse TLR médiait la première phase d'induction d'IFN-I alors que RIG-I contribuait à la phase tardive des réponses des pDCs (Bruni et al., 2015; Szabo et al., 2014). Néanmoins des pDCs isolées à partir de souris RIG-I^{-/-} n'ont montré qu'un léger défaut de production d'IFN α en réponse à la stimulation par le virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Kato et al., 2005), suggérant l'utilisation par les pDCs de mécanismes indépendant de RIG-I. Les TLRs jouent alors un rôle prépondérant dans l'induction de la réponse IFN-I et l'utilisation

exclusive de ces voies de signalisation pour la reconnaissance des acides nucléiques suggère une fonction unique de ces cellules dans le système immunitaire.

Les différentes réponses des pDCs aux acides nucléiques illustrées par l'exemple des oligodéoxynucléotides (ODN) possédant un motif CpG hypométhylé (CpG ODNs).

Il a été observé que les pDCs étaient capables de répondre distinctement par la voie TLR9 à deux classes de CpG ODNs :

- i) le CpG ODNs de type A (CpG-A) qui induit une réponse médiée par IRF7 déclenchant une forte production d'IFN-I chez les pDCs.
- ii) le CpG ODNs de type B (CpG-B) qui déclenche principalement une réponse médiée par NFκB, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et l'IL6, ainsi que la régulation positive des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et l'expression de CMH de classe II (Kadowaki et al., 2001b; Kerkmann et al., 2003) .

Cette bifurcation de réponse de la part des pDCs serait due aux différences structurales existantes entre ces deux types de CpG, à l'origine d'une cinétique de réponse différente. Le CpG-A possède une queue polyG permettant la formation de complexe multimérique d'environ 50 nm de diamètre, qui seront retenus plus longtemps dans les endosomes précoces. Inversement, le CpG-B étant monomérique et incapable de former des structures tertiaires, transit plus rapidement des endosomes précoces vers les endosomes tardifs. Cette différence de temps de rétention peut expliquer la disparité de réponse observée : une durée prolongée de rétention au niveau des endosomes précoces de la voie endo-lysosomale favoriserait la formation d'une plateforme constituée de MyD88 et IRF7 à l'origine d'une production d'IFN-I robuste (Guiducci et al., 2006; Honda et al., 2005). De manière cohérente, lorsque le CpG-A est dissocié en monomère, n'étant plus retenu dans les endosomes précoces, il devient incapable d'induire de haut niveau d'IFN-I mais induit la maturation des pDCs ainsi que la production de TNFα et d'IL6 *via* les activations transcriptionnelles NFκB. Inversement, l'encapsidation de CpG-B, permettant leur rétention dans les endosomes précoces, conduit à l'induction de niveaux important d'IFN-I, accompagné d'une maturation atténuée et de niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats supportent le lien existant entre la localisation dans le compartiment endosomal des ligands du TLR9 et les réponses induites.

En raison de leur résistance accrue aux infections virales, les pDCs doivent être capables de reconnaître des virus incapables de les infecter. Cette reconnaissance est permise par les TLRs endosomaux,

comme soutenue par la capacité des pDCs à répondre à des particules virales du virus influenza inactivé par UV et donc incapable de se répliquer (Kumagai et al., 2009; Lund et al., 2003). En revanche, d'autres virus tel que VSV, n'induisent une réponse IFN-I que lors d'une répllication active (Hornung et al., 2004). Dans ce dernier cas, l'autophagie a été proposée comme mécanisme d'adressage, par lequel l'ARN viral pourrait rejoindre le compartiment endosomal (Lee et al., 2007). De plus l'analyse de la réponse des pDCs humaines au RRV ou au LCMV a permis d'identifier que la répllication virale et la production d'IFN-I avaient lieux dans des cellules différentes au sein de la population de pDCs, les cellules infectées ayant une production d'IFN α altérée (Deal et al., 2010; Macal et al., 2012).

Une caractéristique importante de la reconnaissance virale par les pDCs est la nécessité de former des contacts physiques directe avec les cellules infectées conduisant à la production l'IFN-I. Cette capacité des pDCs a été introduite par une étude sur le virus de l'hépatite C (HCV) où les pDCs étaient capables de produire de l'IFN-I qu'en interagissant physiquement avec les hépatocytes infectées et non pas avec le virus libre (Takahashi et al., 2010). Plus tard il a été démontré que cette reconnaissance était dépendante de TLR7 et qu'elle passait par le transfert d'exosomes contenant l'ARN viral de la cellule infectée vers la pDCs (Dreux et al., 2012a). Ce transfert étant de faible porté, des contacts cellulaires sont nécessaires. Cette caractéristique a ensuite été élargie à de nombreux virus à ARN comme LCMV, HAV, DENV, WNV, YFV où les ARNs viraux en court de répllication seraient transférés *via* des particules immatures ou des virions enveloppés. (Décembre et al., 2014a; Feng et al., 2015; Lepelley et al., 2011; Webster et al., 2016).

III. ii. Les fonctions des cellules dendritiques plasmacytoides

III. ii. i. L'activation des cellules dendritiques plasmacytoides

La fonction de protection antivirale des pDCs repose sur la production rapide et importante d'IFN-I. En effet dans les 6 heures suivant leur activation par un virus, les pDCs dédieent environ 60% de leur transcriptome aux gènes permettant la production d'IFN-I (Ito et al., 2006). Cet engagement permet une production d'IFN-I environ 200 à 1000 fois plus importante que n'importe quel autre type de cellule sanguine (Siegal et al., 1999). De plus, l'utilisation de la voie de signalisation des TLRs endosomaux, *via* la protéine adaptatrice MyD88 et le facteur de transcription IRF7, comme voie principale de production d'IFN-I est tout à fait spécifique aux pDCs. Néanmoins cette voie de signalisation n'est pas exclusive et peut également conduire à la mise en place d'une signalisation NF κ B induisant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Les voies de détection

intracellulaires passant par cGAS/STING ainsi que RIG-I en réponse aux virus à ARN et à ADN sont également présentes chez les pDCs (Bode et al., 2016; Bruni et al., 2015; Kumagai et al., 2009). Dans la plupart des types cellulaires, le facteur de transcription IRF7 est généralement faiblement exprimé ou absent dans l'attente d'être induit par une première vague d'IFN-I. En effet IRF7 étant un ISGs, celui-ci est induit par la boucle de régulation positive incluant IFNAR. Dans le cas des pDCs, même quiescente, celles-ci vont exprimer de hauts niveaux d'IRF7 et ainsi être capables de sécréter rapidement de l'IFN-I sans avoir recours à la boucle de régulation positive (Barchet et al., 2002). En effet IFNAR a été montré comme étant dispensable dans la réponse des pDCs à certains virus comme MCMV *in vivo* même si celui-ci apparaît nécessaire pour induire une réponse complète de la part des pDCs suite à une induction par CpG (Tomasello et al., 2018a). Récemment, l'implication d'une boucle d'amplification paracrine médiée par l'IFN-I a également été rapportée sur des pDCs stimulées par des ligands TLRs où la densité cellulaire influence directement la production d'IFN α (Wimmers et al., 2018a). Néanmoins ce nouvel aspect de coopération entre pDCs dans la modulation de leur activation par l'IFN-I nécessite d'être approfondie dans le cas des infections virales. Différents facteurs de transcription comme Spi-B et NFAT3C vont également interagir avec IRF7 pour induire l'activation des gènes IFN-I (Bao et al., 2016; Sasaki et al., 2012). Ces études démontrent un réseau transcriptionnel complexe qui va permettre aux pDCs de maintenir leur capacité à répondre rapidement.

III. ii. ii. La régulation négative des cellules dendritiques plasmacytoides

La capacité importante des pDCs à produire de l'IFN-I nécessite la présence de mécanismes inhibiteurs. Ces mécanismes passent notamment par des récepteurs comme CXCR4 et CD44, capables d'inhiber l'activation des pDCs en réponse à des monoamines naturels et à la galectin-9 respectivement (Panda et al., 2018; Smith et al., 2017). D'autres récepteurs inhibiteurs comme CD28, largement partagés entre les lymphocytes, sont également impliqués chez les pDCs. De manière plus spécifique aux pDCs, des récepteurs comme BDCA-2 et ILT7 inhibent les réponses des pDCs lors de leur liaison avec des anticorps en engageant la voie de signalisation ITAM (Jähn et al., 2010; Pellerin et al., 2015; Tsukamoto et al., 2009). BDCA-2 est une lectine de type C qui lie de multiples glycoprotéines incluant les immunoglobulines, laissant apparaître l'idée que la réponse anticorps serait capable d'inhiber l'activation des pDCs par ce mécanisme. ILT-7 quant à lui est un récepteur du type immunoglobuline dont le seul ligand est la tetherin (aussi appelé BST2), une protéine membranaire antivirale, induite

par l'IFN (Cao et al., 2009). ILT-7 serait alors impliquée dans une boucle de régulation négative en réponse à la production d'IFN par les pDCs. Un autre récepteur impliqué est PTPRS, exprimé dans de nombreux tissus mais hautement spécifique des pDCs. La ligation de PTPRS à des proteoglycanes heparanes sulfates inhibe l'activation des pDCs, ce qui en ferait un mécanisme de contrôle, dépendant de l'intégrité de la matrice extracellulaire (Bunin et al., 2015). La régulation négative des pDCs est indispensable à leurs fonctions, comme illustré par le récepteur BDCA-2, spécifique des pDCs et impliqué dans des mécanismes d'inhibition. L'étude de ces mécanismes pourrait permettre le développement de cibles thérapeutiques pour l'inhibition de l'activation des pDCs dans le cas de maladies auto immunes ou de cancers. Enfin la régulation des pDCs passe également par leur apoptose massive, suite à leur activation, en raison de l'IFN-I produit (Swiecki et al., 2011).

III. ii. iii. Dérèglement de la réponse des cellules dendritiques dans l'auto-immunité

Les pDCs étant le principal type cellulaire producteur d'IFN-I, leur rôle dans les maladies auto immunes a vite été proposé. Ainsi une activité excessive des pDCs est retrouvée dans des maladies auto immunes ou inflammatoires. C'est notamment le cas dans le diabète de type 1 où une infiltration de pDCs dans les îlots pancréatiques chez des souris NOD a été observée. La déplétion génétique des pDCs dans ce même model murin améliorait significativement l'incidence du diabète (Hansen et al., 2015). L'exemple type d'implication des pDCs dans l'auto-immunité est celui du Lupus Erythémateux Disséminé (SLE), même si les signaux initiateurs responsables de l'hyperactivation des pDCs, et le mode de reconnaissance restent encore à être déterminés (Sisirak et al., 2014). SLE est une maladie systémique induite par la formation d'auto-anticorps relargués au moment de la mort cellulaire et reconnaissant les acides nucléiques, ou des protéines liées aux acides nucléiques, formant des complexes immuns capables d'activer les pDCs (Panda et al., 2017). Dans sa forme clinique, il a été rapporté que le SLE était associé avec une réduction du nombre de pDCs en périphérie et leur accumulation simultanée dans les tissus concernés (Blomberg et al., 2001).

IV. Les contacts cellulaires

IV. i. La synapse immunologique

Les lymphocytes T sont capables de former des contacts cellulaires avec des cellules présentatrices d'antigène (APC) par la formation d'une synapse immunologique (IS). Celle-ci est également retrouvée entre un lymphocyte T cytotoxique (CTL) et une cellule cible, généralement infectée. Cette synapse étant la plus détaillée, c'est elle qui nous servira d'exemple pour illustrer cette notion de contact cellulaire. Cependant il faut préciser l'existence d'autres types de synapses immunologiques, comme celles observées entre une cellule Natural Killer (NK) et une cellule cible ou encore entre un lymphocyte B et une APC.

IV. i. i. Structure et dynamique de la synapse immunologique

Les interactions cellules-cellules et en particulier la IS sont des interfaces dynamiques qui subissent de nombreux changements au court de leur formation. Celle-ci se compose de plusieurs clusters d'activation supramoléculaires (SMACs) sous forme d'anneaux concentriques (**Figure 5**). Au centre on retrouve le SMAC central (cSMAC) contenant le TCR (T cell receptor), reconnaissant le péptide présenté par le MHC (major histocompatibility complex), et ses protéines de signalisation associées. Le SMAC périphérique (pSMAC) enrichie en molécules d'adhésion, notamment l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ aussi appelée LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) vient entourer le cSMAC. Enfin le SMAC distal (dSMAC) constitué d'un anneau dense d'actine filamenteux (F-actine) englobe le tout. La mise en place de cette architecture particulière est permise par la polymérisation d'actine et la contractilité associée à la myosine au niveau du front de migration. En effet, lorsque ce front de migration entre en contact avec la cellule cible, on observe la naissance d'un flux d'actine rétrograde au niveau du dSMAC qui entraîne les clusters de récepteurs d'antigènes et les intégrines vers le centre du contact (Hammer and Burkhardt, 2013; Le Floch and Huse, 2015). Les lymphocytes sont également capables de former des protrusions afin d'augmenter la surface de contact avec les APCs (Sage et al., 2012). Enfin il est important de comprendre que tous ces mouvements génèrent des forces mécaniques au niveau de l'interface cellule-cellule, capables de moduler la fonction et l'organisation structurale de nombreux récepteurs et molécules d'adhésion à la surface des lymphocytes, l'application des forces dérivées du cytosquelette jouant un rôle crucial dans cette régulation.

IV. i. ii. Importance de l'actine dans la synapse immunologique

Les cellules sont capables de générer des réseaux d'actine *via* deux mécanismes impliquant le complexe de nucléation Arp2/3 et les formines. Arp2/3 est un complexe qui, après liaison avec un filament d'actine existant (le filament mère), est capable de nucléariser une branche (filament fille) qui va grandir au côté du filament mère, donnant naissance à une architecture arborescente. Il existe deux facteurs majeurs de nucléation pour Arp2/3 : WASp (Wiskott–Aldrich Syndrome protein) et WAVE (WASP-family Verprolin-homologous protein), deux molécules intrinsèquement inactives dans le cytosol. De nombreuses molécules associées à la membrane plasmique comme Cdc42, le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) ou la protéine adaptatrice Nck synergisent pour recruter, déplier et activer WASp, promouvant ainsi la nucléation d'actine à la membrane plasmique. De son côté, WAVE est associée à un complexe de 4 protéines appelé WCR (WAVE Regulatory complexe). La liaison du WCR à PIP3 et aux Rac-GTP au niveau de la membrane plasmique va altérer la conformation du WCR et permettre la nucléation d'actine par le complexe Arp2/3. Il existe différents réseaux d'actine à la IS, chacun caractéristique et représentatif d'un cluster (**Figure 5**).

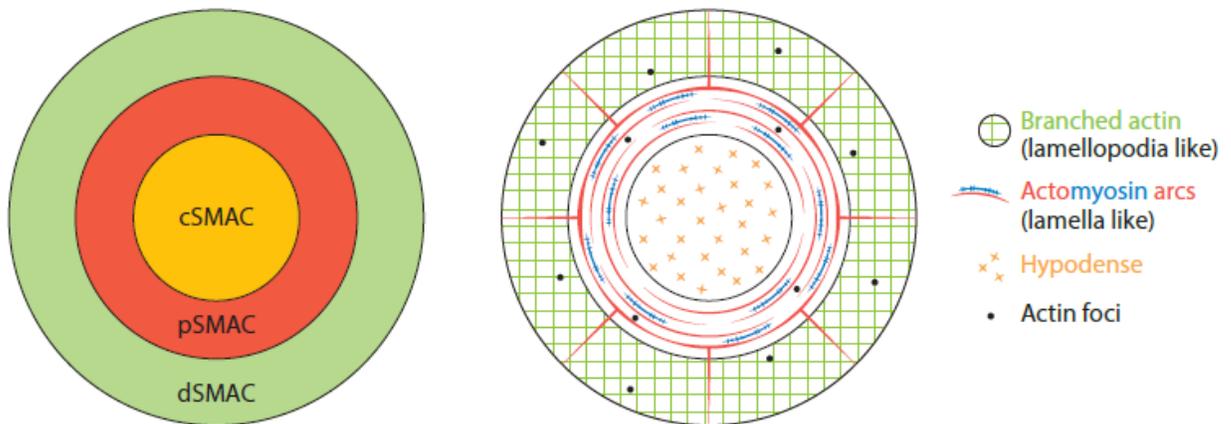


Figure 5 : Représentation des quatre réseaux d'actine présent à la synapse immunologique

On retrouve au niveau de la synapse immunologique (IS) mature 3 clusters d'activation supramoléculaire (SMAC) que sont : le SMAC central (cSMAC) constitué d'un réseau hypodense d'actine – le SMAC périphérique (pSMAC) constitué d'arcs d'acto-myosine – le SMAC distal (dSMAC) constitué d'actine « branchée » ou « ramifiée ». Des foci d'actine sont retrouvés dans le dSMAC et pSMAC (Hammer et al., 2019a).

Le plus important réseau d'actine est celui de l'anneau formant le dSMAC, qui se forme rapidement après le début du contact. Celui-ci est composé presque exclusivement d'un réseau d'actine « en branche », créé par le complexe Arp2/3 localisé tout le long de la bordure extérieure de la IS. Un deuxième réseau d'acto-myosine constitué d'actine « en arc » enrichie en NM-2 (non muscular myosin-2), un acteur majeur de la machinerie de contraction présent dans toutes les cellules non musculaires, est retrouvé au niveau du pSMAC. Enfin au centre de la IS, se trouve une zone de très faible densité de F-actine comparée aux réseaux d'actine présents dans le dSMAC ou le pSMAC. Des petits foci d'actines créés par le complexe Arp2/3 en conjonction avec WASP sont également retrouvés au travers du dSMAC et du pSMAC mais ne représentent qu'une faible fraction de la F-actine. Les structures d'actine et d'acto-myosine à la IS accomplissent 4 fonctions majeurs (Hammer et al., 2019b):

- (1) Favoriser l'assemblage de microclusters des TCR (T cell receptor) pour permettre leurs signalisations.
- (2) Assurer le transport rétrograde, de l'extérieur vers le centre de la IS, des microclusters de TCR préalablement assemblés pour permettre la maturation de la IS.
- (3) Favoriser l'activation des intégrines et leurs localisations pour permettre l'attachement des lymphocytes T.
- (4) Contrôler et faciliter les fonctions effectrices majeures des lymphocytes T, comme la sécrétion polarisée.

Dans le cas de la IS, les microclusters de TCR sont assemblés avec le réseau branché d'actine dans la dSMAC et peuvent s'élargir au fur et à mesure de leur progression vers le pSMAC. En effet l'activation du TCR au niveau du dSMAC active la kinase PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase), entraînant la conversion de PIP2 en PIP3 au niveau de la membrane plasmique. PIP3 recrute ensuite Raf GEF DOCK2 qui va augmenter le niveau d'activation des Rac-GTP à la membrane. La liaison du WCR à PIP3 et aux Rac-GTP lui permet de promouvoir la nucléation d'actine par le complexe Arp2/3 au niveau de la membrane plasmique au niveau des bords extérieurs de la IS conduisant un flux d'actine rétrograde. Une perturbation globale de la F-actine par la latrunculine, un inhibiteur de la polymérisation, va fortement diminuer la formation de ces microclusters, et par conséquent l'activation des lymphocytes T (Le Floc'h and Huse, 2015). De manière intéressante, la signalisation des microclusters de TCR s'opère de manière robuste lors de leur transit du dSMAC au pSMAC, mais s'arrête lorsqu'ils atteignent le cSMAC en raison de leur dissociation avec des molécules adaptatrices

clés (Varma et al., 2006). Simplement en stoppant le flux de polymérisation des branchements d'actine dans le dSMAC par l'utilisation d'un inhibiteur d'Arp2/3 (CK-666), la signalisation du TCR est impactée (Yi et al., 2012). Des effets similaires ont été observés après avoir stoppé le flux rétrograde dépendant de la NM-2, au niveau de la pSMAC par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, la blebbistatine (Murugesan et al., 2016).

IV. i. iii. Transfert polarisé au niveau de la synapse immunologique

Une fonction effectrice de la IS est la sécrétion polarisée de granules lytiques (LG) du lymphocyte T cytotoxique (CTL) vers la cellule cible à éliminer. Cette sécrétion s'opère au niveau du cSMAC, généralement après l'établissement de l'anneau d'intégrine au niveau du pSMAC, et après le repositionnement du centrosome et des microtubules associés au niveau de la membrane plasmique du cSMAC (Stinchcombe et al., 2006). Cet évènement sert de point d'ancrage à une sécrétion polarisée des LGs de la CTL vers sa cellule cible. Des observations par microscopie en super-résolution ont mis en évidence un fin maillage d'actine au niveau de la zone de contact entre la CTL et la cellule cible, permettant au cSMAC mature de laisser passer les LGs (Carisey et al., 2018; Ritter et al., 2015). Le passage des LGs au travers de ce maillage serait régulé par la taille des pores, dont l'élargissement ou la rétractation serait médiée par la NM-2 et les microfilaments d'actine.

L'actine corticale a toujours été pensée comme une barrière à la sécrétion des vésicules, dont les cellules doivent se débarrasser afin de permettre aux vésicules de fusionner avec la membrane plasmique (Ritter et al., 2017). En effet, la forte densité d'actine corticale initialement présente au site de contact entre la CTL et la cellule cible disparaît au niveau du cSMAC, laissant place à un fin maillage d'actine au centre de la synapse mature. Le relargage des LGs au niveau du cSMAC est d'ailleurs suivi par une augmentation de l'assemblage d'actine, précédé par PIP2, et qui sert à restreindre leurs sécrétions (Ritter et al., 2017). En effet à la fois le renforcement ou la diminution de la nucléation d'actine au niveau de la membrane plasmique, est corrélée avec la présence ou l'absence de PIP2 (Ritter et al., 2017). Ce dernier étant un régulateur important des dynamiques du cytosquelette d'actine et servant à la fois pour le recrutement d'intermédiaire de signalisation, et de molécules effectrices modulant leurs localisations et leurs activités. Ainsi, des réarrangements à l'échelle du nanomètre permis par la dynamique des filaments d'actine et la contractilité de la myosine seraient en mesure de réguler la sécrétion des LGs. De plus, il serait également probable que cette fine couche du réseau d'actine soit un acteur clé de la régulation de l'internalisation (Cemerski et al., 2008).

IV. i. iv. Lien avec les cellules dendritiques plasmacytoides

Comme indiqué précédemment, les pDCs sont capables de détecter une infection virale par contact physique direct avec la cellule infectée. Dans ce contexte, le cytosquelette d'actine y joue un rôle central en se polarisant spécifiquement à la jonction entre la pDC et la cellule infectée, formant ainsi une base structurale nécessaire aux transferts des signaux activateurs (Décembre et al., 2014a). Le recrutement de clathrine au niveau de la zone de contact témoigne également d'un transfert vésiculaire contenant les génomes viraux entre la cellule infectée et la pDC (Décembre et al., 2014a).

Comme pour les lymphocytes T, la reconnaissance par contact des cellules infectées par les pDCs n'est pas anodine et présente de nombreux avantages. Tout d'abord elle permettrait à la pDC de détecter le virus durant sa phase de réplication intracellulaire plutôt que durant le court moment de transit extracellulaire. En effet la reconnaissance d'un virus « libre », même à des MOI (Multiplicity of Infection) importantes est moins efficace que la reconnaissance de cellules infectées par le même virus (Frenz et al., 2014). De plus elle permet la détection de virus possédant un tropisme restreint, en permettant une réponse localisée au niveau des tissus infectés. Il s'agit ici d'un moyen unique de surveillance du compartiment intracellulaire.

IV. ii. Rôle fonctionnelle et régulation des intégrines dans la synapse immunologique

IV. ii. i. Activation et positionnement des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs mécano-sensibles dont les membres sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et β , chacune contenant un long domaine extracellulaire, une hélice transmembranaire et une courte queue intracellulaire (Luo et al., 2007). Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , donnant naissance à 24 combinaisons $\alpha\beta$ identifiées à ce jour chez les mammifères. Par exemple l'intégrine $\alpha\beta2$ (LFA-1) est la combinaison d'une sous-unité α L, également appelée CD11a ou ITGAL et d'une sous-unité β 2 ou CD18 (**Figure 6**).

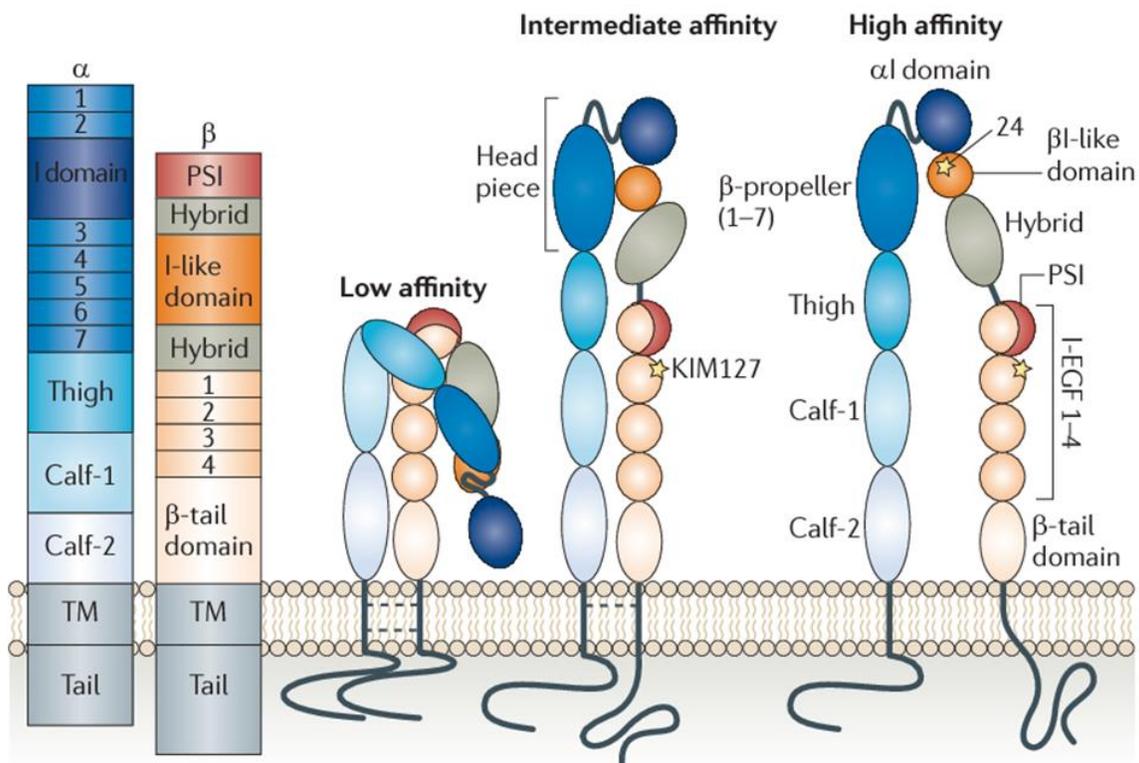


Figure 6 : Les différentes conformations de l'intégrine $\alpha\beta2$ ou LFA-1

Il existe trois conformations de l'intégrine $\alpha\beta2$ en fonction de son affinité de liaison avec son ligand ICAM-I (intercellular Adhesion Molecule 1): La forme de faible affinité (low affinity) où les régions extracellulaires des sous-unités α et β possèdent leur configuration « fermée-courbée ». La forme d'affinité intermédiaire (intermediate affinity), de configuration « fermée-étendue » expose l'extrémité supérieure de la sous-unité α (Head piece), contenant le domaine- α I (α I domain) de liaison à ICAM-I ainsi que l'épitope KIM127. Dans sa forme de haute affinité « high affinity », les deux sous-unités s'écartent donnant cette conformation « ouverte-étendue » où l'inclinaison du domaine transmembranaire de la sous-unité β ouvre d'avantage le domaine- α I en exposant l'épitope 24. Cette forme de haute affinité n'est présente que transitoirement, sauf en cas de stabilisation par liaison avec son ligand (Hogg et al., 2011).

Les intégrines sont capables de se lier à la fois à des composants de la matrice extracellulaire ou à des molécules d'adhésion présentes à la surface d'autres cellules. Leur affinité d'interaction à leur ligand est régulée par des changements de conformation. Dans leur état de repos, les intégrines maintiennent une forme repliée, de faible affinité ou le site de liaison au ligand est dirigé vers la base de la structure (**Figure 6**). Une signalisation « inside out », c'est-à-dire dirigée de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, peut étendre cette conformation inhibitrice en assemblant des complexes protéiques au niveau de la queue cytoplasmique des sous-unités α et β (Kim et al., 2011). Ces complexes contiennent des protéines adaptatrices du cytosquelette comme taline et RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule) qui induisent un changement de conformation permettant l'extension du domaine extracellulaire de l'intégrine vers une forme étendue de plus forte affinité (**Figure 7**).

L'attachement d'un CTL à une cellule cible lors de la formation de la IS est largement médiée par la liaison entre l'intégrine $\alpha L\beta 2$ exprimée à la surface du lymphocyte et son ligand ICAM-I, (intercellular Adhesion Molecule 1) exprimé à la surface de la cellule cible (Le Floc'h and Huse, 2015). Cette interaction a lieu grâce au domaine- αI , situé à l'extrémité du domaine extracellulaire de la sous-unité αL . Dans les synapses matures, l'intégrine $\alpha L\beta 2$ est principalement retrouvée au niveau du pSMAC, et plus particulièrement à la jonction entre la pSMAC et le cSMAC (Yi et al., 2012). Cette organisation permet la mise en place d'un anneau adhésif entourant le cSMAC. La création de ce « joint », couplé au repositionnement de la machinerie de sécrétion des CTLs en direction dans la cellule cible, va venir limiter les fonctions effectrices des CTLs. Tout comme le mouvement concentrique des clusters de TCR, les mouvements des clusters d'intégrines dépendent du flux du réseau d'actine « branché » et des arcs d'acto-myosine. Cependant, les complexes intégrines $\alpha L\beta 2$ /ICAM-I seront exclus de la cSMAC en raison de la taille trop large de leur domaine extracellulaire, contrairement à celui du complexe TCR/pMHC (peptide-MHC), agrégé à la cSMAC (Hartman et al., 2009). De plus les arcs d'acto-myosine qui tirent sur l'intégrine $\alpha L\beta 2$ pour maintenir la signalisation « inside-out », se détachent à la frontière entre le pSMAC et le cSMAC, entraînant la perte de tension exercée sur l'intégrine à l'origine d'un découplage du complexe intégrine $\alpha L\beta 2$ /ICAM-I par diminution d'affinité (Hammer et al., 2019b). Dans le contexte des CTLs, il a été montré que le flux rétrograde d'actine était en grande partie responsable de l'activation de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ et que la NM-2 n'y jouait qu'un rôle mineur (Comrie and Burkhardt, 2016). Cependant, la stabilité des conjugués entre le CTL et sa cellule cible semble grandement réduite lors de l'inhibition de la NM-2, tout comme par le blocage des arcs riches en acto-myosine localisés dans le pSMAC par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le SMIFH2.

La NM-2 contribuant également à l'adhésion des lymphocytes T dépendante de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$.

Comment déterminer la force de contact ?

La force de contact d'une cellule exprimant des intégrines peut être exprimée comme étant la force critique requise pour la séparer d'une surface recouverte du ligand associé. Cette force est à la fois dépendante du nombre de molécules d'intégrine liées au ligand, de l'affinité des intégrines (définie comme la force requise pour rompre une unique interaction intégrine-ligand) ainsi que de la surface de contact. Alors que l'avidité des intégrines peut être modulée par des changements d'affinité et de densité de l'intégrine, il est important de garder en tête la notion d'air de contact, car celle-ci peut varier en fonction des morphologies cellulaires. C'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle les cellules en contact peuvent avoir recours à des protrusions qui augmentent la zone de contact. (Kinashi, 2005).

IV. ii. ii. Activation des intégrines dans la synapse immunologique

L'association entre l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ et ICAM-I requiert que l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ se présente sous sa forme de haute affinité, c'est-à-dire sous sa forme dite « ouverte-étendue » exposant complètement le domaine $\alpha\text{-I}$. (Springer and Dustin, 2012). Le passage de l'intégrine de sa forme de faible affinité, « fermée-repliée », à sa forme de haute affinité nécessite différentes étapes (**Figure 7**). Tout d'abord, l'activation du TCR déclenche un processus de signalisation « inside-out », pour permettre le recrutement du complexe Rap1-RIAM au niveau de la queue cytoplasmique de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (Lagarrigue et al., 2016). Dans un second temps, le complexe Rap1-RIAM favorise le recrutement, le dépliage, et l'activation de la protéine taline, pour permettre son interaction avec la queue cytoplasmique de la sous-unité β2 de. L'interaction directe entre Rap1 et taline a également été proposée pour déclencher l'activation des intégrines (Zhu et al., 2017).

En parallèle la protéine adaptatrice kindline est également recrutée au niveau de la queue cytoplasmique de l'intégrine. Cependant, contrairement à taline qui aurait un rôle de transmission de la force mécanique aux intégrines, kindline serait plus à même de stabiliser l'adhésion. Celle-ci fonctionne comme le centre de l'interaction entre différentes protéines en recrutant la pseudo kinase PINCH ou LIMS1, paxilline et le complexe Arp2/3 aux intégrines. PIP2 a également été impliqué dans l'activation et le clustering des intégrines en venant s'associer directement à taline et vinculine, permettant son activation et son recrutement au niveau de la membrane plasmique. Une délétion

spécifique de PIP5K1, la kinase responsable de la synthèse de PIP2 à partir de PI4P, entraîne une diminution importante du recrutement de taline à la membrane plasmique et au niveau des sites d'adhésion (Thompson et al., 2017; Ye et al., 2016). L'interaction entre taline et l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ permet sa transition vers une forme d'affinité intermédiaire, « fermée-étendue ». Une force perpendiculaire à la membrane plasmique sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β2 de l'intégrine permettra « d'ouvrir » la forme d'affinité intermédiaire. Cette force est dirigée par un flux d'actine corticale localisée sous la membrane plasmique, dont la protéine taline assure la connexion (Comrie and Burkhardt, 2016).

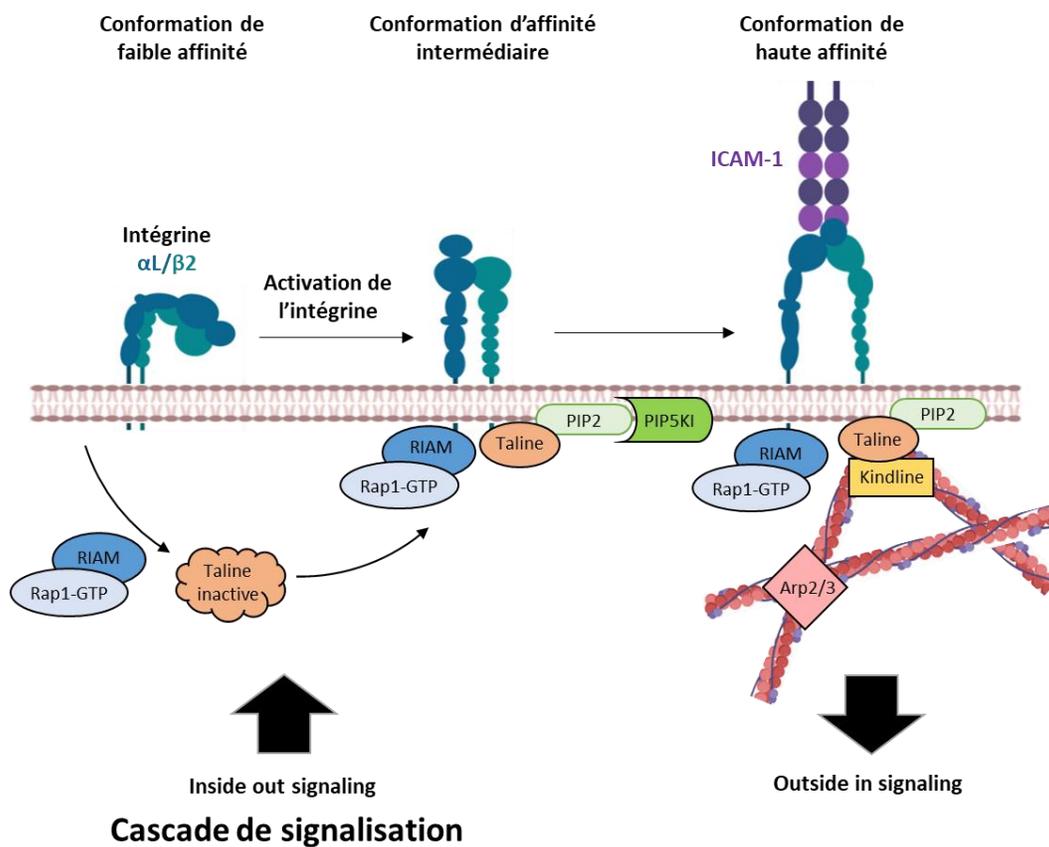


Figure 7 : Modèle d'activation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ ou LFA-1

Après l'activation du récepteur des cellules T (TCR) et la cascade de signalisation associée, taline est recrutée à la membrane plasmique par interaction avec PIP2 et le complexe Rap1-RIAM. Taline activée va interagir avec la queue cytoplasmique de la sous-unité β2 de l'intégrine pour induire son extension vers sa forme d'affinité intermédiaire (Inside out signaling). Cette dernière lui permet d'interagir avec son ligand ICAM-I. Dans le même temps, taline lie la sous-unité β2 de l'intégrine avec le cytosquelette d'actine. La force de traction alors exercée par le cytosquelette d'actine sur l'intégrine (Outside in signaling) induit sa forme de haute affinité. Des régulateurs du cytosquelette incluant Arp2/3, kindline sont alors recrutés, permettant une stabilisation du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ /ICAM-I. (Hogg et al., 2011; Patsoukis et al., 2017).

Néanmoins même si la conformation « fermée-étendue » de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ est capable de lier son ligand, son affinité n'est pas maximale. Pour arriver à sa forme de haute affinité, une force de traction doit être appliquée au complexe intégrine-ligand. Cette force ouvre d'avantage l'intégrine et expose son site de liaison de haute affinité au ligand (environ 100 fois supérieur à la forme d'affinité intermédiaire). Une fois sa forme de haute affinité atteinte, le complexe intégrine-ligand peut recruter de nombreux régulateurs du cytosquelette comme kindline, le complexe Arp2/3, vinculine, les formines, la famille de kinase Src ou FAK qui vont à leur tour renforcer la connexion entre taline et le système d'acto-myosine pour consolider la force de transduction des intégrines. Cela se traduit par un puissant signal « outside-in », c'est-à-dire venant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, qui peut réorganiser le cytosquelette en points d'adhésion focaux (Legate et al., 2009).

Ces signaux ont également de profonds effets sur la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. Dans la IS, l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ est critique pour l'adhésion mais également pour la transduction de signaux costimulateurs qui contribuent à l'activation du lymphocyte T. L'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ engage ICAM-I à la surface de la cellule cible durant les étapes initiales de migration cellulaire avant d'être relocalisé au centre de la IS par un flux de F-actine rétrograde ou elles s'accumulent dans la pSMAC (Yi et al., 2012). Il a été observé que différentes formes de la protéine occupaient des régions distinctes de la IS, avec la forme de plus haute affinité résident plus centralement (Comrie et al., 2015a) et que l'arrêt de la F-actine réduisait l'accumulation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ sous sa forme de haute affinité. Ainsi, l'activation des intégrines à la IS dépend des forces imposées par les dynamiques du cytosquelette. De manière intéressante, la force d'activation exercée sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β2 de l'intégrine par le flux d'actine cortical est augmentée, si la molécule ICAM-I à laquelle l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ se lie est immobilisée. Cela a directement été mesuré par l'expression de la forme de haute affinité de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ à la surface du lymphocyte T liées à des APC, dans lesquelles la mobilité d'ICAM-I était réduite (Comrie et al., 2015b).

IV. ii. iii. Rôle des intégrines dans la migration et leurs régulations par les chémokines

La stimulation des lymphocytes par les chemokines génère une polarité cellulaire. Au travers de la polarisation d'actine se forme un front de migration et par contraction de l'acto-myosine un uropode. Ces événements coordonnent un cycle dépendant des intégrines d'attachement au niveau du front de migration et de détachement à l'arrière des cellules (Sanchez-Madrid, 1999). Par exemple, durant leurs entrées dans les ganglions lymphatiques périphériques, les cellules T naïves interagissent avec les

veinules à endothélium épais (HEV) suivant un procédé qui met en jeu une première phase de roulement et d'attachement, puis une phase de ferme adhésion suivit de la diapédèse. La phase de roulement est permise par l'expression de L-selectine (CD62L) avec seulement une faible contribution de la part de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$. En revanche l'intégrine joue un rôle prépondérant dans l'adhésion soutenue des lymphocytes aux HEV des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyers. Les chémokines localisées sur la surface apicale de l'endothélium comme CCL21, CXCL12 et CXCL13 augmentent rapidement l'affinité et la densité des intégrines, entraînant l'arrêt des lymphocytes (Alon and Feigelson, 2002). Notamment, la stimulation de cellules T primaires avec des chémokines stimule la mobilité latérale de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, induisant la formation rapide de clusters à l'origine d'une augmentation de l'adhésion cellulaire même à de faible densité d'ICAM-I (Montresor et al., 2012). Alors que l'apparition de la forme de haute affinité de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ permet l'arrêt des lymphocytes dans des conditions de hautes et faibles densités d'ICAM-I, sa mobilité latérale n'est critique que dans des conditions de faible densité. De manière intéressante, une étude a montré que seul les chémokines immobilisées sur l'endothélium ou une surface recouverte par ICAM-I, et pas des chémokines solubles, permettaient aux lymphocytes de s'arrêter en dépit des contraintes d'écoulement, en induisant le changement de conformation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ vers sa forme d'affinité intermédiaire (Shamri et al., 2005).

La mobilité latérale de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ induite par les chémokines est contrôlée par la voie de signalisation PI3K. La petite GTPase RAP1 est activée, entre autres, par les chémokines CCL21 et CXCL12 et augmente l'affinité de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ ainsi que la polarisation des clusters (Katagiri et al., 2000). Il a également été montré que des mutants constitutivement actif de RAP1 induisaient une augmentation de l'affinité de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, ainsi que de sa densité, à la surface des lignées cellulaires lymphoïdes et des cellules T primaires (Sebzda et al., 2002), indiquant que RAP1 possède un rôle important dans la voie de signalisation « inside-out » déclenchée par les chemokines. De manière similaire, RAPL (Regulator for cell Adhesion and Polarization enriched in Lymphoid tissues) qui s'associe avec RAP1-GTP après stimulation des lymphocytes par CXCL12 ou la signalisation croisée du TCR, est associée avec une affinité et une densité accrue de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (Katagiri et al., 2003). Une autre protéine de liaison à RAP1, RIAM (RAP1-interacting adaptor molecule) induit un changement de conformation des intégrines, et augmente la migration cellulaire ainsi que l'adhésion à ICAM-I. Les cellules régulées négativement pour RIAM voient leur niveau de polymérisation d'actine et une adhésion dépendante de RAP1 diminuée. Ainsi les chémokines utilisent de multiples voies de signalisation pour permettre l'arrêt des lymphocytes grâce aux intégrines, jouant à la fois sur

leur mobilité latérale rapide, facilitant leur rencontre avec des ligands immobilisés, et leur affinité. Tout ce processus est très rapide et a lieu dans la seconde au niveau du site de restriction. C'est pourquoi il nécessite une coopération étroite entre les voies de signalisation « inside-out » et « outside-in » dans les conditions physiologiques (Montresor et al., 2012).

L'adhésion médiée par l'intégrine $\alpha L\beta 2$ est également régulée par son recyclage intracellulaire, les cycles d'accumulation et de dissociation des intégrines étant cruciaux pour permettre la migration cellulaire. Son endocytose est principalement médiée par des mécanismes indépendants de la clathrine (Fabbri et al., 2005). Après son internalisation, l'intégrine $\alpha L\beta 2$ peut suivre la voie d'exocytose directe, *via* des endosomes précoces ou la voie de recyclage périnucléaire. De plus l'intégrine $\alpha L\beta 2$ peut également utiliser une voie de signalisation dépendante de Rab13, pour faciliter son adressage au niveau du front de migration des lymphocytes T. La protéine RAPL, un régulateur de l'adhésion cellulaire et de la polarisation, peut se lier à RAP1. Le complexe ainsi formé semble à la fois impliqué dans la régulation du transport de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ à la membrane, ainsi que dans le renforcement des interactions entre l'intégrine $\alpha L\beta 2$ et ICAM-I, en augmentant l'affinité de l'intégrine. Un défaut de recyclage de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ par l'inhibition de Rab13 empêche l'activation des cellules T (Nishikimi et al., 2014). Néanmoins le rôle précis de chaque voie de recyclage dans la relocalisation et l'action de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ restent encore à approfondir.

V. Les modèles viraux

V. i. Le virus de la Dengue

Le virus de la dengue (DENV) est un arbovirus transmis par la piqûre de moustiques du genre *Aedes*, principalement *A. aegypti*, dont on estime à 390 millions le nombre de personnes infectées chaque année. DENV se divise en 4 sérotypes distincts (1, 2, 3 et 4), chacun se différenciant des autres par un écart de 25 à 40% dans sa séquence d'acide aminé. Tous ces sérotypes sont retrouvés à travers le monde, notamment dans les régions tropicales et subtropicales ; DENV-2 étant identifié comme étant le plus virulent (Yung et al., 2015).

