



HAL
open science

Réponse innée des cellules dendritiques plasmacytoides lors de stimulations rétrovirales (HTLV-1, VIH-1)

Lucie Barblu

► **To cite this version:**

Lucie Barblu. Réponse innée des cellules dendritiques plasmacytoides lors de stimulations rétrovirales (HTLV-1, VIH-1). Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T087 . tel-00648421v2

HAL Id: tel-00648421

<https://theses.hal.science/tel-00648421v2>

Submitted on 18 Dec 2012

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.



**UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11**



Université Paris XI

Faculté de Médecine Paris Sud

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

CNRS UMR 8147 « Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune »

THÈSE présentée par :

Lucie BARBLU

Soutenance : 23 Novembre 2011

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université Paris Sud 11**

Discipline / Spécialité : **Cancérologie/Biologie-Médecine-Santé**

**Réponse Innée des cellules dendritiques plasmacytoïdes lors
de stimulations rétrovirales (HTLV-1, VIH-1)**

COMPOSITION DU JURY

Président du jury : Pr AUCLAIR Christian

Rapporteurs : Dr GOUGEON Marie-Lise
Dr CIMARELLI Andrea

Examineurs : Pr LAMBOTTE Olivier
Dr SCHWARTZ Olivier

Directeur de thèse: Dr HERBEUVAL Jean-Philippe

Remerciements

Ce travail de thèse s'est déroulé au CNRS à l'UMR8147 « Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune » dans le laboratoire de Michel Dy et plus particulièrement au sein de l'équipe du Dr Jean-Philippe HERBEUVAL.

Ces cinq années passées à l'UMR8147 m'ont permis de rencontrer un grand nombre de personnes qui m'ont aidé, écouté, formé, soutenu, orienté et supporté (dans les deux sens !). Je souhaiterai tout d'abord remercier mon directeur de laboratoire Michel Dy pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire en Master 1 et pour nous avoir demandé de tester un été son histamine! Le simple test qui devait durer deux mois s'est finalement prolongé 4 ans et nous réserve encore à ce jour des surprises ! Merci également à Elke Schneider pour m'avoir fourni toutes les molécules inimaginables qui dérivent de l'histamine, pour sa bonne humeur et sa disponibilité ! Je remercie aussi Anne-France Bertron pour ses conseils H₄R ☺ et surtout pour son soutien! Ce projet d'inhibiteurs d'interférons m'a permis de rencontrer une personne qui a joué un rôle important, il s'agit d'Isabelle McCort, chimiste à la Faculté des Saint-Pères. Je remercie Isabelle très chaleureusement pour les discussions que nous partageons et pour me fournir régulièrement ma dose de FFN !! Merci également à Sophie Bombard qui nous a rejoint récemment dans notre « FFN Team » pour nous aider à finaliser ce projet !

Je souhaiterai remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré à l'Hôpital Bicêtre, en particulier Jean-François Delfraissy, Olivier Lambotte, Isabelle, Camille et surtout mon amie Aurelia Lamine. Aurelia, tu as été un véritable soutien ces 3 dernières années, j'ai beaucoup appris à tes côtés et j'aurai adoré que nous travaillions plus ensemble (mais qui sait ce n'est peut-être que partie remise !) et comme nous nous le sommes promis, motus et bouches cousues en ce qui concerne nos microsiestes dans la pièce PCR! Une autre personne a également beaucoup compté lors de cette collaboration. Cette personne m'a soutenu, motivé, fait confiance et fourni en dose de chocolat ! Je pense qu'elle se reconnaîtra...Merci à toi Dr House !

Je souhaiterai également remercier l'équipe de l'ENS à Lyon qui m'a accueilli à bras ouverts une semaine dans son laboratoire ! Merci à Andrea Cimarelli et à Stéphanie Durand avec qui nous avons entamé une très belle collaboration ! Stéphanie, désolée d'avoir assassiné tes belles lignées cellulaires...c'est l'air parisien!!

Merci à mes collègues du bureau des étudiants (Ruddy, Julien, Maud et Pierre) pour la bonne ambiance ! Vous allez enfin pouvoir remonter les volets ...