Bien que la plupart des infections par DENV soient asymptomatiques (environ 75%), elles résultent également en un large spectre de signes cliniques s'étalant de la « dengue classique », similaire à la grippe, à des cas beaucoup plus sévères de « dengue hémorragique » où de « syndrome de choc » pouvant entraîner la mort. Une primo-infection par un sérotype de DENV confère une protection durable contre ce même sérotype, alors qu'une seconde infection par un sérotype hétérologue est le facteur de risque le plus important couplé à l'apparition des formes sévères de la maladie (Recker Mario et al., 2009). La dengue est aujourd'hui considérée comme une maladie réémergente et un problème de santé publique majeur, étant donné qu'elle est la première cause de maladie transmise par les arthropodes dans le monde. En effet avec la globalisation de l'économie, l'augmentation des échanges des biens et des personnes, elle tend à gagner de nouvelles zones géographiques, infectant chaque année des êtres humains dans plus de 100 pays différents et menaçant près de 3.6 milliards de personnes (Bhatt et al., 2013). Ces dernières années ont d'ailleurs été le théâtre de la colonisation du virus vers les zones tempérées où, en 2010, à Nice les deux premiers cas autochtones de dengue ont été détectés. En 2012 plus de 2000 cas de dengue ont été recensés sur l'archipel de Madère au Portugal (Auerswald et al., 2019). On peut également souligner le premier cas de dengue autochtone dans le département du Rhône, identifié le 23 Septembre 2019 par l'ARS (agence régional de santé). En plus de son impact sur la santé publique, les épidémies de DENV ont un impact massif sur l'économie des pays touchés. En effet, une étude d'Amérique latine a évalué à un milliard de dollars le coût annuel de l'infection par la dengue dans les pays d'Asie du Sud Est, dont une partie importante était due à une perte de productivité (Shepard et al., 2013).

La nature du récepteur cellulaire ainsi que les mécanismes d'entrée de DENV dans les cellules humaines restent encore mal compris. De nombreux récepteurs ont été proposés pour permettre ou

faciliter l'entrée du virus, comme les héparanes sulfates, la neolactotetraosylceramide (nLc4Cer), les récepteurs au mannose, les laminines, DC-SIGN, CD14, HSP70/90 ou encore GRP78 (Cruz-Oliveira et al., 2015). Cela suggère que DENV est capable d'utiliser différentes combinaisons de récepteurs pour entrer dans différents types cellulaires, les cellules permissives au virus étant les cellules dendritiques (DCs), les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les macrophages, les mastocytes ainsi que les monocytes (Garcia et al., 2017).

DENV est un virion sphérique d'environ 50 nm appartenant au genre *Flavivirus*, de la famille des *Flaviviridae*. Il possède une capsidie icosaédrique enveloppée d'environ 30 à 40 nm de diamètre. Son génome est constitué d'un ssRNA de polarité positive (ssRNA +) de 10.7kb. Celui-ci est caractérisé par une coiffe en 5' contenant une région 2'-O-méthylée, un unique cadre ouvert de lecture et une absence de queue poly A en 3'. Après pénétration de la nucléocapsidie dans le cytoplasme, l'ARN génomique est traduit en une unique polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (RER) qui est ensuite clivée par des protéases virales (NS3) et cellulaires. Son clivage donne naissance à 3 protéines de structure : la capsidie (C), responsable de la reconnaissance de l'ARN viral et de l'assemblage du virus, la protéine de membrane immature (preM) empêchant la fusion du virus immature et la glycoprotéine d'enveloppe (E) permettant l'interaction du virus avec ses récepteurs cellulaires et son entrée dans la cellule cible ; ainsi que 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) impliquées dans la régulation de la synthèse protéique, la réplication virale, la pathogénèse du virus, ainsi que dans le control des réponses antivirales de l'hôte. Les brins de ssRNA de polarité négatifs (ARNsb -) sont synthétisés et servent de matrice à la génération de nouveaux brins de ssRNA + dans des vésicules formées à partir d'invaginations de la membrane du réticulum endoplasmique (ER), appelées usines virales. Après réplication, le ssRNA + viral s'associe avec la protéine C pour bourgeonner dans la lumière du ER, et acquérir une membrane lipidique contenant les hétéromères préalablement enchâssés des protéines E et prM. Ces particules immatures sont ensuite transportées le long des voies de sécrétion cellulaire pour subir une étape de maturation par clivage de la protéine prM *via* la furine au niveau du trans-Golgi. Le virion mature est enfin relargué dans le milieu extracellulaire par exocytose.

V. ii. Le virus de l'hépatite C

Environ 170 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C (HCV) à travers le monde. HCV est transmis par contact percutané avec du sang contaminé. Il infecte

principalement le foie où il établit une infection chronique chez 80% des individus, à risque pour le développement de cirrhoses ou de cancers du foie. Le développement récent des DAAs (direct-acting antiviral agents) a permis d'augmenter le taux de rémission des patients infectés à plus de 90% (Gogela et al., 2015). Néanmoins, même si les moyens de dépistage mis en œuvre dans les pays développés ont drastiquement réduit le risque d'infection par les produits dérivés du sang, la transmission de HCV reste élevée dans les pays peu développés. En effet, des moyens de dépistage insuffisants, les prix importants des traitements et leurs faibles accessibilités, sont autant de barrières quant à l'éradication de la maladie (Dore and Feld, 2015). Aucun vaccin n'est à ce jour disponible pour HCV.

HCV est un virus enveloppé appartenant à la famille des *Flaviviridae* du genre *Hepacivirus*. Son génome, constitué d'un ssRNA + de 9.6 kb, ne possède ni de coiffe en 5' ni de queue poly A en 3'. Sa traduction se fait *via* un unique site d'entrée ribosomique interne (IRES) qui permet de contourner l'absence de coiffe. Son génome code pour une unique polyprotéine, maturée de manière co- et post traductionnelle par des protéases virales et cellulaires pour former 3 protéines structurales : la protéine core (C), formant la capsid, et les protéines d'enveloppe E1 et E2 ; ainsi que 7 protéines non structurales (NS) : p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A et NS5B. Après relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule infectée, celui-ci sert de matrice pour la traduction des différentes protéines virales. Les protéines virales NS nouvellement synthétisées (NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5b) forment un complexe de réplication avec l'ARN génomique au sein de membranes dérivées du ER où la réplication s'opère par la génération de ssRNA - et de l'intermédiaire de réplication dsRNA. L'enveloppement des complexes de réplication dans les membranes péri-nucléaires, en plus de faciliter mécaniquement la catalyse de l'ARN polymérase, permet de protéger les ARNs viraux des PRRs de la cellule infectée. Le site de réplication principale de HCV est les hépatocytes, même si celui-ci est retrouvé dans de nombreux types cellulaires non permissifs. En effet sa réplication nécessite de nombreux facteurs spécifiques au foie comme miR-122 (Jopling, 2005). L'assemblage des particules virales est étroitement liée aux voies de synthèse des lipides et des lipoprotéines très actives au niveau des hépatocytes (Aizawa, 2015). En effet, la forme infectieuse de HCV s'associe avec des lipoprotéines de l'hôte et se sert des mécanismes de capture des lipoprotéines des hépatocytes pour les infecter. Etant un virus causant principalement des infections chroniques, il a développé de multiples stratégies pour inhiber l'induction de la réponse immunitaire innée, notamment la réponse IFN-I, ainsi que l'action antivirale de certains effecteurs innés.

V. iii. Les mécanismes d'évasion virale à la réponse interféron de type I

Comme détaillé précédemment, la réponse IFN-I permet de limiter les infections virales par l'établissement d'un état non-permissif chez les cellules infectées et non infectées. Ainsi, de nombreux virus ont développés au cours de leur évolution des stratégies pour échapper à cette réponse, qui peut varier de manière très importante entre différents virus ou même différentes souches. Ces différences peuvent résider dans la quantité de PAMPs viraux produit durant l'infection ou la phase de réplication virale, le type de cellule infectée, mais également la capacité du virus à inhiber la production ou la voie de signalisation d'IFN-I (Randall and Goodbourn, 2008). A ce jour, deux mécanismes d'inhibition de la production d'IFN-I chez les cellules infectées par DENV ont été décrit : une inhibition active, à travers l'altération des molécules de signalisation impliquées dans la voie IFN-I et une inhibition passive d'échappement aux PRRs, lui permettant de répliquer efficacement dans des cellules productrices d'IFN-I comme les DCs.

V. iii. i. Inhibition de la production d'IFN de type I par DENV

Comme un grand nombre de virus se répliquant dans le cytoplasme, DENV peut inhiber la réponse IFN-I en contournant la reconnaissance des récepteurs cellulaires. Celui-ci forme des vésicules intracellulaires dérivées du complexe endomembranaire du RE ressemblant à des organelles, dans lesquelles les protéines et le génome viral s'accumulent. Cela permet d'une part d'améliorer l'efficacité de la réplication virale tout en les protégeant des réponses de la cellule hôte. Des études ont ainsi montrées que des membres de la famille des *Flaviviridae* comme le virus West Nile (WNV), le virus de l'hépatite C (HCV) ou DENV étaient capables d'induire la formation de ces vésicules intracellulaires dans les cellules infectées (Fredericksen and Gale, 2006; Uchil and Satchidanandam, 2003; Welsch et al., 2009). La protéine NS5 du virus permet la 2'-O-méthylation en 5' de l'ARN viral, empêchant sa reconnaissance par RIG-I (Chang et al., 2016). De manière spécifique, DENV utilise ses protéines NS pour bloquer ou inhiber la production d'IFN-I dans les cellules infectées. Ainsi la protéine NS3 bloque la translocation de RIG-I à la mitochondrie en se liant à la protéine chaperonne 14-3-3, empêchant ainsi sa voie de signalisation (Chan and Gack, 2016b). NS2b cible cGas, entraînant sa dégradation par les lysosomes de l'autophagie et prévenant la reconnaissance d'ADN mitochondrial (Aguirre et al., 2017). NS4b de son côté promeut l'élongation des mitochondries en inactivant le facteur de fission mitochondrial associé à DRP1 (dynamamin-related protein 1) et ainsi altérant la formation des MAMs (mitochondria-associated membranes) nécessaire à la signalisation de RIG-I

(Chatel-Chaix et al., 2016). DENV inhibe aussi la production d'IFN-I *via* l'activité catalytique de sa protéase virale NS2B/NS3, en dégradant STING (Aguirre et al., 2012). De manière intéressante, cette interaction n'a pas été observée chez la souris dont l'homologue n'est alors pas dégradé et capable de contrôler la réplication du virus. Cette dernière est également capable de bloquer le domaine kinase d'I κ B kinase ϵ (IKK ϵ) nuisant à l'activation et à la signalisation de RIG-I et empêchant la phosphorylation et la translocation nucléaire d'IRF3 (Angleró-Rodríguez et al., 2014).

V. iii. ii. Inhibition de la voie de signalisation de l'interféron de type I par DENV

Quand bien même DENV est capable de limiter la production d'IFN-I par les cellules infectées, son mécanisme d'évasion le plus efficace reste celui inhibant la voie de signalisation d'IFNAR. La protéine NS4B bloque la phosphorylation de STAT1 (Muñoz-Jordán et al., 2005). De plus, NS5 interagit avec STAT2 par son domaine ARN polymérase pour empêcher sa phosphorylation. Cette interaction est d'ailleurs suffisante pour entraîner la dégradation de STAT2 *via* le protéasome. Ce mécanisme d'inhibition uniquement observé chez l'homme, n'est pas retrouvé chez la souris, où STAT2 est capable de restreindre la réplication du virus dans les premiers moments de l'infection *in vivo* (Ashour et al., 2010), et même de déclencher la voie IFN-I en absence de STAT1 (Perry et al., 2011). C'est une des raisons qui font que DENV est plus sensible à la réponse IFN-I chez la souris que chez l'homme. Néanmoins il est probable que ces mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire innée soient plus complexes que ceux décrits à ce jour, ou les protéines non structurales n'agiraient pas de façon individuelles mais sous la forme de complexe multi protéiques, chacune jouant un rôle spécifique.

V. iii. iii. L'infection chronique par HCV

La réponse IFN-I inhibe efficacement HCV *in vitro*, bien que les détails des mécanismes moléculaires restent encore à déterminer. Un nombre important d'ISGs et d'effecteurs antiviraux induit suite à une infection par HCV, ont été reportés comme ayant un effet direct contre l'infection. Ainsi l'immunité innée anti-HCV s'opère par une addition d'effecteurs individuels, ciblant différentes étapes du cycle de réplication viral, inhibant sa réplication et sa propagation. Au cours d'une infection chronique par HCV, les voies de signalisation de l'immunité innée persistent dans les foies chroniquement infectés, les mêmes transcrits d'ISGs étant retrouvés *in vitro* et durant une infection chronique *in vivo* (Wieland et al., 2014). De plus, la corrélation observée entre l'expression d'ISGs dans le foie et la forte

diminution de la virémie durant la phase aigüe de l'infection suggère que les mécanismes de contrôle dans le cas d'une infection par HCV sont efficaces *in vivo* (Bigger et al., 2001), mais incapables de guérir totalement l'infection. Le virus se servirait d'ailleurs de cette réplication restreinte pour limiter la présentation d'antigènes viraux et ainsi la reconnaissance par les lymphocytes T, empêchant le développement de maladie du foie et étendant la survie de l'hôte.

V. iii. iv. Les mécanismes d'évasion à la réponse interféron de type I par HCV

HCV a développé de nombreuses stratégies pour échapper aux réponses immunitaires des cellules infectées. La plus importante est le clivage des MAVS (IPS-1 ou Cardif) par la protéase virale NS3/4A (Meylan et al., 2005). MAVS est une protéine adaptatrice essentielle dans la voie de signalisation des RLRs, bloquant l'activation de la transcription d'IFN-I aux premières étapes de la voie de signalisation. De plus ce clivage se fait de façon protéolytique, ce qui le rend plus efficace que par interaction protéine-protéine. Ce clivage des MAVS peut facilement être détecté dans les lignées d'hépatocytes infectés par HCV ainsi que dans des biopsies de foie de patients infectés (Bellecave et al., 2010). Cependant, en dépit du clivage des MAVS, les cellules infectées par HCV affichent une réponse immunitaire. Cette dernière peut être expliquée par la reconnaissance très précoce de l'ARN viral, juste après qu'il ait été relargué de la nucléocapside et avant toute réplication ou traduction. La protéase de HCV NS3/4A est capable d'empêcher la voie de signalisations TLR3 par le clivage de TRIF (Li et al., 2005). Un nouveau mécanisme d'évasion est le ciblage de STING par NS4B, un adaptateur impliqué dans la réponse immunitaire innée induite par les virus à ADN. NS4B interagit physiquement avec STING, gênant alors son interaction avec les MAVS ou encore TBK1 (Nitta et al., 2013). De manière plus générale, la polymérase virale dépendante de l'ARN, NS5B, ne possède pas de mécanisme de réparation ou relecture, favorisant l'apparition de mutations dans les génomes, à l'origine d'une évolution rapide du virus observée dans les conditions de sélection mises en place par les réponses immunitaires de la cellule hôte et les drogues antivirales. La protéine C de HCV est capable de se lier à STAT-1 et de bloquer sa phosphorylation, empêchant sa dimérisation avec STAT-2 (Lin et al., 2006). Elle aurait également la capacité d'induire SOCS-3, un régulateur négatif de la voie JAK-STAT. (Bode et al., 2003). La protéine E2 inhibe la voie de signalisation médiée par PKR. Enfin NS5A est capable d'interagir avec IRF7, STAT-1, MyD88, PKR et d'en inhiber les fonctions (Abe et al., 2007; Chowdhury et al., 2014; Gale et al., 1997; Kumthip et al., 2012).

V. iv. Activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par les modèles viraux

V. iv. i. Activation par le transfert de particules immatures

Il a été observé que des composants viraux s'accumulaient au niveau de la zone de contact entre les pDCs et les cellules infectées par DENV (Décembre et al., 2014a). L'activation des pDCs par contact avec des cellules infectées par DENV est dépendante des protéines d'enveloppes présentes sur les particules virales (**Figure 8**). Pour de nombreux virus, les protéines de surface des particules nouvellement formées, vont subir des étapes de maturation au cours de leur sécrétion pour devenir infectieuses (Pasquato et al., 2013). Dans le cas de DENV, la protéine de surface immature preM est clivée pour donner la protéine M. Néanmoins ce procédé n'est pas optimum et environ 30 à 40% des particules secrétées possèdent toujours la protéine d'enveloppe immature (Keelapang et al., 2004). Le niveau d'activation des pDCs par des cellules infectées par DENV dépend du degré de maturation des particules virales produites. Les cellules produisant le plus de particules immatures seront les plus capables d'activer les pDCs. En effet, l'étape de fusion du virus est connue pour être déclenchée par un pH acide, au niveau des endo-lysosomes (Smit et al., 2011). Alors que les particules matures sont capables de fusionner avec la membrane des endo-lysosomes afin de relarguer leur génome viral dans le cytoplasme, les particules immatures y sont retenues, rendant possible la détection du génome viral par TLR7.

V. iv. ii. Activation par le transfert d'exosomes

En plus de la production de particules infectieuses, les cellules infectées par HCV sont capables d'encapsuler l'ARN viral dans des exosomes (EXOs) dont la sécrétion est indépendante de la production des particules virales (Dreux et al., 2012a). De plus, les EXOs peuvent servir d'appareil au virus pour infecter les hépatocytes adjacents, indépendamment de la synthèse des protéines structurales du virus (Ramakrishnaiah et al., 2013) ; divergeant alors des particules infectieuses de par leur structure, leur voie de sécrétion mais également leur voie de transmission. Des études *in vitro* ont montré que les EXOs produits par des cellules infectées par HCV jouaient un rôle clé dans l'activation des pDCs et dans la production d'IFN-I (**Figure 8**) (Dreux et al., 2012a). En effet, les EXOs dérivés de HCV induisent une réponse IFN-I par les pDCs plus forte comparée aux particules infectieuses, capables de bloquer la réponse médiée par TLR7. En particulier la liaison de la glycoprotéine E2 aux

lectines de surfaces exprimées par les pDCs, BDCA-2, est responsable de la régulation négative de la réponse IFN par HCV (Florentin et al., 2012).

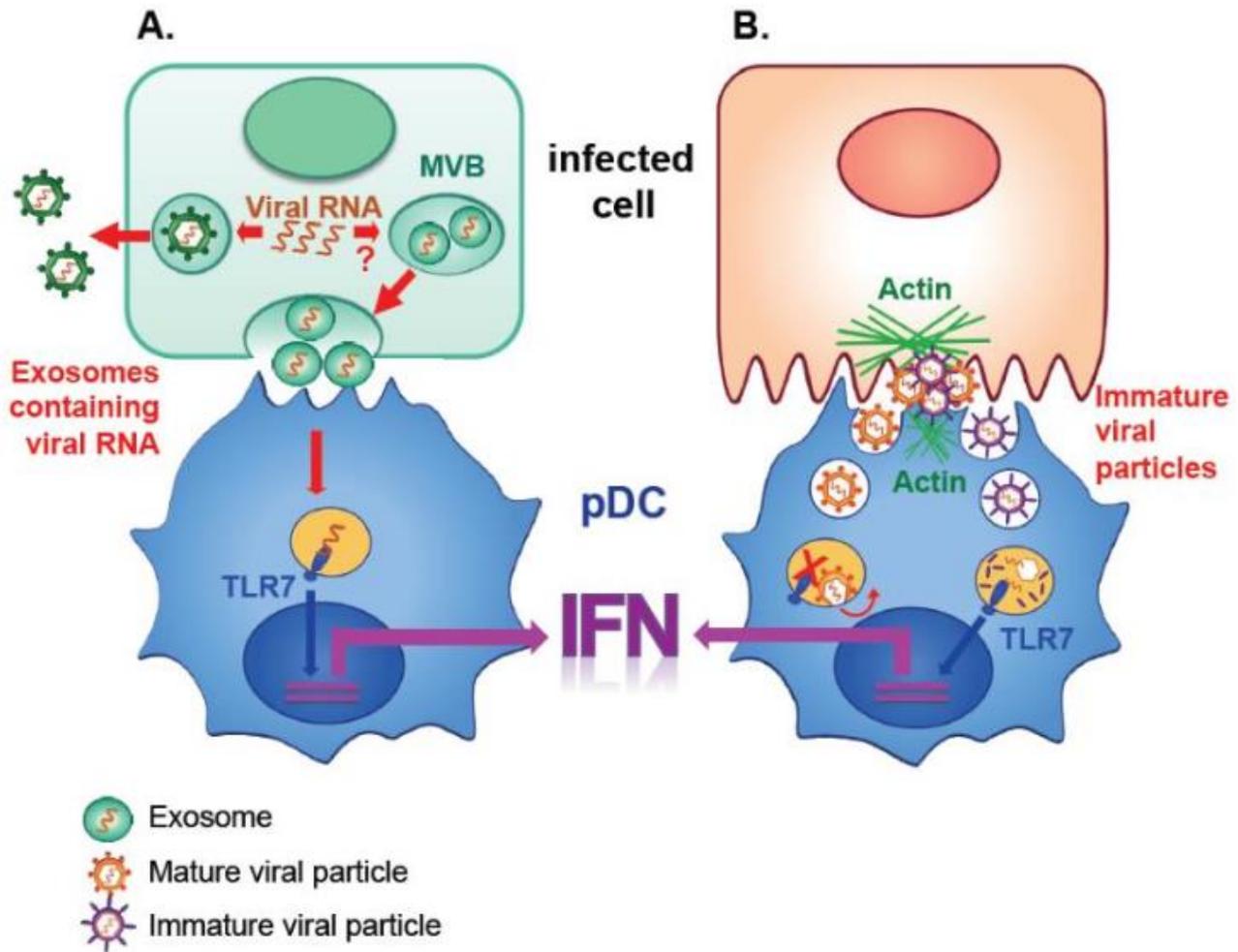


Figure 8 : Modèles d’activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le transfert de PAMPs viraux dans le cas d’une infection par HCV et DENV

(A) En parallèle des virons, les cellules infectées par HCV produisent des exosomes (EXO) contenant l’ARN viral au niveau des MVB (multivesicular body). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) en contact avec des cellules infectées par HCV reconnaissent l’ARN viral empaqueté dans des EXOs après leurs transferts de la cellule infectée vers la pDC *via* TLR7. (B) Les cellules infectées par DENV produisent des particules virales qui se regroupent à l’interface de la cellule infectée et de la pDC. Les particules virales matures transférées aux pDCs sont capables de fusionner avec la membrane des endo-lysosomes et n’activent que faiblement les pDCs. En revanche les particules immatures retenues dans les endo-lysosomes permet la reconnaissance des ARNs viraux par le TLR7 et entraîne la production d’IFN-I (Assil et al., 2015).

Objectifs de la thèse

A. Analyse structurale et fonctionnelle des contacts physiques nécessaires à l'action antivirale des cellules dendritiques plasmacytoïdes avec des cellules infectées : Identification de la synapse immunologique (Papier N°1).

B. Analyse du rôle de la voie de signalisation de l'IFN-I sur la formation de la synapse immunologique entre des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules infectées par le virus de la dengue. (Papier N°2).

Résultats

I. Paper N°1: Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected cells Form an Interferogenic synapse required for Antiviral Responses

Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected cells Form an Interferogenic synapse required for Antiviral Responses

Sonia Assil^{1, 2}, Séverin Coléon^{1, 2}, Congcong Dong¹, Décembre Elodie¹, Sherry Lee¹, Omran Allatif¹, Webster Brian¹, Dreux Marlène¹

1 CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon F-69007, France

2 These authors contributed equally

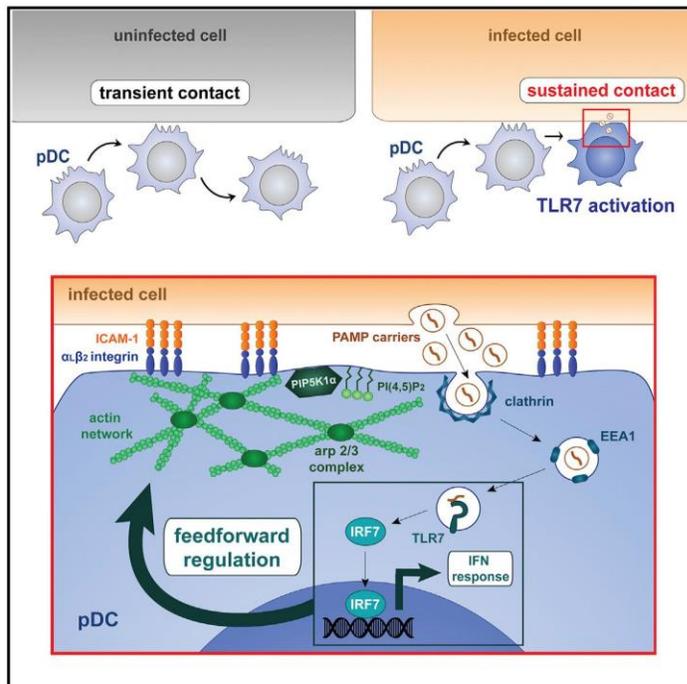
Abstract

Type I interferon (IFN-I) is critical for antiviral defense, and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are a predominant source of IFN-I during virus infection. pDC-mediated antiviral responses are stimulated upon physical contact with infected cells, during which immunostimulatory viral RNA is transferred to pDCs, leading to IFN production via the nucleic acid sensor TLR7. Using dengue, hepatitis C, and Zika viruses, we demonstrate that the contact site of pDCs with infected cells is a specialized platform we term the interferogenic synapse, which enables viral RNA transfer and antiviral responses. This synapse is formed via α Lb2 integrin-ICAM-1 adhesion complexes and the recruitment of the actin network and endocytic machinery. TLR7 signaling in pDCs promotes interferogenic synapse establishment and provides feed-forward regulation, sustaining pDC contacts with infected cells. This interferogenic synapse may allow pDCs to scan infected cells and locally secrete IFN-I, thereby confining a potentially deleterious response.

Cell Host & Microbe

Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses

Graphical Abstract



Authors

Sonia Assil, Séverin Coléon, Congcong Dong, ..., Omran Allatif, Brian Webster, Marlène Dreux

Correspondence

marlene.dreux@ens-lyon.fr

In Brief

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) sense viruses by physically contacting infected cells. Assil et al. show that the contact site between pDCs and infected cells is a specialized platform, termed an interferogenic synapse, with polarized cellular components and machinery that efficiently transfer immunostimulatory RNA to induce antiviral responses in pDCs.

Highlights

- pDCs adhere to infected cells via $\alpha_L\beta_2$ integrin/ICAM-1 interactions
- Regulators of the actin network and endocytosis polarize at contact sites
- TLR7-induced signaling potentiates pDC polarity and contact with infected cells
- Infected cells activate pDCs through the interferogenic synapse



Assil et al., 2019, Cell Host & Microbe 25, 730–745
May 8, 2019 © 2019 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.005>

CellPress

Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses

Sonia Assil,^{1,2} Séverin Coléon,^{1,2} Congcong Dong,¹ Elodie Décembre,¹ Lee Sherry,¹ Omran Allatif,¹ Brian Webster,¹ and Marlène Dreux^{1,3,*}

¹CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon F-69007, France

²These authors contributed equally

³Lead Contact

*Correspondence: marlene.dreux@ens-lyon.fr

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.005>

SUMMARY

Type I interferon (IFN-I) is critical for antiviral defense, and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are a predominant source of IFN-I during virus infection. pDC-mediated antiviral responses are stimulated upon physical contact with infected cells, during which immunostimulatory viral RNA is transferred to pDCs, leading to IFN production via the nucleic acid sensor TLR7. Using dengue, hepatitis C, and Zika viruses, we demonstrate that the contact site of pDCs with infected cells is a specialized platform we term the interferogenic synapse, which enables viral RNA transfer and antiviral responses. This synapse is formed via $\alpha_1\beta_2$ integrin-ICAM-1 adhesion complexes and the recruitment of the actin network and endocytic machinery. TLR7 signaling in pDCs promotes interferogenic synapse establishment and provides feed-forward regulation, sustaining pDC contacts with infected cells. This interferogenic synapse may allow pDCs to scan infected cells and locally secrete IFN-I, thereby confining a potentially deleterious response.

INTRODUCTION

Type I interferon (i.e., IFN α/β , referred to as IFN-I) response is pivotal for protection against viral infections. It is initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) including viral nucleic acids by cellular pathogen recognition receptors (PRRs) such as toll-like receptors (TLRs). This leads to the secretion of IFN-I, type III IFNs, and inflammatory cytokines and the expression of an array of IFN-stimulated genes (ISGs) (Hoffmann et al., 2015). This first line of host response suppresses viral spread and jump-starts the adaptive immune response.

All cells possess signaling pathways designed to trigger antiviral responses against invading viruses. Nonetheless, virtually all viruses have evolved mechanisms to inhibit these host-

sensing pathways within cells that they infect (Garcia-Sastre, 2017). For example, hepatitis C (HCV), dengue (DENV), and Zika (ZIKV) viruses encode viral proteases, which inactivate the adaptors of host antiviral sensing (Garcia-Sastre, 2017). Despite viral countermeasures, cytokines and ISGs are detected in infected humans and play pivotal roles in infection clearance and pathogenicity, suggesting the existence of alternative pathogen-sensing mechanisms (Martina et al., 2009; Snell et al., 2017; Webster et al., 2016). Along this line, we and others uncovered that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce robust levels of IFN-I in response to physical contact with infected cells (Webster et al., 2016). This response is unopposed by viral products as pDCs are not productively infected. pDCs function as sentinels of viral infections and are a major early source of IFN-I *in vivo* during viral infections (Swiecki and Colonna, 2015). This response is predominantly triggered via recognition of viral RNA and DNA species by endolysosome-localized TLR7 and TLR9, respectively. pDC response is pivotal for the control of viral infection as recently demonstrated, e.g., for DENV (Swiecki and Colonna, 2015; Webster et al., 2018). IFN-I production by pDCs also contributes to several autoimmune or inflammatory diseases, and pDCs are pivotal in cancers (Swiecki and Colonna, 2015). Despite this large spectrum of regulatory functions of pDCs, the molecular bases controlling their activation are still largely enigmatic.

We previously demonstrated that immunostimulatory viral RNA can be transferred by non-canonical and/or non-infectious carriers from infected cells to pDCs, leading to IFN production via the TLR7 sensor. These PAMP carriers include exosomes and immature viral particles in the context of HCV and DENV, respectively (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012). The activation of pDCs by exosomal transfer of viral RNA has been also shown for the sensing of genetically distant viruses (Feng et al., 2014; Wieland et al., 2014).

Importantly, while various types of carrier can transfer PAMPs, these pDC activations require physical contact with infected cells (Webster et al., 2016). For example, HCV-infected cells secrete exosomes into the culture supernatant at concentrations that are below an excitatory threshold that could be reached in the intercellular space during cell contacts (Dreux et al., 2012). In the context of DENV, viral components (i.e., envelope proteins) accumulate at the cell contact between infected cells and pDCs



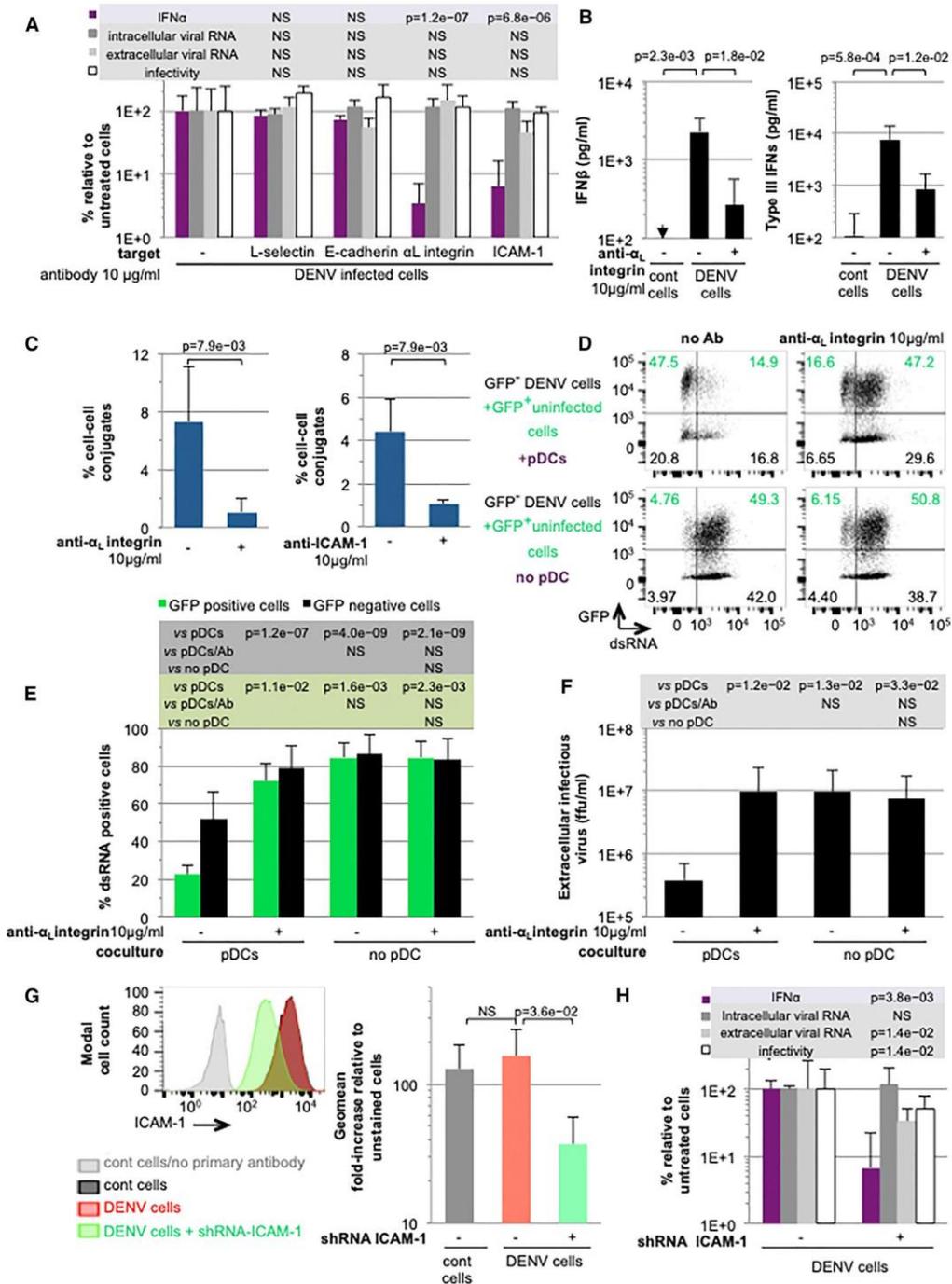


Figure 1. Identification of Adhesion Molecules Involved for pDC-Mediated Antiviral Response against DENV

(A) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected Huh-7.5.1 cells that were treated or not with blocking antibodies against L-selectin, E-cadherin, α_L integrin, or ICAM-1 at 10 μ g/mL. The intracellular and extracellular viral RNA levels and extracellular infectious virus production by DENV-infected cells treated with blocking antibodies were analyzed in absence of pDC, but with treatment conditions similar to the analysis of IFN α production in

(legend continued on next page)

(Decembre et al., 2014). Albeit not universal, the cell contact is increasingly recognized as a requirement for pDC-mediated antiviral state triggered by many genetically distant RNA viruses (e.g., *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Arenaviridae*, *Retroviridae*, and *Togaviridae*) and in different species (Bruni et al., 2015; Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012; Feng et al., 2014; Garcia-Nicolas et al., 2016; Lepelley et al., 2011; Takahashi et al., 2010; Webster et al., 2016; Webster et al., 2018; Wieland et al., 2014); nonetheless, how cell contact mediates pDC response is still largely unknown.

Here, we explored the molecular mechanisms underlying the establishment of contacts between pDCs and infected cells, its modulation and impact on the activation of an antiviral state using DENV, HCV, and ZIKV as viral models. Our results uncovered that pDCs established cell adhesion with infected cells via $\alpha_L\beta_2$ integrin complex and ICAM-1. We showed that regulators of actin network are polarized together with components of the endocytosis machinery at contact sites. These actin-mediated reorganizations define a remodeled territory acting as a platform for the transfer of PAMP carriers to the endolysosomal TLR7, leading to pDC-mediated antiviral response. We further demonstrated that the molecular rearrangements at contact sites were potentiated by the TLR7-mediated response, which thus acts as a positive feed-forward regulation of pDC activation. The formation of interferogenic synapse is thus a pDC attribute critical for their robust IFN response.

RESULTS

The $\alpha_L\beta_2$ Integrin-ICAM-1 Adhesion Molecules Are Involved in pDC Activation by Contacts with DENV-Infected Cells

The pDC response to many viruses requires contact, so we sought to define the molecular basis for establishment of physical contacts between pDCs and infected cells. We tested whether cell adhesion complexes can establish pDC-infected cell contact leading to pDC activation. We analyzed the surface expression of selected representatives of cell adhesion and/or homing complexes, known to be key for pDC functions, e.g., migration and antigen presentation (Sozzani et al., 2010; Swiecki and Colonna, 2015). L-selectin (also called CD62L), α_L integrin (also called ITGAL or CD11a), and intercellular adhesion mole-

cule (ICAM)-1 (CD54) were all expressed at the pDC surface (Figure S1A). ICAM-1 was also present at the surface of the donor cells (i.e., infected and uninfected cells), while E-cadherin was present only on donor cell surface (Figure S1A). Next, we tested the role of cell adhesion molecules in pDC IFN α production induced by contact with DENV-infected cells in antibody-mediated blocking assays. The blockade of L-selectin and E-cadherin had no significant impact on pDC IFN α production induced by DENV-infected cells (Figures 1A and S1B). In sharp contrast, inhibition of both α_L integrin and its ligand ICAM-1 (Rothlein et al., 1986) prevented the pDC IFN α response in a dose-dependent manner, along with the production of IFN β and type III IFNs (IL-29, IL-28A, and IL-28B) (Figures 1A, 1B, S1B, and S1C). Viral infectivity and RNA levels were maintained upon similar treatment of infected cells in absence of pDCs, thus ruling out non-specific effects on DENV replication (Figures 1A, S1B, and S1C). The regulation of the establishment of pDC-infected cell contact by the α_L integrin and its ligand ICAM-1 was determined by imaging flow cytometry technology (Figure S1D). We showed that blocking of both α_L integrin and ICAM-1 significantly prevented the contact of pDCs with DENV-infected cells (Figure 1C).

Next, to define how the pDC response to contact with DENV-infected cells inhibits viral propagation, we set up an assay consisting of pDCs cocultured with GFP $^-$ DENV-infected cells and GFP $^+$ uninfected cells. The results demonstrated that pDC response readily prevented viral spread from GFP $^-$ DENV-infected cells to the cocultured GFP $^+$ uninfected cells and consistently diminished the replication in GFP $^-$ cells, i.e., infected prior to the coculture (Figures 1D and 1E). The inhibition of pDC-infected contact via blockage of the α_L integrin restored the viral propagation to levels comparable to those in the absence of pDC (Figures 1D and 1E). Consistently, the analysis of infectious virus production by DENV-infected cells demonstrated similar inhibition by cocultured pDCs (compared to the absence of pDCs) and the restoration of the viral production upon inhibition of α_L integrin (Figure 1F). This indicates that the establishment of cell contact via adhesion molecules is required for pDC-mediated antiviral response. Further, we assessed the impact of silencing ICAM-1 expression in infected cells. pDC IFN α production was strongly reduced when ICAM-1 expression was silenced in DENV-infected cells (Figures 1G and 1H). In absence of pDC, reduced ICAM-1 expression has no impact

cocultures (i.e., incubation time and concentration). Results are expressed as percentages relative to untreated cells; mean \pm SD; 4–7 independent experiments. The statistical significances reflected by p values are indicated in the table; not significant (NS; $p \geq 0.05$).

(B) Quantification of IFN β and type III IFNs (IL-29, IL-28A, IL-28B) in supernatants of pDC and DENV-infected cell cocultures treated, or not, with blocking anti- α_L integrin as in A. Results expressed as pg/mL; mean \pm SD.

(C) Quantification of conjugates between pDCs and DENV infected cells by Image Stream X technology, as exemplified in Figure S1D. Celltrace Violet stained-pDCs were cocultured with GFP $^+$ Huh7.5.1 infected cells for 4–5 h incubation in presence or not of anti- α_L integrin or anti-ICAM-1. Results of 5 independent experiments for each graph expressed as percentage of conjugates; mean \pm SD; $n = 10,000$ events per condition and per experiment.

(D and E) FACS analysis of viral transmission from GFP $^-$ DENV infected cells to GFP $^+$ uninfected cells cocultured with or without pDCs for 48 h and in presence of anti- α_L integrin (10 μ g/mL). (D) Dot plots of a representative experiment. (E) Results expressed as the percentage of cells positive for dsRNA (a marker of viral replication) in the GFP $^+$ and GFP $^-$ cell populations, mean \pm SD; 5 independent experiments; p values are indicated in green and gray for GFP $^+$ and GFP $^-$ cells, respectively.

(F) Quantification of extracellular infectious virus production harvested after 48 h coculture, as in (D) and (E) and expressed as foci forming unit (ffu) per mL, mean \pm SD.

(G and H) Down-regulation of ICAM-1 expression in Huh7.5.1 cells obtained by transduction using shRNA-expressing lentiviral vectors. (G) FACS analysis of ICAM-1 surface expression: representative histogram and quantifications expressed as fold-increases of geomean relative to unstained cells; $n = 4$ independent experiments. (H) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected Huh-7.5.1 cells down-regulated or not for ICAM-1 expression, as in (G). The intracellular and extracellular viral RNA levels and infectivity were analyzed in the absence of pDC. Error bar represents mean \pm SD; $n = 4$ independent experiments.

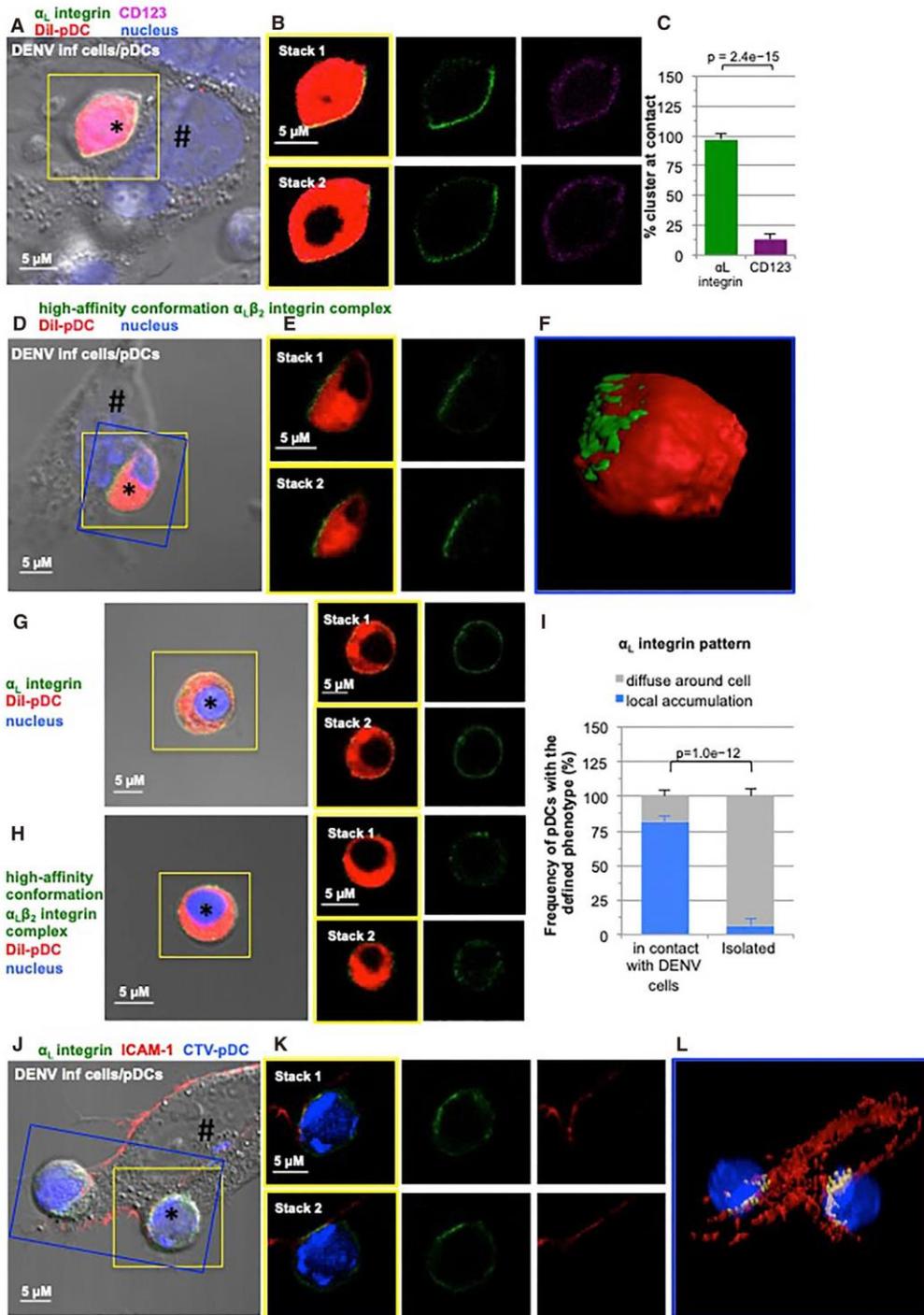


Figure 2. Accumulation of α_L Integrin and Its Ligand ICAM-1 at the Contact

(A–C) Confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin (green) and CD123 (purple) in cocultures of pDCs (Dil staining prior to coculture; red; marked by *) and DENV Huh7.5.1 infected cells (#) for 4–5 h incubation; nuclei stained with Hoechst (blue). (A) Detection of α_L integrin, CD123, Dil and Hoechst projected

(legend continued on next page)

on virus replication, yet slightly diminished the release of DENV (Figure 1H). Although we cannot formally exclude that decreased viral production could contribute to lower pDC activation, pDC IFN α production was disproportionately reduced when ICAM-1 expression was silenced in cocultured infected cells (Figure 1H). Of note, this is in accordance with the results obtained with ICAM-1 blocking antibody, suggesting a regulation by ICAM-1 independent of viral production (Figures 1A, S1B, and S1C). Together, our results identified α_L integrin and ICAM-1 as a key cell adhesion complex for the sensing of DENV-infected cells by pDC, leading to a potent antiviral response.

Cell Polarity of the Adhesion Molecules at the Contact of pDC and DENV-Infected Cell

Next we demonstrated that α_L integrin specifically accumulated at the contact site of pDC and DENV-infected cell (i.e., over 90% of the analyzed contacts), as opposed to marginal accumulation at contact of CD123, a surface molecule not involved in cell adhesion (Figures 2A–2C, S2A, and S2B). The α_L integrin forms complex with β_2 integrin, which is known to undergo conformational rearrangement to an open form compatible with high-affinity interaction with its ligands, including ICAM-1 (Shimaoka et al., 2003). The high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex polarized at the contact site of pDC and infected cell, on the pDC side (Figures 2D–2F, S2C, and S2D). Of note, cell polarity of α_L integrin and the high-affinity conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex was absent when pDCs were not in contact with infected cells, shown by the quantification of α_L integrin accumulation versus diffuse localization around the pDCs (Figures 2G–2I, S2E, and S2F), thus validating the specificity of the polarization upon cell contact. Further, in agreement with the engagement of the $\alpha_L\beta_2$ integrin complex with its ligand, ICAM-1, the latter was detected at contact on the surface of infected cells apposed to polarized α_L integrin on pDC side (Figures 2J–2L). Our results demonstrate that the high-affinity (open) conformation $\alpha_L\beta_2$ integrin complex accumulates at contact, facing its partner ICAM-1.

The $\alpha_L\beta_2$ Integrin-ICAM-1 Adhesion Molecules Are Required for pDC Activation by Distinct Viruses

The activation of pDCs by HCV-infected cells also requires physical contact, yet this involves a distinct PAMP carrier, i.e., exosome (versus immature viral particles for DENV) (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012). We thus tested whether $\alpha_L\beta_2$ integrin-ICAM-1 adhesion complexes were also required for pDC activation by HCV-infected cells. Similar to DENV, ICAM-1 is

present at the surface of HCV-infected cells (Figure S3D), and blocking of both α_L integrin and ICAM-1 diminished the pDC IFN α response to HCV-infected cells in dose-response experiments, without any non-specific effect on HCV viral production—in absence of pDC (Figures 3A and S3A). Consistently, blocking both α_L integrin and ICAM-1 significantly prevented the contact of pDCs with HCV-infected cells (Figure 3B). Although the presence of ICAM-1 on PAMP carriers could additionally contribute to their tethering to the surface of the pDCs, together these results demonstrated that the $\alpha_L\beta_2$ integrin-ICAM-1 interaction regulates the formation of pDC-infected cell conjugate and is required for pDC activation, independent of the nature of PAMP carrier. In sharp contrast, anti- α_L integrin and anti-ICAM-1 did not prevent pDC IFN α production triggered by cell-free virus, i.e., influenza virus (Figure 3C), suggesting that $\alpha_L\beta_2$ integrin-ICAM-1 interaction regulates cell contact-mediated-pDC activation.

Next, we extended our demonstration to ZIKV, which also represents an important health concern (Miner and Diamond, 2017). Using epidemic ZIKV strains (i.e., isolated from patients in Brazil and French Polynesia; H/PF), we demonstrated that robust pDC IFN α productions were induced when pDCs were in physical contact with ZIKV-infected cells (Figure 3D; coculture set-up). On the contrary, no IFN α response was detected when pDCs were exposed to ZIKV infectious supernatants (SN) or upon physical separation of pDCs from ZIKV-infected cells by a semi-permeable membrane in transwell (TW) experiments (Figure 3D). In accordance with TLR7 localized in endolysosome, and like DENV and HCV, pDC activation by ZIKV-infected cells involved endocytosis (Figure S3B). Importantly, we showed that similar to what is observed for DENV and HCV, pDC response to ZIKV-infected cells is mediated by α_L integrin-ICAM-1 adhesion molecules as shown by the reduced production of IFN α , IFN β , and type III IFNs by antibody blocking (Figures 3F, 3G, S3C, and S3E).

Next, we demonstrated that similar to the observation with DENV, pDC response to contact with ZIKV infected cells prevented ZIKV transmission to uninfected cells (GFP⁺), replication in the cells infected prior to coculture (GFP⁻) and viral production (Figures 3H, 3I, and S3F). Of note, the inhibition of α_L integrin in pDC-infected cell cocultures greatly restored viral propagation to levels similar to those in the absence of pDCs (Figures 3H, 3I, and S3F) indicated that the establishment of cell contact is required for pDC-mediated antiviral response against ZIKV. Together, our results demonstrate that the establishment of pDC-infected cell interactions via the cell adhesion complex is

on the phase contrast imaging. (B) Magnification of two consecutive Z-stacks of yellow-boxed pDC shown in (A). (C) Quantification of the frequency of pDCs with accumulation of α_L integrin or CD123 at contact. Results of 3 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells; mean \pm SD; n = 39 analyzed contacts; p value as indicated.

(D–F) Confocal microscopy imaging of immunostained high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex (detection of the exposure of m24 epitope in β_2 I domain) in cocultures of pDCs (Dil stained; *) and DENV-infected cells (#), 4–5 h incubation; nuclei (Hoechst). Detection of the high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex projected on the phase contrast imaging (D), magnification of two consecutive Z-stacks of yellow-boxed pDC shown (E), and 3D reconstruction of consecutive Z-stacks of blue-boxed pDC (F).

(G and H) Confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin (G) and the high-affinity conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex (H) in pDCs in absence of contact, displayed as in (D) and (E).

(I) Quantification of the frequency of α_L integrin with accumulation or diffuse localization around pDCs. Results of 3 independent experiments are expressed as in the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells versus in absence of contact; mean \pm SD; n > 37 analyzed contacts.

(J–L) Confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin and ICAM-1 in cocultures of pDCs (stained by CellTrace Violet) and DENV-infected cells, 4–5 h incubation. Staining of α_L integrin-ICAM-1 projected on the phase contrast imaging (J) and magnification of two consecutive Z-stacks of yellow-boxed pDC shown (K) and 3D reconstruction of consecutive Z-stacks of blue-boxed contacts, with colocalized signal in white (L).

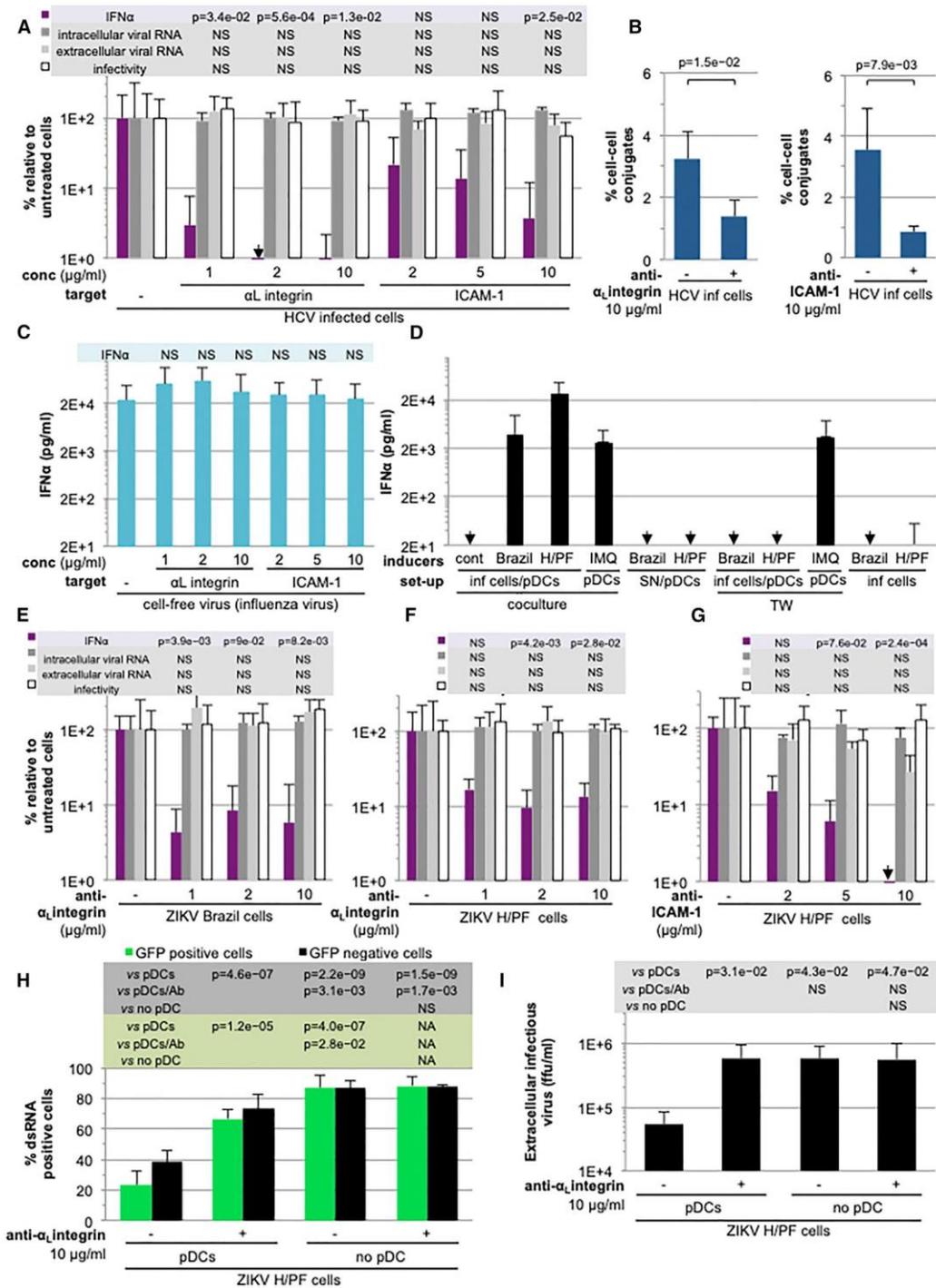


Figure 3. Inhibition of α_L Integrin and ICAM-1 Prevents pDC IFN α Production Induced by Coculture with Cells Infected by Distinct Viruses
 (A) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with HCV-infected Huh7.5.1c2 cells that were treated or not with blocking antibodies against α_L integrin or ICAM-1. The intracellular and extracellular viral RNA levels and infectious virus production by infected cells treated with blocking antibodies were analyzed in absence of pDCs. Results and statistical significances are presented as in Figure 1A; mean \pm SD; n = 4–7 independent experiments.

(legend continued on next page)
 Cell Host & Microbe 25, 730–745, May 8, 2019 735

a prerequisite for the antiviral function of pDC in response to cells infected by distinct viruses.

Polarization at Contact Site of Actin Network and Regulators Contribute to pDC Response

The engagement of integrins with their ligand can induce the local recruitment of the actin network, notably via Arp2/3 complex, which mediate actin nucleation by branching of the actin filaments within network (DeMali et al., 2002; DeMali et al., 2014; Rotty et al., 2013; Vicente-Manzanares et al., 2009). This is in line with our preceding observations for the presence of actin at the contact of pDC and DENV-infected cell (Decembre et al., 2014). Here, we showed that actin network accumulated at cell contacts using both HCV-infected cells and the subgenomic replicon (SGR) model for HCV replication (Figures S4A–S4D). HCV SGR cells do not produce virus but trigger pDC IFN response, as previously reported (Dreux et al., 2012; Takahashi et al., 2010), thus demonstrating that cell polarity at contact is independent of viral production (Figures S4A–S4B). Non-specific polarized immunodetection was ruled out by the simultaneous analysis of another intracellular component, the protein disulfide-isomerase (PDI), an ER marker and by the expected decrease of actin clustering upon treatment with inhibitor of actin polymerization, i.e., Latrunculin B (Figures S4B and S4D).

We thus sought to define the subcellular localization of key regulators of actin network scaffolding at the plasma membrane. We first selected the phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PI(4,5)P₂) because it is a plasma membrane-localized modified lipid known to recruit actin-adaptor proteins and to regulate the clustering of integrins as well as clathrin-mediated endocytosis (Jost et al., 1998; Martel et al., 2001; Posor et al., 2015; Vicente-Manzanares et al., 2009). The type I phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase α (referred to as PIP5K1 α) generates PI(4,5)P₂ from its PI4P precursor (Doughman et al., 2003). We showed that PI(4,5)P₂ and PIP5K1 α co-clustered at the contact sites of pDCs with cells infected either by DENV or HCV, or with HCV replicating (rep) cells (Figures 4A–4L). The 3D reconstruction of consecutive Z-stacks further revealed that the co-clusters were present on the side of pDCs (Figures 4C, 4G, and 4K). The quantification of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α co-clustering revealed that an intact actin network was required for the polarization at contact, as demonstrated by the decrease in phenotype when using inhibitors of Arp2/3 complex and actin polymerization (Figures 4D, 4H, and 4L). Of note, the frequency of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α co-clustering at pDC-infected cell contacts was lower than the polarization of

the α_L integrin (Figures 2C and 2I), likely reflecting the transient nature and/or differential kinetics of these recruitments at contact as compared to the adhesion complexes.

Next, we tested the functional role of actin network regulators, including Arp2/3 complex, and the Rho GTPase CDC42, which also regulates actin polymerization, and along with PI(4,5)P₂, is known to induce actin nucleation via Arp2/3 (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi et al., 1999; Rozelle et al., 2000). The pharmacological inhibition of either Arp2/3 complex, CDC42 or actin polymerization prevented pDC IFN α production induced by DENV or HCV-infected cells, without non-specific effect on the viral replication of DENV and HCV in absence of pDC (Figures 4M–4O, S4E–S4G, and S4I–S4L). Of note, similar pharmacological inhibition of Arp2/3 did not prevent pDC IFN α production triggered by cell-free influenza virus (Figure 4P), implying that Arp2/3-mediated actin nucleation is pivotal for pDC response induced by contact with infected cells. This assumption was validated by the reduced frequency of pDC-infected cell contacts upon inhibition of Arp2/3 and actin polymerization (Figures 4Q, 4R, and S4H). Our results underscore that integrin-mediated adhesion and rearrangement at contact of actin network via, notably, Arp2/3 are pivotal for the establishment and/or reinforcement of the cell contacts with infected cells and subsequent pDC activation, presumably by a concerted structuring of the contact site.

Components of the Endocytosis Machinery Polarize at Contacts

The immunostimulatory viral RNAs are transferred by vesicles (i.e., exosome or immature virion) from infected cells to pDCs and induce IFN-I response via clathrin-mediated endocytosis by pDCs and recognition through endolysosome-localized TLR7 (Figure S3B) (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012; Takahashi et al., 2010; Webster et al., 2016). Of note, PI(4,5)P₂, which clustered at contact (Figures 4A–4L), is known to mark the plasma membrane and, together with cargo proteins, is pivotal for the initiation of clathrin-coated pit formation, and consistently, PIP5K1 α via PI(4,5)P₂ synthesis control the rate and growth of clathrin-coated pits (Jost et al., 1998; Posor et al., 2015). We thus tested whether the components of the endocytosis machinery could polarize at contact and thereby facilitate the internalization of PAMP carriers by pDCs. We observed co-clusters of PI(4,5)P₂ and Early Endosome Antigen 1 (EEA1) at the contact sites of pDCs with DENV-infected cells, and similarly with HCV replicating cells (Figures 5A–5F, 5J, 5K, S5A, and S5B). The 3D reconstruction of consecutive Z-stack

(B) Quantification of conjugates between pDCs and HCV Huh7.5.1c2 infected cells in presence or not of anti- α_L integrin or -ICAM-1; mean \pm SD; n = 5 independent experiments; expressed as in Figure 1C.

(C) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs stimulated by cell-free influenza virus and treated with blocking antibodies as in (A); mean \pm SD; n = 3–4 independent experiments.

(D) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with Huh-7.5.1 cells infected by the epidemic ZIKV strains (i.e., clinical isolates from patients in Brazil and French Polynesia; H/PF) when cells were in physical contact (coculture), separated by the permeable membrane of transwell (TW), or treated with supernatants from ZIKV infected cells (SN) or imiquimod at 20 μ M (IMQ), as positive control. Mean \pm SD; n = 4–7 experiments; non detectable (arrays).

(E–G) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with ZIKV infected Huh-7.5.1 cells treated or not with anti- α_L integrin or anti-ICAM-1 blocking antibodies and parallel analysis of intracellular and extracellular viral RNA levels and infectivity in absence of pDC, as in A. Mean \pm SD; n = 4–5 independent experiments in panel E and n = 3 independent experiments in panels F and G.

(H) FACS analysis of viral spread from GFP⁻ ZIKV infected cells to GFP⁺ uninfected cells in cocultures with or without pDCs for 48 h and in presence of blocking antibody, as indicated.

(I) Quantification of infectious virus production in presence of pDCs and blocking antibody, as indicated and performed as in panel H. Experiments performed and expressed as in Figures 1E and 1F; 5 independent experiments.

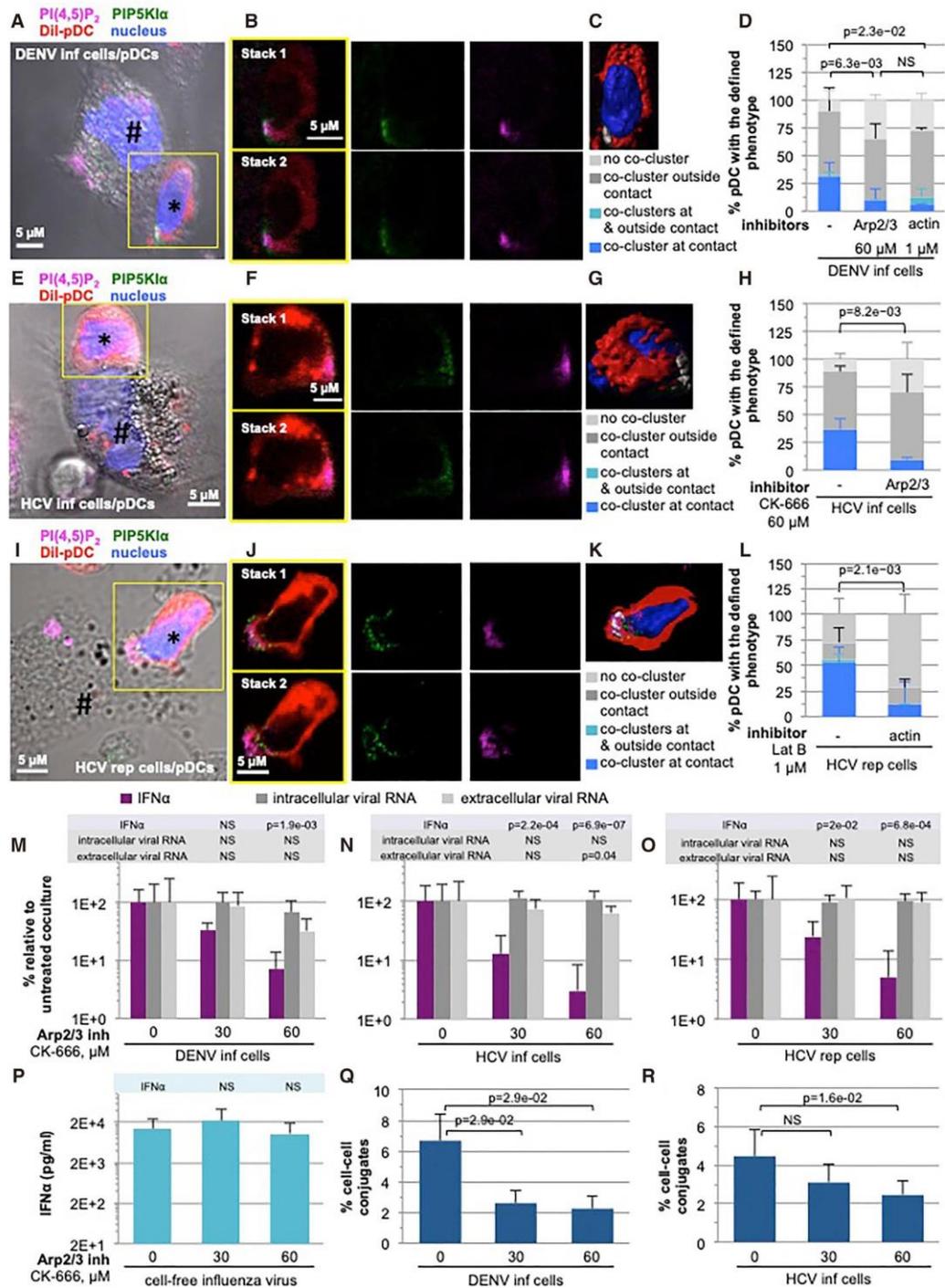


Figure 4. Actin Network Regulators Polarize at the Contact and an Intact Actin Network Is Required for pDC Response
(A–L) Confocal microscopy imaging of immunostained PI(4,5)P₂ and PIP5K1α in 4–5 h cocultures of pDCs (Dil stained) and DENV (A–D), HCV-infected cells (E–H) and HCV-replicating (rep) Huh7.5.1c2 cells (I–L), nuclei (Hoechst). Imaging of PI(4,5)P₂ and PIP5K1α projected on the phase contrast (A), (E), and (I), confocal

(legend continued on next page)

imaging suggested that the PI(4,5)P₂-EEA1 co-clustering was present on the pDC side of the contact (Figures 5C and 5F). Similarly, clathrin co-clustered with actin on the pDC side, as revealed by the 3D reconstruction of contact sites (Figures 5G–5I, 5L, and S5C–S5F). The cell polarity of both these markers at contact required an intact actin network, as demonstrated by using inhibitors of Arp2/3 complex and actin polymerization (Figures 5J–5L). Together, our results suggest that components of the endocytosis machinery polarize at the contact between pDCs and infected cells, thus representing a functional remodeling to favor a localized endocytosis of PAMP carriers leading to pDC activation via the endolysosomal TLR7.

TLR7-Induced pDCs Establish Sustained Contact with Virally Infected Cells

The rearrangement of the contact site into a specialized territory on the side of pDCs suggests the existence of a dynamic process within pDCs when in contact and sensing infected cells. We hypothesized that the sensing by pDCs of PAMP carriers released by infected cells, and thereby, the activated state of the pDCs could control the contact establishment and/or the polarization of pDC cellular machineries. The frequency of pDCs conjugated with infected cells was significantly higher than with uninfected cells (Figure 6A). Similar results were obtained for DENV and HCV infected cells, thus showing that the potentiation of contact by sensing virally infected cells is not virus restricted.

To further demonstrate that pDC contact with infected cells is more stable than uninfected cells, we developed a live-imaging approach (using spinning-disk confocal microscopy) to quantify the duration of pDC contact with infected cells as compared to uninfected cells (Figure S6A). Distinct categories of contact duration were observed, including short-lived contacts (<100 min), intermediate duration contacts of low frequencies, and sustained contact (>350 min) (Figures 6B–6I). Importantly, the frequency of long-lasting contacts was higher when pDCs were cocultured with DENV-infected cells as compared to contact with uninfected cells (Figures 6B and 6F). In accordance, as highlighted in tracking motion analysis pDC motility, and consistently the number of contact per pDCs, were reduced when cocultured with infected as compared to uninfected cells (Figures S6B, S6C, and S6K). Similar results were obtained in the context of pDC cocultured with HCV replicating cells (Figures 6C and 6G), suggesting that this regulation is not virus restricted and independent of the type of PAMP carriers. Live-imaging experiments with blocking anti- α_L integrin revealed that the

long-lasting contacts with infected cells involved α_L integrin (Figures 6D, 6H and S6E). Furthermore, the blocking anti- α_L integrin decreased the frequency of conjugates even when added later in course of pDC-infected cell coculture, leading to reduced IFN α production by pDCs (Figures S6G–S6I).

Our results demonstrated that pDCs established sustained contact with infected cells, thus implying that a molecular regulation of the contact by either sensing of the infected status of cells and/or the activating state of pDCs promotes their retention at the contact of infected cells. We thus tested the regulation of the pDC-infected cell contact by TLR7-induced signaling. To address this question, we used a specific TLR7 inhibitor (*i.e.*, IRS661), which diminished the pDC IFN α production induced by DENV-infected cells, as previously reported (Decembre et al., 2014). We found that the inhibition of TLR7 signaling diminished the frequency of the long-lived contacts of pDCs with infected cells (Figures 6B, 6F, and S6D). Inhibition of TLR7 signaling thus reverted the duration of pDC contacts to those observed with uninfected cells. Accordingly, TLR7 agonist increased the frequency of long-lasting contact of pDCs with non-infected cells, without a marked impact on pDC velocity (Figures 6E, 6I, S6F, S6J, S6L, and S6M). Together, our results demonstrate that TLR7 signaling induced by recognition of infected cells exerts a feed-forward regulation, leading to sustained contact of pDCs with infected cells.

Recognition of Viral Infection Favors Polarization of Cellular Components at Contacts via TLR7-Induced Signaling

Next, we tested whether the sustained contact observed with infected cells was associated with increased polarization of the identified cell adhesion molecules at the contact sites. The total surface expression of ICAM-1 did not markedly change when comparing uninfected versus cells infected by the different viral models (Figures S1A and S3D), neither did the level of α_L integrin on pDC cell surface when cocultured with either infected or uninfected cells (Figures S7A–S7B). Importantly, the co-accumulation at contact of α_L integrin-ICAM-1 significantly augmented when pDCs were in contact with DENV or HCV-infected cells as compared to uninfected cells (Figures 7A and 7B). In accordance with the known interplay between α_L integrin-ICAM-1 and the regulators of actin network (DeMali et al., 2014), we showed that the polarization of actin network regulators including PI(4,5)P₂-PIP5K1 α increased upon contact with DENV-infected cells and similarly for HCV-infected and HCV-replicating cells (Figures 7C, 7F, and 7I).

stacks of magnification of yellow-boxed pDC (B), (F), and (J) and 3D reconstruction of consecutive Z-stacks with colocalization of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α in white (C), (G), and (K). (D), (H), and (L) Quantification of the phenotype of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α co-clustering as indicated (*i.e.*, co-cluster at the contacts, outside the contact or no co-cluster) in pDCs cocultured with infected cells and treated with inhibitors of Arp 2/3 complex (CK-666; 60 μ M) or actin polymerization (Latrunculin B, Lat B; 1 μ M). Results of 3 independent experiments (D, n > 53; H, n > 40; L, n > 21; analyzed contacts per condition) are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact; mean \pm SD; p value as indicated.

(M–O) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected (M), HCV infected (N) or HCV rep Huh7.5.1c2 cells (O) treated or not with inhibitor of Arp 2/3 complex (CK-666). The levels of intracellular and extracellular viral RNA by infected or replicating cells treated with inhibitors were analyzed in absence of pDC. Results are expressed as percentages relative to untreated cells; mean \pm SD; n = 4 (M and N) and n = 3 (O) independent experiments; p value as indicated.

(P) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs stimulated by cell-free influenza virus and treated or not with inhibitor of Arp 2/3 complex, presented as in Figure 3C; mean \pm SD; n = 4 independent experiments.

(Q and R) Quantification of pDC-infected cell conjugates by Image Stream X technology. CellTrace Violet stained-pDC cocultured with GFP⁺ DENV or HCV-infected cells for 4–5 h treated or not with Arp 2/3 complex inhibitor, as in M–O. Results of 4 (Q) and 5 (R) independent experiments are expressed as percentage of conjugates; mean \pm SD; n = 10,000 events per condition and per experiment.

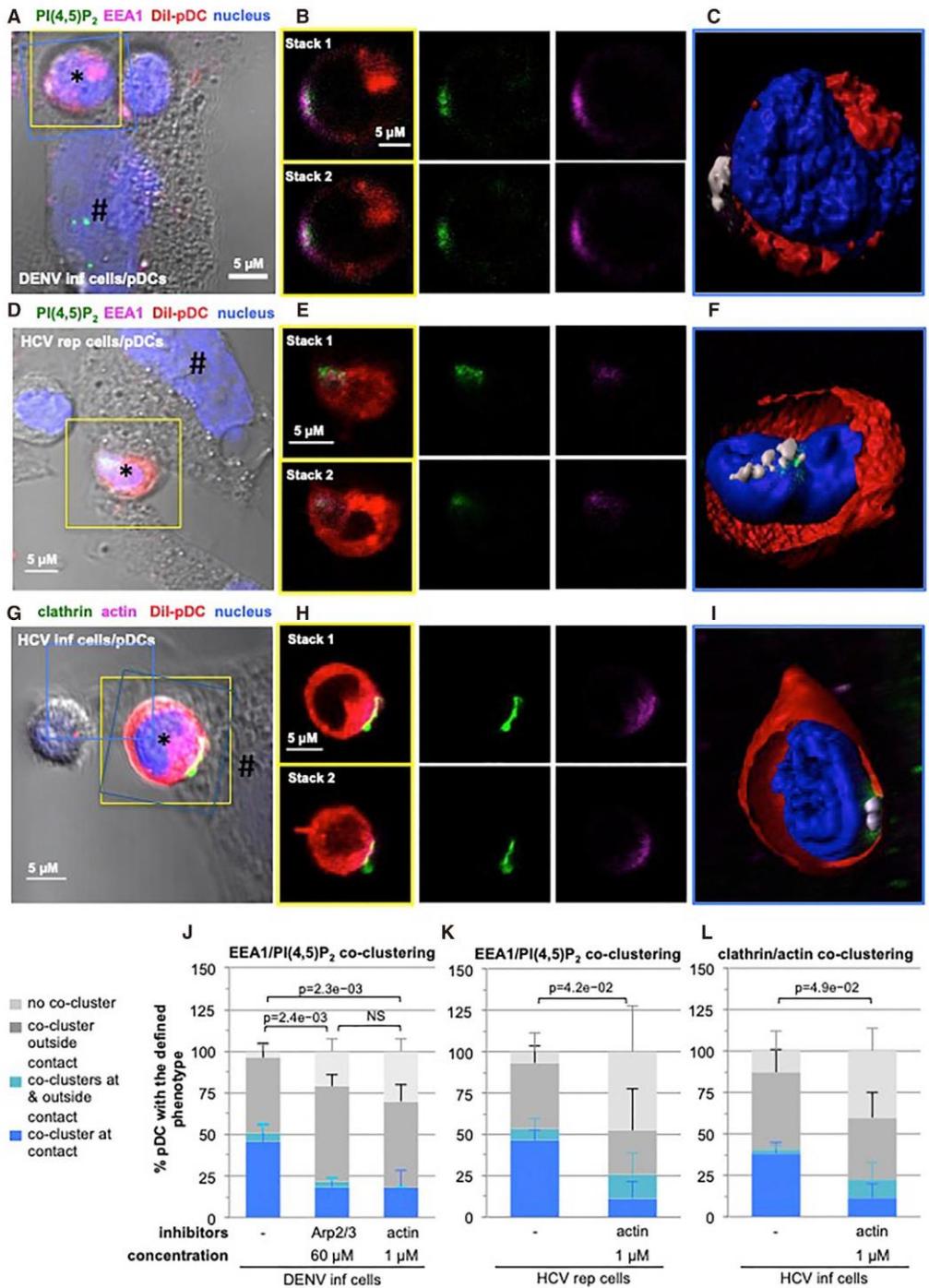


Figure 5. Polarization of Endocytosis Machinery Components at the Cell Contact

(A–F) Confocal microscopy imaging of immunostained PI(4,5)P₂ and EEA1 in cocultures of pDCs and DENV infected cells for 4–5 h (A–C) and HCV (rep) replicating cells for 7–8 h (D and F); nuclei (Hoechst). Representative detection of PI(4,5)P₂ and EEA1 projected on the phase-contrast imaging (A and D), two successive

(legend continued on next page)

We demonstrated that the inhibition of TLR7-induced signaling prevented the establishment of long-lived contact of pDCs with infected cells (Figures 6B and 6F). By analogy to inside-out signaling defined in the context of other cell contact including neurological and immunological synapses (Hogg et al., 2011; Park and Goda, 2016), we hypothesized that TLR7-induced signaling might promote the cell polarity. We showed that the inhibition of TLR7 significantly reduced co-clustering of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α at contact, along with endocytosis components, including the co-clustering of PI(4,5)P₂-EEA1 and clathrin-actin (Figures 7C, 7D, 7F, and 7I–7L). The co-clusters of $\alpha_L\beta_2$ integrin and the high-affinity conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex together with the endocytosis components (i.e., clathrin and EEA1, respectively) at the contact site of pDCs were also subjected to regulation by TLR7-mediated pDC activation (Figures 7E, 7H, S7C, and S7D). This further implies a connection between components of the cell adhesion, actin network, and the endocytosis machinery modulated by TLR7 signaling. Similar results were obtained using DENV-, HCV-, and ZIKV-infected cells (Figures 7 and S7), highlighting that the control by TLR7-mediated signaling of pDC polarity is restricted to neither a specific virus nor a PAMP carrier. Our results demonstrate that the sensing of infected cells via TLR7 sensor induces cell polarity of regulators of adhesion, actin network, and endocytosis machinery at contact on the pDC side, thus acting as a positive feedback regulation for the efficient transfer of PAMP carriers and pDC response.

DISCUSSION

pDCs are important mediators of IFN-I response. We demonstrate that pDC activation is mediated by the establishment of sustained contact with infected cells via cell adhesion molecules, $\alpha_L\beta_2$ integrin complex, and ICAM-1. This is associated with the polarization of the actin network and its regulators as well as components of the endocytosis machinery, at the contact site within pDCs, requiring and facilitating sensing of viral RNA by endolysosome-localized TLR7. We provide compelling evidence that TLR7-induced signaling in pDCs regulates the rearrangement of a polarized platform at contact site and prolongs cell contacts, thus acting as a feed-forward regulation for the transfer of PAMP carrier to the pDCs. Cell polarity is thus a previously unappreciated primary attribute of pDCs necessary to sense virally infected cells and respond by a robust antiviral response, which prevents viral spread. We propose to call this functional structuring the interferogenic synapse, by analogy to previously described synapses, while functionally driving a distinct cellular response.

PAMP Transfer via Physical Contact and Cell Polarity: the Interferogenic Synapse

Different types of synapses including neurological, immunological, and virological synapses have been defined; these differ in composition and signal transferred but are all specialized cell

junctions to convey information between cells. Across all synapses, this information-sharing capacity is supported by adhesion complexes, thereby focusing signaling, secretion, and internalization at the point of cell contact (Dustin and Choudhuri, 2016; Hogg et al., 2011; Park and Goda, 2016). Likewise, we showed that adhesion molecules accumulate at the contact site of pDC-infected cell and are required for pDC IFN response. Moreover, identical to the immunological synapse, the $\alpha_L\beta_2$ integrin complex is present on the signal recipient cells (pDCs versus T cells) and ICAM-1 on the signal delivering cells (infected cells versus antigen-presenting cells) (Dustin and Choudhuri, 2016). Again, like all synapses, the actin network (and regulators) polarizes at contact and acts as a functional structuring platform. Analogous to the neurological synapse, the mechanism of pDC activation involved a secreted activating signal. In accordance with the transfer of PAMPs via vesicles and the endolysosomal localization of the sensor (i.e., TLR7), endocytosis components polarize at contacts. Cell polarity of vesicular trafficking is a hallmark of other synapses, primarily defined for secretory pathways, e.g., local secretion of synaptic vesicles or lytic granules at the neurological and immunological lytic synapses by NK cells, respectively. Additionally, the endocytosis machinery also polarizes at the level of the immunological synapse and regulates T cell activation via the internalization and recycling of the T cell receptor (TCR) (Compeer et al., 2018; Das et al., 2004). Importantly, the feed-forward regulation by TLR7-induced signaling is reminiscent of the stabilization of the cell polarity and contact described for immunological and neurological synapses, referred to as inside-out signaling and induced by the activation in recipient cells (Dustin and Choudhuri, 2016; Hogg et al., 2011). For example, TCR engagement at the immunological synapse reinforces cell adhesion by the activation of integrin ectodomain (Dustin and Choudhuri, 2016; Hogg et al., 2011). Therefore, the interferogenic synapse presents hallmarks of other synapses while being deployed to achieve a distinct cellular response, the IFN response, thus representing a previously unappreciated type of synapse.

Scanning Function of pDCs Regulated by a TLR7-Centered Feed-Forward Signaling

We propose that the immune surveillance by pDCs involves a scanning function by physical cell contacts. In this “scanning” model, a pDC encounters a cell and initially establishes a transient contact. When the cell is not infected (i.e., in the absence of PAMP transfer), the non-activated pDC resumes its motion. By contrast, when a pDC encounters an infected cell, PAMP transfer during the initial contact activates TLR7 in the pDC. In turn, TLR7-mediated signaling potentiates the structural reorganization at the contact site. These molecular rearrangements include polarized endocytosis components, which can facilitate the subsequent transfer of PAMPs to pDCs and further strengthen TLR7 activation. TLR7-induced signaling primes the establishment of sustained pDC-infected cell contact, which in turn further promotes TLR7 activation, leading to a feed-forward

confocal stacks with magnified yellow-boxed pDC (B and E) and 3D reconstruction of consecutive Z-stacks of the blue-boxed view, PI(4,5)P₂-EEA1 colocalization in white (C) and (F).

(G–I) Confocal microscopy imaging of immunostained clathrin and actin co-clustering in 4–5 h cocultures of pDCs with HCV-infected cells, displayed as in (A–C). (J–L) Quantification of EEA1-PI(4,5)P₂ (J–K) and clathrin-actin co-clustering (G) in coculture treated with inhibitors of Arp2/3 or actin polymerization, as in Figure 4D. Results of 3 independent experiments are expressed as in Figure 4D; mean \pm SD; n > 43 (J); n > 50 (K); n > 40 (L) analyzed contacts per condition.

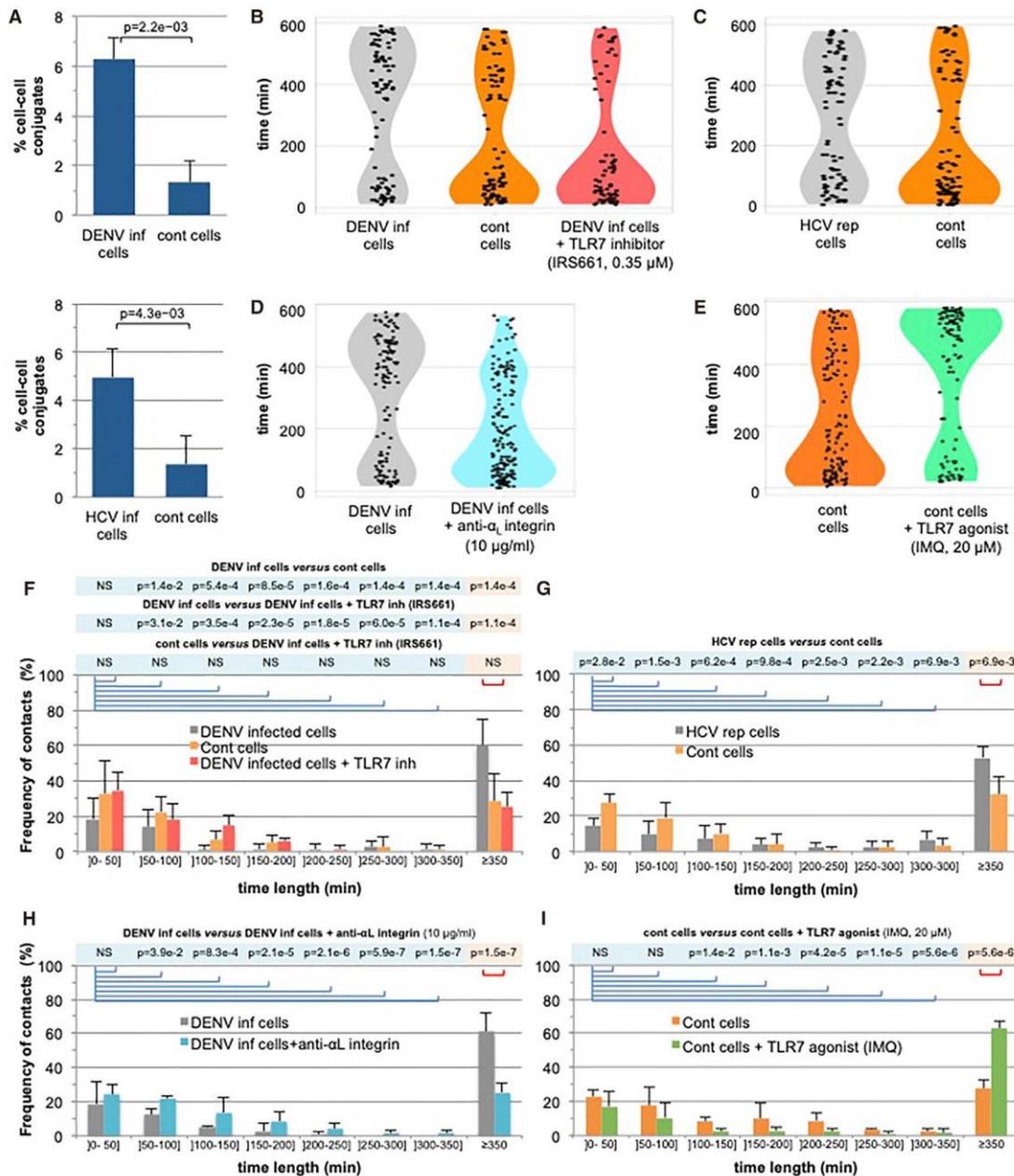


Figure 6. Establishment of Sustained Contact of pDCs with Infected Cells Regulated by α_L Integrin and TLR7-Induced Signaling
 (A) Quantification of conjugates of pDCs with cells infected by DENV or HCV versus uninfected cells by Image Stream X technology. Results of 6 independent experiments are expressed as percentage of conjugates; $n = 10,000$ events per condition per experiment.
 (B–I) Quantification of the duration of cell contacts between pDCs and DENV infected cells (B, D, F, and H), HCV replicating (rep) cells (C and G), uninfected (cont) cells (B, C, E, F, G, and I) determined by live imaging with spinning-disc confocal microscopy (see details in STAR Methods). As indicated, the cocultures were treated with TLR7 inhibitor (IRS661; 0.35 μ M) (B and F), anti- α_L integrin blocking antibody (10 μ g/ml) (D and H) or TLR7 agonist (IMQ; 20 μ M) (E and I). Confocal Z-stacks of cocultures of Dil stained-pDCs and GFP⁺ infected or uninfected cells are acquired every 5 min. The cell contact is defined as Dil signal (pDCs) apposed or merged with GFP signal of HCV- or DENV-infected cells or uninfected (cont) cells, as shown on Figure S6A. The results of 3–4 independent experiments are presented by violin plots with dots representing the durations of the individual recorded contacts in each indicated experimental condition (B–E) and displayed as percentages of contacts in the indicated time interval relative to the total number of examined pDC-infected cell contacts (F–I).

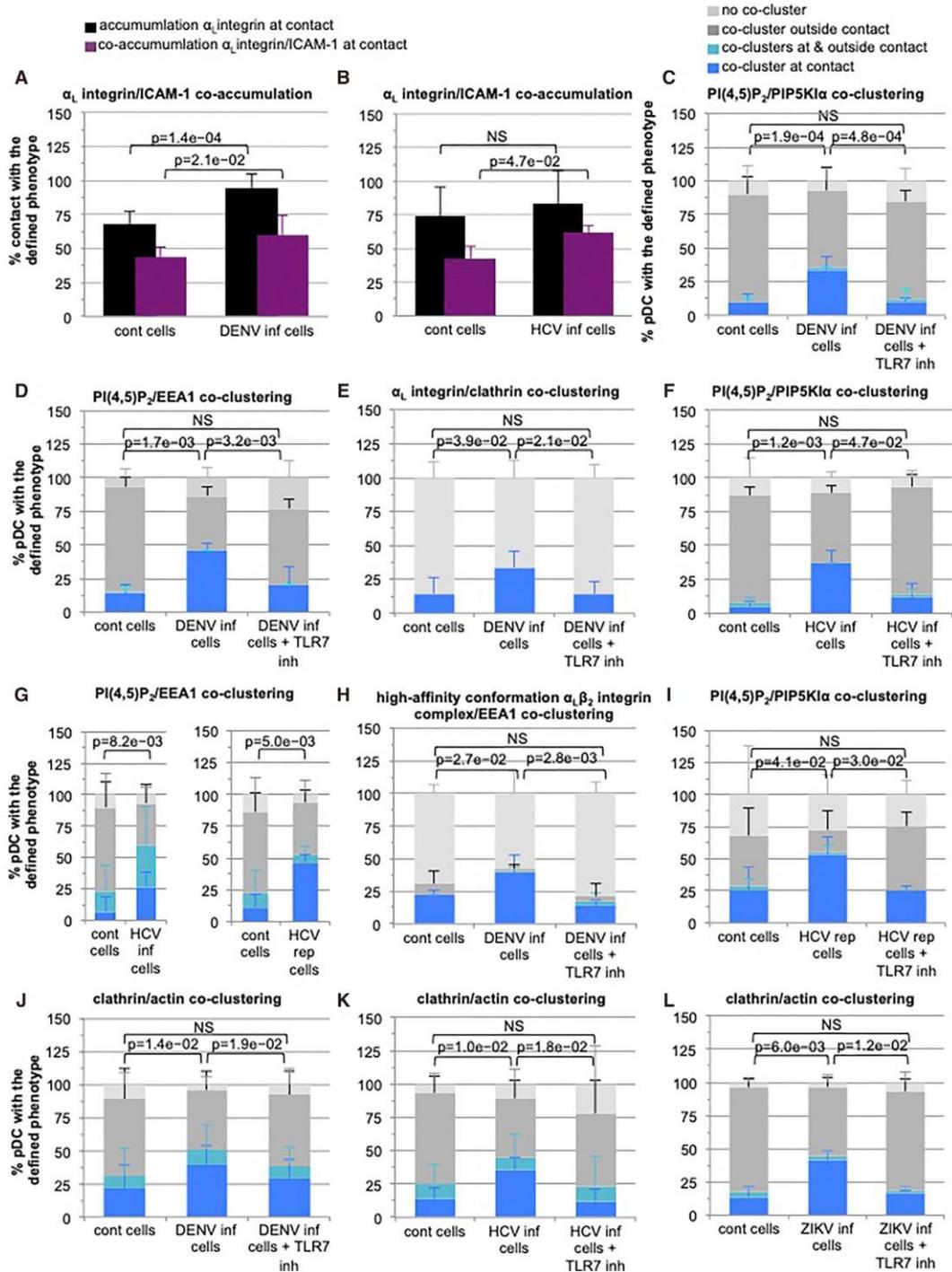


Figure 7. TLR7-Mediated pDC Activation Potentiates Cell Polarity at the Contact

(A and B) Quantification of the α_L integrin accumulation and α_L integrin-ICAM-1 co-accumulation at the contact between pDCs and DENV (A) or HCV (B) infected cells versus uninfected (cont) cells, analyzed as in Figures 2J–2L. Results are expressed as the percentage of indicated phenotype relative to the total number of analyzed contacts; 4 (A; $n > 62$ analyzed contacts per condition) and 3 (B; $n > 46$) independent experiments; mean \pm SD.