Je tiens à remercier tout particulièrement l'association Pour les Femmes et la Science présidée par Claudine Hermann, ainsi que les bourses L'Oréal-France en association avec l'Unesco et l'Académie des Sciences. Merci à Hervé Navellou (Directeur Général de L'Oréal Grand Public France), Alain Carpentier (Président de l'Académie des Sciences) et Geneviève Dupont (Directrice de la communication L'Oréal Grand Public France). Recevoir le prix L'Oréal-France a été un véritable honneur et m'a été d'une aide précieuse pour l'élaboration de mon projet professionnel après ma thèse. Ce prix m'a permis de participer à des congrès internationaux et de rencontrer mon futur chef Daniel Kaufmann.

Je souhaite remercier Lucie Sengmanivong à la plateforme d'imagerie Nikon à l'Institut Curie. Merci pour m'avoir toujours trouvé des créneaux disponibles pour que je passe mes lames. Et merci pour nos discussions et les poires bio !!

Je remercie également Olivier Hermine pour m'avoir aidé à préparer mon oral de demande de financement de thèse en 2008 et pour notre collaboration sur le projet HTLV-1.

Je tiens à remercier également tous les membres de mon jury qui ont accepté de participer et de clore cette belle aventure ! Je remercie en particulier mes deux rapporteurs de thèse, Marie-Lise Gougeon et Andrea Cimarelli, pour avoir pris de leur temps et pour m'avoir permis d'améliorer nettement la qualité de mon manuscrit. Je souhaite aussi remercier Muriel Nicoletti qui gère avec une efficacité inégalable notre cursus universitaire (Master 2 et doctorat) à l'Ecole Doctorale de Cancérologie ainsi que l'organisation de notre virée doctorale à Roscoff.

Trois personnes ont beaucoup compté pour moi pendant ma thèse. Je remercie Yves Lepelletier pour son soutien et pour m'avoir transmis ses techniques! Tu m'as été d'une grande aide, tu m'as aidé à surmonter les moments difficiles que tout thésard digne de ce nom rencontre lors de sa thèse et je t'en suis très reconnaissante. Je tiens également à remercier Christophe Gras. Christophe, cela fait 4 ans que nous travaillons ensemble et je pense n'avoir jamais rencontré de personne aussi serviable que toi. Je te dis un grand merci. Tu m'as toujours aidé et pas seulement techniquement ! J'ai été ravie de travailler à tes côtés.

J'aurai beau être de l'autre côté de l'Atlantique, attends toi à recevoir régulièrement des mails de confirmation de dilutions !! Et je suis d'accord avec toi...les cellules ont migré !!!

Enfin, je tiens à remercier mon chef, Jean-Philippe. Lorsque je suis arrivée dans ton équipe, je ne connaissais rien. Tu as toujours répondu présent, tu m'as tout appris et je t'en suis reconnaissante. Tu as été un chef toujours disponible. Je garderais de très bons souvenirs de nos 5 années de collaboration. Je parle de collaboration car tu ne m'as jamais considéré comme une simple « petite main » de laboratoire. Tu m'as permis de faire de belles et nombreuses rencontres professionnelles. Resteront des moments mémorables dont notre vadrouille dans le quartier à la recherche d'un centre EFS qui voudrait bien de nous et cette soirée au Palais de la Découverte qui récompensait notre travail. Il y a bien sûr pleins d'autres souvenirs, mais je devrais rédiger un nouveau pavé de thèse et je t'avoue ne pas en avoir le courage ! Merci aussi pour m'avoir fait rencontrer Daniel. J'espère que tu continueras à transmettre ton savoir et ton énergie aux futurs étudiants et que tes projets se concrétiseront. Un grand merci à The Star.

Je n'oublie pas mes amies, Chouquette, Chaussette, Sandra, Eva, Fatémeh. Merci les filles d'être là. Merci aussi à Benoit, ça y est, je me rapproche, bientôt sur le même continent ! Le plus grand merci revient à mes parents et à mon frère. Cela aura été long et parfois difficile pour vous de me soutenir pendant toutes ces années d'étude. Mais vous allez pouvoir enfin souffler ! J'ai énormément de chance de vous avoir à mes côtés. Merci à vous et aux ratounes.

Résumé

La réponse innée est caractérisée notamment par la production de cytokines antivirales, les interférons-alpha (IFN- α). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules rares (0,5% des leucocytes sanguins) qui ont la capacité de produire jusqu'à 1000 fois plus d'IFN- α que les autres types cellulaires, les plaçant ainsi comme les cellules centrales de la réponse antivirale.