(legend continued on next page)

regulatory loop culminating in sustained contacts as well as robust and localized IFN production. As such, the sensing mechanism by pDCs can be seen as a “relay switch:” a relatively small initial “PAMP current” leads to a “high amperage” flow of PAMPs via a functional platform for efficient PAMP transfer at the contact sites resulting in a potent pDC-mediated antiviral response.

TLR7-induced signaling is expected to induce a bifurcated signaling: the transcriptional activators IRF7 and nuclear factor- κ B (NF- κ B), respectively leading to type I and III IFNs and other inflammatory cytokine response. One might hypothesize that the autocrine or paracrine action of IFNs (and/or subsequently induced-ISGs or other cytokines) could potentiate the interferogenic synapse. Alternatively, the signaling downstream of TLR7, including the phosphorylation cascade might directly reinforce cell polarity and contact (Olayioye et al., 2013; Park et al., 2009; Saitoh et al., 2017).

Local Response to Viral Infection by pDCs

Systemic and massive productions of IFNs and other inflammatory cytokines are known to be detrimental to the host, as they correlate with systemic homeostatic dysfunction, including tissue damage (e.g., increased vascular permeability in the context of DENV) (Costa et al., 2013). Here, we uncovered that the organization of a functional territory in pDCs at the contact site with infected cells is required for IFN-I production, thus implying that this antiviral response is confined to the proximity of infected cells. This is reminiscent of previous reports showing a pivotal *in vivo* antiviral regulation by early pDC response, despite undetectable or very transient and limited pDC-derived IFN-I at systemic levels (Swiecki et al., 2010; Webster et al., 2018), thus positioning pDC IFN-I secretion as a response likely confined to the infected site. Therefore, the cell-contact-dependent robust pDC response could have evolved in favor of the host fitness to locally respond at the infected sites and thereby to thwart the otherwise harmful systemic IFN and inflammatory responses.

Albeit not universal, the requirement for cell contact with infected cells is increasingly recognized for pDC activation by a large spectrum of genetically divergent viruses (Webster et al., 2016). It is, therefore, likely that the interferogenic synapse that we describe here for pDC response to DENV, ZIKV, and HCV via distinct PAMP carriers, is also at play for pDC activation by other viruses. Additionally, pDCs can participate in the priming of both immunogenic and tolerogenic adaptive immunity, being also increasingly recognized as pivotal mediators in pathogenesis of autoimmune diseases and cancers (Swiecki and Colonna, 2015). It is possible that the interferogenic synapse is of importance for pDC-mediated sensing in these other contexts.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Cell Lines and Primary Cell Cultures
 - Preparation of Viral Stocks and Infections
 - Reagents
- METHOD DETAILS
 - Immunostaining and FACS Analysis
 - Co-culture Experiments
 - Viral Spread Assay
 - Imaging Combined with Flow Cytometry Analysis
 - Immunostaining for Confocal Analysis
 - Live Imaging of Coculture
 - Analysis of Viral RNA Levels
 - Analysis of Extracellular Infectivity
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.005>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A.D. Davidson (University of Bristol, UK) for the molecular clone N.G.C., A. Kohl (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, UK) and R. Freitas de Oliveira Franca (FIOCRUZ, Recife, Brazil) for clinical isolate ZIKV Brazil, the European Virus Archive for ZIKV H/PF, C.M. Rice (Rockefeller University, New York, NY) for the anti-HCV NS5A, P. Despres (PIMIT, Université de La Réunion-INSEERM France) for providing the anti-DENV E, F.V. Chisari (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the Huh7.5.1 cells, and V. Lotteau (CIRI, Lyon, France) for Influenza A virus. We are grateful to Y. Jaillais, H. Paidassi, T. Walzer, and S. Munoz-Gonzalez for critical reading of the manuscript and to our colleagues for their encouragement and help. We thank the technical assistance of the staffs of PLATIM and AniRA-cytometry facilities - SFR Biosciences Lyon, Gerland (UMS3444/US8) for imaging and FACS analyses. We acknowledge the contribution of the EFS Confluence-Lyon. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC-EXAMIN), the Agence Nationale pour la Recherche contre le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS-AO 2017-01), the Fondation pour la recherche médicale (DBI20141231313 DREUX Bioinfo 2014), and LabEx Ecofect grant ANR-11-LABX-0048. S.A.’s PhD fellowship was sponsored by French ministry and Ligue Contre le Cancer. The post-doc fellowships for B.W. and D.C. were sponsored by EMBO and ANRS, respectively.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.A., S.C., D.C., L.S., B.W., and M.D. conceived and designed the experiments. S.A., S.C., D.C., E.D., and L.S. performed the experiments. S.A., S.C., D.C., E.D., L.S., O.A., B.W., and M.D. analyzed the data. S.A., S.C., and M.D. wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: May 1, 2018

Revised: January 3, 2019

Accepted: March 8, 2019

Published: April 16, 2019

(C–L) Quantification of the co-clustering of PI(4,5)P₂-PIP5K1 α (C, F, and I), PI(4,5)P₂-EEA1 (D and G), clathrin-actin (J–L), α _L integrin-clathrin (E), and high-affinity (open) conformation α _L β ₂ integrin complex-EEA1 (H), as shown in Figures 4A–4L, 5, S5, and S7 in cocultures of pDCs with uninfected (cont) cells, or with cells infected by DENV, ZIKV, or HCV or HCV rep cells, in the presence or not of TLR7 inhibitor (IRS661; 0.35 μ M). Results are expressed as the percentage of the indicated phenotype relative to the total number of analyzed pDCs in contact with infected cells; 3 (D, F, G, I, and L), 7 (J), 4 (C, E, H, and K) independent experiments; mean \pm SD.

REFERENCES

- Bruni, D., Chazal, M., Sinigaglia, L., Chauveau, L., Schwartz, O., Despres, P., and Jouvenet, N. (2015). Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci. Signal.* *8*, ra25.
- Compeer, E.B., Kraus, F., Ecker, M., Redpath, G., Amiezer, M., Rother, N., Nicovich, P.R., Kapoor-Kaushik, N., Deng, Q., Samson, G.P.B., et al. (2018). A mobile endocytic network connects clathrin-independent receptor endocytosis to recycling and promotes T cell activation. *Nat. Commun.* *9*, 1597.
- Costa, V.V., Fagundes, C.T., da Gloria de Souza, D., and Teixeira, M.M. (2013). Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am. J. Pathol.* *182*, 1950–1961.
- Das, V., Nal, B., Dujancourt, A., Thoulouze, M.I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* *20*, 577–588.
- de Chasse, B., Aublin-Gex, A., Ruggieri, A., Meyniel-Schicklin, L., Pradezynski, F., Davoust, N., Chantier, T., Tafforeau, L., Mangeot, P.E., Ciancia, C., et al. (2013). The interactomes of influenza virus NS1 and NS2 proteins identify new host factors and provide insights for ADAR1 playing a supportive role in virus replication. *PLoS Pathog.* *9*, e1003440.
- Decembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.* *10*, e1004434.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell. Biol.* *159*, 881–891.
- DeMali, K.A., Sun, X., and Bui, G.A. (2014). Force transmission at cell-cell and cell-matrix adhesions. *Biochemistry* *53*, 7706–7717.
- Donald, C.L., Brennan, B., Cumberworth, S.L., Rezeli, V.V., Clark, J.J., Cordeiro, M.T., Freitas de Oliveira Franca, R., Pena, L.J., Wilkie, G.S., Da Silva Filipe, A., et al. (2016). Full genome sequence and sRNA interferon antagonist activity of zika virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *10*, e0005048.
- Doughman, R.L., Firestone, A.J., and Anderson, R.A. (2003). Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J. Membr. Biol.* *194*, 77–89.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Decembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* *12*, 558–570.
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., and Chisari, F.V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 14046–14051.
- Dustin, M.L., and Choudhuri, K. (2016). Signaling and polarized communication across the T cell immunological synapse. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *32*, 303–325.
- Feng, Z., Li, Y., McKnight, K.L., Hensley, L., Lanford, R.E., Walker, C.M., and Lemon, S.M. (2014). Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J. Clin. Invest.* *125*, 169–176.
- Garcia-Nicolas, O., Auray, G., Sautter, C.A., Rappe, J.C., McCullough, K.C., Ruggli, N., and Summerfield, A. (2016). Sensing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected macrophages by plasmacytoid dendritic cells. *Front. Microbiol.* *7*, 771.
- Garcia-Sastre, A. (2017). Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell Host Microbe* *22*, 176–184.
- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell. Biol.* *150*, 1311–1320.
- 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.
- Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 416–426.
- Jost, M., Simpson, F., Kavan, J.M., Lemmon, M.A., and Schmid, S.L. (1998). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr. Biol.* *8*, 1399–1402.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* *125*, 1808–1817.
- Kroschewski, H., Lim, S.P., Butcher, R.E., Yap, T.L., Lescar, J., Wright, P.J., Vasudevan, S.G., and Davidson, A.D. (2008). Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. *J. Biol. Chem.* *283*, 19410–19421.
- Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* *7*, e1001284.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R., and Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* *276*, 21217–21227.
- Martina, B.E., Koraka, P., and Osterhaus, A.D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 564–581.
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM families of phosphatidylinositol receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* *12*, 544–557.
- Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* *21*, 134–142.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* *42*, 3858–3863.
- Nordenfelt, P., Elliott, H.L., and Springer, T.A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nat. Commun.* *7*, 13119.
- Olayioye, M.A., Barisic, S., and Hausser, A. (2013). Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cell Signal.* *25*, 1739–1747.
- Park, J.E., Kim, Y.I., and Yi, A.K. (2009). Protein kinase D1 is essential for MyD88-dependent TLR signaling pathway. *J. Immunol.* *182*, 6316–6327.
- Park, Y.K., and Goda, Y. (2016). Integrins in synapse regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* *17*, 745–756.
- Posor, Y., Eichhorn-Grunig, M., and Hauke, V. (2015). Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys. Acta* *1851*, 794–804.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* *97*, 221–231.
- Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* *137*, 1270–1274.
- Rotty, J.D., Wu, C., and Bear, J.E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *14*, 7–12.
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H.L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr. Biol.* *10*, 311–320.
- Saitoh, S.I., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori Saitoh, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., et al. (2017). TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat. Commun.* *8*, 1592.
- Salas, A., Shimaoka, M., Phan, U., Kim, M., and Springer, T.A. (2006). Transition from rolling to firm adhesion can be mimicked by extension of integrin alphaLbeta2 in an intermediate affinity state. *J. Biol. Chem.* *281*, 10876–10882.
- Sen, M., Koksai, A.C., Yuki, K., Wang, J., and Springer, T.A. (2018). Ligand and cation-induced structural alterations of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.* *293*, 6565–6577.

- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., et al. (2003). Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* *112*, 99–111.
- Snell, L.M., McGaha, T.L., and Brooks, D.G. (2017). Type I interferon in chronic virus infection and cancer. *Trends Immunol.* *38*, 542–557.
- Sozzani, S., Vermi, W., Del Prete, A., and Facchetti, F. (2010). Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol.* *31*, 270–277.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 471–485.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* *33*, 955–966.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 7431–7436.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009). Integrins in cell migration—the actin connection. *J. Cell. Sci.* *122*, 199–206.
- Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-cell sensing of viral infection by plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* *90*, 10050–10053.
- Webster, B., Wernke, S.W., Zafirova, B., This, S., Coleon, S., Decembre, E., Paidassi, H., Bouvier, I., Joubert, P.E., Duffy, D., et al. (2018). Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *ELife* *7*.
- Wieland, S.F., Takahashi, K., Boyd, B., Whitten-Bauer, C., Ngo, N., de la Torre, J.C., and Chisari, F.V. (2014). Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J. Virol.* *88*, 752–757.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 9294–9299.

STAR METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
mouse anti-DENV E glycoprotein (clone 3H5)	P. Despres (PIMIT, Université de La Réunion-INSERM France)	N/A
mouse anti-DENV E glycoprotein (clone 4G2)	P. Despres (PIMIT, Université de La Réunion-INSERM France)	N/A
mouse anti-HCV NS5A (clone 9E10)	C. Rice (Rockefeller University, New York, US)	N/A
mouse anti-dsRNA (clone J2)	Scicons	Cat# 10010200, RRID:AB_2651015
mouse anti-integrin α_L subunit (clone 38)	LSBio	Cat# LS-C134275-100, RRID:AB_10852892
mouse anti-integrin β_2 I-like domain (m24 epitope)	Biolegend	Cat# 363402, RRID:AB_2564213
mouse anti-ICAM-1 (clone LB-2)	BD Pharmingen	Cat# 559047, RRID:AB_397183
mouse anti-E-Cadherin (SHE78-7)	Life Technologies	Cat# 13-5700, RRID:AB_2533022
mouse anti-L-selectin/CD62L (clone DREG55; unconjugated)	Invitrogen	Cat# BMS121, RRID:AB_10609216
mouse anti-L-selectin/CD62L (clone 145/15; Vioblue-conjugated)	Miltenyi	Cat# 130-098-700, RRID:AB_2660505
mouse anti-actin (clone AC74)	Sigma-Aldrich	Cat# A2228, RRID:AB_476697
rabbit anti-protein disulfide isomerase (PDI) (anti-P4HB, HPA018884)	Sigma-Aldrich	Cat# HPA018884, RRID:AB_1854896
mouse anti-PI(4,5)P ₂ (ab2335)	Abcam	Cat# ab2335, RRID:AB_302989
goat anti-PIP5K1 α (C-17/sc-11774)	Santa Cruz	Cat# sc-11774, RRID:AB_2164700
rabbit anti-clathrin (ab21679)	Abcam	Cat# ab21679, RRID:AB_2083165
rabbit anti-EEA1 (ALX-210-239)	Enzo Life Sciences	Cat# ALX-210-239/1-C100, RRID:AB_2051338
mouse PE or APC-conjugated anti-CD123 (clone AC145)	Miltenyi	Cat# 130-090-901, RRID:AB_244209
mouse APC-conjugated anti-BDCA-2 (clone AC144)	Miltenyi	Cat# 130-090-905, RRID:AB_244165
anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-11094, RRID:AB_221544
anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 647-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-31573, RRID:AB_2536183
anti-mouse IgG1 conjugated with Alexa 488-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21121, RRID:AB_2535764
anti-mouse IgG2a conjugated with Alexa 488-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21131, RRID:AB_2535771
anti-mouse IgG1 conjugated with Alexa 555-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21127, RRID:AB_2535769
anti-mouse IgG2b conjugated with Alexa 555-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21147, RRID:AB_2535783
anti-mouse IgG conjugated with Alexa 594-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21203, RRID:AB_2535789
anti-mouse IgG2a conjugated with Alexa 647-fluorochrome	Life Technologies	Cat# A-21241, RRID:AB_2535810
anti-mouse Ig (Human ads) conjugated with APC fluorochrome	Southern Biotech	Cat#1012-11
Virus strain		
HCV JFH1 strain	Zhong et al., 2005	N/A
DENV-2 strain New Guinea C (NGC) (AF038403)	Kroschewski et al., 2008	N/A
ZIKV from Brazil (PE243_KX197192)	Dr A.Kohn (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, UK); Donald et al., 2016	N/A
ZIKV H/PF from French Polynesia (H/PF/2013_KJ776791.1)	European Virus Archive (EVA)	N/A
Influenza A Virus (FluAV, H1N1/New Caledonia/2006)	Dr V. Lotteau (CIRI, Lyon, France); de Chassez et al., 201	N/A
Biological Samples		
Blood or cytopheresis units from healthy adult human volunteers	"Etablissement Français du sang" (EFS)	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Latrunculin B (Lat B)	Sigma-Aldrich	Cat# L5288, CAS:76343-94-7
Arp2/3 complex inhibitor I (CK-666)	Merck Millipore	Cat# 182515, CAS:442633-00-3
CDC42 inhibitor (ML141)	Sigma-Aldrich	Cat# SML0407, CAS:71203-35-5
Chlorpromazine	Sigma-Aldrich	Cat# C8138, CAS:69-09-0
Dynasore	Sigma-Aldrich	Cat# D7693, CAS:1202867-00-2
Imiquimod	Invivogen	Cat# tirl-imqs, CAS:99011-78-6
Vybrant cell-labeling solution (CM-Dil)	Life Technologies	Cat# V22888, CAS:180854-97-1
CellTrace Violet cell Proliferation kit (CTV)	Life Technologies	Cat# C34557
poly-L-lysine (P6282)	Sigma-Aldrich	Cat# P6282, CAS:25988-63-0
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Life Technologies	Cat# 10566016
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies	Cat# 15140122
L-Glutamine	Life Technologies	Cat# A2916801
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Life Technologies	Cat# 11140050
Critical Commercial Assays		
VeriKine Human Interferon Alpha Multi-Subtype ELISA Kit	PBL Interferon Source	Cat# 41105-2
DIY Human IFN Lambda 1/2/3 (IL-29/28A/28B) ELISA	PBL Interferon Source	Cat# 61830-1
VeriKine Human Interferon Beta ELISA Kit	PBL Interferon Source	Cat# 41410-1
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies	Cat#4368813
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Life Technologies	Cat# A25742
BDCA-4-magnetic beads	Miltenyi	Cat# 130-090-532
Experimental Models: Cell Lines		
Human hepatoma cell line	Nakabayashi et al., 1982	Huh-7.5.1 (RRID:CVCL_E049)
Huh-7.5.1c2 cells that harbor the JFH-1 subgenomic replicon	Kato et al., 2003	N/A
Oligonucleotides		
IRS661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3')	synthesized on a phosphorothioate backbone (Decembre et al., 2014)	N/A
Recombinant DNA		
lentivirus-based vector expressing shRNA against ICAM-1 (TRCN0000372477, target sequence: GCCCGAGCTCAAGTGCTAA)	Sigma-Aldrich	Cat# SHCLNV-NM_000201
Softwares and Algorithms		
R Statistical Computing Software	GNU General Public License	https://www.r-project.org/
Image J software (Fiji)	NIH	http://imagej.net/Fiji
IMARIS software	Bitplane	http://www.bitplane.com/
IDEAS software	Amnis	https://www.luminexcorp.com/imaging-flow-cytometry/
INSPIRE software	Amnis	https://www.luminexcorp.com/imaging-flow-cytometry/
Flow Jo software	FlowJo LLC	https://www.flowjo.com/
StepOne Software	Life Technologies	https://www.thermofisher.com/fr/home/technical-resources/software-downloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr. Marlène Dreux (marlene.dreux@ens-lyon.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Cell Lines and Primary Cell Cultures

Huh7.5.1, Huh-7.5.1c2 cells and Huh-7.5.1c2 cells (male) that harbor the JFH-1 subgenomic replicon (HCV rep cells) (Kato et al., 2003) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, 100 units (U)/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and non-essential amino acids (Life Technologies) at 37°C/5% CO₂ (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012).

The pDCs were isolated from blood or cytopheresis units from healthy adult human volunteers which was obtained from the 'Etablissement Français du Sang' (EFS; Auvergne Rhône Alpes, France) under the convention EFS 16-2066 and according to procedures approved by the EFS committee. Informed consent was obtained from all subjects in accordance with the Declaration of Helsinki. Information on sex and age was not available for all subjects, however was not relevant for the purpose of the study, since we previously showed that pDC responses are within the same range for all donors (Decembre et al., 2014). PBMCs were isolated using Ficoll-Hypaque density centrifugation and pDCs were positively selected from PBMCs using BDCA-4-magnetic beads (MACS Miltenyi Biotec), as previously described (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012). The typical yields of PBMCs and pDCs were 500-800x10⁶ and 1-2x10⁶ cells, respectively, with a typical purity of >95% pDCs. Isolated pDCs were maintained in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate at 37°C/5% CO₂.

The down-regulation of ICAM-1 in huh7.5.1 cells was achieved using lentivirus-based vector expressing shRNA against ICAM-1 (TRCN0000372477, target sequence: GCCCGAGCTCAAGTGTCTAAA, Sigma-Aldrich), produced using 293T cells (female), as we previously described (Dreux et al., 2012). Cells were transduced 4 days prior to infection by DENV for 48 hours and followed by coculture with pDCs.

Preparation of Viral Stocks and Infections

Viral stocks of HCV JFH1 strain (Zhong et al., 2005) and the prototypic DENV-2 strain New Guinea C (NGC) (AF038403) (Kroschewski et al., 2008) were produced as previously described (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012). The clinical isolate of epidemic strains of ZIKV including from Brazil (PE243_KX197192) (Donald et al., 2016) and H/PF from French Polynesia (H/PF/2013_KJ776791.1) obtained from the European Virus Archive (EVA) were amplified using Vero cells (female). Huh7.5.1 cells were infected by DENV or ZIKV (MOI of 1) and Huh-7.5.1c2 cells by the cell-culture adapted HCV JFH-1 virus (MOI of 1) (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2012) 48 hours prior to co-culture with isolated pDCs.

Viral stocks of Influenza A Virus (FluAV, H1N1/New Caledonia/2006) were produced as previously described (de Chasse et al., 2013) and kindly provided by Dr V. Lotteau (CIRI, Lyon, France).

Reagents

The antibodies used for immunostaining were mouse anti-DENV E glycoprotein (hybridoma, clone 3H5 and 4G2) kindly provided by P. Despres (PIMIT, Université de La Réunion-INSERM France); mouse anti-HCV NS5A (clone 9E10) kindly provided by C. Rice (Rockefeller University, New York, US); mouse anti-dsRNA (clone J2; Scicons); mouse anti-integrin α_4 subunit (clone 38; LSBio); mouse anti-integrin β_2 I-like domain, i.e., high-affinity conformation - m24 epitope (Biolegend); mouse anti-ICAM-1 (clone LB-2; BD Pharmingen); mouse anti-E-Cadherin (SHE78-7; Life Technologies); mouse anti-L-selectin/CD62L (unconjugated clone DREG55; Invitrogen and Clone 145/15; Vioblate-conjugated; Miltenyi); mouse anti-actin (clone AC74; Sigma-Aldrich); rabbit anti-protein disulfide isomerase (PDI) (anti-P4HB, HPA018884, Sigma-Aldrich); mouse anti-PI(4,5)P₂ (ab2335, Abcam); goat anti-PIP5K1 α (reference C-17/sc-11774, Santa Cruz); rabbit anti-clathrin (ab21679, Abcam); rabbit anti-EEA1 (ALX-210-239, Enzo Life Sciences); pDC specific markers: mouse PE or APC-conjugated anti-CD123 (clone AC145, Miltenyi), mouse APC-conjugated anti-BDCA-2 (AC144; Miltenyi) and Alexa-conjugated secondary antibodies for confocal analysis (Life Technologies) and APC-conjugated secondary antibodies for FACS analysis (Southern Biotech).

The inhibitors used were Latrunculin B (Sigma-Aldrich); Arp2/3 complex inhibitor I (CK-666, Merck Millipore); CDC42 inhibitor (ML141, Sigma-Aldrich); chlorpromazine (CPZ, Sigma-Aldrich), dynasore (Sigma-Aldrich); TLR7 inhibitor IRS661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAA GCA-3') synthesized on a phosphorothioate backbone (Decembre et al., 2014).

The other reagents were TLR7 agonist (Imiquimod; IMQ; Invivogen); Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences); Fc Blocking solution (MACS Miltenyi Biotec); ELISA kits (PBL Interferon Source) for the specific detections of IFN α , IFN β and type III IFNs (including IL-29/28A/28B); 96-Well Optical-Bottom Plates and Nunc UpCell 96F Microwell Plate (Thermo Fisher Scientific); 96-well format transwell chambers separated by a 0.4 mm membrane (Corning); Vybrant cell-labeling solution (CM-Dil, Life Technologies); CellTrace Violet cell Proliferation kit (Life Technologies); Hoescht and Fc receptor blocking reagent (MACS Miltenyi Biotec); cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies); poly-L-lysine (P6282, Sigma-Aldrich).

METHOD DETAILS

Immunostaining and FACS Analysis

Surface immunostainings were performed on freshly isolated pDCs, DENV infected and uninfected Huh-7.5.1 cells and cocultured cells that were harvested and resuspended using 0.48 mM EDTA-PBS solution. Surface adhesion molecules were detected by a

30-minute incubation at 4°C with 5 µg/mL of mouse anti- α_L integrin (clone 38); mouse anti-ICAM-1 (Clone LB-2); mouse anti-E-cadherin (clone SHE78-7); Vioblue-conjugated mouse anti-L-selectin/CD62L (clone 145/15) diluted in staining buffer (PBS - 1% FBS), followed by PBS washes. For α_L integrin, ICAM-1 and E-cadherin detection, cells were incubated for 20 minutes with APC-conjugated-anti-mouse antibody diluted in staining buffer (2 µg/mL) and cells were fixed in PFA4% (20 minutes, 4°C). Flow cytometric analysis was performed using a BD FACS Canto II, and the data were analyzed with Flow Jo software (Tree Star).

Co-culture Experiments

Unless otherwise indicated, 10^4 pDCs were co-cultured with 2×10^4 infected cells or uninfected parental cells in a 200 µl final volume in 96-well round-bottom plates incubated at 37°C/5% CO₂. Eighteen to twenty hours later, cell-culture supernatants were collected and the levels of IFN α and, when indicated, IFN β and type III IFNs, were measured using a commercially available specific ELISA kit (PBL Interferon Source) following the manufacturer's instructions. To optimize the pDC response to HCV replicating (SGR) cells, 2×10^4 pDCs were co-cultured with 10^5 cells for 22-to-24 hours.

Viral Spread Assay

5×10^4 GFP⁺ uninfected cells and 5×10^4 GFP⁻ cells, that were infected by DENV or ZIKV, as indicated, for 48 hours prior to coculture, were cocultured with 2×10^4 pDCs and incubated for 48 hours. When indicated, the cocultures were treated by anti- α_L integrin at 10 µg/mL. The levels of the viral spread from infected cells (GFP⁺) to uninfected cells (GFP⁻) during coculture were determined by FACS analysis of the frequency of infected cells in the GFP⁺ cell population. Similar detection in GFP⁻ populations demonstrated the inhibition of viral replication during coculture. The infected cells were detected by immunostaining of dsRNA, a marker of viral replication. Briefly, after 48 hours of coculture, cells were fixed with 4% PFA, followed by PBS washes and a permeabilization step with 90% methanol/10% PBS for one-hour incubation at 20°C. The mouse anti-dsRNA (clone J2; Scicons) was diluted at 1 µg/mL staining buffer (PBS - 1% FBS) and added to the cells for one-hour incubation at 4°C. After PBS wash, cells were incubated with anti-mouse IgG2a conjugated with Alexa 647-fluorochrome and diluted staining buffer with 30-minute incubation at 4°C. Flow cytometric analysis was performed using a BD FACS Canto II, and the data were analyzed with Flow Jo software (Tree Star).

Imaging Combined with Flow Cytometry Analysis

Huh 7.5.1c2 cells were transduced with lentiviral based vector pseudotyped with VSV glycoprotein to stably express GFP, as previously described (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2009). Forty-eight hours prior co-culture with pDCs, GFP-expressing Huh 7.5.1c2 cells were infected by HCV or DENV as above-described. After immuno-isolation, pDCs were stained by using CellTrace Violet Cell Proliferation kit (Life Technologies) by 20-minute incubation at 37°C in the dark. Labeled pDCs were then spun down and resuspended into pDC coculture medium. 10^5 GFP-expressing HCV/DENV infected or uninfected cells were co-cultured with 4×10^4 pDCs in low-adherence micro-plate designed for cell harvesting by temperature reduction (Nunc UpCell 96F Microwell Plate from Thermo Scientific) for 4-5 hours at 37°C in presence or not of inhibitor, as indicated. The co-cultured cells were detached and harvested by 20-minute incubation at room temperature. After 2% PFA fixation, cells are washed twice with staining buffer (PBS - 2% FBS). Co-cultured cells were analyzed by Image Stream X technology (Amnis) at magnification x40 using IDEAS software. The cell population defined as pDC/HCV-infected or uninfected cell conjugates comprises conjugates of at least one CellTrace Violet (CTV) positive cell and at least one GFP positive cell among the total of CTV positive cells, GFP positive cells and conjugates. The cell populations were sorted by using masks (IDEAS software) to eliminate cells not in focus and/or with saturating fluorescent signal, conjugate population was further selected by with Area dilate IDEAS mask (i.e., double fluorescent signal without overlay) and then sorted based of cell size of the positive cells (i.e., fluorescent signal area). Post-cell sorting, the accuracy of the gated cell populations in regards to the defined criteria was controlled by a visual inspection of the individual pictures in the gated cells population (Figure S1D).

Immunostaining for Confocal Analysis

After immuno-isolation, 4×10^4 pDCs were stained by using either 0.5 µM Vybrant cell-labeling solution (CM-Dil, Life Technologies) by successive incubations for 10 and 15 minutes at 37°C and 4°C, respectively or CellTrace Violet cell Proliferation kit (Life Technologies) as above-described. Labeled pDCs were washed twice with PBS and then co-cultured with 2×10^4 DENV infected Huh7.5.1 cells or HCV infected Huh7.5.1c2 cells at 37°C for 4-5 hours, in a 96-Well Optical-Bottom Plate pre-coated with 8 µg/mL poly-L-lysine for 30-minute incubation at 37°C. A longer incubation time (i.e., 7-8 hours) was preferred for analysis of clathrin/actin and EEA1/PI(4,5)P₂ in HCV cells, as a pilot experiment suggested that the polarization of endocytic components is slightly higher at this time point. After 4% PFA fixation and three PBS washes, immunostainings were performed without additional permeabilization step, as previously (Decembre et al., 2014; Meertens et al., 2012). After blocking step (PBS 3% BSA), primary antibody antibodies were diluted in 3% BSA-PBS and added to the cell for one-hour incubation at room temperature. Primary antibodies used in this study include mouse anti-actin (20 µg/mL); rabbit anti-PDI (2 µg/mL); mouse anti-PI(4,5)P₂ (20 µg/mL); goat anti-PIPK1 α (4 µg/mL); rabbit anti-clathrin (2 µg/mL); rabbit anti-EEA1 (2 µg/mL); mouse anti-ICAM-1 (10 µg/mL); mouse anti- α_L integrin subunit (clone 38 LSBio at 5 µg/mL); mouse anti-integrin β_2 I-like domain, i.e., high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex (Nordenfelt et al., 2016; Salas et al., 2006; Sen et al., 2018) (clone m24 at 5 µg/mL); APC-conjugated mouse anti-CD123 (clone

AC145 at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After three washes with PBS, cells were incubated with the appropriate anti-mouse, rabbit or goat antibody [conjugated with Alexa 488-, 555- or 647-fluorochrome] or Alexa-conjugated antibody against specific mouse isotypes [*i.e.*, anti-IgG1 for detection of m24 epitope of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex and anti-IgG2a for detection of the integrin α_L subunit] at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 3% BSA-PBS and add to the cells along with Hoechst diluted at 1:1000 (Molecular Probes) for one-hour incubation at room temperature. After three gentle washes with PBS, cells were observed with a Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope. The quantification of the phenotypes defined to as clusters or co-clusters at the contact, outside contact or no cluster/co-clusters were performed using Image J software package (<http://rsb.info.nih.gov/ij>); results were validated in a “double-blind” set-up. IMARIS (Bitplane Inc.) software package with coloc tools was used for the 3D-reconstructions of the consecutive Z-stacks.

Live Imaging of Coculture

Huh 7.5.1c2 cells were transduced with lentiviral based vector to stably express GFP and infected, or not, with HCV or DENV 48 hours before co-culture, as above described. GFP-expressing DENV infected cells or HCV replicating cells and corresponding uninfected control (cont) cells were seeded (2×10^4 cells per well) in a 96-Well Optical-Bottom Plate pre-coated with poly-L-lysine (30-minute incubation at 37°C with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly-L-lysine). Isolated pDCs were stained with Vybrant cell-labeling solution (CM-Dil, Life Technologies) as above described. When pDCs were added to the seeded infected (or uninfected) cells, the cocultures were imaged every 5 minutes for 10 hours at magnification x10 with a BSL3-based spinning-disc confocal microscope (AxioObserver Z1, Zeiss). The cocultures were maintained at 37°C, 5% CO₂ in an incubation chamber throughout the course of the experiments. The analyses of pDC motion (as illustrated in Figure S6) were performed using projection of Z-stacks with maximal intensity (*i.e.*, about 3-to-5 selected Z-stacks per fields out of 15 Z-stacks in total). The quantification of the duration of contacts between pDCs and infected cells *versus* uninfected cells were performed using Image J software package (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The calculations of cell positions for the motion graphs were performed using Trackmate plug-in of Image J software. The representation with violin plots were obtained using R software environment for statistical computing and graphics, version 3.3.2. The results of Figures S6L and S6M were obtained by 10-hour records in similar condition (37°C, 5% CO₂) of the isolated pDCs (stained by CellTracker Red CMTPX fluorescent dye) in absence of other cells. The pDC velocities were determined by using Trackmate plug-in of Image J software.

Analysis of Viral RNA Levels

RNAs were isolated from cells or supernatants harvested in guanidinium thiocyanate citrate buffer (GTC) by phenol/chloroform extraction procedure as previously described (Dreux *et al.*, 2012). The efficiency of RNA extraction and reverse transcription-real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was controlled by the addition of carrier RNAs encoding Xef1 α (xenopus transcription factor 1 α) *in vitro* transcripts in supernatants diluted in GTC buffer. DENV, HCV and ZIKV RNA, Xef1 α and intracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were determined by RT-qPCR using cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies) and analyzed using StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies), using previously described primers (Decembre *et al.*, 2014; Dreux *et al.*, 2009). Extracellular and intracellular DENV, HCV and ZIKV RNA levels were normalized for Xef1 α and GAPDH RNA levels, respectively.

Analysis of Extracellular Infectivity

Infectivity titers in supernatants were determined by end-point dilution using Huh 7.5.1 cells. Foci forming unit (ffu) were detected 72 hours after infection by anti-HCV NS5A and anti-E glycoprotein specific immunofluorescence for HCV, DENV (clone 3H5), ZIKV (clone 4G2), as previously described (Decembre *et al.*, 2014; Dreux *et al.*, 2009). Briefly, Huh-7.5.1 cells were fixed with 4% PFA and permeabilized by incubation for 7 minutes in PBS containing 0.1% Triton. Cells were then blocked in PBS containing 3% BSA for 15 minutes and incubated for 1 hour with mouse anti-HCV NS5A (clone 9E10) diluted at 1:500 or mouse anti-DENV E glycoprotein (clone 3H5 or 4G2) hybridoma supernatant diluted at 1:200 in PBS containing 1% BSA. After 3 washes with PBS, cells were incubated 1 hour with secondary Alexa 555-conjugated anti-mouse antibody (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Hoechst dye in PBS containing 1% BSA. Percentage of NS5A-positive and E-positive cells was determined using Zeiss Axiovert 135 or Olympus CKX53 microscopes.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as the mean values \pm standard deviation (SD). The figure legends report the number of independent experiments.

Statistical analysis was performed using R software environment for statistical computing and graphics, version 3.3.2. For levels of IFN α productions, viral RNA levels, viral titers and cell surface expression, the values were considered relative to untreated references for each independent experiment and analysis using an one-way ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis test). When the test was significant, we used the Nemenyi *post hoc* test for multiple comparisons of mean rank sums to determine which contrast(s) between individual experimental condition pairs was significant. For the statistical analysis of polarization of structure/component at contact (assessed by confocal microscopy analysis), the distribution of the analyzed pDCs in contact with infected cells that present

co-clusters at the contact (without or with additional cluster outside contact) *versus* no co-cluster at contact (without or with cluster outside contact) were compared using Fisher's exact test for count data. Similar results were obtained when using the test for equality of proportions. Statistical analysis of viral transmission from GFP⁻ infected cells to GFP⁺ uninfected cells was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons of means. The results of imaging flow cytometry (using Image Stream X technology) were analyzed using the Wilcoxon Unpaired test. For statistical analysis of the duration of contact (assessed by live-imaging using spinning-disk confocal microscopy analysis), a test for pairwise equality of proportions was applied to determine whether the duration of contact depends on the experimental conditions by comparing the frequency of the indicated time lengths. Data considered significant demonstrated adjusted p-value by False Discovery Rate (FDR) less than 0.05.

Supplementary Figure Legends

Figure S1, related to Figure 1. Surface expression of adhesion molecules and impact of their inhibition on pDC IFN α production and the frequency of pDC-infected cell conjugates. (A) FACS analysis of adhesion molecule expression at the cell surface of pDCs, and/or donors cells *i.e.*, DENV infected and uninfected (cont) Huh7.5.1 cells. Upper panels, representative histograms with unstained cells or stained only with secondary antibody as reference for immunostained L-selectin or E-cadherin/ α _L integrin /ICAM-1, respectively, in grey. Lower panel, results are presented as fold-increase of surface expression relative to unstained cells or stained only with secondary antibody; 5-7 independent experiments; geometric fold-increase \pm standard deviation (SD). **(B)** Results of **Figure 1A** presented as absolute values. Upper panel, quantification of IFN α (expressed as pg/ml) in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected cells, treated or not with blocking antibodies (at 10 μ g/ml) against the indicated targets. Lower panels, paralleled quantification of the intracellular and extracellular viral RNA levels and infectious virus production by infected cells in absence of pDC, expressed as genome equivalent (GE) per μ g of total RNA or mL of supernatants and foci forming unit (ffu) per mL of supernatants, respectively. The detection limits of the assays are 20 pg/mL for IFN α ; 1000 GE for RT-qPCR and 200 ffu for infectivity. The statistical significances are indicated with p values, when ≤ 0.05 . Of note, no significant difference for the levels of intracellular and extracellular DENV RNA and infectivity. **(C)** Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected cells, treated or not with blocking antibodies against α _L integrin or ICAM-1, at the indicated concentration. The intracellular and extracellular viral RNA levels and infectious virus production by infected cells (in absence of pDC) treated with blocking antibodies were analyzed. Results are presented as absolute values and detection limits as in panel **B**; mean \pm SD; p value ≤ 0.05 are

indicated; n=4-7 independent experiments. Of note, no significant difference for the levels of intracellular and extracellular viral RNA and infectivity. **(D)** DENV infected Huh7.5.1 cells, which stably express GFP marker (green) were cocultured with pDCs for 4-5 hours. pDCs are detected by staining with CellTrace Violet Cell Proliferation solution prior to coculture (purple). Representative pictures of the cell populations gated as conjugates between pDCs and GFP⁺ DENV infected cells (upper panel) as well as single cell populations (lower panels). Panels, as displayed from the left to the right: Bright field; GFP field; CellTrace-stained pDC field and Merge. Of note, we did not observe any cell double positive for GFP and CellTrace Violet Cell Proliferation for 5071 pDC-infected cell conjugates (7 independent experiments with visual validation), thus assessing the absence of cytosolic mixing between the infected cells and pDCs. Visual examination of the individual images (n=4379) from the population gated as conjugates also validated a purity of the cell population over 93%.

Figure S2, related to Figure 2. Accumulation of $\alpha_L\beta_2$ integrin is observed at pDC/infected cell contacts, but not in absence of contact. (A-B) Confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin (green) and CD123 (purple) in co-cultures of pDCs (stained by the lipophilic dye DiI prior coculture; red; star mark *) and DENV infected cells (#) for 4-5 hour incubation, nuclei stained with Hoechst (blue), as in **Figure 2A-B**, with detection of α_L integrin and CD123 projected on the phase contrast imaging (A) and magnification of two consecutive Z-stacks of yellow-boxed pDC (B). **(C-D)** Confocal microscopy imaging of immunostained high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex (m24 epitope; green) in cocultures of pDCs (DiI stained; red; *) and DENV infected cells (#), 4-5 hour-incubation, nuclei (Hoechst, blue), displayed as in **Figure 2D-E**. **(E-F)** Confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin (green) in absence of contact of pDCs (*) with infected cells, displayed as in panels **A-B**.

Figure S3, related to Figure 3. pDC-mediated IFN-I/III production and inhibition of viral propagation in response to contact with HCV- and ZIKV-infected cells. (A) Results of **Figure 3A** presented as absolute values of the quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with HCV-infected cells, treated or not with blocking antibodies against α_L integrin and ICAM-1 at the indicated concentration and of the levels - in absence of pDC - of intracellular and extracellular viral RNA and infectious virus production by infected cells. Results are expressed as in **Figure S1B-C** with same detection limits; p values ≤ 0.05 are indicated. Of note, no significant difference for the levels of intracellular and extracellular viral RNA and infectivity. **(B)** Impact of inhibitors of clathrin-mediated endocytosis including chlorpromazine (CPZ; 14 μ M) and dynamin inhibitor (dynasore; Dyn; 100 μ M), or of actin polymerization (latrunculin B; Lat B; 1 μ M), as previously described (Decembre et al., 2014). Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with ZIKV infected Huh-7.5.1 cells, treated as indicated (upper panel). The intracellular and extracellular viral RNA levels (middle panel) and extracellular infectious virus production (lower panel) by ZIKV infected cells were analyzed in absence of pDC with treatment conditions similar to the analysis of IFN α production in cocultures. Results are expressed as in panel **A**; mean \pm SD; 4-5 independent experiments. **(C)** Results of the absolute values relative to **Figure 3E-G** and expressed as in panel **A**. **(D)** FACS analysis of ICAM-1 expression at the surface of cells infected by DENV, ZIKV, HCV and uninfected (cont) Huh-7.5.1 cells. Results are presented as fold-increase of surface expression relative to the corresponding cells stained only with secondary antibody, as reference; 4-5 independent experiments; geomean \pm SD; no significant different (p value > 0.05) using Kruskal-Wallis rank test. **(E)** Quantification of IFN β and type III IFNs (IL-29, IL-28A and IL-28B) in supernatants of pDCs cocultured with ZIKV infected cells and treated with blocking anti- α_L integrin, as indicated. **(F)** FACS analysis of viral

transmission from GFP⁻ ZIKV infected cells to GFP⁺ uninfected cells when cocultured, or not, with pDCs for 48 hour-incubation and in presence of anti- α L integrin (10 μ g/ml), as indicated. ZIKV infected cells are detected by immunostaining of the dsRNA viral marker. Results presented as dot plots are representative of 5 independent experiments, related to **Figure 3H**. The frequency of the cell populations is indicated as percentage on the dot plot.

Figure S4, related to Figure 4. Actin network polarizes at contact and is required for pDC response. (A) Confocal microscopy imaging of immunostained actin (purple) and ER marker PDI (green) in co-cultures of pDCs (DiI stained; *) and HCV SGR replicating Huh7.5.1c2 cells (HCV rep cells; #), 4-5 hour-incubation; nuclei (Hoechst; blue). Detection of actin and PDI projected on the phase contrast imaging, two successive confocal stacks with magnified yellow-boxed pDC. (B) Quantification of the frequency of pDCs with clustering of actin or PDI at contact in cocultures treated, or not, with actin polymerization inhibitor (Latrunculin B; Lat B; 1 μ M). Results are expressed as the percentages of analyzed pDCs in contact with HCV rep cells (B; n>25 analyzed contacts per experimental conditions) (C) Confocal microscopy imaging of immunostained actin (purple) and the ER marker PDI (green) in co-cultures of pDCs (DiI stained; *) and HCV infected cells (#), 4-5 hour incubation; nuclei (Hoechst, blue). Image displayed as in panels A. (D) Quantification of the frequency of pDCs with clustering of actin (purple) or PDI (green) at the contact site in cocultures of pDCs and HCV infected cells. Results are expressed as the percentages of analyzed pDCs in contact with HCV infected cells (D; n>31 analyzed contacts); 3 independent experiments; mean \pm SD; p value as indicated. (E-G) Results presented as absolute values relative to **Figure 4M-0**. The detection limits of the assays are 20 pg/mL for IFN α and 1000 GE for RT-qPCR. (H) Quantification of pDC-infected cell conjugates by Image Stream X technology. pDCs cocultured with GFP⁺ HCV infected or replicating (rep)

cells for 4-5 hours in presence or not actin polymerization inhibitor (Lat B; 1 μ M) as in panel **B**. Results of 5 (HCV inf cells) and 1 (HCV rep cells) independent experiments expressed as percentage of conjugate; mean \pm SD; n=10 000 events per condition and per experiment; p value as indicated. (**I-L**) Quantification of IFN α in supernatants of pDCs cocultured with DENV infected (**I**) or HCV replicating (rep) cells (**J, L**) and HCV infected cells (**K**) that were treated or not with CDC42 inhibitor (ML141; at indicated concentrations) or actin polymerization inhibitor (Lat B; 1 μ M). The intracellular and extracellular viral RNA levels were analyzed for infected/replicating cells similarly treated with inhibitors, in absence of pDC. Results are expressed as absolute values as in panels **E-G**; mean \pm SD; n=3-6 independent experiments (**I-J**) and n=4 independent experiments (**K-L**); p value indicated when \leq 0.05; the arrays indicate non-detectable.

Figure S5, related to Figure 5 and 7. Co-clustering of regulators of actin network and endocytosis machinery at the contact. (**A-B**) Confocal microscopy imaging of immunostained EEA1 (green) and PI(4,5)P₂ (purple) in cocultures of pDCs (DiI-stained, *) and HCV infected cells; nuclei (Hoechst) projected on the phase contrast imaging (**A**) and two successive confocal stacks with magnified yellow-boxed pDC (**B**). (**C-F**) Confocal microscopy imaging of immunostained clathrin (green) and actin (purple) in cocultures of pDCs (DiI-stained, *) and HCV infected cells (**C-D**) or DENV infected cells (**E-F**); nuclei (Hoechst). Representative detection of actin and clathrin projected on the phase contrast imaging (**C, E**) and two successive confocal stacks with magnified yellow-boxed pDCs (**D, F**).

Figure S6, related to Figure 6. Regulation of the long-lasting contacts of pDCs with infected cells by α _L integrin and TLR7-induced signaling. (**A**) Representative live imaging of DiI stained-pDC (red) cocultured with GFP⁺ DENV infected cells (green) analyzed using

spinning disc confocal microscopy. Results are presented as a series as 5 min interval imaging, *i.e.*, projection of confocal Z-stacks; motion tracking of pDCs indicated by yellow line; red-colored frames corresponding of time of the pDC-infected cells contact. **(B-F)** Motion tracking graphs of 10 pDCs cocultured with DENV infected cells **(B)**, with uninfected (cont) cells **(C)**, with DENV infected cells in the presence of TLR7 inhibitor (IRS661; 0.35 μ M) **(D)**, with DENV infected cells in the presence of anti- α_L integrin blocking antibody (10 μ g/ml) **(E)** and with uninfected (cont) cells in the presence of TLR7 agonist (IMQ; 20 μ M) **(F)**. Time-lapse images were processed using Trackmate plug-in of Image J software, and position/motion of each individual tracked pDC reported on the graph. **(G)** Schematic representation of the experimental timelines for the kinetic analyses of cell conjugate frequency between pDCs and DENV infected cells (left schema) and the impact of anti- α_L integrin (ab) when added at various times of coculture (right schema). **(H)** Left bars, kinetic analysis of the frequency of conjugate between pDCs and DENV infected cells at 30 min, 2 and 4 hours post-coculture, as indicated. Right bars, kinetic analysis of the inhibition of cell-cell conjugate by anti- α_L integrin added at the indicated time-points *i.e.*, pre-incubation for 20 min with pDCs *versus* 30 min, 2 hours post-coculture and harvested at 4 hours post-culture for analysis by Image Stream X technology. Results of 4 independent experiments expressed as percentage of conjugate; mean \pm SD; n=10 000 events per condition and per experiment; p values as indicated. **(I)** Quantification of IFN α production (pg/ml) by pDCs cocultured with DENV infected cells in the presence anti- α_L integrin, added at the indicated time points, and harvested at 16 hours post-coculture. **(J)** Quantification of conjugates between pDCs and uninfected cells in the presence, or not, of TLR7 agonist (IMQ; 20 μ M) and in comparison with DENV infected cells, in 4-5 hour-coculture and analyzed by Image Stream X technology. Results of 5 independent experiments expressed as percentage of conjugate; mean \pm SD; n=10 000 events per condition; p-value as indicated. **(K)** Determination of the contact number per

pDCs (*i.e.*, included when contact is observed for $n \geq 2$ successive imaging) in the course of live-imaging of the coculture presented in **Figure 6B and 6F**; mean \pm SD; $n=112$ pDCs cocultured with cont cells; $n=103$ pDCs with DENV cells and $n=90$ pDCs with DENV cells treated by TLR7 inhibitor. **(L-M)** Analysis of the velocity of pDCs (stained with DiI) treated or not with TLR7 agonist (IMQ; 20 μ M) and in absence of other cells. **(L)** Representation of pDC velocities in a 10-hour recording are shown with color-scale from red (*i.e.*, maximum; 5.2 μ m/min) to blue (*i.e.*, minimum; 0.07 μ m/min). Analyses were performed using Trackmate plug-in of Image J software. **(M)** Dot plot representation of the average of velocity in 1 hour-timeframe for individual pDC. Means are indicated as black bar; $n=3$ independent experiments; no statistical difference was determined by Student T test.

Figure S7, related to Figure 7. Surface expression of α_L integrin on cocultured pDCs and imaging of co-clustering of the adhesion complex and vesicular trafficking components at the contact. **(A-B)** FACS analysis of immunostained α_L integrin at the cell surface of pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 cells *versus* uninfected (cont) cells for 4-5 hours. Results are presented with representative histogram **(A)** and quantification of the surface expression **(B)**, expressed as fold-increase of geomean relative to cells stained only with secondary antibody; geomean \pm SD; $n=3$ independent experiments. **(C)** Representative confocal microscopy imaging of immunostained α_L integrin (green) and clathrin (purple) in cocultures of pDCs (stained with CellTrace violet; CTV; *) and DENV infected cells (#); nuclei (Hoechst); detection of α_L integrin/clathrin projected on the phase contrast imaging (left panels); two successive confocal stacks with magnified yellow-boxed pDC (middle panels) and 3D-reconstruction of consecutive Z-stacks of the blue-boxed view (right panel). **(D)** Representative confocal microscopy imaging of immunostained high-affinity (open) conformation of $\alpha_L\beta_2$ integrin complex (*i.e.*, m24 epitope, green) and the early endosome

EEA1 marker (purple) in cocultures of pDCs (DiI-stained; red) and DENV infected cells; nuclei (Hoechst); displayed as in panel **C**. **(E)** Representative confocal microscopy imaging of immunostained clathrin (green) and actin (purple) in cocultures of pDCs (DiI-stained, *) and ZIKV infected cells (#); nuclei (Hoechst); displayed as in panel **C**.

References

Decembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* *10*, e1004434.

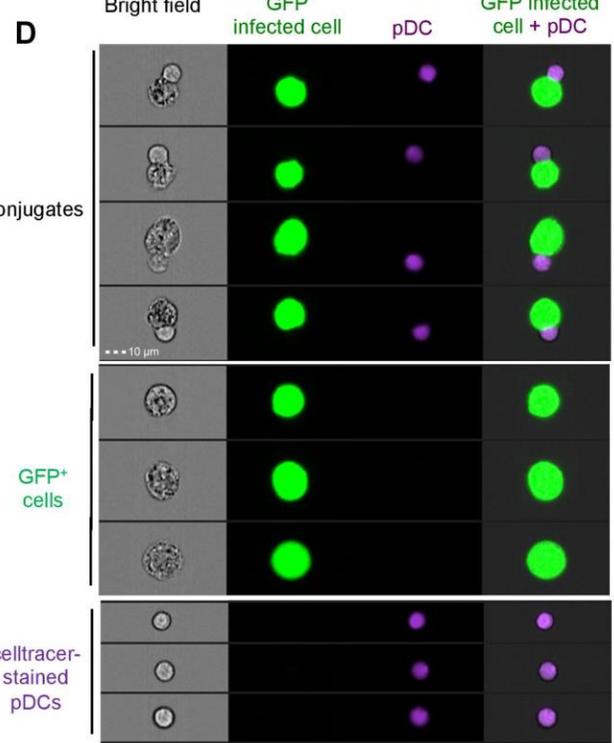
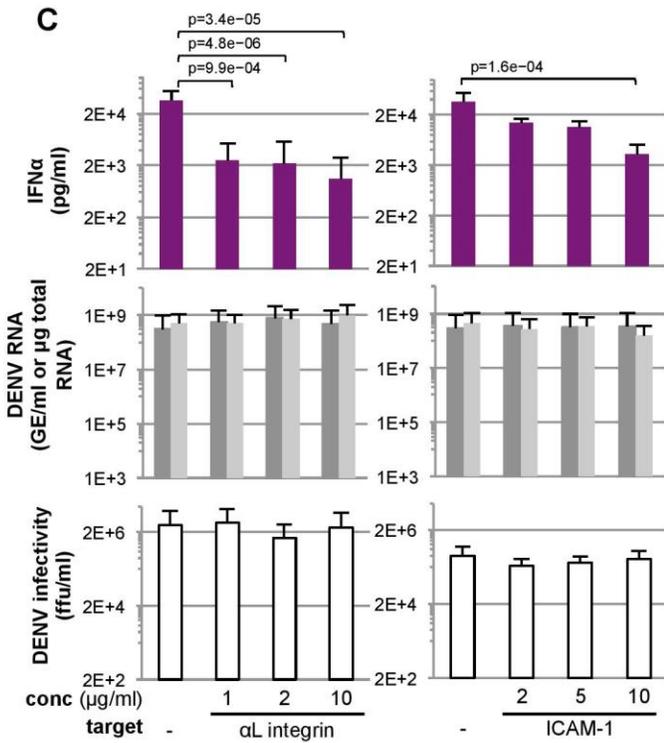
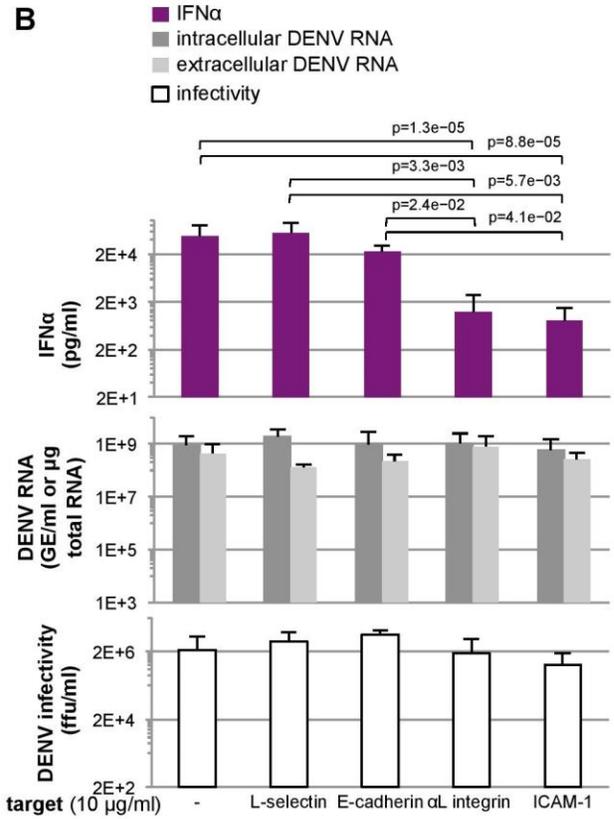
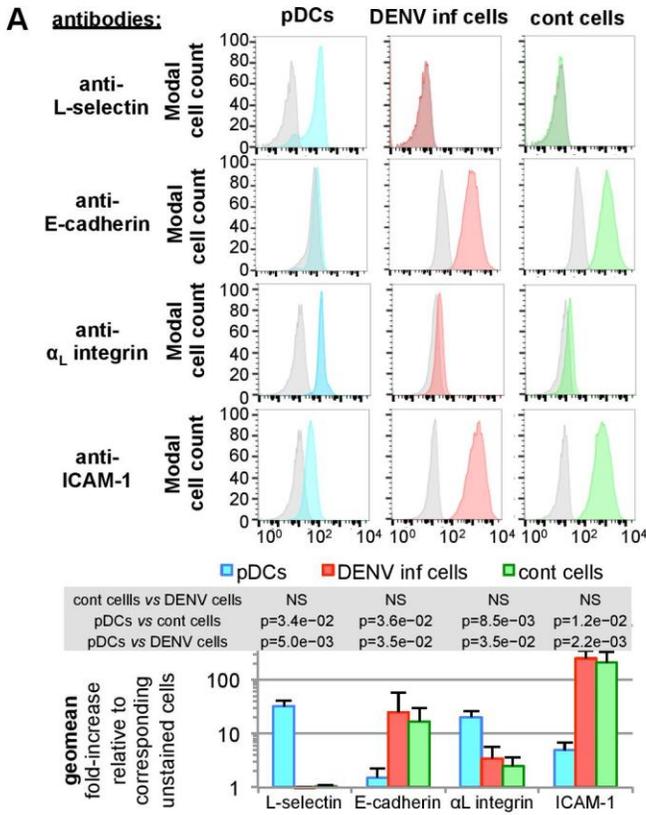


Figure S1

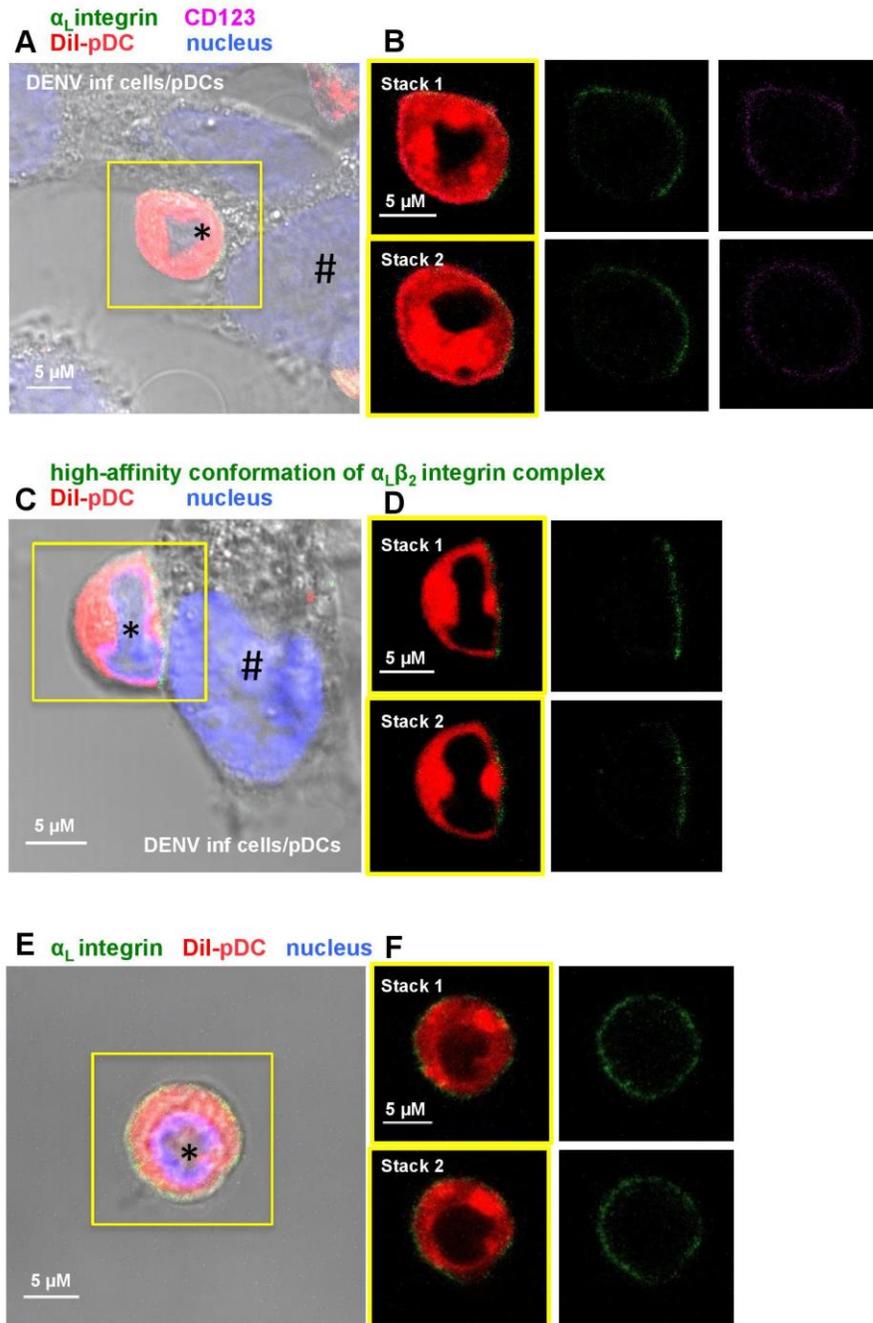


Figure S2
 Page 88

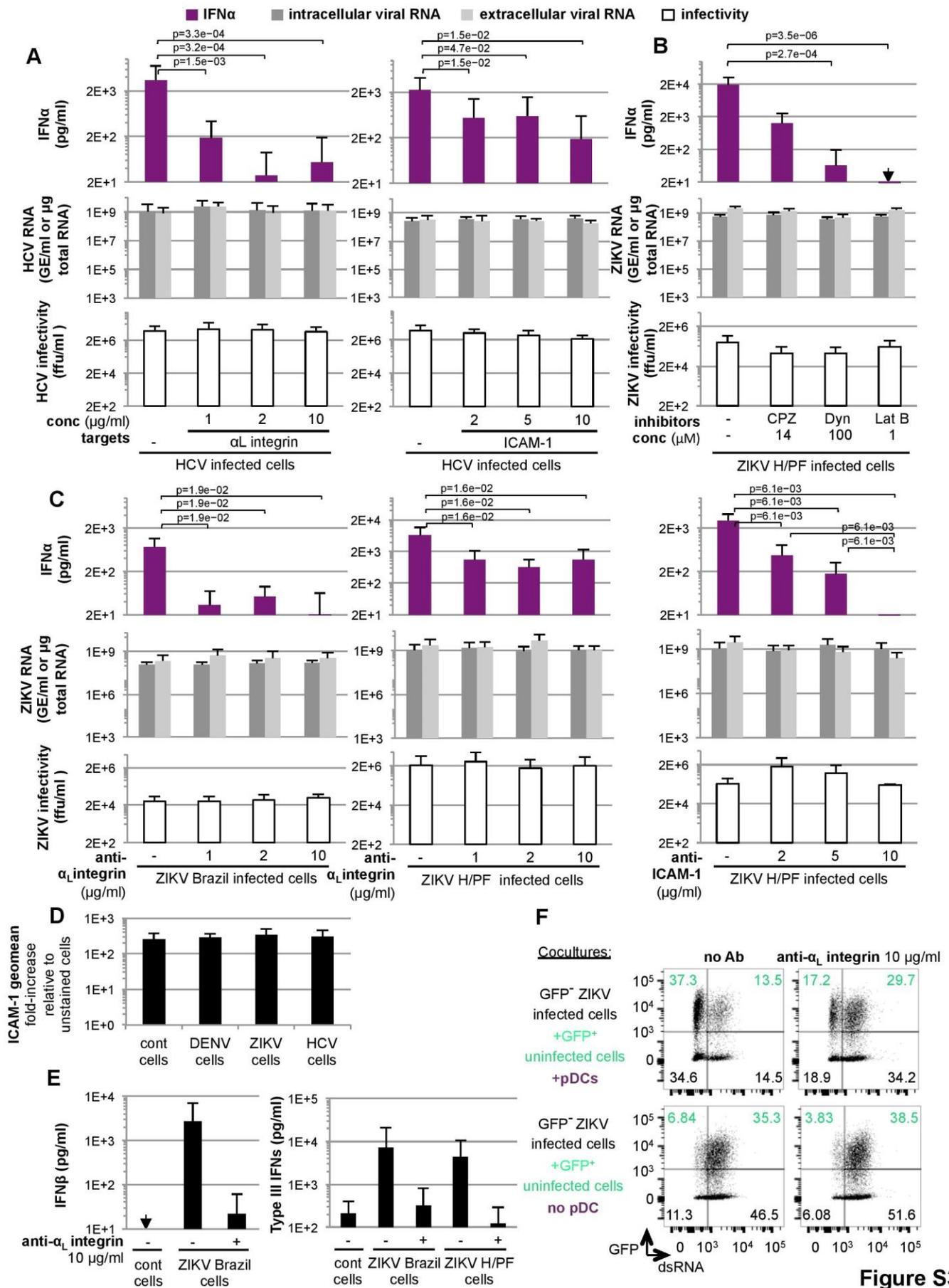


Figure S3

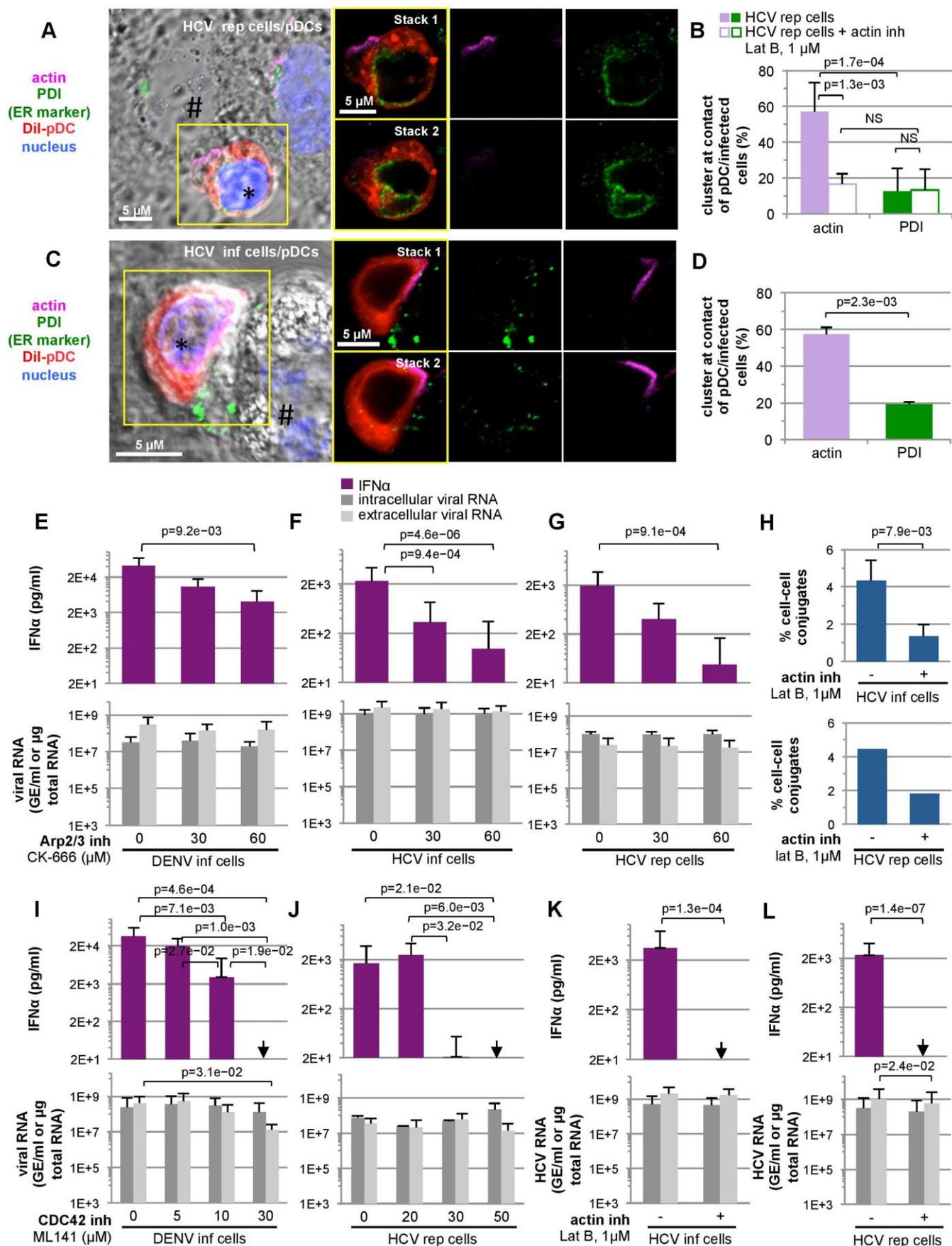


Figure S4

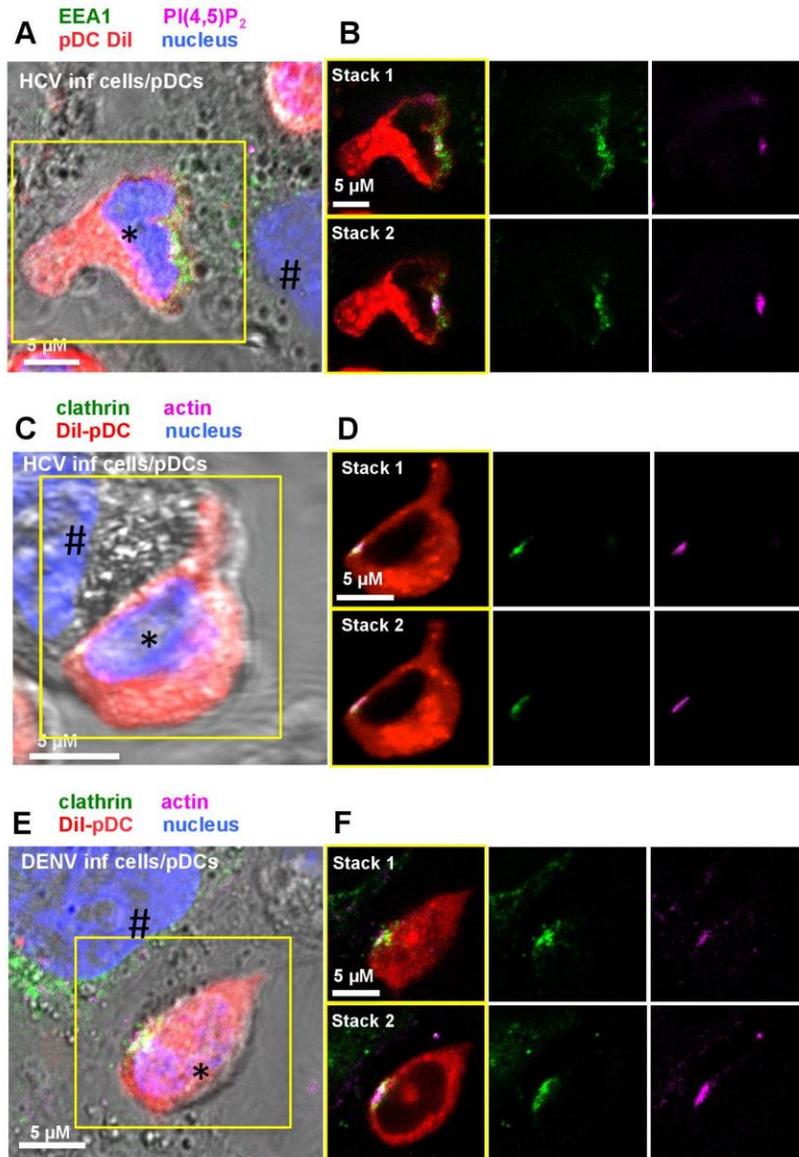


Figure S5

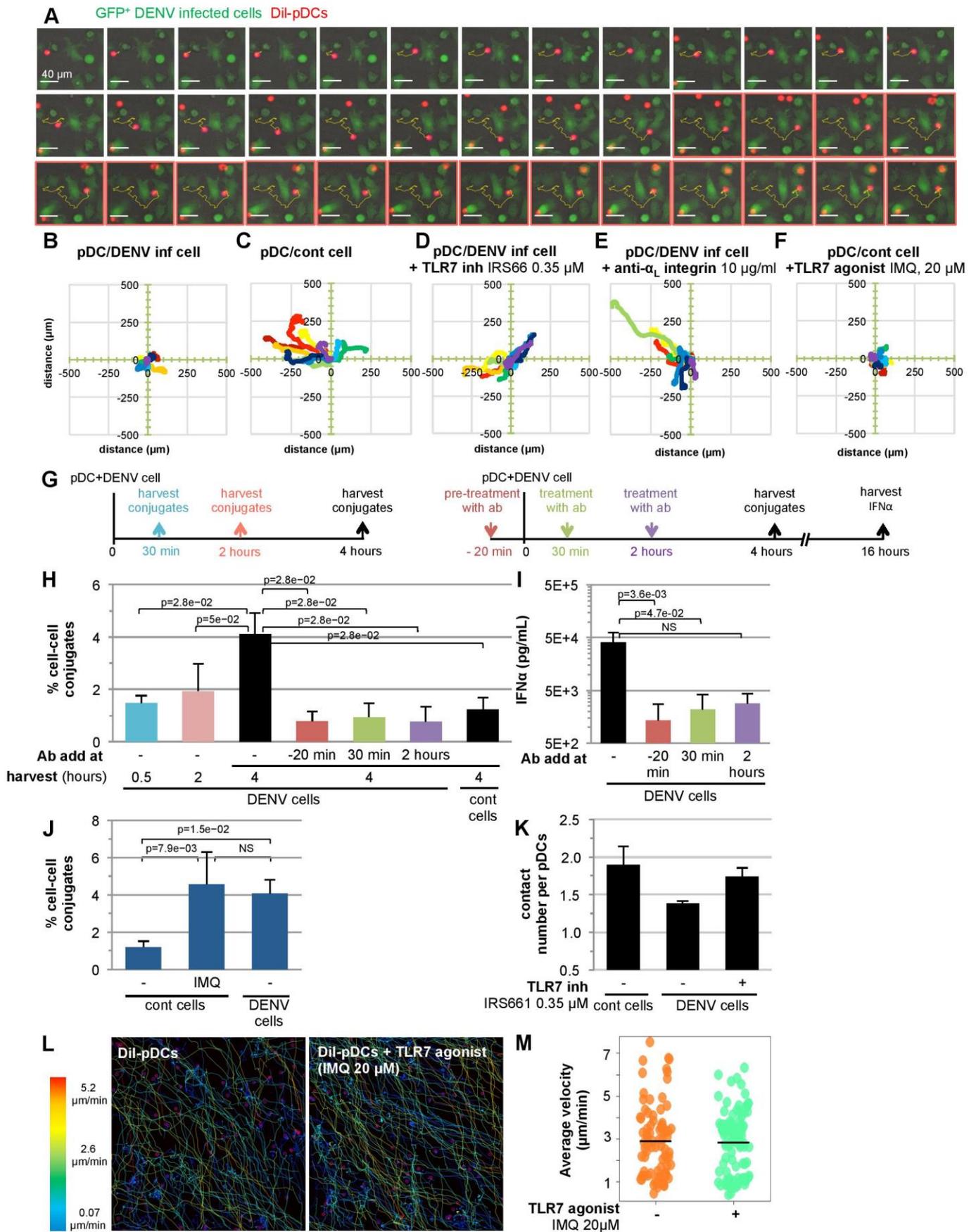


Figure S6

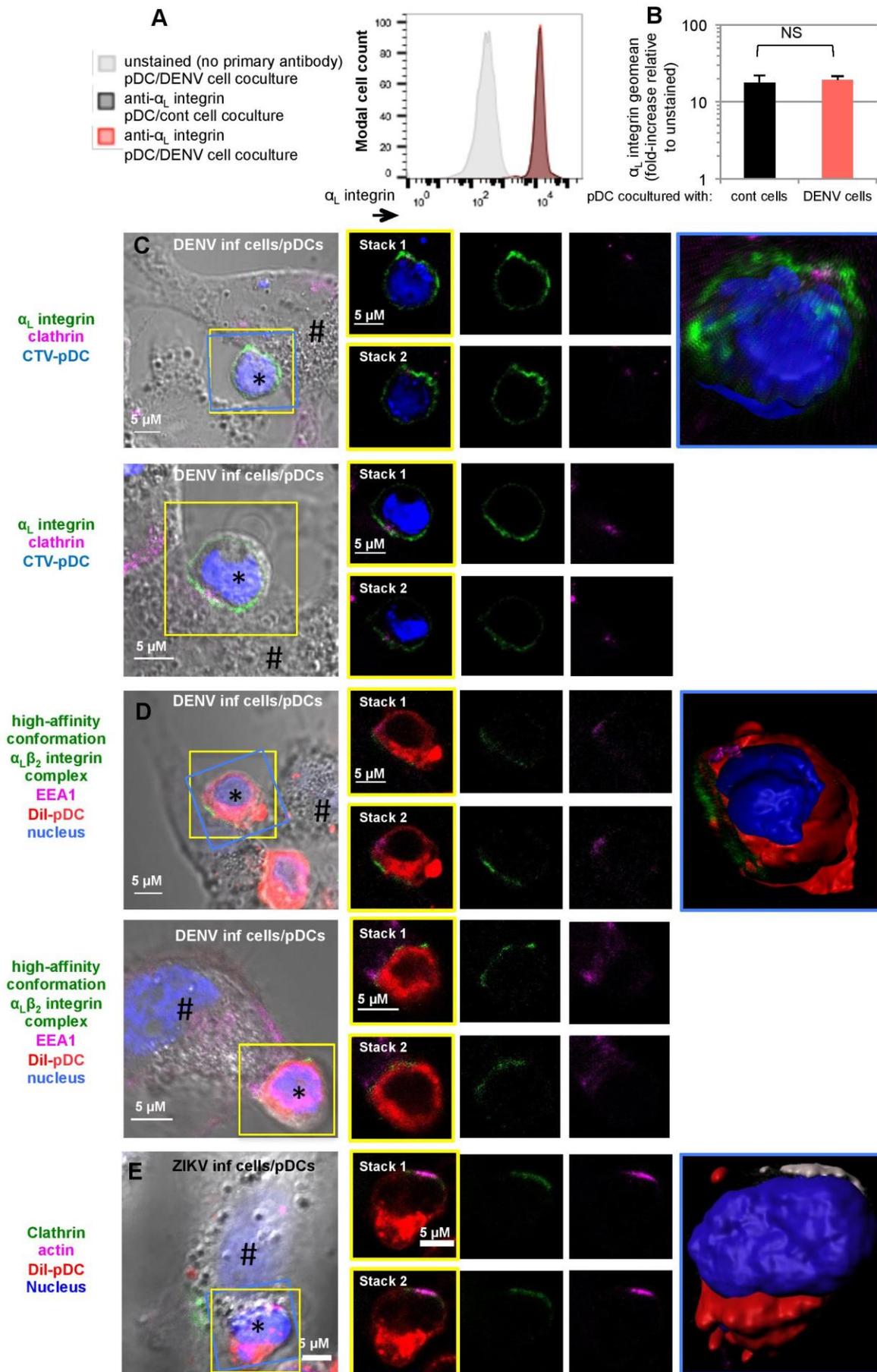


Figure S7

II. Paper N°2: IFN-I signaling reinforces the interferogenic synapse-mediated sensing of infected cells by the plasmacytoid dendritics and antiviral response (in preparation)

IFN-I signaling reinforces the interferogenic synapse-mediated sensing of infected cells by the plasmacytoid dendritics and antiviral response

Séverin Coléon¹, Décembre Elodie¹, Hardy Emilie¹, Dreux Marlène¹

¹ CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon F-69007, France

Abstract

Plasmacytoid dendritics cells (pDCs) are a major type I interferon (IFN-I) cell producer in response to the detection of virally infected cells. We previously demonstrated that pDC-mediated antiviral responses required the formation of an interferogenic synapse (iSYN) with infected cells for the transfer of immunostimulatory viral RNAs from infected cells to pDC. The subsequent recognition by the nucleic acid sensor TLR7 leads to a robust IFN-I production by pDCs. The iSYN is composed by α L β 2 integrin-ICAM-I adhesion complexes, along with recruitment of the actin network and endocytic machinery, all polarized at the contact site of pDCs with infected cells. TLR7-mediated acts as a feedforward regulation to promote iSYN establishment and sustain pDC contact with infected cells. Here, using dengue virus (DENV) as model, we studied the molecular basis of this feed-forward regulation. We showed that the IFN-I produced by pDCs can reinforce the contact frequency, the cell polarity, and thus promote pDC response against infected cells. These results highlight the cooperative nature of pDC antiviral response mediated by physical contact.

Introduction

Type I interferon (IFN-I) response is pivotal for protection against viral infections. It is initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) including viral nucleic acids by cellular pathogen recognition receptors (PRRs) such as toll-like receptors (TLRs). pDCs function as sentinels of viral infections and are known to be a major early source of IFN-I *in vivo* (Reizis, 2019). This response is predominantly triggered *via* recognition of viral nucleic acid by endolysosomes-localized TLR7 or TLR9, recognizing RNA and DNA respectively (Reizis, 2019; Webster et al., 2016). We and others reported that the activation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) requires physical contact with DENV infected cells to produce robust levels of IFN-I (Décembre et al., 2014b). Those contacts allow the transfer from infected cells to pDCs of immunostimulatory RNA contained in vesicles as immature virions (Décembre et al., 2014b).

We recently uncovered the organization of a functional territory in pDCs at the contact site with infected cells required for IFN-I production that we named interferogenic synapse (iSYN) (Assil et al., 2019). This newly feature of pDCs is reminiscent with previous reports showing that the pDC-IFN-I secretion as a response likely confined to the infection site *in vivo* (Webster et al., 2018). We also showed that TLR7-induced signaling regulates the rearrangement of the interferogenic synapse, thus acting as a positive feed-forward regulation for the transfer of PAMP-carriers to the pDCs.

Nevertheless, how the TLR7 pathway potentiates the reinforcement of the iSYN remains enigmatic. In accordance, a recent study using a single-activation assay highlighted the cooperative nature of pDCs, revealing that pDC IFN-I response to TLR-7 and TLR-9 ligands increases with cell density (Wimmers et al., 2018b). These observations suggest a cooperation between pDCs to achieve a robust IFN-I response, likely by an autocrine/paracrine IFN-I amplification loop. Here, we explored the molecular mechanisms underlying the reinforcement of contacts between pDCs and infected cells, using DENV as viral model. We uncovered new insights on how the TLR7-induced signaling regulates iSYN and potentiates pDC response and the contribution of the autocrine/paracrine action of IFN-I

Results

Type I IFN produced upon pDC activation potentiate the contact and response of pDCs against DENV infected cells.

First, we hypothesized that the feedforward regulation of the iSYN by pDC-TLR7-induced signaling can involve the secretion of an activating component at early time of pDC activation by infected cells. To address this question, we tested whether the supernatant harvested from pDC/infected cells coculture, referred to as ccSN can increase cell-contact and pDC response when applied to another pDC/infected cells coculture (**Figure 1A**). To rule out any possible impact by dengue infectious particles contained in the ccSN, the latter was UV-inactivated. As expected, pDCs readily produced interferon IFN- α in response to DENV infected cells (DENV inf.), already detectable at 4 hours of coculture (**Figure 1B**). Importantly, we showed that addition of ccSN greatly increases the production of IFN α by pDCs (i.e., 5 folds increase).

We then aimed at identifying the activating signal contained in ccSN. We previously reported that the sensing of DENV infected cells by pDCs leads to an IRF7-restricted response (i.e., type IFN production), and not, or poorly, NF κ B-mediated production of pro-inflammatory cytokines (Webster et al., 2018). Therefore, we tested the contribution of type I IFN (IFN-I) present into the ccSN, by using neutralizing antibodies directed against the IFN-I receptor (IFNAR) subunit 2. We showed that the addition of anti-IFNAR fully abrogated the potentiation of pDC IFN α production by ccSN, since the levels of IFN α were reduced to those observed in absence of ccSN (**Figure 1B**). These results suggested that the enhancement of pDC IFN α production by ccSN is, primarily mediated by IFN-I.

Consistently, we showed that addition of recombinant IFN β was sufficient to increase pDC IFN α production at a level comparable to ccSN (**Figure 1B**). Of note, the addition of anti-IFNAR antibody, in absence of ccSN did not reduce IFN α production by pDCs, suggesting that the IFNAR signaling is likely not yet at play at this early time point of coculture (**Figure 1B**). Next, we analyzed the impact of IFN-I signaling on the cell contact using Image Stream X (ISX) technology, as previously described (Assil et al., 2019). We showed that the addition of ccSN greatly increased the frequency of conjugates between pDCs and DENV infected cells, while anti-IFNAR abrogated ccSN-mediated enhancement (**Figure 1C**) in accordance with the impact on IFN α production by pDCs (**Figure 1B**). Consistently, addition of recombinant IFN β increased the formation of conjugates between pDC and DENV infected cells (**Figure 1C**).

We further investigate the kinetic of action of IFN β treatment on pDCs contacts and response. As expected, IFN α mRNA and secreted IFN α protein were detected when pDCs were cocultured with uninfected cells (Cont.) (**Figure 1D and 1E**). The levels of IFN α mRNA increased over time when pDC were cocultured with DENV infected cells and was enhanced by addition of IFN β (**Figure 1D**). The secreted IFN α was detected at 3 hours of coculture between pDCs and DENV infected cells, only when treated with recombinant IFN β (**Figure 1E**). The difference of IFN α mRNA level with or without IFN β treatment was higher at 3 hours post-coculture (10 fold-increase) as compared to 1 hour (2 fold-increase) and 5 hours (5 fold-increase) (**Figure 1D**). We observed that the frequency of conjugates between pDCs and DENV infected cells increased over time, and were already increased as soon as 1 hour of coculture when compared to uninfected cells (**Figure 1F**). As opposed to the increase of IFN α protein and mRNA levels observed at 5 hours, addition of IFN β increase the frequency of conjugates only enhanced at 3 hours of coculture (**Figure 1F**). This restricted window of potentiation by exogenous IFN β , likely suggests that at later time point endogenous IFN α produced by pDCs could act in a paracrine/autocrin manner to sustain this potentiation.

IFN β stimulated pDCs established sustained contacts with DENV infected cells (preliminary data)

To distinguish whether the augmented frequency of conjugates results from a stronger cell interaction or from a longer duration, we tracked the impact of IFN β on pDC interaction with infected cells by live-imaging analysis of the cocultures. We showed that the addition of recombinant IFN β in pDC-DENV infected cells coculture increases the median of the contact duration, as represented on the violin plot (**Figure 2A**). Importantly, the comparison of the frequency determined by time length revealed that the long-term contacts of pDCs with DENV infected cells (i.e., >350 min) was increased by addition of IFN β with a reciprocal diminution of the contacts of shorter duration, especially between 50-100 min (**Figure 2B**). These results suggests that IFN β can increase the frequency of longer duration contacts between pDCs and DENV infected cells.

IFNAR-mediated signaling induces pDC polarity at the contact

We previously reported that TLR7 signaling also modulates the polarization of several components at the iSYN (Assil et al., 2019), therefore we addressed whether IFN-I also acts at this level. First, we tested the impact of ccSN on the polarization of the actin network, along with components of the endocytosis machinery, including clathrin or the endosomal marker EEA1.

As shown on representative confocal images, and consistent with our previous observations (Assil et al., 2019), actin network and clathrin form co-clusters on the side of pDC at the contact site (**Figure 3 B and C**). The quantification of different phenotypes as illustrated in **Figure 3A**, demonstrated that the addition of ccSN enhanced the polarization of actin/clathrin coclusters at the iSYN, and anti-IFNAR2 abrogated this effect (**Figure 3D**). In accordance the addition of recombinant IFN β (rec. IFN β) enhanced the polarization of actin/EEA1 coclusters at the iSYN (**Figure 3G**). Together those results demonstrated that IFNAR pathway promotes the polarization of the actin network and components of the endocytosis machinery at the iSYN, and thereby contributes to enhance IFN-I production.

Next, we asked whether IFN-I could regulate events potentially upstream of the polarization of the actin network and the endocytosis machinery at contact. We previously showed that the contact between pDCs and DENV infected cells is established, at least, *via* the interaction the α L β 2 integrin and its ligand ICAM-I (Assil et al., 2019). The polarization of α L integrin at contact was observed for virtually all analyzed pDCs in contact and was modulated neither by the contact with infected cells as compared to uninfected cells nor by the addition of ccSN or recombinant IFN β (**Figure 3J**).

Since the linkage between integrin and the actin cytoskeleton is notably strengthened by vinculin, an actin-binding protein, known to reinforce cell-cell and cell-matrix adhesion, we analyzed whether vinculin polarized at the iSYN and its regulation by IFN-I. In sharp contrast to co-analyzed α L integrin, the polarization of vinculin at contact was increased when pDCs were in contact with DENV infected (DENV inf.) cells as compared to uninfected (Cont.) cells (**Figure 3K**). Importantly, we showed that treatment with ccSN potentiated vinculin polarization, and its effect was specifically abrogated by addition of anti-IFNAR (**Figure 3K**). Recombinant IFN β similarly enhanced the polarization of vinculin clusters at the iSYN (**Figure 3K**). In accordance, the polarization of vinculin/clathrin coclusters were increased in pDCs when in contact with DENV infected (DENV inf.) cells as opposed to uninfected (Cont.) cells (**Figure 3L**). Addition of ccSN or IFN β increased this coclusters polarization at contact in an IFNAR-dependent manner (**Figure 3L**).

Taken together, these results demonstrate that the IFNAR pathway acts as a feedforward loop, by inducing the polarization of vinculin, actin network, endocytosis components at contacts between pDCs and DENV infected cells, leading to an increased production of IFN α by pDCs.

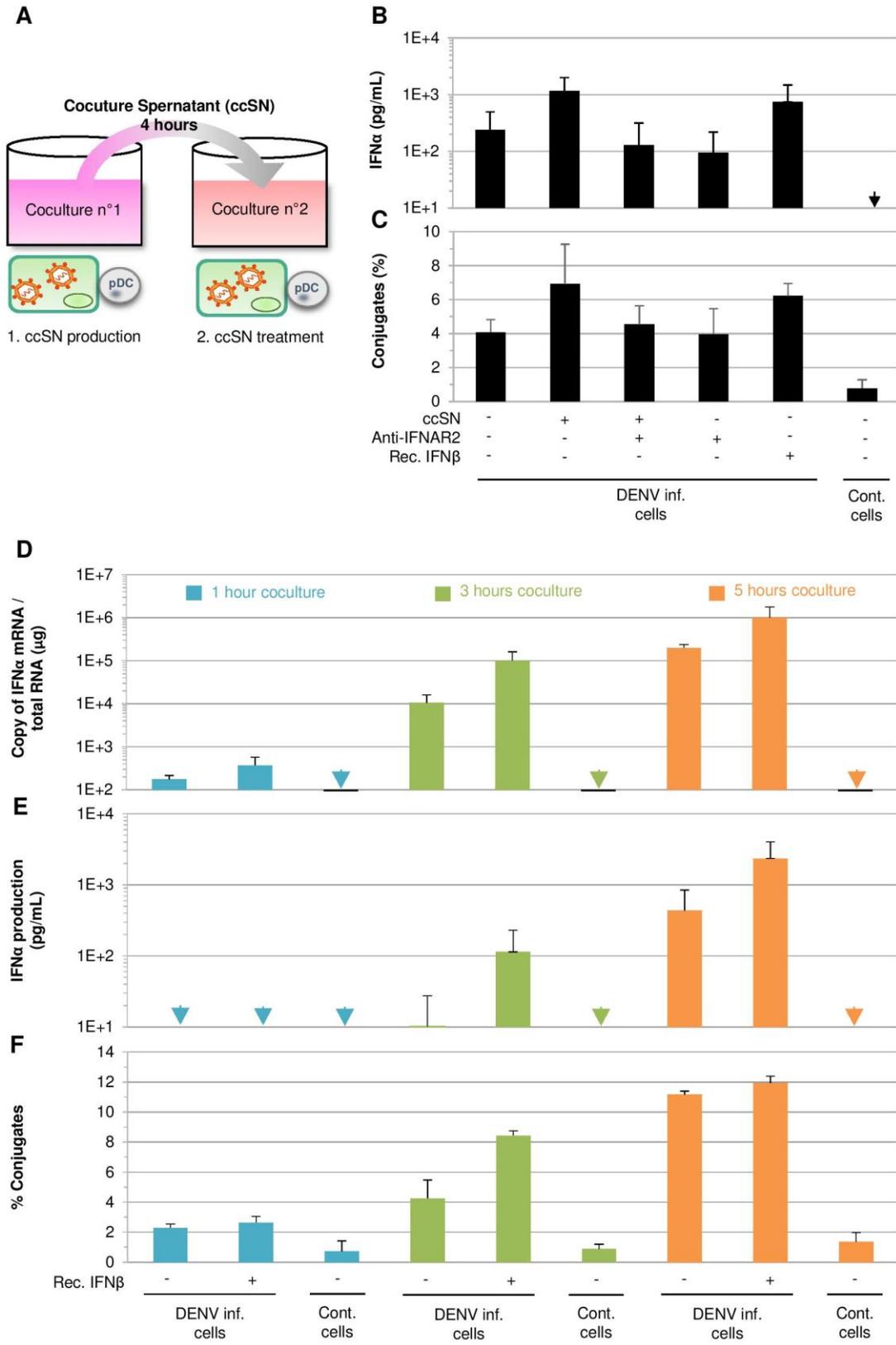


Figure 1. Type I IFN produced upon pDC cocultured with infected potentiate the cell contact and pDC activation.