Nous avons montré que les virus libres d'HTLV-1 induisaient une réponse innée se traduisant par une forte production d'IFN- α . L'analyse par microscopie en 3 dimensions (3D) a révélé que les pDC non stimulées étaient dans un état de quiescence avec des taux du ligand pro-apoptotique TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) intracellulaire très élevés, rapidement mobilisés à la surface des pDC après l'activation de la voie du Toll-like receptor 7. Les pDC acquièrent alors un phénotype de cellules tueuses, les IKpDC (Interferon producing killer pDC). C'est la première fois qu'une réponse innée induite par les particules libres d'HTLV-1 a été mise en évidence.

Il a été montré que des taux sériques d'IFN- α apparaissaient dans les phases tardives du SIDA, suggérant un rôle de l'IFN- α dans la pathologie du VIH. Nous émettons l'hypothèse de l'implication de la voie TRAIL/DR5 dans la déplétion massive des LTCD4⁺ des patients infectés par le VIH. Il a été démontré que l'IFN- α produit par les pDC exposées au VIH induit leur transformation en IKpDC et TRAIL à la surface des LTCD4⁺. De plus, la fixation de la gp120 virale à son récepteur cellulaire CD4 induit l'expression membranaire du récepteur de mort DR5 à la surface des LTCD4⁺, conduisant ainsi à leur apoptose.

Les patients « *HIV Controllers* » (HIC) sont des patients infectés par le VIH mais qui contrôlent la charge virale et la mort des LTCD4⁺. Nous avons alors étudié la voie IFN/TRAIL/DR5 chez ces patients. Notre étude n'a décelé aucun défaut quantitatif ni qualitatif des pDC chez les HIC, excluant le rôle des pDC dans le phénomène observé. Néanmoins, notre analyse protéique et génomique de DR5 a révélé un défaut d'expression de DR5 à la surface des LTCD4⁺ des patients HIC par rapport aux patients virémiques. Le séquençage du gène DR5 a révélé l'existence d'une substitution homozygote dans l'exon 1 du gène des HIC. Cette substitution génomique a pour conséquence le changement d'un acide aminé dans la région leader de la protéine DR5 entraînant le non-clivage de cette séquence et la séquestration intracellulaire de DR5. Cette mutation associée au profil des patients HIC pourrait expliquer le maintien du nombre de leurs LTCD4⁺, ainsi que la non-progression vers la phase SIDA.

Summary

Innate immune response is characterized by antiviral cytokines production such as interferon-alpha (IFN- α). Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are very rare cells (0,5% of blood leukocytes) that have the ability to produce more than 1000 time folder IFN- α than others cells types, leading them as main cells of antiviral response.

We demonstrated that HTLV-1 free viruses induced a strong IFN- α production by pDC. The three dimensional (3D) microscopic analysis revealed that unstimulated pDC were in fact dormant cells stocking intracellular proapoptotic ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), which was quickly mobilized at the cell surface of pDC after Toll-like receptor 7 activation. Then, pDC acquire a new killer phenotype, the IKpDC (Interferon producing killer pDC). This is the first demonstration that HTLV-1 free viruses can induce an innate immune response by pDC.

Plasma levels of IFN- α have been found in HIV-1-infected patients, suggesting a role of IFN- α in HIV-associated disease. We hypothesized in our HIV *in vitro* model the implication of TRAIL/DR5 pathway in CD4 T cells massive depletion observed in HIV-1-infected patients. We demonstrated that IFN- α produced by HIV-stimulated pDC induced the expression of TRAIL at the cell surface of pDC (transforming them into IKpDC) and CD4 T cells. Simultaneously, the binding of HIV-1 gp120 to its cellular receptor CD4 induces membrane expression of the TRAIL death receptor 5 (DR5) at the cell surface of CD4 T cells leading to apoptosis of DR5-expressing CD4 T cells.

A population of HIV-infected patients, called « *HIV Controllers* » (HIC), do not progress to AIDS despite HIV infection, control their viral load and their CD4 T cells depletion. We have then study IFN/TRAIL/DR5 pathway of these patients. Our study revealed any quantitative nor qualitative default from HIV-Controllers pDC, excluding a potential role of these cells in the observed phenomem. Nevertheless, our proteomic and genomic analysis revealed a default of DR5 expression at the cell surface of CD4 T cells from HIV controllers in contrast to progressor patients. DNA sequencing revealed a homozygous substitution in the exon 1 of DR5 gene from HIC. The consequence of this substitution is the change of one amino-acid in the leader region of DR5 protein. Thus, DR5 is uncleaved and is sequestrated in the intracellular copartements in CD4 T cells. The lack of DR5 cell surface expression in HIV Controllers may explain the maintain of CD4⁺ T cells count and thus the non progression to AIDS.