(A) Schematic representation of the coculture between pDC and DENV treated by the supernatant harvested from a previous coculture, referred to as ccSN.

(B) Quantification of IFN α production by pDCs cocultured for 4 hours with DENV infected Huh7.5.1 cells (DENV inf. cells) or uninfected cells (Cont.) and treated as indicated by ccSN (12U/mL) ; recombinant IFN β (rec. IFN β) (100U/mL) and neutralizing antibodies against IFN α and β subunit (anti-IFNAR2) (10 μ g/mL). Results of 7 independent experiments; mean \pm SD.

(C) Quantification of conjugates between pDCs and DENV infected Huh7.5.1 cells treated as panel B and determined by Image Stream X technology. Results of 6 independents experiments are expressed as percentage of conjugates relative to the total cell number of analyzed cells; mean \pm SD ; n= 10,000 events per condition per experiment.

(D) Quantification of IFN α mRNA of the cocultured between pDCs and DENV infected Huh7.5.1 (DENV inf.) cells or uninfected cells (Cont.), harvested at 1 (cyan), 3 (green) and 5 (orange) hours post-coculture, and treated as indicated with recombinant IFN β (100U/mL). Results of 3 independents experiments expressed as copy number of mRNA per μ g of the total cellular RNA.

(E) Quantification of IFN α production by pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 (DENV inf.) cells or uninfected cells (Cont.) cocultured and treated as in D. Results of 3 independents experiments expressed as the quantity of IFN α (pg/mL), mean \pm SD.

(F) Quantification of conjugates between pDCs and DENV infected Huh7.5.1 cells (DENV inf.) by Image Stream X technology cocultured and treated as in C. Results of 3 independents experiments are expressed as percentage of conjugates ; mean \pm SD ; n= 10,000 events per condition per experiment.

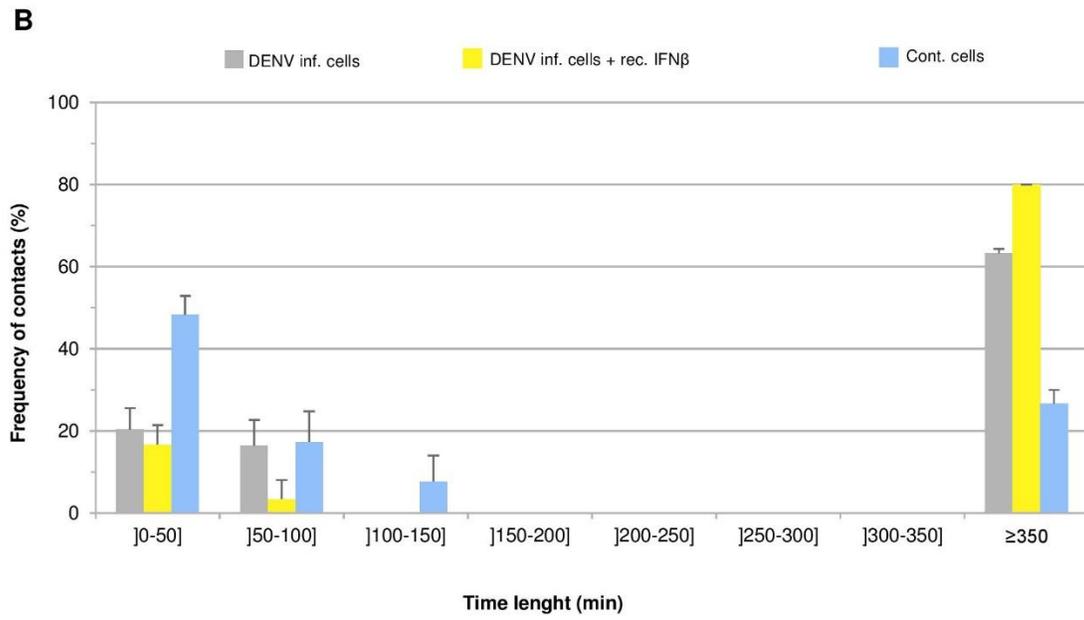
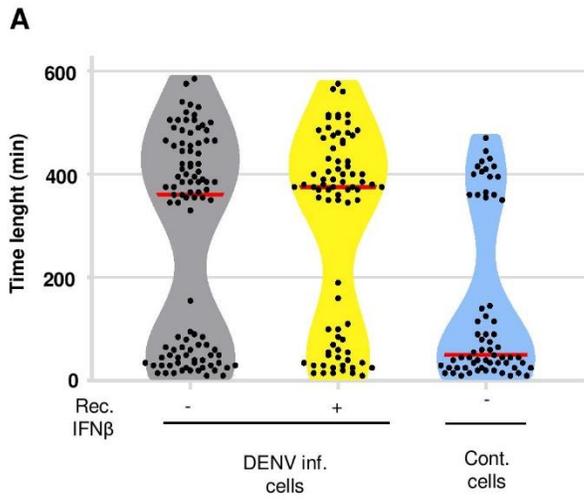


Figure 2. Type I IFN produced upon pDC cocultured with infected potentiate the cell contact and pDC activation.

Quantification of the duration of cell contacts illustrated between pDCs and DENV infected Huh7.5.1 cells (DENV. inf.) and uninfected Huh7.5.1 cells (Cont. cell) determined by live-imaging using spinning-disc confocal microscopy. The coculture was treated with recombinant IFN β (100U/mL), as indicated. Confocal Z-stacks of coculture of CMTPX-stained pDCs and GFP⁺ infected or uninfected cells are acquired every 5 min 10 hours. The cell contact is defined as CMTPX signal (pDCs) apposed or merged with GFP signal of DENV infected cells or uninfected cells; results of 2 independents experiments (n=75 pDCs tracked for DENV inf. cells ; n=67 pDCs tracked for DENV inf. + rec. IFN β ; n=44 pDCs tracked for Cont. cells).

(A) The results are presented by violin plots with dots representing the durations of the individual recorded contacts in each experimental condition. The median for each condition is represented by a red bar.

(B) The results are displayed as percentages of contacts in the indicated time interval relative to the total number of examined pDC-infected cell contacts, mean \pm SD.

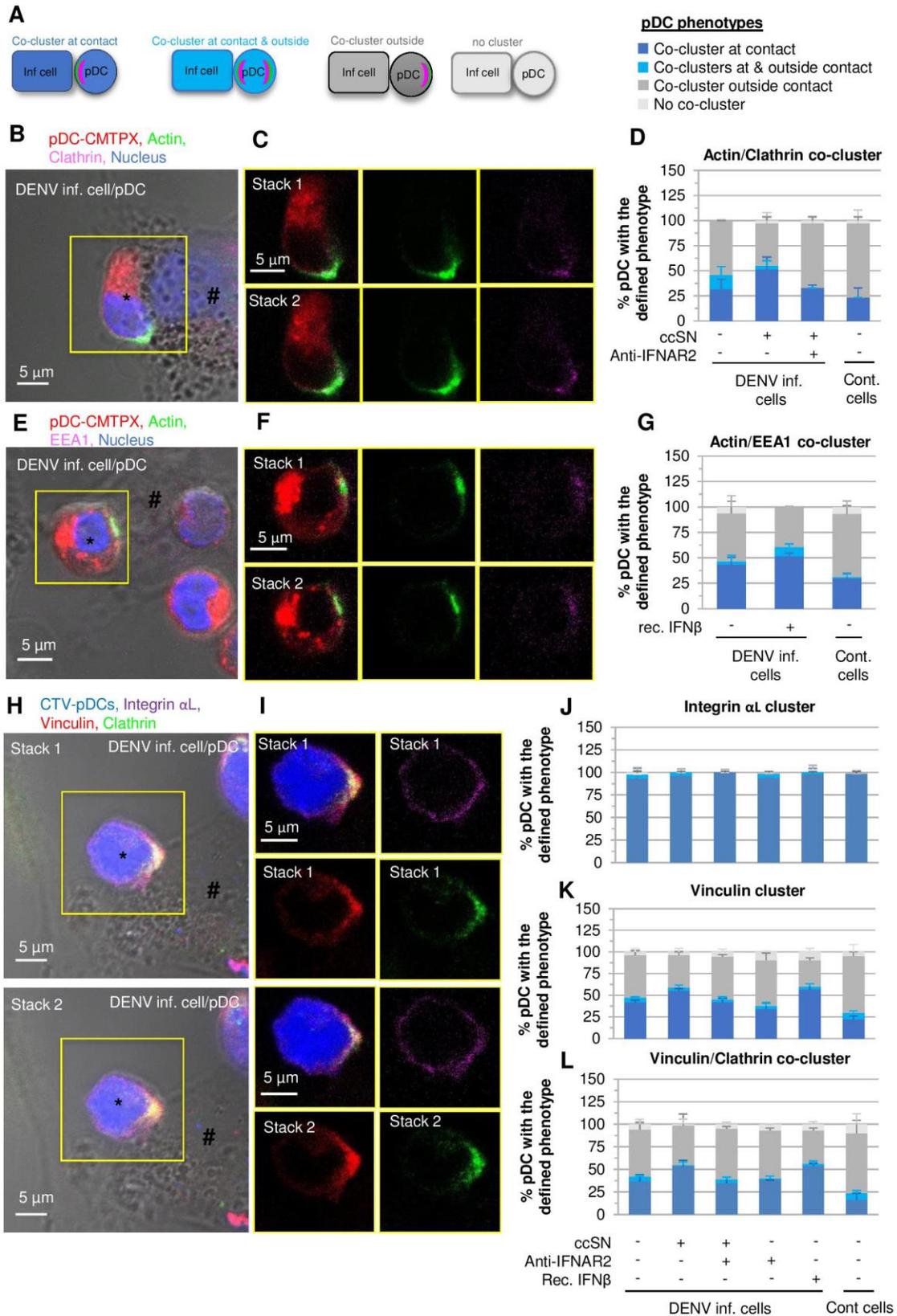


Figure 3. IFNAR-mediated signaling in pDC favor cell polarity at the contact.

(A) Schematic representation of the categories of phenotypes of co-cluster polarization observed in pDCs, and defined as co-cluster polarization; co-cluster at contacts (in dark blue), co-cluster at the contact and outside the contact (light blue), co-cluster outside the contact (grey), no co-cluster (light grey).

(B-C) Confocal microscopy imaging of immunostained actin (green) and clathrin (purple) coclusters in cocultures of pDCs (stained by CMTPX staining prior to coculture; red marked by *) with DENV infected Huh7.5.1 cells (#) for 4-5hours; nucleus stained with Hoechst (blue). **(B)** Detection of actin, clathrin, CMTPX, Hoechst, projected on the phase contrast imaging. **(C)** Magnification of two consecutive Z-stacks of yellow boxed pDC shown in **(B)**. **(D)** Quantification of the frequency of actin/clathrin coclusters as indicated **(A)** in pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 cells (DENV inf. cells) or uninfected cells (Cont.) and treated as indicated with supernatant (ccSN) (10 μ l); neutralizing anti-IFNAR2 (anti-IFNAR2) (10 μ g/mL). Results of 2 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells; mean \pm SD; n>20 analyzed contacts

(E-F) Confocal microscopy imaging of immunostained actin (green) and EEA1 (purple) coclusters in cocultures of pDCs (CMTPX staining prior to coculture; red marked by *) with DENV infected Huh7.5.1 cells (#) for 4-5hours; nucleus stained with Hoechst (blue). **(E)** Detection of actin, EEA1, CMTPX, Hoechst, projected on the phase contrast imaging. **(F)** Magnification of two consecutive Z-stacks of yellow boxed pDC shown in **(E)**. **(G)** Quantification of the frequency of actin/EEA1 coclusters as indicated **(A)** in pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 (DENV inf. cells) or uninfected (Cont.) cells and treated as indicated with recombinant IFN β (rec. IFN β) (100U/mL). Results of 3 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells; mean \pm SD; n>68 analyzed contacts

(H-I) Confocal microscopy imaging of immunostained Integrin α L (purple), vinculin (red) and clathrin (green) in cocultures of pDCs (CTV staining prior to coculture; blue marked by *) with DENV infected cells (#) for 4-5hours. **(H)** Detection on two consecutive Z-stacks of Integrin α L, vinculin and clathrin, CTV, projected on the phase contrast imaging. **(I)** Magnification of the two consecutive Z-stacks of yellow boxed pDC shown in **(H)**. (*legend continued on next page*)

(J) Quantification of the frequency of Integrin α L clusters as indicated **(A)** in pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 cells and treated as indicated with supernatant (ccSN) (10 μ l) ; neutralizing antibodies against interferon alpha and beta receptor subunit 2 (anti-IFNAR2) (10 μ g/mL) ; recombinant IFN β (rec. IFN β) (100U/mL). Results of 4 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells ; mean \pm SD; n>75 analyzed contacts.

(K) Quantification of the frequency of vinculin as indicated **(A)** in pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 cells and treated as indicated in **(J)**. Results of 4 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells ; mean \pm SD; n>75 analyzed contacts.

(L) Quantification of the frequency of vinculin clusters as indicated **(A)** in pDCs cocultured with DENV infected Huh7.5.1 cells and treated as indicated in **(J)**. Results of 4 independent experiments are expressed as the percentage of total number of analyzed pDCs in contact with infected cells ; mean \pm SD; n>75 analyzed contacts.

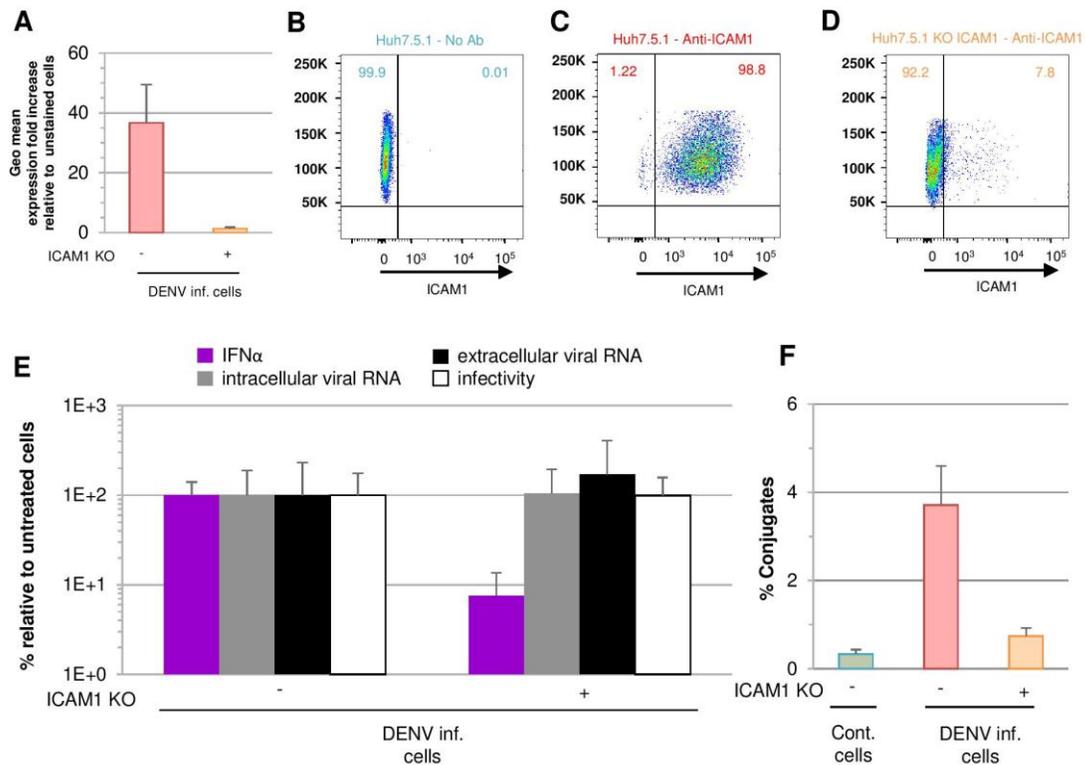


Figure 4. Knock Out of ICAM-I expression in DENV infected cells diminished pDC response.

(A-F) CRISPR/cas9 editing of ICAM-I in Huh7.5.1 was obtained by the transduction of nanoblades to express gRNA(s) targeting ICAM-I gene along with Cas9 in target cells as previously described (Mangeot et al., 2019). (A) Determination of geomean of ICAM-I surface expression by FACS and analysis of expressed as fold-increases relative to unstained cells (n=3 independent experiments).

(B-D) Representatives dot plot of parental Huh7.5.1 cells and ICAM-I KO Huh7.5.1 cells stained (anti-ICAM-I) or not (no Ab) against ICAM-I (10 000 events acquired).

(E) Quantification of IFN α in supernatant of pDCs cocultured with 10E4 DENV infected Huh7.5.1 (Denv inf.) cells or DENV infected Huh7.5.1 cells, invalidated (KO) or nor for ICAM-I. The intracellular and extracellular viral RNA levels and extracellular infectious virus production by the indicated cell types. Results of 3-5 independents experiments expressed as percentages relative to untreated cells mean \pm SD.

(F) Quantification of the frequency of conjugates between pDC and the indicated cocultured cells using image stream X technologies. Results of 3 independent experiments expressed as percentage of conjugates ; mean \pm SD; n = 10 000 events per condition and per experiments.

Discussion

pDCs are important mediators in the IFN-I response. We provide evidence that the positive feedback loop mediated upon TLR7-induced signaling in pDC is mediated by IFN-I, thus involving the IFNAR pathway into the reinforcement of the iSYN. We observe that the IFNAR pathway is not required for pDCs activation against DENV infected cells by contact at early time point. Nevertheless, despite its ostensible elective action, when stimulated by recombinant IFN β , IFNAR signaling in pDC can specifically accelerate their response against DENV infected cells. Interestingly, we show that the effect of recombinant IFN β on the increase of conjugates formation between pDCs and DENV infected cells was only observed during a restricted window of 3 hours of coculture. Because 1 hour is too early for the TLR7-signaling pathway to occur, these results suggest that IFNAR-mediated reinforcement requires at first a TLR7-mediated activation. Moreover, 5 hours is enough for pDCs to secrete IFN-I in response to DENV infected cells, thus overriding the effect of recombinant IFN β . This suggests that the IFNAR-mediated reinforcement of conjugate can take place right after the secretion of IFN-I by pDCs, as observed at 3 hours, thus in the presence of low amount of IFN-I.

These results highlight the cooperative nature of pDCs, where the autocrine/paracrine effect of produced IFN-I can potentiate the activation of neighboring pDCs. Thus, TLR7-mediated sensing of infected cells by pDCs could lead to the production of IFN-I, which in addition to its antiviral function on infected cells, could also reinforce already formed iSYN or potentiate the establishment of new ones. This potentiation is observed by the enhancement of polarization at contact of the actin network, along with the endocytosis machinery. Moreover, we extended the composition of the iSYN by describing the specific polarization of vinculin, a protein known to reinforce the link between integrin and actin cytoskeleton, at contacts between pDCs and DENV infected cells. Vinculin could stabilize the iSYN by strengthening the interaction between the integrin α L β 2, and the actin cytoskeleton.

Material and methods

Cell lines and primary cells cultures

Huh7.5.1 and HuH7.5.1c2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (life technologies) supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 units (U)/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine and non-essential amino acids (Life technologies) at 37°C/5% CO₂. The human fibrosarcoma cell line containing a plasmid encoding the luciferase gene under the control of the immediate early IFN-I inducible 6–16 promoter (HL116) (a kind gift from S. Pelligrini, Institut Pasteur, France) was maintained under HAT selection in DMEM (life technologies) supplemented with 10% FBS and 100 units (U)/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂. Cell line Knock Out for ICAM-I was developed by transduction of Huh7.5.1 cell with Nanoblades containing gRNA(s) targeting ICAM-I gene using the DNA guide CGCACTCCTGGTCCTGCTCGngg kindly provided by Dr. Ricci (CIRI, Lyon, France) and produced as described in (Mangeot et al., 2019). The transduced cells were stained against ICAM-I and only the negatives cells were sorted using a FACS Aria II. Cell sorter. The pDCs were isolated from cytopheresis units from healthy adult human volunteers which was obtained from “Etablissement Francais du Sang” (EFS; Auvergne Rhône Alpes, France) under the convention EFS-16-2066 and according to procedures approved by the EFS committee. Informed consent was obtained from all subjects in accordance with the declaration of Helsinki. Information on sex and age was not available for all subjects, however was not relevant for the purpose of the study, since we previously showed that pDC responses are the within the same range for all donors. PBMC were isolated using Ficoll-Hypaque density centrifugation and pDCs were positively selected from PBMCs using BDCA-4 magnetic beads (MACS Miltenyi Biotec), as previously described. The typical yield of PBMCs and pDCs were 500-800x10⁶ and 1-2x10⁶ cells respectively, with a purity > 95% pDCs. Isolated pDCs were maintained in “pDC medium” - RPMI 1640 medium (life technologies) supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 units (U)/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, non-essential amino acids (Life technologies) and 1 mM sodium pyruvate at 37°C/5% CO₂.

Preparation of viral Stocks and Infections

The prototypic DENV-2 strain New Guinea C (NGC) (AF038403) were produced as previously described. Huh7.5.1 and Huh-7.5.1c2 cells were infected by DENV (MOI of 1) 48 hours prior to co-culture with isolated pDCs.

Reagents

The antibodies used for immunostaining for confocal analysis were mouse anti integrin α L subunit (clone G43-25B; BD Pharmingen); mouse anti-actin (clone AC74; Sigma-Aldrich); rabbit anti-clathrin (ab21679; Abcam); rabbit anti-EEA1 (ALX-210-239; Enzo Life Sciences); mouse anti-vinculin (clone V284; Merk Millipore); and Alexa-conjugated secondary antibodies (Life Technologies). The antibody used for immunostaining for FACS analysis were anti-CD54 (clone HA58; Biolegend); anti-CD54 (3E2 ; BD-pharmigen) ; Alexa-conjugated secondary antibodies (Life Technologies).

The reagents used for cocultures were recombinant human IFN β -1a (mammalian ;pbl assay science) and anti-IFNAR subunit 2 neutralizing antibodies (clone MMHAR-2; pbl assay science). The other reagents were; Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences); Fc Blocking solution (MACS Miltenyi Biotec); ELISA kits (PBL Interferon Source) for the specific detections of IFN α ; 96-Well Optical-Bottom Plates and Nunc UpCell 96F Microwell Plate (Thermo Fisher Scientific); CellTracker Red CMTPIX Dye (Life Technologies) ;CellTrace Violet cell Proliferation kit (Life Technologies); Hoescht (MACS Miltenyi Biotec); cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies); poly-L-lysine (P6282, Sigma-Aldrich).

Methods Details

Co-culture Experiments

1×10^4 pDCs were co-cultured with 2×10^4 DENV infected cells or uninfected cells in a final volume of 200 μ l, in 96-well round-bottom plates incubated at 37 °C/5% CO₂. At the indicated time, cell-culture supernatants were collected and stored at -80°C. The levels of IFN α were next measured using a commercially available specific ELISA kit (PBL Interferon Source) following the manufacturer's instructions.

ccSN production

2×10^4 pDCs were co-cultured with 5×10^4 DENV infected cells in a final volume of 200 μ l, in 96-well round-bottom plates incubated at 37 °C/5% CO₂. At 4 hours, cell-culture supernatants were collected, inactivated using a UV irradiation system BIO-LINK, BLX 254 (2min; 120J) and stored at -80°C. Detection of specific activity of IFN α/β in supernatant was performed using the luciferase reporter cell line HL116. HL116 cells were seeded at $2 \cdot 10^4$ cells/well in 96-well plate 24 h prior the assay, and incubated for 17 h with supernatant collected from pDC co-cultures (100 μ L) or serial dilution of recombinant human IFN- α 2a (PBL Interferon Source), used for standard curve titration. Cells were

then lysed and luciferase activity assayed. IFN-I levels were expressed as equivalent of IFN- α 2a concentration, in Unit/mL.

The level of IFNA in supernant were measured using a commercially available specific ELISA kit (PBL Interferon Source) following manufacturer's instructions.

Immunostaining for Confocal Analysis

After immuno-isolation, 4×10^4 pDCs were stained by using either CellTracker Red CMTPX Dye (CM-DiI, Life Technologies) or CellTrace Violet cell Proliferation kit (Life Technologies) following manufacturer's instructions. Labeled pDCs were then co-cultured with 2×10^4 DENV infected Huh7.5.1 or Huh7.5.1c2 cells in 200 μ l final of pDC medium at 37°C for 4-5 hours, in a 96-Well Optical-Bottom Plate. The wells were pre-coated with 50 μ l of poly-L-lysine (100 mg/mL) for 30-minute incubation at 37°C, washed two times with PBS and one time with pDC medium and dried off O/N at 37°C. At the end of the coculture, supernatant was discarded and cells were fixed using 4% PFA fixation for 20min at 4°C. After three PBS washes, immunostainings were performed without additional permeabilization step, as previously described (Décembre et al., 2014b; Meertens et al., 2012). Cells were blocked using a PBS-3% BSA solution for one-hour at room temperature. Primary antibodies were diluted in a PBS-3% BSA solution and added to the wells for one-hour incubation at room temperature. Primary antibodies used in this study include mouse anti- α L subunit (5 μ g/mL); mouse anti-actin (20 μ g/mL); rabbit anti-clathrin (2 μ g/mL); rabbit anti-EEA1 (2 μ g/mL); mouse anti-vinculin (10 μ g/mL). After three 5min washes with PBS, cells were incubated with the appropriate anti-mouse, rabbit or goat antibody [conjugated with Alexa 488-, 555- or 647-fluorochrome] diluted at 2 μ g/mL in PBS-3% BSA solution and add to the cells along with Hoechst (1/1000) (Molecular Probes) for one-hour incubation at room temperature. After three 5min washes with PBS, cells were observed with a Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope. The quantification of the phenotypes defined to as clusters or co-clusters at the contact, outside contact or no cluster/co-clusters were performed using Image J software package (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Live Imaging of Coculture

Huh7.5.1 cells were transduced with lentiviral based vector to stably express GFP and infected, or not, with DENV 48 hours before co-culture, as above described. GFP-expressing DENV infected cells (DENV inf.) and corresponding uninfected control cells (Cont.) were seeded (1×10^4 cells per well) in a 96-Well Optical-Bottom Plate. The wells were pre-coated with 50 μ l of poly-L-lysine with (100 mg/mL) for 30-minute incubation at 37°C, washed two times with PBS and one time with pDC

medium and dried off O/N at 37°C. Isolated pDCs were stained with CellTracker Red CMTPX Dye (CM-DiI, Life Technologies) as above described. When pDCs were added to the seeded infected (or uninfected) cells, the cocultures were imaged every 5 minutes for 10 hours at magnification x10 with a BSL3-based spinning-disc confocal microscope (AxioObserver Z1, Zeiss). The cocultures were maintained at 37°C, 5% CO₂ in an incubation chamber throughout the course of the experiments. The analyses of pDC motion were performed using projection of Z-stacks with maximal intensity (i.e., about 3-to-5 selected Z-stacks per fields out of 20-30 Z-stacks in total). The quantification of the duration of contacts between pDCs and infected cells versus uninfected cells were performed using Image J software package (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The representation with violin plots were obtained using GraphPad Prism software v8.0.

Analysis of Viral RNA Levels

RNAs were isolated from cells or supernatants harvested in guanidinium thiocyanate citrate buffer (GTC) by phenol/chloroform extraction procedure as previously described (Dreux et al., 2012b). In the case of analysis of IFN-I mRNA analysis, RNAs isolation was followed by a DNase treatment for 30 min at 37°C using Turbo DNase (Invitrogen) and inactivated in 15mM EDTA for 10min at 75°C. The efficiency of RNA extraction and reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was controlled by the addition of carrier RNAs encoding Xef1 a (xenopus transcription factor 1 a) in vitro transcripts in supernatants diluted in GTC buffer. DENV RNA, Xef1 a and intracellular glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were determined by RT-qPCR using cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies) and analyzed using StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies), using previously described primers (Decembre et al., 2014; Dreux et al., 2009). Extracellular and intracellular DENV RNA levels were normalized for Xef1 and GAPDH RNA levels, respectively. IFN-I mRNA levels were determined by RT-qPCR using cDNA synthesis qPCR kits (Life Technologies) and analyzed using StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies), using For_IFNa2_6_14_22 : cacacaggctccaggtcat and Rev_IFNa2_6_14_22 : tcttcagcacaaggactcatctg as forward and reverse primers respectively. Intracellular IFN RNA levels were normalized for GAPDH RNA levels.

Analysis of Extracellular Infectivity

Infectivity titers in supernatants were determined by end-point dilution using Huh 7.5.1 cells. Foci forming unit (ffu) were detected 72 hours after infection by anti-E glycoprotein specific immunofluorescence for DENV (clone 3H5), as previously described (Décembre et al., 2014b; Dreux

et al., 2009). Briefly, Huh-7.5.1 cells were fixed with 4% PFA and permeabilized by incubation for 7 minutes in PBS containing 0.1% Triton. Cells were then blocked in PBS containing 3% BSA for 30 minutes and incubated for 1 hour with mouse anti-DENV E glycoprotein (clone 3H5) hybridoma supernatant diluted at 1:200 in PBS containing 1% BSA. After 3 washes with PBS, cells were incubated 1 hour with secondary Alexa 555-conjugated anti-mouse antibody (2 µg/mL) and Hoechst dye in PBS containing 3% BSA. Percentage of E-positive cells was determined using Olympus CKX53 microscopes.

Transduction procedure with Nanoblades

Specials acknowledgments to Thibault Sohier (CIRI, Lyon, France) for designing and producing the nanoblades used in this article. 10^5 Huh7.5.1 cells were transduced with 20 µl of Nanoblades containing gRNA(s) targeting ICAM-I gene in a final volume of 1 mL of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (life technologies) supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 100 units (U)/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine and non-essential amino acids (Life technologies) for 6-8 h at 37°C/5% CO₂ before supplementing with fresh medium.

Cell sorting

13 days after transduction by Nanoblades containing gRNA(s) targeting ICAM-I gene, cells were harvested using versen solution (PBS – 0.48 mM EDTA) and stained 30 min at 4°C with antibodies anti-CD54-647 (1µg/mL) diluted into PBS, 2% SVF, 2mM EDTA solution. After staining the cells were washed one times with PBS, 2% SVF, 2mM EDTA solution and concentrated at 1×10^7 cells/mL in 1mL of PBS, 2% SVF, 2mM EDTA. The negatives cells for ICAM-I (APC negatives) were sorted using a cell sorter FACS Aria II and collected into Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (life technologies) supplemented with 10% FBS.

References

- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* *201*, 1157–1167.
- Assil, S., Coléon, S., Dong, C., Décembre, E., Sherry, L., Allatif, O., Webster, B., and Dreux, M. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* *25*, 730-745.e6.
- Barnard, A.L. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* *106*, 988–995.
- Compeer, E.B., Kraus, F., Ecker, M., Redpath, G., Amiezer, M., Rother, N., Nicovich, P.R., Kapoor-Kaushik, N., Deng, Q., Samson, G.P.B., et al. (2018). A mobile endocytic network connects clathrin-independent receptor endocytosis to recycling and promotes T cell activation. *Nat. Commun.* *9*.
- Das, V., Thoulouze, M.-I., Galli, T., Roux, P., and Dautry-Varsat, A. Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse: Involvement of SNARE Complexes. *12*.
- Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* *10*, e1004434.
- Dustin, M.L., and Choudhuri, K. (2016). Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *32*, 303–325.
- Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q.J. (2007). Adhesion Molecule Interactions Facilitate Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Virological Synapse Formation between T Cells. *J. Virol.* *81*, 13916–13921.
- Kim, S., Kaiser, V., Beier, E., Bechheim, M., Guenther-Biller, M., Ablasser, A., Berger, M., Endres, S., Hartmann, G., and Hornung, V. (2014). Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* *44*, 807–818.

- Kliche, S., Worbs, T., Wang, X., Degen, J., Patzak, I., Meineke, B., Togni, M., Moser, M., Reinhold, A., Kiefer, F., et al. (2012). CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood* 119, 777–785.
- Laufer, J.M., Kindinger, I., Artinger, M., Pauli, A., and Legler, D.F. (2019). CCR7 Is Recruited to the Immunological Synapse, Acts as Co-stimulatory Molecule and Drives LFA-1 Clustering for Efficient T Cell Adhesion Through ZAP70. *Front. Immunol.* 9.
- Ménager, M.M., and Littman, D.R. (2016). Actin Dynamics Regulates Dendritic Cell-Mediated Transfer of HIV-1 to T Cells. *Cell* 164, 695–709.
- Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 50, 37–50.
- Saitoh, S.-I., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori Saitoh, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., et al. (2017). TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat. Commun.* 8.
- Seth, S., Oberdörfer, L., Hyde, R., Hoff, K., Thies, V., Worbs, T., Schmitz, S., and Förster, R. (2011). CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. *J. Immunol.* 186, 3364–3372.
- Starling, S., and Jolly, C. (2016). LFA-1 Engagement Triggers T Cell Polarization at the HIV-1 Virological Synapse. *J. Virol.* 90, 9841–9854.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8⁺ T Cell Accrual. *Immunity* 33, 955–966.
- Tomasello, E., Naciri, K., Chelbi, R., Bessou, G., Fries, A., Gressier, E., Abbas, A., Pollet, E., Pierre, P., Lawrence, T., et al. (2018). Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation *in vivo* during a viral infection. *EMBO J.* 37.
- Umemoto, E., Otani, K., Ikeno, T., Verjan Garcia, N., Hayasaka, H., Bai, Z., Jang, M.H., Tanaka, T., Nagasawa, T., Ueda, K., et al. (2012). Constitutive Plasmacytoid Dendritic Cell Migration to the Splenic White Pulp Is Cooperatively Regulated by CCR7- and CXCR4-Mediated Signaling. *J. Immunol.* 189, 191–199.

Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* *90*, 10050–10053.

Webster, B., Werneke, S.W., Zafirova, B., This, S., Coléon, S., Décembre, E., Paidassi, H., Bouvier, I., Joubert, P.-E., Duffy, D., et al. (2018). Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections *via* IRF7-regulated interferon responses. *ELife* *7*.

Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivié, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., et al. (2018). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* *9*.

Discussion

I. La synapse interferogenic : Une plateforme structurale polarisée

Les synapses sont définies comme étant des zones de contact intercellulaires, fonctionnelles et asymétriques. Différents types de synapses ont ainsi été identifiées, comme la synapse neurologique (NS), immunologique (IS) ou plus récemment la synapse virologique (VS). Bien qu'elles diffèrent par leur composition et le signal transféré, elles sont toutes spécialisées dans le transfert d'information entre cellules. Comme nous l'avons montré précédemment, les pDCs sont capables de former des contacts avec des cellules infectées. Cette caractéristique est d'ailleurs nécessaire à la bonne reconnaissance et à l'action antivirale des pDCs contre un large panel de virus (Webster et al., 2016).

Nous montrons que le complexe d'adhésion constitué de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ et de son ligand ICAM-I est essentiel à la formation des contacts entre les pDCs et les cellules infectées, ces mêmes molécules étant impliquées dans la IS entre un lymphocyte T et une APC (Dustin and Choudhuri, 2016) ou encore au niveau de la VS dans le cas de cellules infectées par HIV-I ou HTLV-I (Barnard, 2005; Jolly et al., 2007). La stabilisation des contacts est une caractéristique importante de la formation des synapses et permet notamment aux cellules d'orienter leur sécrétion. Ainsi dans la IS, la sécrétion des granules lytiques par un CTL se fait exclusivement en direction de la cellule cible. Dans le cas de la VS, la sécrétion des virions se fait logiquement de la cellule infectée vers la cellule saine. Concernant les pDCs, un transfert vésiculaire de PAMPs viraux s'opère de la cellule infectée vers la pDC. Ainsi, la présence de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ accompagnée de la sécrétion polarisée de PAMPs viraux sont deux caractéristiques fondamentales des synapses retrouvées chez les pDCs.

Nous démontrons chez la pDC, la polarisation au niveau de la zone de contact du cytosquelette d'actine et de certains de ses régulateurs, aux côtés de composants de la machinerie d'endocytose sous forme de coclusters. Les régulateurs du cytosquelette d'actine incluent PIP2 et sa kinase PIP5KI α , responsable de la synthèse de PIP2 à partir de PI4P. Concernant la machinerie d'endocytose, nous montrons la polarisation de clathrin et de EEA1, un marqueur des endosomes précoces. La polarisation de ces différents composants au niveau de la zone de contact, suggère leurs implications dans l'internalisation et l'acheminement des PAMPs viraux vers le compartiment endosomal où est localisé TLR7. Des observations similaires de polarisation ont été observées au niveau de la IS, où le cytosquelette d'actine permettait la réorganisation de la synapse en différentes régions fonctionnelles et où l'activation des lymphocytes T était régulée par l'internalisation du TCR, bien qu'indépendant de la clathrine (Compeer et al., 2018; Das et al.). Dans le cas de la VS, le transfert de virions est

largement dépendant du remodelage du cytosquelette d'actine au niveau de la zone de contact entre la cellule saine et la cellule infectée, même si l'implication de la machinerie d'endocytose n'a pas encore été définie clairement pour l'internalisation des virions (Ménager and Littman, 2016). La présence des molécules d'adhésion, d'une sécrétion polarisée ainsi que de la polarisation spécifique des différents composants du cytosquelette d'actine et de la machinerie d'endocytose nécessaire à l'activation des pDCs par contact avec des cellules infectées nous conduit à décrire un nouveau type de synapse. Cette structure, regroupant toutes les caractéristiques des synapses préalablement décrites et requise pour la production d'IFN-I médiée par les pDCs, est appelée la Synapse Interférogénique (iSYN) (**Figure 9**).

En plus de l'identification de la iSYN, nous montrons que sa formation est régulée par la voie de signalisation TLR7, et renforcée par la voie de signalisation IFNAR. En effet nous observons une polarisation accrue au niveau de la iSYN chez les pDCs en contact avec des cellules infectées, contrairement à des cellules saines. La voie de signalisation TLR7 étant impliquée dans l'activation des pDCs en réponse à DENV et HCV, son implication dans la formation de la iSYN ne fait aucun doute. De plus nous avons également montré que l'IFN-I stimulait également la polarisation des différents constituant de la iSYN, soulignant la contribution de la voie de signalisation IFNAR dans sa régulation. Bien que l'état d'activation des pDCs ne semble pas impacter la polarisation au niveau de la zone de contact de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, la polarisation de vinculine dépendante de la voie TLR7 suggère que la stabilité du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ /ICAM-I est dépendante de l'état d'activation des pDCs. En effet, après interaction entre la forme d'affinité intermédiaire de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ et son ligand ICAM-I, les tensions exercées par le cytosquelette d'actine sur la queue cytoplasmique de l'intégrine, permettent son ouverture vers sa forme de haute affinité. La polarisation de vinculine subséquente à l'activation complète des intégrines, stabilise les interactions entre le cytosquelette d'actine et les intégrines au niveau de la zone de contact, renforçant les contacts, et par extension la iSYN. La iSYN agit donc comme une plateforme structurale dont la polarisation au contact est médiée par l'état d'activation des pDCs, notamment *via* les voies de signalisation TLR7 et IFNAR dans le cas de la réponse antivirale médiée contre DENV, HCV et ZIKA.

Il est important de noter que les différents éléments observés dans la composition de la iSYN comme l'actine, PIP2, clathrin, EEA1 ou vinculine, sont également retrouvés sous forme de coclusters chez les pDCs isolées. Cela suggère l'existence d'une plateforme structurale « préformée » qui pourrait expliquer la rapidité de réponse des pDCs. Des observations en live imaging spinning disk de coculture entre pDCs et cellules infectées, sont en cours de réalisation au laboratoire afin d'observer la

polarisation du cytosquelette d'actine *via* l'utilisation de Sir-actine, un fluorogène marquant spécifiquement l'actine sous sa forme filamenteuse. Ces observations pourraient nous renseigner sur la vitesse de polarisation du cytosquelette d'actine au niveau de la zone de contact entre les pDCs et les cellules infectées, et par extension la vitesse de formation de la iSYN. Néanmoins une observation plus exhaustive des différents composants polarisant à la iSYN nécessite le développement de nouveaux modèles de cellules dendritiques plasmacytoïdes génétiquement modifiées. La constitution de tels modèles constitue un véritable défi, étant donné la durée de vie des pDCs s'étalant à quelques jours. Il nous faudrait pour cela modifier génétiquement des cellules souches CD34+ isolées à partir de sang de cordon, pour ensuite les différencier en pDCs. Un processus loin d'être triviale, mais dont l'optimisation est en cours de développement, avec comme exemple la récente démonstration que l'IFN était essentiel pour la maturation et le fonctionnement des pDCs dérivées de CD34+ (Laustsen et al., 2018).

II. Modèle d'action antivirale des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Nos résultats nous ont permis de développer un modèle d'action des pDCs par contact physique avec des cellules infectées. Dans ce modèle, des pDCs circulantes rencontrent une cellule avec laquelle elles établissent un premier contact transitoire. Ce contact est caractérisé par la conservation de la morphologie ronde des pDCs, où l'on observe une faible polarisation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ au niveau de la zone de contact. Si la cellule rencontrée n'est pas infectée, la pDC incapable de s'activer ne stabilisera pas le contact qui finira par se rompre. Dans le cas où la cellule rencontrée est infectée, le transfert vésiculaire de PAMPs vers la pDC permet sa reconnaissance par TLR7. La voie de signalisation TLR7 entraîne la formation de la iSYN mais également la production d'IFN-I médiée par IRF7. L'IFN-I sécrété va alors agir de manière autocrine sur le pDC déjà en contact par la voie de signalisation IFNAR et renforcer la iSYN. Cette réorganisation du cytosquelette d'actine et de la machinerie d'endocytose au niveau du contact par les voies de signalisation TLR7 et IFNAR facilite *de novo* le transfert de PAMPs vers la pDC et sa reconnaissance par TLR7 (**Figure9**). Apparaît alors une boucle de régulation positive, permettant un transfert toujours important de PAMPs de la cellule infectée vers la pDC, résultant en une production robuste et localisée d'IFN-I. L'IFN-I sécrété va également agir de manière paracrine sur les pDCs isolées et potentialiser leurs réponses par la synthèse d'ISGs impliqués dans la formation de la iSYN. Ainsi, IFNAR pourrait favoriser la voie de signalisation TLR7 par l'induction d'IRF7, un ISG, comme suggéré par (Tomasello et al., 2018b) où

la production d'IFN-I en réponse au CpGA *in vivo* est altérée en absence d'IFNAR. Les pDCs ainsi apprêtées seraient moins dépendantes de l'action autocrine de l'IFN-I pour renforcer la iSYN, accélérant leurs réponses. La coopération entre pDCs serait une notion essentielle à leur activité, l'activation de quelques-unes entraînant l'activation d'un plus grand nombre. Ce modèle est cohérent avec les publications suggérant que la réponse IFN-I des pDCs par la stimulation de leurs TLRs est facilitée par la densité cellulaire (Kim et al., 2014; Wimmers et al., 2018b).

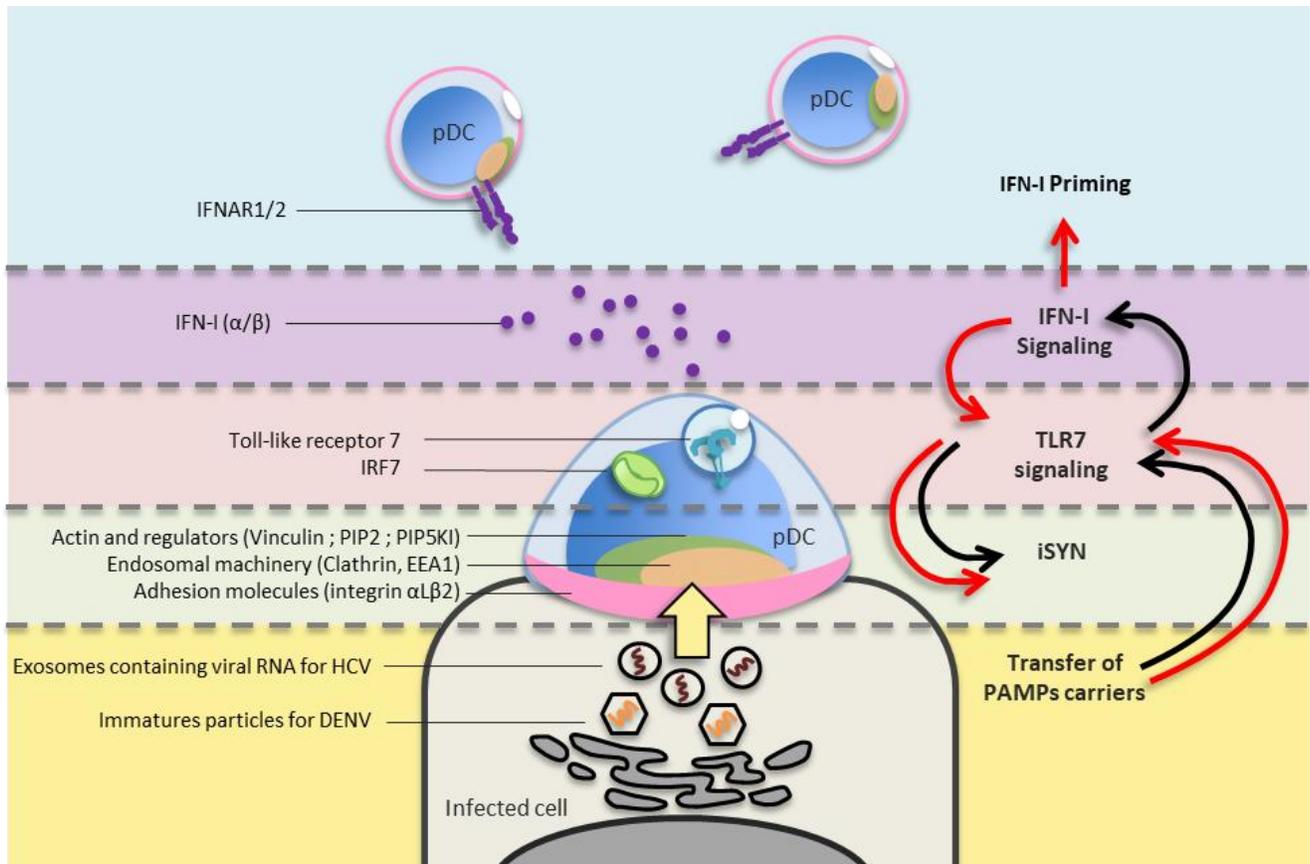


Figure 9 : Modèle d'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

La première phase d'activation des pDCs consiste en la formation d'un contact par l'interaction du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}/\text{ICAM-I}$, permettant le transfert de « transporteurs de PAMPs » ou « PAMPs carriers », de la cellule dendritique plasmacytoïde vers la cellule infectée. Ces PAMPs carriers incluent des exosomes contenant l'ARN virale dans le cas de HCV ou des particules immatures dans le cas de DENV. Les PAMPs endocytés, sont acheminés au niveau des endo-lysosomes ou ils sont reconnus par TLR7, déclenchant sa voie de signalisation via le facteur de transcription IRF7. La voie de signalisation TLR7 entraîne la polarisation au niveau de la zone de contact du cytosquelette d'actine accompagné de ses régulateurs ainsi que des composants de la machinerie d'endocytose pour former la iSYN ainsi que la production d'IFN-I (flèches noires) représentant la première phase d'activation des pDCs. Dans un second temps, l'IFN-I produit entraîne l'expression d'ISGs dans les pDCs via la voie de signalisation d'IFNAR. IRF7 étant un ISG, est régulé de manière positive, favorisant la voie de signalisation de TLR7. Cette amplification va entraîner une maturation de la iSYN via le renforcement de la polarisation des différents composants au niveau de la iSYN. Il s'en suit une augmentation de la stabilisation du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}/\text{ICAM-I}$, consolidant les contacts entre la pDC et la cellule infectée, permettant un transfert plus important de PAMPs carriers (flèches rouges). En parallèle l'IFN-I produit par l'activation des pDCs va accélérer la formation des iSYN des pDCs adjacents encore non activées, par la régulation positive de IRF7.

III. Une boucle de régulation IFN-I restreinte dans le temps ?

De manière intéressante, nos résultats suggèrent que l'effet de potentiation de l'IFN β recombinant sur les contacts entre pDCs et cellules infectées ne serait présent uniquement que dans les premières heures d'activation des pDCs. Néanmoins, il est probable que cet effet soit présent en continu, mais qu'il ne soit observable que dans les premières heures de coculture, avant que l'IFN-I produit par les pDCs rende négligeable le traitement d'IFN β .

Comme suggéré par nos résultats de coculture en présence de ccSN, les pDCs seraient très sensibles à l'IFN-I, et l'ajout de faibles quantités d'IFN-I serait suffisant pour induire la potentiation de la iSYN et la stimulation des pDCs. En effet le ccSN est récolté seulement après 4 heures de coculture entre pDCs et cellules infectées, peu après qu'elles aient commencées à produire de l'IFN α . Ce dernier est ensuite dilué près de 20 fois lors de son ajout dans la seconde coculture (10 μ l de ccSN dans 200 μ l de coculture finale). La concentration d'IFN α dans la coculture après le traitement ccSN est alors très faible, et ne serait même pas détectable par test ELISA. Cependant son effet est bien observable sur l'activation des pDCs, à la fois sur la production d'IFN α que sur la formation de conjugué. Il serait intéressant de regarder l'expression d'IFNAR à la surface des pDCs, son expression importante à l'état basale pouvant expliquer une réponse rapide à des niveaux réduits d'IFN-I.

Des résultats de coculture entre pDCs et cellules infectées par DENV n'ont montré qu'un faible effet de neutralisation d'IFNAR sur la production d'IFN α après 20 heures de coculture (résultats non montrés). Ces résultats en accord avec l'effet succinct de la potentiation médiée par IFNAR peuvent néanmoins être contestés. En effet, pour déterminer l'impact de la voie de signalisation de l'IFN-I sur l'activation des pDCs, nous avons recours à des anticorps neutralisants dirigés contre IFNAR. Les pDCs et les cellules infectées exprimant IFNAR, la neutralisation obtenue n'est pas spécifique aux pDCs. Les cellules infectées n'étant pas capables de répondre à la voie de signalisation de l'IFN-I, celles-ci deviennent potentiellement plus sensibles à l'infection. Cela pourrait augmenter le nombre de particules infectieuses secrétées par les cellules infectées par rapport aux conditions de coculture sans anti-IFNAR, et en parallèle le nombre de particules immatures dans le cas de DENV, à l'origine d'une augmentation de la réponse IFN-I par les pDCs, indépendante de la boucle d'activation.

La capacité de neutralisation de l'anticorps pour des durées prolongées de coculture est également remise en cause. Celui-ci ne bloquant pas l'interaction entre IFNAR et son ligand IFN-I, mais sa voie

de signalisation, l'internalisation et le recyclage du récepteur à la surface des cellules pourrait toujours être actif, à l'origine d'un effet atténué.

Nous avons également montré que les pDCs étaient capables de sécréter des quantités importantes d'IFN-III suite à des contacts avec des cellules infectées par DENV. L'IFN-III possède des récepteurs qui lui sont propres, appelés récepteurs à l'interféron lambda (IFNLR), mais sa voie de signalisation est commune avec celle induite par l'IFN-I. Les pDCs exprimant également IFNLR, il serait intéressant d'investir le rôle de l'IFN-III dans la réponse antivirale médiée par les pDCs, notamment son implication dans le renforcement de la iSYN.

IV. La synapse interférogénique permet une réponse localisée

Une production systémique et massive d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires sont connues pour avoir un effet néfaste pour l'hôte. Nous démontrons ici que la formation des contacts entre les pDCs et les cellules infectées par l'intermédiaire d'une iSYN est requise pour la production d'IFN-I, confinant la réponse antivirale au niveau du site d'infection. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes publications démontrant que l'action antivirale médiée par les pDCs *in vivo* se faisait en dépit d'un niveau indétectable ou très transitoire d'IFN-I systémique, suggérant la sécrétion d'IFN-I par les pDCs au niveau du site d'infection (Swiecki et al., 2010; Webster et al., 2018). Ici nous démontrons que l'action paracrine de l'IFN-I par les pDCs en contact avec des cellules infectées stimule la mise en place de la iSYN des pDCs avoisinantes, suggérant l'importance de la contiguïté entre pDCs dans l'exercice de leurs actions antivirales. Ainsi, cette réponse localisée au niveau du site d'infection serait également requise pour une activation optimale des pDCs. De plus il a été observé *in vivo* des défauts de migration chez les pDCs dépourvues d'IFNAR. Ces pDCs n'étant plus capables de migrer de la pulpe rouge vers les zones des cellules T pour former des coclusters après stimulation par un ligand de TLR7. Ce défaut de migration n'étant pas retrouvé chez les cDCs suggère une implication spécifique d'IFNAR dans le confinement éventuel des réponses des pDCs (Asselin-Paturel et al., 2005). Ainsi la réponse localisée des pDCs au niveau du site d'infection permettrait à la fois d'éviter les dégâts potentiels d'une production d'IFN-I systémique tout en favorisant leurs activations.

V. Caractériser d'avantage la synapse interférogénique

Il serait intéressant d'investiguer l'impact des chémokines sur l'activation et la polarisation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ au niveau de la zone de contact entre les pDCs et les cellule infectées. En effet, nous avons observé que ces évènements de polarisation étaient indépendants et certainement antérieurs aux voies de signalisation TLR7 et IFNAR. Contrairement à l'IS, où l'activation des intégrines à la surface du lymphocyte T est médiés par l'engagement de son TCR et de ses récepteurs aux chémokines (CXCR ou CCR), seul les récepteurs aux chémokines sont exprimés à la surface des pDCs. Bien que ces récepteurs divergent de ceux exprimés par les lymphocytes, ils apparaissent comme une alternative plausible quant à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$.

La migration des pDCs implique de nombreux récepteurs de chémokines et il a notamment été montré *in vivo* qu'en cas d'inflammation, la migration des pDCs vers le tissu enflammé était médiée par CXCR3 et CCR7. Les auteurs ont également démontré que la stimulation des pDCs par un ligand de TLR9 augmentait l'expression de CCR7 et par conséquent leur capacité à répondre à son ligand CCL21 (Asselin-Paturel et al., 2005). L'implication de CCR7 dans la migration des pDCs *in vivo* au niveau des ganglions lymphatiques, aussi bien dans des conditions basales que dans des conditions d'inflammation, a également été rapportée (Seth et al., 2011;). *In vitro*, des pDCs stimulées par CCL21 ont manifesté une adhésion accrue sur une surface recouverte de fragments Fc de ICAM-I, ces effets étant inhibés par traitement avec la toxine pertussique, reconnue pour inhiber le chémotactisme des cellules neutrophiles, des lymphocytes et des macrophages (Umemoto et al., 2012). Ces observations suggèrent que la stimulation des pDCs *via* leurs TLRs, stimulerait l'expression de certains récepteurs aux chémokines, dont l'activation favorisait l'attachement des pDCs, notamment par la formation du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ / ICAM-I. De plus, la voie de signalisation médiée par CCR7 est impliquée dans l'augmentation d'affinité de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ au niveau de la IS (Kliche et al., 2012). Une récente étude a également démontré le recrutement de CCR7 au niveau de la IS et son implication spécifique dans l'activation du TCR ainsi que dans la polarisation de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (Laufer et al., 2019).

Par ailleurs l'engagement de l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ avec son ligand ICAM-I au niveau de la IS et de la VS, est impliqué dans la polarisation vers la zone de contact du centrosome (MTOC) et du golgi. Cette polarisation dirigerait la sécrétion des granules lytiques dans le cas de la IS entre un CTL et une cellule cible (Dustin and Choudhuri, 2016), ou encore des virions dans le cas de la VS (Starling and Jolly, 2016). C'est pourquoi nous sommes actuellement en cours d'observation au laboratoire afin de

déterminer si des mécanismes similaires de polarisation étaient observés chez les pDCs en réponse à la formation de la iSYN. Contrairement au transfert de PAMPs viraux précédemment cité, la polarisation du MTOC et du Golgi au niveau de la zone de contact pourrait permettre la sécrétion polarisée de molécules effectrices comme l'IFN-I de la pDC vers la cellule infectée.

De plus, bien que la production d'IFN α par les pDCs en réponse au virus influenza soit indépendante des contacts, des défauts de production ont été observés pour des pDCs incapables de relocaliser leur TLR7 en périphérie (Saitoh et al., 2017). Il serait donc intéressant de transposer ces marquages immunologiques de TLR7 dans le cadre de la iSYN, afin d'y observer ou non la présence de TLR7. En effet, nous avons démontré que des composants de la machinerie d'endocytose polarisaient au niveau de la zone de contact entre les pDCs et les cellules infectées, incluant EEA1, un marqueur des endosomes précoces. Ainsi, dans le cas où les endosomes contenant TLR7 polariseraient au niveau de la iSYN, leurs proximités physiques avec des endosomes précoces contenant les PAMPs viraux, favoriseraient une reconnaissance rapide à l'origine d'une réponse IFN-I médiée par IRF7.

VI. Une lignée cellulaire déficiente pour ICAM-I, un nouvel outil

Nous avons montré que l'intégrine $\alpha\text{L}\beta_2$ s'accumule au niveau du site de contact entre le pDC et la cellule infectée. De plus nous avons démontré par l'utilisation d'anticorps bloquant que la production d'IFN α par les pDCs est dépendante de l'interaction entre l'intégrine $\alpha\text{L}\beta_2$ et son ligand ICAM-I. Ces observations ont été confirmées par une diminution de la production d'IFN α par les pDCs en coculture avec des cellules infectées régulées négativement pour ICAM-I (ICAM-I DR). Bien que diminuée, les pDCs sont toujours capables de produire de l'IFN-I en présence de cellules infectées ICAM-I DR. Ce résultat peut être expliqué par une régulation négative insuffisante d'ICAM-I s'élevant à 60% des cellules infectées, celui-ci étant fortement exprimé à la surface des cellules Huh7.5.1. Pour valider l'implication du complexe intégrine $\alpha\text{L}\beta_2$ /ICAM-I dans l'activation des pDCs nous avons souhaité développer une lignée cellulaire Huh7.5.1 Knock out pour ICAM-I (ICAM-I KO).

A l'aide de la technologie nanoblade, utilisant des enveloppes virales contenant un ARN guide spécialement dirigé contre le gène ICAM-I associé à l'endonucléase Cas9, nous avons mis en place une lignée de cellule Huh7.5.1 déficiente pour ICAM-I (Mangeot et al., 2019). La réduction de l'expression de ICAM-I dans la lignée cellulaire KO a été validée par FACS, avec plus de 92% des cellules négatives pour ICAM-I (**Figure 4A-D**). De manière consistante avec les résultats obtenus pour

les cellules ICAM-I DR, nous montrons que la production d'IFN α par des pDCs en coculture avec des cellules infectées déficientes pour ICAM-I est grandement diminuée mais pas totalement inhibée (**Figure 4E**). En absence de pDC, l'élimination de ICAM-I n'a entraîné aucun changement sur la réplication du virus ou sur le relargage de particules infectieuses (**Figure 4E**). Nous démontrons également que la fréquence de formation des conjugués entre pDCs et cellules infectées était fortement réduite dans le cas des cellules ICAM-I KO (**Figure 4F**). En accord avec nos précédents résultats, nous confirmons que les interactions entre pDCs et cellules infectées sont médiées par la formation du complexe α L β 2/ICAM-I et que celui-ci est nécessaire pour la production d'IFN α par les pDCs.

Il n'est pas exclu que la production d'IFN α produit par les pDCs en coculture avec les cellules infectées ICAM-I soit due à la faible proportion de cellules toujours positives pour ICAM-I (**Figure 4D**). Néanmoins il est plus probable d'envisager l'implication d'autres molécules d'adhésion, dont l'action a été inhibée par encombrement stérique lors des traitements par des anticorps bloquant dirigés contre l'intégrine α L β 2 ou son ligand ICAM-I. Néanmoins il n'a été observé aucun contact entre pDC et cellule ICAM-I KO par microscopie confocal (résultats non montrés). De plus, il est également envisageable que les contacts entre pDCs et cellules infectées, même ICAM-I KO, soient forcés dans nos cocultures *in vitro*, un grand nombre de cellules finissant par sédimenter au fond du puits, shuntant la formation des complexes d'adhésion nécessaires à l'activation des pDCs.

Un autre mécanisme à considérer est la production d'IFN-I dépendante des contacts entre pDCs. En effet, il a été montré que des pDCs *in vitro* stimulées par un ligand de TLR7 (ARNsb polyU) étaient capables de se regrouper en cluster pour produire de l'IFN-I, les clusters étant médiés par le complexe d'adhésion α L β 2 et son ligand ICAM-I, tous deux exprimés par les pDCs (Saitoh et al., 2017). Ainsi en présence de cellules infectées déficientes pour ICAM-I, les pDCs pourraient avoir recours à cette alternative pour s'activer, se transférant des PAMPs viraux en absence de iSYN. Néanmoins ce moyen d'activation serait très restreint et ne permettrait pas une activation complète des pDCs. Des analyses complémentaires de nos données d'Image Stream X, technique utilisée pour déterminer la fréquence des contacts, des cocultures entre pDCs et cellules ICAM-I KO, pourraient être conduites en ciblant spécifiquement les conjugués pDC-pDC. Néanmoins il n'est pas exclu que les contacts entre pDCs soient moins stables que ceux observés avec les cellules infectées, entraînant leurs ruptures lors de l'acquisition.

Cette lignée cellulaire pourrait également nous permettre de tester la spécificité d'espèce dans la formation de la iSYN pour déterminer si les pDCs humaines sont capables d'interagir avec des cellules exprimant ICAM-I murin. Le but étant de mettre en place des systèmes contenant des molécules ICAM-I tronquées pour prévenir son interaction avec le cytosquelette d'actine et ainsi moduler la stabilisation des contacts.

Bibliographie

- Abdul-Sater, A.A., Majoros, A., Plumlee, C.R., Perry, S., Gu, A.D., Lee, C., Shresta, S., Decker, T., and Schindler, C. (2015). Different STAT Transcription Complexes Drive Early and Delayed Responses to Type I IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 210–216.
- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., et al. (2007). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates the Toll-Like Receptor-MyD88-Dependent Signaling Pathway in Macrophage Cell Lines. *J. Virol.* *81*, 8953–8966.
- Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al. (2012). DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLOS Pathog.* *8*, e1002934.
- Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M.T., Maestre, A.M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A.C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat. Microbiol.* *2*.
- Aizawa, Y. (2015). Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J. Gastroenterol.* *21*, 10299.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.
- Alcumbre, S.G., Saint-André, V., Domizio, J.D., Vargas, P., Sirven, P., Bost, P., Maurin, M., Maiuri, P., Wery, M., Roman, M.S., et al. (2018). Diversification of human plasmacytoid dendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* *19*, 63.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732–738.
- Alon, R., and Feigelson, S. (2002). From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin. Immunol.* *14*, 93–104.
- Angleró-Rodríguez, Y.I., Pantoja, P., and Sariol, C.A. (2014). Dengue Virus Subverts the Interferon Induction Pathway *via* NS2B/3 Protease-IκB Kinase ϵ Interaction. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* *21*, 29–38.

Ashour, J., Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Belicha-Villanueva, A., Plumlee, C.R., Bernal-Rubio, D., Williams, K., Harris, E., Fernandez-Sesma, A., Schindler, C., et al. (2010). Mouse STAT2 Restricts Early Dengue Virus Replication. *Cell Host Microbe* 8, 410–421.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* 201, 1157–1167.

Assil, S., Coléon, S., Dong, C., Décembre, E., Sherry, L., Allatif, O., Webster, B., and Dreux, M. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* 25, 730-745.e6.

Auerswald, H., de Jesus, A., Seixas, G., Nazareth, T., In, S., Mao, S., Duong, V., Silva, A.C., Paul, R., Dussart, P., et al. (2019). First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasit. Vectors* 12.

Bao, M., Wang, Y., Liu, Y., Shi, P., Lu, H., Sha, W., Weng, L., Hanabuchi, S., Qin, J., Plumas, J., et al. (2016). NFATC3 promotes IRF7 transcriptional activity in plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 213, 2383–2398.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. (2002). Virus-induced Interferon α Production by a Dendritic Cell Subset in the Absence of Feedback Signaling In Vivo. *J. Exp. Med.* 195, 507–516.

Barnard, A.L. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106, 988–995.

Bauer, J., Dress, R.J., Schulze, A., Dresing, P., Ali, S., Deenen, R., Alferink, J., and Scheu, S. (2016). Cutting Edge: IFN β Expression in the Spleen Is Restricted to a Subpopulation of Plasmacytoid Dendritic Cells Exhibiting a Specific Immune Modulatory Transcriptome Signature. *J. Immunol.* 196, 4447–4451.

Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., and Vinkemeier, U. (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10418–10423.

Bellecave, P., Sarasin-Filipowicz, M., Donzé, O., Kennel, A., Gouttenoire, J., Meylan, E., Terracciano, L., Tschopp, J., Sarrazin, C., Berg, T., et al. (2010). Cleavage of mitochondrial antiviral signaling

protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* 51, 1127–1136.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507.

Bhattacharya, S., HuangFu, W.-C., Dong, G., Qian, J., Baker, D.P., Karar, J., Koumenis, C., Diehl, J.A., and Fuchs, S.Y. (2013). Anti-tumorigenic effects of Type 1 interferon are subdued by integrated stress responses. *Oncogene* 32, 4214–4221.

Bigger, C.B., Brasky, K.M., and Lanford, R.E. (2001). DNA Microarray Analysis of Chimpanzee Liver during Acute Resolving Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 75, 7059–7066.

Biron, C.A. (2001). Interferons α and β as Immune Regulators—A New Look. *Immunity* 14, 661–664.

Blomberg, S., Eloranta, M.L., Cederblad, B., Nordlind, K., Alm, G.L., and Rönnblom, L. (2001). Presence of cutaneous interferon- α producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10, 484–490.

Bode, C., Fox, M., Tewary, P., Steinhagen, A., Ellerkmann, R.K., Klinman, D., Baumgarten, G., Hornung, V., and Steinhagen, F. (2016). Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA *via* the cGAS-STING signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* 46, 1615–1621.

Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C., and Häussinger, D. (2003). IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J.* 17, 488–490.

van Boxel-Dezaire, A.H.H., Rani, M.R.S., and Stark, G.R. (2006). Complex Modulation of Cell Type-Specific Signaling in Response to Type I Interferons. *Immunity* 25, 361–372.

Bruni, D., Chazal, M., Sinigaglia, L., Chauveau, L., Schwartz, O., Desprès, P., and Jouvenet, N. (2015). Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci. Signal.* 8, ra25.

Bunin, A., Sisirak, V., Ghosh, H.S., Grajkowska, L.T., Hou, Z.E., Miron, M., Yang, C., Ceribelli, M., Uetani, N., Chaperot, L., et al. (2015). Protein Tyrosine Phosphatase PTPRS Is an Inhibitory Receptor on Human and Murine Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 43, 277–288.

- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D.B., Wang, Y.-H., Shaw, J.L., Du, Q., et al. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med.* *206*, 1603–1614.
- Carisey, A.F., Mace, E.M., Saeed, M.B., Davis, D.M., and Orange, J.S. (2018). Nanoscale Dynamism of Actin Enables Secretory Function in Cytolytic Cells. *Curr. Biol.* *28*, 489-502.e9.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919.
- Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2008). The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* *29*, 414–422.
- Chan, Y.K., and Gack, M.U. (2016). A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity. *Nat. Immunol.* *17*, 523–530.
- Chang, D.C., Hoang, L.T., Mohamed Naim, A.N., Dong, H., Schreiber, M.J., Hibberd, M.L., Tan, M.J.A., and Shi, P.-Y. (2016). Evasion of early innate immune response by 2'-O-methylation of dengue genomic RNA. *Virology* *499*, 259–266.
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C.J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., et al. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* *20*, 342–356.
- Cheon, H., and Stark, G.R. (2009). Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9373–9378.
- Cheon, H., Holvey-Bates, E.G., Schoggins, J.W., Forster, S., Hertzog, P., Imanaka, N., Rice, C.M., Jackson, M.W., Junk, D.J., and Stark, G.R. (2013). IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *EMBO J.* *32*, 2751–2763.
- Chmiest, D., Sharma, N., Zanin, N., Viaris de Lesegno, C., Shafaq-Zadah, M., Sibut, V., Dingli, F., Hupé, P., Wilmes, S., Piehler, J., et al. (2016). Spatiotemporal control of interferon-induced JAK/STAT signalling and gene transcription by the retromer complex. *Nat. Commun.* *7*, 13476.

- Chowdhury, J.B., Kim, H., Ray, R., and Ray, R.B. (2014). Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates IRF-7-Mediated Interferon- α Signaling. *J. Interferon Cytokine Res.* 34, 16–21.
- Compeer, E.B., Kraus, F., Ecker, M., Redpath, G., Amiezer, M., Rother, N., Nicovich, P.R., Kapoor-Kaushik, N., Deng, Q., Samson, G.P.B., et al. (2018). A mobile endocytic network connects clathrin-independent receptor endocytosis to recycling and promotes T cell activation. *Nat. Commun.* 9.
- Comrie, W.A., and Burkhardt, J.K. (2016). Action and Traction: Cytoskeletal Control of Receptor Triggering at the Immunological Synapse. *Front. Immunol.* 7.
- Comrie, W.A., Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2015a). F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J. Cell Biol.* 208, 475–491.
- Comrie, W.A., Li, S., Boyle, S., and Burkhardt, J.K. (2015b). The dendritic cell cytoskeleton promotes T cell adhesion and activation by constraining ICAM-I mobility. *J. Cell Biol.* 208, 457–473.
- Crow, M.K., and Ronnblom, L. (2019). Type I interferons in host defence and inflammatory diseases. *Lupus Sci. Med.* 6, e000336.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A.R.B., and Da Poian, A.T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 155–170.
- Daffis, S., Samuel, M.A., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2008). Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* 82, 10349–10358.
- Das, V., Thoulouze, M.-I., Galli, T., Roux, P., and Dautry-Varsat, A. Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse: Involvement of SNARE Complexes. 12.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T.M., and Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon $\alpha\beta$ in acute influenza infection. *Nat. Commun.* 5.
- Deal, E.M., Jaimes, M.C., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Greenberg, H.B. (2010). Rotavirus Structural Proteins and dsRNA Are Required for the Human Primary Plasmacytoid Dendritic Cell IFN α Response. *PLoS Pathog.* 6, e1000931.
- Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014a). Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus

Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS Pathog.* *10*, e1004434.

Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014b). Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* *10*, e1004434.

Dore, G.J., and Feld, J.J. (2015). Hepatitis C Virus Therapeutic Development: In Pursuit of “Perfectovir.” *Clin. Infect. Dis.* *60*, 1829–1836.

Dress, R.J., Dutertre, C.-A., Giladi, A., Schlitzer, A., Low, I., Shadan, N.B., Tay, A., Lum, J., Kairi, M.F.B.M., Hwang, Y.Y., et al. (2019). Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D⁺ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat. Immunol.* *20*, 852–864.

Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., and Chisari, F.V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 14046–14051.

Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012a). Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host Microbe* *12*, 558–570.

Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012b). Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host Microbe* *12*, 558–570.

Du, Z., Shen, Y., Yang, W., Mecklenbrauker, I., Neel, B.G., and Ivashkiv, L.B. (2005). Inhibition of IFN- α signaling by a PKC- and protein tyrosine phosphatase SHP-2-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10267–10272.

Dustin, M.L., and Choudhuri, K. (2016). Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *32*, 303–325.

Embgenbroich, M., and Burgdorf, S. (2018). Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* *9*.

- Fabbri, M., Meglio, S.D., Gagliani, M.C., Consonni, E., Molteni, R., Bender, J.R., Tacchetti, C., and Pardi, R. (2005). Dynamic Partitioning into Lipid Rafts Controls the Endo- LEEexuockyotciyc tCe yCchleemofotthaxeis □ □DL/□2 Integrin, LFA-1, during. *Mol. Biol. Cell* *16*, 11.
- Feng, Z., Li, Y., McKnight, K.L., Hensley, L., Lanford, R.E., Walker, C.M., and Lemon, S.M. (2015). Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J. Clin. Invest.* *125*, 169–176.
- Florentin, J., Aouar, B., Dental, C., Thumann, C., Firaguay, G., Gondois-Rey, F., Soumelis, V., Baumert, T.F., Nunes, J.A., Olive, D., et al. (2012). HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *120*, 4544–4551.
- Fredericksen, B.L., and Gale, M. (2006). West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling. *J. Virol.* *80*, 2913–2923.
- Fuchs, S.Y. (2013). Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *33*, 211–225.
- Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.-L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence That Hepatitis C Virus Resistance to Interferon Is Mediated through Repression of the PKR Protein Kinase by the Nonstructural 5A Protein. *Virology* *230*, 217–227.
- Gao, S., von der Malsburg, A., Dick, A., Faelber, K., Schröder, G.F., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2011). Structure of Myxovirus Resistance Protein A Reveals Intra- and Intermolecular Domain Interactions Required for the Antiviral Function. *Immunity* *35*, 514–525.
- Garcia, M., Wehbe, M., Lévêque, N., and Bodet, C. (2017). Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur. Cytokine Netw.* *28*, 41–51.
- Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L., and Reizis, B. (2010). Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* *33*, 905–916.
- Ghosh, H.S., Ceribelli, M., Matos, I., Lazarovici, A., Bussemaker, H.J., Lasorella, A., Hiebert, S.W., Liu, K., Staudt, L.M., and Reizis, B. (2014). ETO family protein Mtg16 regulates the balance of dendritic cell subsets by repressing Id2. *J. Exp. Med.* *211*, 1623–1635.

- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 594–606.
- Gogela, N.A., Lin, M.V., Wisocky, J.L., and Chung, R.T. (2015). Enhancing our understanding of current therapies for Hepatitis C virus (HCV). *Curr. HIV/AIDS Rep.* 12, 68–78.
- Grajkowska, L.T., Ceribelli, M., Lau, C.M., Warren, M.E., Tiniakou, I., Nakandakari Higa, S., Bunin, A., Haecker, H., Mirny, L.A., Staudt, L.M., et al. (2017). Isoform-Specific Expression and Feedback Regulation of E Protein TCF4 Control Dendritic Cell Lineage Specification. *Immunity* 46, 65–77.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.-D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* 203, 1999–2008.
- Hall, J.C., and Rosen, A. (2010). Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 40–49.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896.
- Hammer, J.A., and Burkhardt, J.K. (2013). Controversy and Consensus Regarding Myosin II Function at the Immunological Synapse. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 300–306.
- Hammer, J.A., Wang, J.C., Saeed, M., and Pedrosa, A.T. (2019a). Origin, Organization, Dynamics, and Function of Actin and Actomyosin Networks at the T Cell Immunological Synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 201–224.
- Hammer, J.A., Wang, J.C., Saeed, M., and Pedrosa, A.T. (2019b). Origin, Organization, Dynamics, and Function of Actin and Actomyosin Networks at the T Cell Immunological Synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 201–224.
- Hansen, L., Schmidt-Christensen, A., Gupta, S., Fransén-Pettersson, N., Hannibal, T.D., Reizis, B., Santamaria, P., and Holmberg, D. (2015). E2-2 Dependent Plasmacytoid Dendritic Cells Control Autoimmune Diabetes. *PLOS ONE* 10, e0144090.
- Hardarson, H.S., Baker, J.S., Yang, Z., Purevjav, E., Huang, C.-H., Alexopoulou, L., Li, N., Flavell, R.A., Bowles, N.E., and Vallejo, J.G. (2007). Toll-like receptor 3 is an essential component of the

innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *292*, H251–H258.

Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.-P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17453–17458.

Hartman, N.C., Nye, J.A., and Groves, J.T. (2009). Cluster size regulates protein sorting in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12729–12734.

Herbeuval, J.-P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., and Shearer, G.M. (2006). Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 7000–7005.

Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035.

Hornung, V., Schlender, J., Guenther-Biller, M., Rothenfusser, S., Endres, S., Conzelmann, K.-K., and Hartmann, G. (2004). Replication-dependent potent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5935–5943.

Hu, X., Herrero, C., Li, W.-P., Antoniv, T.T., Falck-Pedersen, E., Koch, A.E., Woods, J.M., Haines, G.K., and Ivashkiv, L.B. (2002). Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat. Immunol.* *3*, 859–866.

Hu, X., Park-Min, K.-H., Ho, H.H., and Ivashkiv, L.B. (2005). IFN- γ -Primed Macrophages Exhibit Increased CCR2-Dependent Migration and Altered IFN- γ Responses Mediated by Stat1. *J. Immunol.* *175*, 3637–3647.

HuangFu, W.-C., Qian, J., Liu, C., Liu, J., Lokshin, A.E., Baker, D.P., Rui, H., and Fuchs, S.Y. (2012). Inflammatory signaling compromises cell responses to interferon alpha. *Oncogene* *31*, 161–172.

Huynh, L., Wang, L., Shi, C., Park-Min, K.-H., and Ivashkiv, L.B. (2012). ITAM-coupled receptors inhibit IFNAR signaling and alter macrophage responses to TLR4 and *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 3447–3457.

- Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *107*, 2423–2431.
- Ivashkiv, L.B. (2013). PTPN22 in autoimmunity: different cell and different way. *Immunity* *39*, 91–93.
- Jähn, P.S., Zänker, K.S., Schmitz, J., and Dzionek, A. (2010). BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation. *Cell. Immunol.* *265*, 15–22.
- 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.
- Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q.J. (2007). Adhesion Molecule Interactions Facilitate Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Virological Synapse Formation between T Cells. *J. Virol.* *81*, 13916–13921.
- Jopling, C.L. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* *309*, 1577–1581.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. de W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.-J. (2001a). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863–870.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (2001b). Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c⁻ type 2 dendritic cell precursors and CD11c⁺ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 2291–2295.
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S. -k., Takatsu, K., and Kinashi, T. (2000). Rap1 Is a Potent Activation Signal for Leukocyte Function-Associated Antigen 1 Distinct from Protein Kinase C and Phosphatidylinositol-3-OH Kinase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1956–1969.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* *4*, 741–748.

- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* 23, 19–28.
- Keelapang, P., Sriburi, R., Supasa, S., Panyadee, N., Songjaeng, A., Jairungsri, A., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., and Sittisombut, N. (2004). Alterations of pr-M Cleavage and Virus Export in pr-M Junction Chimeric Dengue Viruses. *J. Virol.* 78, 2367–2381.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 4465–4474.
- Kim, C., Ye, F., and Ginsberg, M.H. (2011). Regulation of Integrin Activation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 321–345.
- Kim, S., Kaiser, V., Beier, E., Bechheim, M., Guenther-Biller, M., Ablasser, A., Berger, M., Endres, S., Hartmann, G., and Hornung, V. (2014). Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 44, 807–818.
- Kliche, S., Worbs, T., Wang, X., Degen, J., Patzak, I., Meineke, B., Togni, M., Moser, M., Reinhold, A., Kiefer, F., et al. (2012). CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood* 119, 777–785.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 2154–2163.
- Kumagai, Y., Kumar, H., Koyama, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3960–3964.
- Kumthip, K., Chusri, P., Jilg, N., Zhao, L., Fusco, D.N., Zhao, H., Goto, K., Cheng, D., Schaefer, E.A., Zhang, L., et al. (2012). Hepatitis C Virus NS5A Disrupts STAT1 Phosphorylation and Suppresses Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* 86, 8581–8591.

- Lagarrigue, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* 128, 479–487.
- Laufer, J.M., Kindinger, I., Artinger, M., Pauli, A., and Legler, D.F. (2019). CCR7 Is Recruited to the Immunological Synapse, Acts as Co-stimulatory Molecule and Drives LFA-1 Clustering for Efficient T Cell Adhesion Through ZAP70. *Front. Immunol.* 9.
- Le Floch, A., and Huse, M. (2015). Molecular mechanisms and functional implications of polarized actin remodeling at the T cell immunological synapse. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 537–556.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–1401.
- Legate, K.R., Wickstrom, S.A., and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397–418.
- Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K.W., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* 7, e1001284.
- Levy, D.E., Lew, D.J., Decker, T., Kessler, D.S., and Darnell, J.E. Synergistic interaction between interferon- α and interferon- γ through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. 7.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2992–2997.
- 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.
- Liang, Z., Wu, S., Li, Y., He, L., Wu, M., Jiang, L., Feng, L., Zhang, P., and Huang, X. (2011). Activation of Toll-Like Receptor 3 Impairs the Dengue Virus Serotype 2 Replication through Induction of IFN β in Cultured Hepatoma Cells. *PLoS ONE* 6, e23346.

- Liedtke, C., Gröger, N., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2006). Interferon- α enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8 transcription in human hepatoma cells. *J. Hepatol.* *44*, 342–349.
- Lin, W., Kim, S.S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Kim, K.A., Holtzman, M.J., and Chung, R.T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J. Virol.* *80*, 9226–9235.
- Liu, Y.-J. (2004). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.
- Loschko, J., Rieke, G.J., Schreiber, H.A., Meredith, M.M., Yao, K.-H., Guernonprez, P., and Nussenzweig, M.C. (2016). Inducible targeting of cDCs and their subsets *in vivo*. *J. Immunol. Methods* *434*, 32–38.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like Receptor 9-mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *198*, 513–520.
- Luo, B.-H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 619–647.
- Macal, M., Lewis, G.M., Kunz, S., Flavell, R., Harker, J.A., and Zúñiga, E.I. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Are Productively Infected and Activated through TLR-7 Early after Arenavirus Infection. *Cell Host Microbe* *11*, 617–630.
- MacMicking, J.D. (2014). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *39*.
- Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massouridès, E., Sohier, T.J.M., Corbin, A., et al. (2019). Genome editing in primary cells and *in vivo* using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat. Commun.* *10*.
- Marchetti, M., Monier, M.-N., Fradagrada, A., Mitchell, K., Baychelier, F., Eid, P., Johannes, L., and Lamaze, C. (2006). Stat-mediated Signaling Induced by Type I and Type II Interferons (IFNs) Is Differentially Controlled through Lipid Microdomain Association and Clathrin-dependent Endocytosis of IFN Receptors. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2896–2909.
- McNab, F.W., Rajsbaum, R., Stoye, J.P., and O’Garra, A. (2011). Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 46–56.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* 12, 544–557.
- Ménager, M.M., and Littman, D.R. (2016). Actin Dynamics Regulates Dendritic Cell-Mediated Transfer of HIV-1 to T Cells. *Cell* 164, 695–709.
- Meyer, T., Gavenis, K., and Vinkemeier, U. (2002). Cell Type-Specific and Tyrosine Phosphorylation-Independent Nuclear Presence of STAT1 and STAT3. *Exp. Cell Res.* 272, 45–55.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.
- Montresor, A., Toffali, L., Constantin, G., and Laudanna, C. (2012). Chemokines and the Signaling Modules Regulating Integrin Affinity. *Front. Immunol.* 3.
- Muñoz-Jordán, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I., and García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, 8004–8013.
- Murugesan, S., Hong, J., Yi, J., Li, D., Beach, J.R., Shao, L., Meinhardt, J., Madison, G., Wu, X., Betzig, E., et al. (2016). Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *J. Cell Biol.* 215, 383–399.
- Nagasawa, M., Schmidlin, H., Hazekamp, M.G., Schotte, R., and Blom, B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur. J. Immunol.* 38, 2389–2400.
- Nishikimi, A., Ishihara, S., Ozawa, M., Etoh, K., Fukuda, M., Kinashi, T., and Katagiri, K. (2014). Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci. Signal.* 7, ra72–ra72.
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., et al. (2013). Hepatitis C virus NS4B protein

targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 46–58.

Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., and Wetzler, L.M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front. Immunol.* 3.

Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amai, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., and Ohteki, T. (2013). A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity* 38, 943–957.

Panda, S.K., Kolbeck, R., and Sanjuan, M.A. (2017). Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 20–25.

Panda, S.K., Facchinetti, V., Voynova, E., Hanabuchi, S., Karnell, J.L., Hanna, R.N., Kolbeck, R., Sanjuan, M.A., Ettinger, R., and Liu, Y.-J. (2018). Galectin-9 inhibits TLR7-mediated autoimmunity in murine lupus models. *J. Clin. Invest.* 128, 1873–1887.

Pasquato, A., Ramos da Palma, J., Galan, C., Seidah, N.G., and Kunz, S. (2013). Viral envelope glycoprotein processing by proprotein convertases. *Antiviral Res.* 99, 49–60.

Pellerin, A., Otero, K., Czerkowicz, J.M., Kerns, H.M., Shapiro, R.I., Ranger, A.M., Otipoby, K.L., Taylor, F.R., Cameron, T.O., Viney, J.L., et al. (2015). Anti- BDCA 2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO Mol. Med.* 7, 464–476.

Perry, S.T., Buck, M.D., Lada, S.M., Schindler, C., and Shresta, S. (2011). STAT2 Mediates Innate Immunity to Dengue Virus in the Absence of STAT1 *via* the Type I Interferon Receptor. *PLoS Pathog.* 7.

Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Górna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., et al. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.* 12, 624–630.

Platanitis, E., Demiroz, D., Schneller, A., Fischer, K., Capelle, C., Hartl, M., Gossenreiter, T., Müller, M., Novatchkova, M., and Decker, T. (2019). A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat. Commun.* 10.

Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A.A., Stalin Raj, V., Jenster, G., et al. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13109–13113.

Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* *89*, 1–47.

Recker Mario, Blyuss Konstantin B., Simmons Cameron P., Hien Tran Tinh, Wills Bridget, Farrar Jeremy, and Gupta Sunetra (2009). Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of dengue. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *276*, 2541–2548.

Reinert, L.S., Harder, L., Holm, C.K., Iversen, M.B., Horan, K.A., Dagnæs-Hansen, F., Ulhøi, B.P., Holm, T.H., Mogensen, T.H., Owens, T., et al. (2012). TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1368–1376.

Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* *50*, 37–50.

Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.

Ritter, A.T., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., Dieckmann, N.M.G., Chen, B.-C., Gawden-Bone, C., van Engelenburg, S., Legant, W., Gao, L., Davidson, M.W., et al. (2015). Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse. *Immunity* *42*, 864–876.

Ritter, A.T., Kapnick, S.M., Murugesan, S., Schwartzberg, P.L., Griffiths, G.M., and Lippincott-Schwartz, J. (2017). Cortical actin recovery at the immunological synapse leads to termination of lytic granule secretion in cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E6585–E6594.

Rodrigues, P.F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G.E., Ivanek, R., and Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* *19*, 711–722.

Sage, P.T., Varghese, L.M., Martinelli, R., Sciuto, T.E., Kamei, M., Dvorak, A.M., Springer, T.A., Sharpe, A.H., and Carman, C.V. (2012). Antigen Recognition Is Facilitated by Invadosome-like Protrusions Formed by Memory/Effector T Cells. *J. Immunol.* *188*, 3686–3699.

- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523–527.
- Saitoh, S.-I., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori Saitoh, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., et al. (2017). TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat. Commun.* 8.
- Sanchez-Madrid, F. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18, 501–511.
- Sarasin-Filipowicz, M., Wang, X., Yan, M., Duong, F.H.T., Poli, V., Hilton, D.J., Zhang, D.-E., and Heim, M.H. (2009). Alpha Interferon Induces Long-Lasting Refractoriness of JAK-STAT Signaling in the Mouse Liver through Induction of USP18/UBP43. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4841–4851.
- Sasaki, I., Hoshino, K., Sugiyama, T., Yamazaki, C., Yano, T., Iizuka, A., Hemmi, H., Tanaka, T., Saito, M., Sugiyama, M., et al. (2012). Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* 120, 4733–4743.
- Sathe, P., Vremec, D., Wu, L., Corcoran, L., and Shortman, K. (2013). Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 121, 11–19.
- 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.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2012). A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. 16.
- Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N., and Cantrell, D.A. (2002). Rap1A positively regulates T cells *via* integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat. Immunol.* 3, 251–258.
- See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356, eaag3009.
- Seth, S., Oberdörfer, L., Hyde, R., Hoff, K., Thies, V., Worbs, T., Schmitz, S., and Förster, R. (2011). CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. *J. Immunol.* 186, 3364–3372.

Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J.-M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., von Andrian, U.H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* 6, 497–506.

Shepard, D.S., Undurraga, E.A., and Halasa, Y.A. (2013). Economic and Disease Burden of Dengue in Southeast Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7.

Shigeno, M., Nakao, K., Ichikawa, T., Suzuki, K., Kawakami, A., Abiru, S., Miyazoe, S., Nakagawa, Y., Ishikawa, H., Hamasaki, K., et al. (2003). Interferon- α sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF- κ B inactivation. *Oncogene* 22, 1653.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284, 1835–1837.

Silvin, A., Yu, C.I., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J.-B., Cardinaud, S., Becker, C., Kwan, W.-H., Conrad, C., Maurin, M., et al. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141⁺ dendritic cells. *Sci. Immunol.* 2, eaai8071.

Sisirak, V., Ganguly, D., Lewis, K.L., Couillault, C., Tanaka, L., Bolland, S., D'Agati, V., Elkon, K.B., and Reizis, B. (2014). Genetic evidence for the role of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 211, 1969–1976.

Smit, J., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3, 160–171.

Smith, N., Pietrancosta, N., Davidson, S., Dutrieux, J., Chauveau, L., Cutolo, P., Dy, M., Scott-Algara, D., Manoury, B., Zirafi, O., et al. (2017). Natural amines inhibit activation of human plasmacytoid dendritic cells through CXCR4 engagement. *Nat. Commun.* 8, 14253.

Springer, T.A., and Dustin, M.L. (2012). Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 107–115.

Stark, G.R., and Darnell, J.E. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* 36, 503–514.

Starling, S., and Jolly, C. (2016). LFA-1 Engagement Triggers T Cell Polarization at the HIV-1 Virological Synapse. *J. Virol.* 90, 9841–9854.

- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8⁺ T Cell Accrual. *Immunity* 33, 955–966.
- Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R.D., and Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers *in vivo*. *J. Exp. Med.* 208, 2367–2374.
- Szabo, A., Magyarics, Z., Pazmandi, K., Gopcsa, L., Rajnavolgyi, E., and Bacsi, A. (2014). TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol. Cell Biol.* 92, 671–678.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3516–3521.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7431–7436.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 535–584.
- Tartour, K., and Cimorelli, A. (2015). Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *médecine/sciences* 31, 377–382.
- Tassioulas, I., Hu, X., Ho, H., Kashyap, Y., Paik, P., Hu, Y., Lowell, C.A., and Ivashkiv, L.B. (2004). Amplification of IFN- α -induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors. *Nat. Immunol.* 5, 1181–1189.
- Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C.F., Welch, M., Schreiber, R.D., Carlos de la Torre, J., and Oldstone, M.B.A. (2013). Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science* 340, 207–211.

Thompson, P.M., Ramachandran, S., Case, L.B., Tolbert, C.E., Tandon, A., Pershad, M., Dokholyan, N.V., Waterman, C.M., and Campbell, S.L. (2017). A Structural Model for Vinculin Insertion into PIP2-Containing Membranes and the Effect of Insertion on Vinculin Activation and Localization. *Structure* 25, 264–275.

Tomasello, E., Naciri, K., Chelbi, R., Bessou, G., Fries, A., Gressier, E., Abbas, A., Pollet, E., Pierre, P., Lawrence, T., et al. (2018a). Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation *in vivo* during a viral infection. *EMBO J.* 37, e98836.

Tomasello, E., Naciri, K., Chelbi, R., Bessou, G., Fries, A., Gressier, E., Abbas, A., Pollet, E., Pierre, P., Lawrence, T., et al. (2018b). Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation *in vivo* during a viral infection. *EMBO J.* 37.