Table des matières

Introduction	14
- PARTIE 1 - Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	15
1. Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines	16
2. Caractérisation du phénotype des pDC humaines	18
3. Quelle(s) origine(s) donner aux pDC ?	22
4. Caractéristiques fonctionnelles des pDC.....	24
5. Les pDC et les Toll-like Receptors (TLRs).....	27
5.1. Activation de la voie de signalisation TLR7	27
5.2. Activation de la voie de signalisation TLR9	28
5.3. Autre mécanisme d'internalisation des virus : l'opsonisation	30
6. Les interférons	31
6.1. Les différentes familles d'interférons.....	31
6.2. La régulation de la synthèse et de la réponse à l'interféron.....	33
- PARTIE 2 - Les Virus VIH-1 et HTLV-1	36
1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine.....	37
1.1. La structure génomique du VIH.....	37
1.2. Le VIH-2.....	39
2. Pathologie : le VIH et le système immunitaire.....	40
2.1. Les phases de la maladie.....	40
2.2. L'immunité cellulaire induite par le VIH	42
2.3. Le VIH et l'activation immune chronique.....	43
2.4. Le Yin et le Yang des interférons.....	45
2.5. Sites d'interaction des DC avec le VIH-1.....	48
3. L'étude des patients HIV-Controllers	51
4. Le virus HTLV-1 (Human T cell leukaemia virus Type 1)	53
4.1. La structure du virus.....	53
4.2. Epidémiologie	55
4.3. Etude de la réponse innée dirigée contre HTLV-1.....	56
- PARTIE 3 - La voie apoptotique TRAIL/DR5	59
1. La famille des récepteurs du TNF	61
2. Etude du ligand TRAIL et de ses récepteurs.....	63
2.1. Structure du gène codant TRAIL	63

2.2. Les transcrits de TRAIL	64
2.3. La protéine TRAIL.....	64
3. Les récepteurs de TRAIL	66
3.1. Les récepteurs de mort TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5	66
3.2. Les récepteurs Decoy (DcR) ou « leurres ».....	67
4. TRAIL en cancérologie.....	70
5. TRAIL dans le contexte de l'infection par le VIH	72
5.1. Rôle du ligand TRAIL chez les cellules NK	72
5.2. Rôle de l'interaction TRAIL/DR5 au niveau des pDC	73
5.3. TRAIL dans l'infection des singes par le VIS	76
5.4. Effet de la trithérapie sur la voie TRAIL/DR5 chez les patients/singes infectés par le VIH/VIS	78
Objectifs de la thèse.....	80
Matériels et Méthodes.....	84
Résultats	92
Résultat 1 : Etude de la réponse innée des pDC par le virus HTLV-1	93
Résultat 2 : Etude des pDC chez les patients HIV-Controllers.....	98
Résultat 3 : Etude des LTCD4 ⁺ et de la voie TRAIL/DR5 chez les patients HIV-Controllers	102
Résultat 4 : Etude d'inhibiteurs de la production d'IFN- α et de l'activation des pDC.....	106
Discussion	117
Bibliographie	132

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APRIL	A PRoliferation-Inducing Ligand
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAFF	B cell Activating Factor
CB	Clobenpropit
CCL	CC chemokine Ligand
CCR	CC chemokine Receptor
CD	Cluster de Differentiation
DC	Dendritic Cells
DR5	Death receptor 5
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EFS	Etablissement français du sang
FFN511	Fluorescent False Neurotransmitter
HA	Histamine
HD	Healthy donors (Donneurs sains)
HEV	High Endothelium Venule
HIC	HIV-1 Controllers patients
HTLV-1	Human T cell leukaemia virus type 1
IFN- α /b	Interferon-alpha/beta
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LTCD4	Lymphocyte T CD4
LPS	Lipopolysaccharide

mDC	Myeloid dendritic cells
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Plasmacytoid dendritic cells
RT	Reverse Transcriptase
SIDA	Syndrôme d'Immunodéficience Acquise
SEM	Standard Error of the Mean
TCR	T-Cell Receptor
TGF	Tumor Growth Factor
TLR	Toll-like receptor
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIR	Patients virémiques
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne

Liste des figures

Figure 1 : Expression des marqueurs caractéristiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	19
Figure 2 : Cytokines et chimiokines produites par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	19
Figure 3 : Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes en cytométrie en flux.	20
Figure 4: Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	23
Figure 5 : Les pDC font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.....	26
Figure 6: Activation de la voie TLR7 par les pDC stimulées par le VIH.....	28
Figure 7: Activation des voies TLR7 et TLR9 par les pDC stimulées respectivement par les virus à ARN et ADN. D'après Akira, Proc. Jpn. Acad., 2009.	29
Figure 8: Activation des récepteurs des interférons de type I, II et III.....	33
Figure 9: Schéma représentant la régulation de la réponse interféron.....	34
Figure 10: Activation de la transcription des ISGs par les interférons.	35
Figure 11: Représentation schématique d'une coupe du virion du VIH.	38
Figure 12: Organisation des neuf gènes du VIH.....	38
Figure 13: Relation entre l'activation immune induite par le VIH, l'apoptose des cellules T et la progression vers le SIDA.	41
Figure 14: Réponses immunitaires précoces détectées après la transmission du VIH-1 .	43
Figure 15: Représentation schématique de l'activation immune chronique et de la dérégulation des réponses innées et adaptatives lors de l'infection par le VIH.	44
Figure 16 : Rôle des pDC et des interférons dans des maladies humaines.	46
Figure 17: Le rôle des pDC et de l'interféron dans l'infection par le VIH.....	48
Figure 18: Sites d'interaction des cellules dendritiques avec le VIH dans différents organes.....	50
Figure 19: Structure génomique du virus HTLV-1.....	54
Figure 20: Modèle de l'histoire naturelle de l'infection par HTLV-1 et de la physiopathologie de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL).....	55
Figure 21: Régions les plus touchées par le virus HTLV-1 dans le monde.....	56
Figure 22: Modèle représentant le complexe multimoléculaire du récepteur à HTLV-1 pour expliquer l'entrée du virus dans les cellules.....	57

Figure 23: Différents modes d'induction de l'apoptose.....	60
Figure 24: Représentation des ligands de la superfamille du TNF et de leurs récepteurs.	61
Figure 25 : Organisation du gène de TRAIL (Apo2L)..	63
Figure 26 : Cristallisation du complexe formé par TRAIL et DR5.....	67
Figure 27: Modèle représentant l'activation de la voie apoptotique par TRAIL.....	68
Figure 28: Modèle d'étude <i>in vitro</i> de la mort massive des LTCD4⁺ chez les patients VIH.	74
Figure 29: Mise en évidence d'une proximité entre les pDC TRAIL⁺ et les LTCD4⁺ en apoptose dans les amygdales de patients virémiques, en comparaison avec des amygdales de donneurs sains.	76
Figure 30: Modèle African Green Monkey (AGM) versus Rhesus Macaque (RM).....	77
Figure 31: Schéma expliquant les différences entre les modèles simiens sensibles (Rhésus macaques, RM) et résistants (African Green Monkey (AGM), et Sooty mangabey (SM)) au SIDA.....	78
Figure 32 : Comparaison de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) des donneurs sains, patients virémiques (VIR) et HIV-Controllers (HIC).	101

Liste des annexes

Annexe 1 - Liste des communications scientifiques.....	157
--	-----

Introduction

- PARTIE 1 -

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

1. Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines

Les premières cellules dendritiques ont été identifiées par Langerhans en 1968. Les cellules dendritiques (DC, dendritic cells) conventionnelles ont été décrites et caractérisées par Ralph Steinman. Les DC sont connues pour être des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et jouent un rôle primordial dans le contrôle de la réponse immunitaire (Banchereau and Steinman, 1998).

Chez l'homme, deux familles caractérisent les DC: les DC myéloïdes et les DC plasmacytoïdes. Les DC myéloïdes ont également été nommées DC1 pour leur capacité à induire une réponse immune de type 1 (Th1). A l'inverse, les DC plasmacytoïdes ont été nommées DC2 pour leur capacité à induire une réponse de type 2 (Th2) (Liu, 2005).

Notre étude sur les cellules dendritiques sera exclusivement consacrée aux DC plasmacytoïdes humaines (pDC).