Toomey, N.L., Deyev, V.V., Wood, C., Boise, L.H., Scott, D., Liu, L.H., Cabral, L., Podack, E.R., Barber, G.N., and Jr, W.J.H. (2001). Induction of a TRAIL mediated suicide program by interferon alpha in primary effusion lymphoma. *Oncogene* 20, 7029.

Tsukamoto, N., Okada, S., Onami, Y., Sasaki, Y., Umezawa, K., and Kawakami, Y. (2009). Impairment of Plasmacytoid Dendritic Cells for IFN Production by the Ligand for Immunoglobulin-Like Transcript 7 Expressed on Human Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 5733–5743.

Uchil, P.D., and Satchidanandam, V. (2003). Architecture of the Flaviviral Replication Complex. *J. Biol. Chem.* 278, 24388–24398.

Umemoto, E., Otani, K., Ikeno, T., Verjan Garcia, N., Hayasaka, H., Bai, Z., Jang, M.H., Tanaka, T., Nagasawa, T., Ueda, K., et al. (2012). Constitutive Plasmacytoid Dendritic Cell Migration to the Splenic White Pulp Is Cooperatively Regulated by CCR7- and CXCR4-Mediated Signaling. *J. Immunol.* 189, 191–199.

Upadhaya, S., Sawai, C.M., Papalexii, E., Rashidfarrokhi, A., Jang, G., Chattopadhyay, P., Satija, R., and Reizis, B. (2018). Kinetics of adult hematopoietic stem cell differentiation *in vivo*. *J. Exp. Med.* 215, 2815–2832.

Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* 25, 117–127.

- Wang, L., Gordon, R.A., Huynh, L., Su, X., Min, K.-H.P., Han, J., Arthur, J.S., Kalliolias, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2010). Indirect Inhibition of Toll-like Receptor and Type I Interferon Responses by ITAM-coupled Receptors and Integrins. *Immunity* 32, 518–530.
- Wang, Y., Shaked, I., Stanford, S.M., Zhou, W., Curtsinger, J.M., Mikulski, Z., Shaheen, Z.R., Cheng, G., Sawatzke, K., Campbell, A.M., et al. (2013). The Autoimmunity-Associated Gene PTPN22 Potentiates Toll-like Receptor-Driven, Type 1 Interferon-Dependent Immunity. *Immunity* 39.
- Warke, R.V., Khaja, K., Martin, K.J., Fournier, M.F., Shaw, S.K., Brizuela, N., de Bosch, N., Lapointe, D., Ennis, F.A., Rothman, A.L., et al. (2003). Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol.* 77, 11822–11832.
- Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* 90, 10050–10053.
- Webster, B., Werneke, S.W., Zafirova, B., This, S., Coléon, S., Décembre, E., Paidassi, H., Bouvier, I., Joubert, P.-E., Duffy, D., et al. (2018). Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections *via* IRF7-regulated interferon responses. *ELife* 7.
- de Weerd, N.A., and Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol. Cell Biol.* 90, 483–491.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375.
- Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B., Calabrese, D., Dill, M.T., Chung, J., Chisari, F.V., and Heim, M.H. (2014). Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology* 59, 2121–2130.
- Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* 340, 202–207.
- Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivié, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., et al. (2018a). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* 9.

Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivié, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., et al. (2018b). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* 9.

Yan, N., and Chen, Z.J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 13, 214–222.

Ye, X., McLean, M.A., and Sligar, S.G. (2016). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Modulates the Affinity of Talin-1 for Phospholipid Bilayers and Activates Its Autoinhibited Form. *Biochemistry* 55, 5038–5048.

Yi, J., Wu, X.S., Crites, T., and Hammer, J.A. (2012). Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol. Biol. Cell* 23, 834–852.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., 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.

Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465.

You, C., Richter, C.P., Löchte, S., Wilmes, S., and Piehler, J. (2014). Dynamic Submicroscopic Signaling Zones Revealed by Pair Correlation Tracking and Localization Microscopy. *Anal. Chem.* 86, 8593–8602.

Yung, C.-F., Lee, K.-S., Thein, T.-L., Tan, L.-K., Gan, V.C., Wong, J.G.X., Lye, D.C., Ng, L.-C., and Leo, Y.-S. (2015). Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 999–1005.

Zhan, Y., Chow, K.V., Soo, P., Xu, Z., Brady, J.L., Lawlor, K.E., Masters, S.L., O’keeffe, M., Shortman, K., Zhang, J.-G., et al. (2016). Plasmacytoid dendritic cells are short-lived: reappraising the influence of migration, genetic factors and activation on estimation of lifespan. *Sci. Rep.* 6.

Zhang, S., Sun, Y., Chen, H., Dai, Y., Zhan, Y., Yu, S., Qiu, X., Tan, L., Song, C., and Ding, C. (2014). Activation of the PKR/eIF2 α signaling cascade inhibits replication of Newcastle disease virus. *Virology* 11, 62.

Zhu, L., Yang, J., Bromberger, T., Holly, A., Lu, F., Liu, H., Sun, K., Klapproth, S., Hirbawi, J., Byzova, T.V., et al. (2017). Structure of Rap1b bound to talin reveals a pathway for triggering integrin activation. *Nat. Commun.* 8, 1744.

Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., et al. (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* 12, 137–143.

Annexe



Chapter 22

Monitoring of Interferon Response Triggered by Cells Infected by Hepatitis C Virus or Other Viruses Upon Cell–Cell Contact

Séverin Coléon, Sonia Assil, and Marlène Dreux

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) constitute a unique DC subset specialized in rapid and massive secretion of cytokines, including type I interferon (i.e., IFN α and IFN β), known to be pivotal for both innate immunity and the onset of adaptive response. The production of type I IFNs by pDCs is primarily induced by the recognition of viral nucleic acids through Toll-like receptor (TLR)-7 and -9 sensors located in the endolysosomal compartment. Importantly, in the context of hepatitis C virus (HCV) infection, pDC type I IFN response is triggered by the sensing of infected cells via physical cell–cell contact. Such a feature is also observed for many genetically distant viruses, including notably viruses of the *Retroviridae*, *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae* families and observed for various infected cell types. Here, we described a set of experimental methods for the ex vivo studies of the regulation of pDC activation upon physical cell–cell contact with virally infected cells.

Key words Innate immunity, Hepatitis C virus (HCV), Plasmacytoid dendritic cells (pDCs), Interferon (IFN), Cell–cell contact, Inflammation, Toll-like receptor (TLR), Imaging flow cytometry, Confocal microscopy analysis, Coculture

1 Introduction

Dendritic cell (DC) subsets have varied functions including antigen presentation and cytokine production, and hereby they are essential players of innate and adaptive immunity. Among DCs, plasmacytoid DC (pDC) is thought to be a DC subset specialized for the production of type I interferons (IFN-I) (reviewed in [1, 2]). The IFN-I are pleiotropic cytokines with abilities to enhance both innate and adaptive immunity. Their antiviral activity involves notably the induction of interferon stimulated genes (ISGs), which shut-down viral replication. The pDC IFN-I response is mainly triggered by the endolysosomal sensors Toll-like receptors (TLR)-7 and -9 that recognize nucleic acids (i.e., RNA and DNA, respectively). These immunostimulatory nucleic acids could be derived

from bacterial or viral genomes in the context of infections, or from cellular DNA or RNA when presented in immune complexes, formed by apoptotic or necrotic cellular materials along with auto-antibodies (reviewed in [1, 3, 4]). Such self DNA- or RNA-containing immune complexes can act as endogenous inducers of IFN-I response contributing to the development of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) (reviewed in [3, 4]).

The pDCs are able to rapidly produce large amount of IFN-I, in part, likely because they constitutively express high level of the transcriptional activator interferon regulatory factor 7 (IRF7) [1, 5]. In the context of viral infections, such a rapid activation of antiviral response might explain why they are refractory to infection by most viruses and consistently, pDC activation does not require their productive infection by viruses [1, 6–8]. The pDCs also produce type III IFNs, yet the contribution of this part of the pDC response in the outcome of infection is still elusive. As exemplified for different viruses, pDCs are likely an important component of the host antiviral response at the acute phase of infection [9–13]. The pDCs, via an early IFN-I production, are thought to modulate various innate and adaptive responses, yet the regulatory mechanisms and outcomes appear to differ for distinct viruses. For instance, specific depletion of pDCs in a transgenic mouse model, in which the diphtheria toxin receptor (DTR) is expressed under the control of the promoter of a specific pDC gene, (i.e., *BDCA-2*) revealed that pDC response limits the expansion of virus-specific NK cells in the context of murine cytomegalovirus (MCMV) infection, likely in keeping with the control via IFN production of viral load [11]. In contrast, this study, using the same mouse model, also uncovered that pDCs primarily influence the accrual of CD8+ T cells in response to vesicular stomatitis virus (VSV) infection [11]. Notably, pDCs, via the NF κ B-mediated signaling, are a source of proinflammatory cytokines and chemokines, that promote immune cell recruitment to infection sites and the adaptive immunity [14]. Importantly, a study using a mouse model in which IRF7 signaling is restricted to pDCs demonstrated that this pDC-restricted response is sufficient to control both dengue and Chikungunya viruses and was sufficient to protect mice from lethal Chikungunya infection [15].

Interestingly, recent works uncovered that pDCs preferentially respond to viral RNA transferred by noncanonical and/or noninfectious vesicles rather than through infection by conventional viral particles [8]. In the context of Hepatitis C virus (HCV), infected cells produce exosome-like vesicles, which contain HCV genome (referred to as HCV EXOs) [16]. The transfer of viral genomes via HCV EXOs activates IFN-I response by the pDCs. This transmission does not required the viral structural proteins (i.e., the surface glycoproteins E1 and E2, as well as the core protein), thus

demonstrating that HCV-EXOs are structurally distinct from canonical HCV particles [16]. HCV EXOs also likely contribute to the spread of viral infection to neighboring naïve hepatocytes [17–20]. Interestingly, recent studies highlighted additional regulatory functions exerted by HCV-EXOs on the host responses, including monocyte activation and differentiation into macrophage [21] and the activation of profibrotic markers by hepatic stellate cells [22]. These observations imply that the modulation of cellular functions by HCV EXOs depends on the target cell type. The transfer of immunostimulatory RNAs to pDCs via exosome-like vesicles has been demonstrated for other genetically distant viruses, including Hepatitis A virus (HAV) and Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) [23, 24].

Importantly, several recent *in vitro* studies uncovered that pDCs sense viral infections when in physical contact with infected cells [8, 15, 16, 23–30]. Additionally, studies suggested that such activation of pDCs by cell–cell contact with infected cells involves clathrin-mediated endocytosis of secreted PAMPs, in accordance with the involvement of a vesicular-mediated cell-to-cell transfer of the viral RNA to the pDCs (via exosomes or immature viral particles, depending on the viruses) [16, 23, 24, 26, 30]. The first study on the structures and components present at the contacts between pDCs and virally infected cells highlighted a local accumulation of the actin network [26], a hallmark of previously described synapses. Systemic and massive productions of IFNs and inflammatory cytokines can be detrimental to the host as they correlate notably with tissue damages [31, 32]. Therefore, one might speculate that the requirement for direct cell–cell contact to trigger a robust pDC response could have evolved in favor of the host fitness to locally respond at the infected sites, and hereby to thwart the otherwise harmful systemic IFN and inflammatory responses.

The requirement for cell–cell contact is a newly assigned primarily feature of pDC functionality. Therefore, defining the mechanism underlying the establishment of cell–cell contact and its impact on the antiviral state *in vitro* and *in vivo* is a key question in the field of innate immunity. Here, we described the methods for *ex vivo* studies of pDC response to virally infected cells, with a focus on the experimental methods to determine how pDC activation is regulated by cell–cell contact with infected cells and the current approaches developed to define the underlining molecular events.

2 Materials

The indicated quantity of buffers and reagents are relative to the procedure of pDC isolation from a 450 mL blood unit (*see Note 1*). The same experimental process can apply to pDC isolation from a cytopheresis unit.

2.1 Isolation of pDCs from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

1. Ficoll Hypaque (GE Healthcare Life Sciences) stored away from light at room temperature.
2. HANK's 2 mM EDTA buffer: prepared with 0.5 M pH 8 EDTA solution (Life Technologies) diluted in HANK's Balanced Salt Solution (HBSS, Life Technologies) stored at room temperature.
3. Separation buffer: Phosphate-buffered saline (PBS, Life Technologies), supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA. Filtration with 0.22 µm filter unit and stored at 4 °C.
4. Cell culture medium for isolated pDCs: RPMI 1640 medium (reference: 31870-074, from Life Technologies), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM hepes, 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, and nonessential amino acids (Life Technologies), stored at 4 °C.
5. pDCs are positively selected from PBMCs using BDCA-4/Neuropilin-1-magnetic microbead kit (reference: 130-090-532, from MACS Miltenyi Biotec) and LS Columns (reference: 130-042-401, from MACS Miltenyi Biotec) and magnetic stand (MACS Miltenyi Biotec).
6. The antibodies against pDC markers used to assess the purity of pDC isolation by immunostaining followed by FACS analysis were: PE-conjugated anti-CD123 and APC-conjugated anti-BDCA-2 (MACS Miltenyi Biotec).

2.2 Biological Reagents: Infected Cells

1. Huh-7, the derivative Huh-7.5.1 and a subclone of Huh-7.5.1 cells (Huh-7.5.1c2) [16, 33, 34] are maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX, reference 61965059, from Life Technologies), supplemented with 10% FCS, 10 mM hepes, 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL penicillin, 2 mM L-glutamine, and nonessential amino acids (Life Technologies) at 5% CO₂/37 °C. Huh-7.5.1c2 cells that harbor the JFH-1 HCV subgenomic replicon (SGR) [35] were maintained in the same medium with neomycin selection by adding G418 (at 500 µg/mL final concentration, Sigma-Aldrich).
2. Cells were infected by the JFH-1 infectious molecular clone of HCV [36–38]. Viral stocks of cell-culture adapted JFH-1 virus (D183) [39] were prepared by infection of Huh-7.5.1c2 cells at a multiplicity of infection (moi) of 0.01, as described previously [16, 40].

2.3 Imaging of the Cell-Cell Contacts by Immunofluorescent Staining and/or Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analyzed by Confocal Microscopy

1. 96-well optical-bottom plates (Thermo Fisher Scientific).
2. Polylysine solution: dissolved polylysine (reference: P6282, from Sigma-Aldrich) at final concentration 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in H_2O .
3. Vibrant CM-DiI cell-labeling solution (reference V22888, from Thermo Fisher Scientific) and CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (reference C34571, from Thermo Fisher Scientific) used for the staining of pDC prior to coculture with infected cells, with fluorescence absorption/emission at approximately 553/570 nm and 405/450, respectively. Store at -20°C .
4. Fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) solution (Sigma-Aldrich).
5. Reagents for immunofluorescent staining include Hoechst solution (Life Technologies); Alexa-conjugated secondary antibodies (Life Technologies); CF488A-conjugated phalloidin (Biotium); mouse APC conjugated anti-IFN α (MACS Miltenyi Biotec); mouse IgG2a monoclonal Anti- β -Actin (Sigma); mouse anti-NS5A (HCV protein)—clone 9E10 (kindly provided by Dr. C Rice, Rockefeller University).
6. Detection of HCV RNA by FISH performed using reagents from Panomics/Affymetrix [16].
7. Confocal microscopy analysis performed using Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope and analyzed with Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and IMARIS (Bitplane Inc.) software packages.

2.4 Imaging Combined with Flow Cytometry Analysis of pDC/HCV Cell Conjugates

1. Micro-plate designed for cell harvesting by temperature reduction (Nunc UpCell 96F Microwell Plate from Thermo Scientific).
2. Analysis by a technology combining imaging and flow cytometry analysis (Image Stream X technology, Amnis) using IDEAS software.

2.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The cytokine productions by cocultured pDCs are quantified using commercially available ELISA kits specific for IFN α and IFN β (PBL Interferon Source), TNF α and IL-6 (Affymetrix), following the manufacturer's instructions.

3 Methods

The workflow of the experimental procedure to study the activation of pDCs by infected cells includes the isolation of pDCs from PBMCs and the infection of cells by HCV, followed by the setup of coculture. The study of the response of pDCs to infected cells

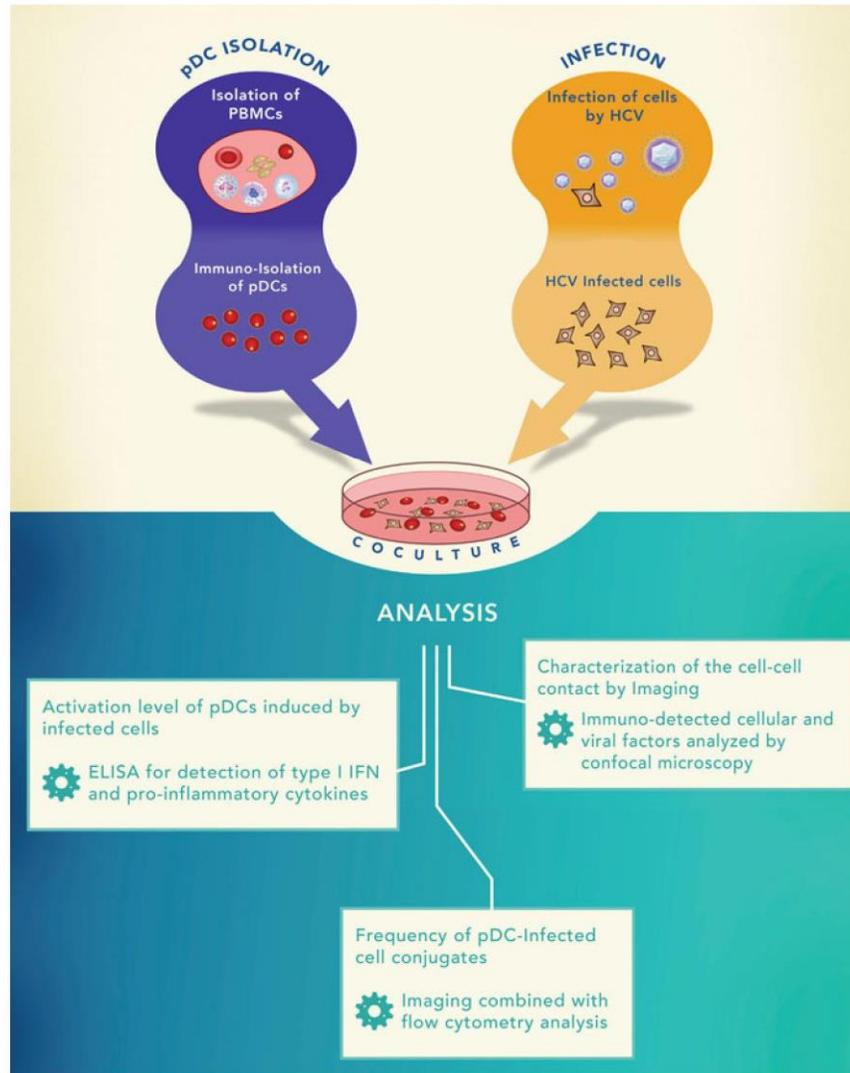


Fig. 1 Workflow of the analysis of pDC activation by cell–cell contact with infected cells. The pDCs are isolated from PBMCs issued from healthy blood donors (Subheadings 3.1 and 3.2) and cocultured with infected cells (Subheadings 3.3 and 3.4). The levels of pDC activation by infected cells can be assessed by the quantification of cytokine levels in the supernatant of cocultures (Subheading 3.3). The features of this cell–cell communication can be determined by confocal microscopy analysis of cellular and viral determinants, including the transfer of viral genomes (Subheading 3.4), along with the impact of the experimental modulations of cellular factors on the frequency of pDC/infected cell conjugates determined by imaging flow cytometry technology (Subheading 3.5)

can include the analysis of the production of type I IFNs and other cytokines, the confocal imaging of the cell–cell contact and transfer of the viral genome to the pDCs and the quantification of the formation of pDC/infected cell conjugates by imaging flow cytometry (Fig. 1).

**3.1 Isolation
of PBMCs from Blood
from Healthy Adult
Human Volunteers**

PBMCs are separated using density gradient medium (ficoll).

1. Dispense 15 mL Ficoll-Hypaque in 50 mL tubes. Prepare 16 tubes for a blood unit.
2. Carefully overlay 20–30 mL of blood on 15 mL Ficoll-Hypaque by inclining the tube (*see Note 2*).
3. Centrifuge the tubes at $500 \times g$ for 30 min at 20 °C (without brake).
4. During centrifugation, distribute 30 mL of HANK's 2 mM EDTA buffer into 50 mL tubes. Prepare 12 tubes for a blood unit.
5. After the centrifugation, discard about 11–12 mL of the upper layer (i.e., corresponding to plasma, yellow to translucent phase).
6. Collect and pool mononuclear cells at the cloudy interface by pipetting carefully on the side of the tube. Distribute the collected cells into the 50 mL tube containing the HANK's 2 mM EDTA buffer (prepared at **step 4**).
7. Centrifuge at $300 \times g$ for 10 min at 20 °C (with brake).
8. Discard the supernatants and resuspend cell pellets in 8 mL HANK's 2 mM EDTA buffer per tube. Combine all cell suspensions in two 50 mL tubes.
9. Centrifuge at $300 \times g$ for 6 min at room temperature.
10. Discard the supernatants and resuspend cell pellets in 25 mL HANK's 2 mM EDTA buffer. Centrifuge tubes at $300 \times g$ for 6 min at RT.
11. Discard the supernatants and resuspend cell pellets into 10 mL of Separation buffer. Combine all cell suspensions in one 50 mL tube. Keep cells on ice from now on.
12. Determine viable cell count with Trypan Blue (*see Note 3*).

**3.2 Isolation of pDCs
from PBMCs**

The pDC isolation from PBMCs for most steps is performed by positive selection using BDCA-4/Neuropilin-1-magnetic microbead kit and LS Columns accordingly to the manufacturer's instructions (MACS Miltenyi). The steps of the protocol that were optimized and thus different from the manufacturer's instructions are indicated by asterisks (*).

1. Pellet the PBMCs by centrifugation at $300 \times g$ for 6 min at 4 °C.
2. Discard the supernatant and resuspend cell pellet in 1 mL of separation buffer (*). Add 500 μ L of FcR blocking antibody.

3. Resuspend cells with 1 mL tips pipetting to disrupt cell aggregates (*), then add 500 μ L of CD304 (BDCA-4) antibody microbeads.
4. Mix well and incubate for 15 min at 4 °C in the dark.
5. Resuspend cells in 50 mL of separation buffer. Centrifuge at $300 \times g$ for 8 min at 4 °C.
6. During centrifugation, set the LS column into magnetic stand above a 15 mL tube and load 3 mL of separation buffer (do not let the column dry).
7. After centrifugation, discard the supernatant and resuspend cell pellet in 5 mL of separation buffer.
8. Load cell suspension onto the LS column. Let pass the whole cell suspension through the column.
9. Wash the column three times with 3 mL of Separation buffer. The through-out of the column can be collected, i.e., 12 mL of cell suspension in separation buffer, corresponding to PBMCs depleted of pDCs (*see Note 4*).
10. Remove the LS column from the magnet/stand and place it on a new 15 mL tube.
11. Load 5 mL separation buffer onto the column and immediately flush out the cells by firmly pushing the plunger into the column.
12. (*) Place a new LS column into the stand and add 3 mL separation buffer and repeat **steps 8-11** (*see Note 5*). pDCs are collected by a flush out of the column harvested in a 15 mL tube (as in **step 11**).
13. Centrifuge the collected pDCs at $300 \times g$ for 8 min at 4 °C. Discard the supernatant and resuspend cell pellet in 1 mL of cell culture medium for pDCs are kept on ice.
14. Determine viable cell count with Trypan Blue (*see Note 3*).

**3.3 Infection
of the Cells
and Coculture
with Isolated pDCs
for the Analysis
of Cytokine Production**

The infection of Huh-7.5.1 cells (or derivate) are performed using the JFH1 molecular clone of HCV [36–38] or adapted viral stock, as previously described [16].

1. Seed Huh-7.5.1 cells (or derivate) at 5×10^5 in T25 culture flask.
2. Six to eight hours later, inoculate cells with viral stock at MOI of 1.
3. Next day, change culture medium of infected cells.
4. The infected cells are harvested for coculture with pDCs 48 h post-infection. After one wash with PBS, infected cells are detached by incubation with trypsin/EDTA (Life technologies) at 37 °C for 2–3 min and pipetting up and down.

5. Determine viable cell count with Trypan Blue.
6. Centrifuge the collected infected cells at $300 \times g$ for 8 min at 4°C . Discard supernatant and resuspend cell pellet in cell culture medium for pDCs at the appropriated cell density (e.g., 10^6 cells per mL, in accordance with indication below).
7. Cocultures are performed in 96-well round-bottom plate with 2×10^4 pDCs and 10^5 infected cells (e.g., by adding 100 μL of cell suspension at 10^6 cells per mL for infected cells and 100 μL at 2×10^5 for pDCs) or uninfected parental cells used as negative controls, in a 200 μL final volume, incubated at $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$.
8. Eighteen to twenty hours later, cell-culture supernatants are collected. Levels of $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, and IL-6 are measured by ELISA, following the manufacturer's instructions. The cell-culture supernatants can be stored at -80°C prior to analysis.

Cocultured cells can be collected in guanidinium thiocyanate citrate (GTC) solution to determine of the upregulation of IFN-I and ISG expression by RT-qPCR analysis.

To demonstrate the requirement of cell–cell contact for pDC activation by infected cells, 10^5 infected cells or uninfected cells are cocultured with 2×10^4 pDCs in 96-well format transwell chambers separated by a 0.4 μm membrane (Corning) [26]. Similar results were obtained when pDCs were cultured in either the upper or the lower compartment [26].

The impact of HCV-EXOs is analyzed by the isolation of exosome-enriched fraction from the supernatants of SGR or infected cells as previously described [16, 41] (*see Note 6*).

3.4 Analysis of Cell–Cell Contacts by Immunofluorescence and Confocal Microscopy Analysis

3.4.1 Setup of Cocultures with pDCs and Infected Cells

Cell culture wells are coated with polylysine to improve cell adherence. Prior to coculture with infected cells (and uninfected cells, used as controls), isolated pDCs are stained with lipophilic dyes (e.g., CM-Dil staining solution) to facilitate the identification of pDCs in the coculture. The pDC/infected cell coculture should be set up rapidly after pDC isolation.

1. Culture plates are coated by distributing about 50–100 μL of polylysine solution per well (i.e., enough volume to cover the bottom of the well) in a 96-Well optical-bottom plates, overnight incubation at 37°C .
2. Remove the polylysine solution from the wells and rinse twice with 100 μL of PBS.
3. Discard supernatant and rinse wells once with 200 μL of cell culture medium for pDCs. Add 100 μL cell culture medium for pDCs in the wells surrounding the wells of interest to prevent border effect and evaporation. The plate is kept at room temperature until the addition of cells.

4. The infected cells are prepared as in Subheading 3.3.
5. Prior to coculture with infected cells, isolated pDCs are stained by using a CM-Dil staining solution (at the final concentration of 0.5 μM in PBS), with gentle pipetting of the pDC suspension in 1 mL of PBS-CM-DiI solution and incubate for 10 min at 37 °C and then 15 min at 4 °C, in the dark.
6. Spin down pDCs at $300 \times g$ for 6 min at 4 °C and remove supernatant.
7. Resuspend pDCs at the require concentration in cell culture medium for pDCs.
Alternatively, for compatibility with other fluorochromes used for the immunostaining and/or FISH detection, pDCs can be stained with CellTrace Violet Cell Proliferation (*see Note 7*).
8. The infected cells and pDCs are cocultured in the plates prepared as described in **steps 1–3**. 6×10^4 pDCs and 2×10^4 infected cells are distributed in a final volume of 200 μL per well, and incubated for 4–8 h at 37 °C/5% CO_2 .

3.4.2 Immunostaining and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Detection for the Analysis of Cell–Cell Contact and Viral Product Transfer Analyzed by Confocal Microscopy

All the procedures of immunostaining should be performed by gentle addition of solutions by pipetting on the side of the wells and not directly on the bottom of the plate.

1. Remove culture medium and add 100 μL of 4% PFA solution. Incubate for 20 min at room temperature, in the dark. Wash cells three times with PBS. At this stage, the plate can be kept at 4 °C in the dark for a couple of days prior to immunostaining.
2. The cocultured cells can be permeabilized with 100 μL of 0.1% Triton X-100 in PBS for 7 min at room temperature followed by a washing step with PBS.
3. Blocking is performed by incubation with 50 μL of PBS supplemented with 3% BSA for 15 min at room temperature, followed by a PBS washing step.
4. Incubation with primary antibodies diluted in PBS supplemented with 3% BSA is performed for 1 h at room temperature with final volume of 50 μL per well, followed by three washes with PBS.
5. Incubation with secondary antibodies and Hoechst dye diluted in PBS supplemented with 3% BSA is performed for 1 h at room temperature (final volume of 50 μL per well), followed by three washes with PBS.
6. The detection of positive-strand HCV RNA is performed using a probe set that targets a region between nucleotide positions 3733–4870 in the JFH-1 genome [16] and a fluorochrome amplifying system designed by Panomics/Affymetrix (Quantigene ViewRNA ISH Cell Assay kit) with incubation steps

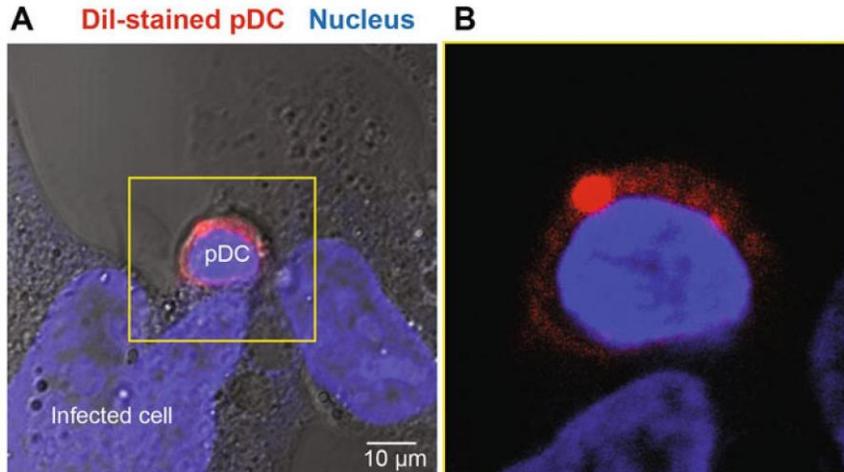


Fig. 2 Representative imaging of a pDC in contact with infected cells analyzed by confocal microscopy. The pDCs are stained with Dil lipophilic dye prior to coculture with HCV infected cells, nuclei stained with Hoechst. A flattening of pDCs, as reflected also by the shape of the nucleus, toward the infected cells is a hallmark of cell–cell contact between pDCs and infected cells. **(a)** Imaging of nucleus (blue) and Dil stained pDC (red) on the phase contrast. **(b)** Magnification of yellow-boxed pDC, shown in **(a)**

according to the manufacturer’s instructions, except for the protease digestion step that was omitted. The omission of protease digestion step does not affect detection of HCV RNA. The steps for HCV RNA FISH labeling can be performed either prior to the immunostaining, or after. In the latter case, a PFA 4% fixation step is included at the end of the immunostaining procedure, as previously reported [16, 42]. Note the recognition of antigens by some antibodies can be compromised by the procedure for FISH detection. The negative-strand HCV RNA can be detected using a similar procedure (*see Note 8*). At this stage, the plate can be stored at 4 °C in the dark prior to confocal microscopy analysis.

7. Images are acquired with a Zeiss LSM 710 laser scanning confocal microscope and analyzed with Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and IMARIS (Bitplane Inc.) software packages.

The cell–cell contacts between pDC and infected cell are identified by the flattening of pDC toward the side of HCV infected cells (Fig. 2). Additionally, the flattening of pDC nucleus is also observed in front of the infected cells, a characteristic previously described for other types of physical contact, in relation with mechanical signaling [43]. These features are defined by the careful inspection of consecutive Z-axis sections (with 1–2 μm interspace) of the cell–cell contact.

8. Clustering and polarization of cellular and viral elements at the contact are assessed by two blind inspections of the acquired Z-stacks of the contact and with counting of the defined phenotypes, e.g., clusters or coclusters of elements at contact, outside of the contact or absence of clustering.

3.5 Quantification of pDC/Infected Cell Conjugates by Imaging Combined with Flow Cytometry Analysis

For analysis of the establishment of cell conjugates by imaging combined with flow cytometry technology, cocultures are performed in microplate designed for cell harvesting by temperature reduction (*see* Subheading 2). The pDCs are identified in the coculture by staining with CellTrace Proliferative Kit prior to coculture, as described in Subheading 3.4 and **Note 7**, or by antibody against specific pDC markers, e.g., CD123 [26]. Further, to accurately distinguish infected cells from pDCs, infected cells express GFP marker. This stable GFP expression is obtained thanks to their transduction using retroviral vector, as previously reported [26]. As mentioned in the previous sections, infected cell/pDC cocultures should be set up rapidly after pDC isolation. The frequency of cell conjugates is determined using Image stream X technology (Amnis).

1. GFP-expressing infected cells are harvested as in Subheading 3.3. Prior to coculture, the isolated pDCs are stained using CellTracer, as described in Subheading 3.4.
2. Cocultures are set-up with 4×10^4 pDCs and 1×10^5 infected cells in a final volume of 100 μ L per well, and cells are incubated for 4–8 h at 37 °C/5% CO₂.
3. At the end of the coculture, culture plates are incubated at room temperature for 20 min to enable detachment of the cells from the support.
4. Cocultures are transferred into V-bottom 96 plates. The fixation of the cell culture is performed by incubation for 20 min at 4 °C with PFA 4% solution (addition of 100 μ L per well).
5. Cells are washed three times in PBS (with spinning of cell pellet at $600 \times g$ for 2 min). Culture plate is stored at 4 °C in the dark prior to analysis.
6. Cell suspensions in a final volume of 30 μ L in PBS in 1.5 mL eppendorf tubes are analyzed using the Image stream X Technology.
7. The cell population defined as to pDC/HCV cell conjugates comprises conjugates of one stained pDC (by CellTrace Proliferative Kit or antibody against CD123) and one cell solely GFP+ cell (Fig. 3). Cell populations are thus sorted by using a series of masks (IDEAS software), notably to eliminate nonspecific signals, i.e., double positive single cells and to select for

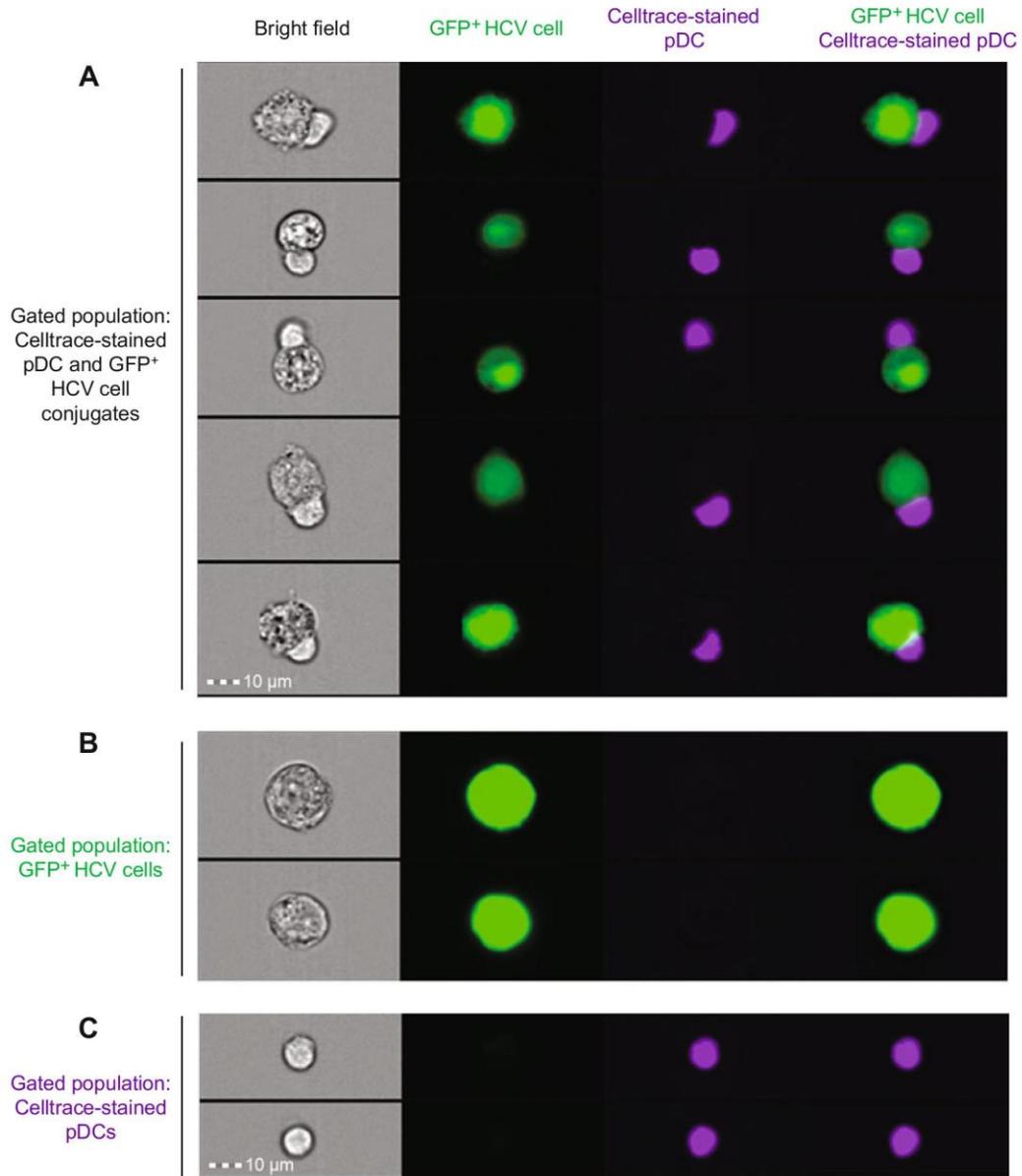


Fig. 3 Analysis of pDC/infected cell conjugates by imaging flow cytometry technology. Imaging flow cytometry analysis (Image stream X technology) of HCV infected Huh-7.5.1 cells, which stably express GFP marker (green), were cocultured with pDCs for 4-5 h. pDCs are detected by using CellTrace Violet Cell Proliferation solution (purple). Representative pictures of the cell populations gated as conjugates between pDCs and GFP expressing HCV infected cells as well as single cell populations. Panels, as displayed from the left to the right, Bright field; GFP field; CellTrace-stained pDC field; and Merge

cells in direct contact using automatic analysis of the overlay of GFP and pDC staining/marker at the cell periphery.

8. The frequency of pDC/HCV cell conjugates is determined relatively to total cell number of cells solely CD123 (or CellTrace staining) positive, solely GFP positive and the conjugates (Fig. 3).
9. Post-cell sorting, the accuracy of the gated cell population in regards to the defined criteria is controlled by a visual inspection of the individual pictures in the gated cell population (i.e., assessment with 100 randomly picked pictures of the population defined as conjugates).

4 Notes

1. Blood units and cytopheresis units from healthy adult human volunteers are obtained according to procedures approved by the “Etablissement Français du sang” (EFS) Committee.
2. The blood should not be mixed with Ficoll and carefully layered without disturbing the interface between the two layers.
3. The typical yields of PBMCs and pDCs are 5-to- 8×10^8 and 1-to- 3×10^6 cells, respectively, with an expected purity of >95% for pDCs.
4. The analysis of the efficiency of pDC isolation from PBMCs is performed by immunostaining and FACS analysis of PBMCs before and after pDC isolation and isolated pDCs [16, 26]. The pDCs are detected by combining staining of the CD123 and BDCA2 specific markers using PE-conjugated anti-CD123, mouse APC-conjugated anti-BDCA-2, respectively (MACS Miltenyi Biotec).
5. Two rounds of passage of the cell suspension through the column increase the purity with a minimal loss of pDCs.
6. The HCV-EXOs can be isolated from the supernatant of SGR and HCV infected cells, as previously described [16, 41]. Briefly, supernatants harvested from 80% confluent cells are precleared by sequential low- and high-speed centrifugations. Exosomes in the clarified supernatants are then pelleted at $110,000 \times g$ for 2 h at 4 °C using a SW28 rotor. The pelleted exosome preparations are resuspended in exosome-depleted medium. Approximately 0.25–0.5 mg of exosomal proteins are obtained from 1-to- 2×10^6 cells. The purity of the preparation can be determined by western blot analysis using exosome markers (e.g., CD81, CD63) and nonexosome markers (e.g., the calnexin ER protein and the COX IV mitochondrial protein) [16].

7. Isolated pDCs are stained with CellTrace Violet Cell Proliferation solution (prepared at the final concentration of 2.5 μ M in PBS) by incubation for 20 min at 37 °C, in the dark. After centrifugation ($600 \times g$ for 8 min), stained pDCs are resuspended at the required cell density in cell culture medium for pDCs by pipetting, followed by an incubation for 5 min at 37 °C.
8. Detection of the negative strand HCV RNA is performed using a probe set that target regions between nucleotide positions 4904 and 5911 in the JFH1 complementary strand with experimental procedures similar to those described for the positive strand HCV RNA and as previously reported [42].

Acknowledgments

We are grateful to Helena Paidassi (CIRI, INSERM U1111, Lyon) for critical reading of the manuscript and to our colleagues for encouragement and help. We are grateful to Camille Demure for the graphical design of Fig. 1. This work was supported by grants from the French “Agence Nationale pour la Recherche” (ANR-13-JSV3-0004-01-EXAMIN) and the “Agence Nationale pour la Recherche contre le SIDA et les Hépatites Virales” (ANRS-AO 2017-01, ECTZ35316) and the LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048).

References

1. Swiecki M, Colonna M (2015) The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15:471–485
2. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A (2013) The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563–604
3. Gilliet M, Cao W, Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8:594–606
4. Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA (2016) Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 44:20–25
5. Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N et al (2003) Comparative analysis of IRF and IFN- α expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 74:1125–1138
6. Kumagai Y, Kumar H, Koyama S, Kawai T, Takeuchi O et al (2009) Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 182:3960–3964
7. Thitithanyanont A, Engering A, Ekchariyawat P, Wiboon-ut S, Limsalakpetch A et al (2007) High susceptibility of human dendritic cells to avian influenza H5N1 virus infection and protection by IFN- α and TLR ligands. *J Immunol* 179:5220–5227
8. Assil S, Webster B, Dreux M (2015) Regulation of the host antiviral state by intercellular communications. *Viruses* 7:4707–4733
9. Bruel T, Dupuy S, Demoulin T, Rogez-Kreuz C, Dutrieux J et al (2014) Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon- α production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog* 10:e1003915
10. Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanaroj S, Nisalak A, Yongvanitchit K et al (2003) A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is

- associated with increased disease severity. *J Immunol* 171:5571–5578
11. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M (2010) Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 33:955–966
 12. Swiecki M, Wang Y, Gilfillan S, Colonna M (2013) Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog* 9:e1003728
 13. Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW (2006) Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med* 203:1153–1159
 14. Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F (2010) Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* 31:270–277
 15. Webster B, Werneke SW, Zafirova B, This S, Coleon S, Decembre E, Paidassi H, Bouvier I, Joubert PE, Duffy D et al (2018) Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *Elife* 7:e34273. <https://doi.org/10.7554/eLife.34273.001>
 16. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E, Chung J et al (2012) Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 12:558–570
 17. Longatti A, Boyd B, Chisari FV (2015) Virion-independent transfer of replication competent HCV RNA between permissive cells. *J Virol* 89:2956–2961
 18. Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q et al (2013) Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13109–13113
 19. Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G (2014) Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog* 10:e1004424
 20. Liu Z, Zhang X, Yu Q, He JJ (2014) Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 455:218–222
 21. Saha B, Kodys K, Adejumo A, Szabo G (2017) Circulating and exosome-packaged hepatitis C single-stranded RNA induce monocyte differentiation via TLR7/8 to polarized macrophages and fibrocytes. *J Immunol* 198:1974–1984
 22. Devhare PB, Sasaki R, Shrivastava S, Di Bisceglie AM, Ray R et al (2017) Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Virol* 91:e02225–e02216
 23. Feng Z, Li Y, McKnight KL, Hensley L, Lanford RE et al (2014) Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest* 125:169–176
 24. Wieland SF, Takahashi K, Boyd B, Whitten-Bauer C, Ngo N et al (2014) Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J Virol* 88:752–757
 25. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P et al (2010) Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7431–7436
 26. Decembre E, Assil S, Hillaire ML, Dejnirattisai W, Mongkolsapaya J et al (2014) Sensing of immature particles produced by dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* 10:e1004434
 27. Bruni D, Chazal M, Sinigaglia L, Chauveau L, Schwartz O et al (2015) Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal* 8:ra25
 28. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J et al (2011) Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog* 7:e1001284
 29. Python S, Gerber M, Suter R, Ruggli N, Summerfield A (2013) Efficient sensing of infected cells in absence of virus particles by plasmacytoid dendritic cells is blocked by the viral ribonuclease E(rns.). *PLoS Pathog* 9:e1003412
 30. Garcia-Nicolas O, Auray G, Sautter CA, Rappe JC, McCullough KC et al (2016) Sensing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected macrophages by plasmacytoid dendritic cells. *Front Microbiol* 7:771
 31. Costa VV, Fagundes CT, da Gloria de Souza D, Teixeira MM (2013) Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol* 182:1950–1961
 32. Tomasello E, Pollet E, Vu Manh TP, Uze G, Dalod M (2014) Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Front Immunol* 5:526

33. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM et al (2007) Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449:919–922
34. Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M et al (2010) Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* 84:10999–11009
35. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K et al (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125:1808–1817
36. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M et al (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791–796
37. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T et al (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9294–9299
38. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL et al (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623–626
39. Zhong J, Gastaminza P, Chung J, Stamataki Z, Isogawa M et al (2006) Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 80:11082–11093
40. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV (2009) The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14046–14051
41. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3 22
42. Boson B, Denolly S, Turlure F, Chamot C, Dreux M et al (2017) Daclatasvir prevents hepatitis C virus Infectivity by blocking transfer of the viral genome to assembly sites. *Gastroenterology* 152:895–907
43. Cho S, Irianto J, Discher DE (2017) Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships. *J Cell Biol* 216:305–315