La première étude des pDC remonte à un demi-siècle, dans laquelle Isaacs et Lindenmann décrivaient l'interféron (Isaacs, 1957). Les auteurs étudiaient *in vitro* le phénomène d'interférence virale, dans lequel un virus est capable de bloquer l'infection d'un deuxième virus, lorsque ces deux derniers sont cultivés en même temps. Cette interférence virale résultait de la production d'une cytokine qui conférait une résistance à l'infection virale : l'interféron. La découverte de l'interféron fut le point de départ d'une longue série de travaux sur le type de cellules capables de produire cette cytokine. Dans la littérature, différents noms ont été attribués pour définir ces cellules.

En 1958, Lennert et al décrivent une cellule de taille moyenne dont la morphologie plasmacytoïde évoque alors une origine plasmocytaire. En fonction de leur localisation (organes lymphoïdes) et de leurs marqueurs membranaires (comme CD68), certains auteurs nommeront respectivement ces cellules « cellules T plasmacytoïdes » (Facchetti et al., 1988) ou « monocytes plasmacytoïdes » (Cella et al., 1999).

Le terme cellules dendritiques plasmacytoïdes apparaît en 1997, lorsque Liu et al nomment ces cellules DC2 (dendritic cells 2) du fait de leur état de maturation et l'orientation Th2 qu'elles confèrent en présence d'IL-3 et de CD40 ligand (CD40L) (Liu, 2005). (Grouard et

al., 1997). Cependant, il sera montré plus tard que ces cellules diffèrent des cellules dendritiques classiques, qui, elles, ne produisent pas d'IFN- α (Chehimi et al., 1989).

En 1999, Siegal démontre que les NIPC (natural IFN producing cells), ces cellules sanguines qui expriment le marqueur CD4 et les molécules HLA de classe II, et qui représentent les principales cellules productrices d'interféron-alpha en réponse à une stimulation virale, appartiennent à la population des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Siegal et al., 1999).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui représentent seulement 0,4-0,6% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, peripheral blood mononuclear cells), ont la capacité de produire de grandes quantités d'interférons de type I, à des taux 100 à 1000 fois supérieurs à ceux des autres types cellulaires (Ronnlom et al., 1983).

2. Caractérisation du phénotype des pDC humaines

➤ Morphologie des pDC

Les pDC possèdent une morphologie particulière qui se traduit par une taille de 8 à 10µm et un noyau excentré. Les pDC possèdent un cytoplasme défini par un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi très développé. Cette caractéristique suggère que les pDC possèdent une importante propriété de sécrétion (Grouard et al., 1997). En visualisant les cellules en culture au microscope, on remarque que les pDC non stimulées sont rondes, alors que leur forme sous stimulation virale est allongée et forme des amas.

➤ Phénotype des pDC

Depuis cette dernière décennie, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation du phénotype des pDC. Il a été montré que les pDC n'expriment ni les marqueurs de la lignée B (CD19⁻, CD20⁻, CD22⁻), ni ceux des cellules NK (CD16⁻, CD56⁻, CD57⁻), ni les marqueurs T (CD3⁻, CD8⁻, TcR⁻, CD7⁻ et CD2⁻), ni ceux des monocytes (CD14⁻, CD64⁻, CD11b⁻, CD15⁻) et ni les marqueurs myéloïdes (CD13⁻, CD16⁻, CD33⁻, CD35⁻) ou encore des cellules de Langerhans (CD1a⁻) (Grouard et al., 1997; Risoan et al., 1999). Le phénotype des pDC diffère entre les espèces. En effet, contrairement aux pDC murines, les pDC humaines n'expriment pas le CD11c et expriment très faiblement le récepteur au GM-CSF (Asselin-Paturel et al., 2001; Bjorck, 2001).

A l'inverse, les pDC humaines sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD4, CD45RA, HLADR, CXCR4, CCR5 et CD123 (récepteur à l'IL-3) dont le ligand IL-3 est un facteur de survie des pDC (Grouard et al., 1997). Les pDC sont également ILT3⁺. Les récepteurs ILT (Immunoglobulin like transcripts) appartiennent à la famille des immunoglobulines et sont impliqués dans les mécanismes de surveillance immune (Figure 1 et Figure 2).

Les pDC sont des cellules rares (0,5% des leucocytes sanguins) mais elles ont cependant la capacité de produire jusqu'à 1000 fois plus d'IFN-α que les autres types cellulaires après stimulation virale. Ceci les place comme les cellules centrales de la réponse innée antivirale (Figure 2) (Siegal et al., 1999).

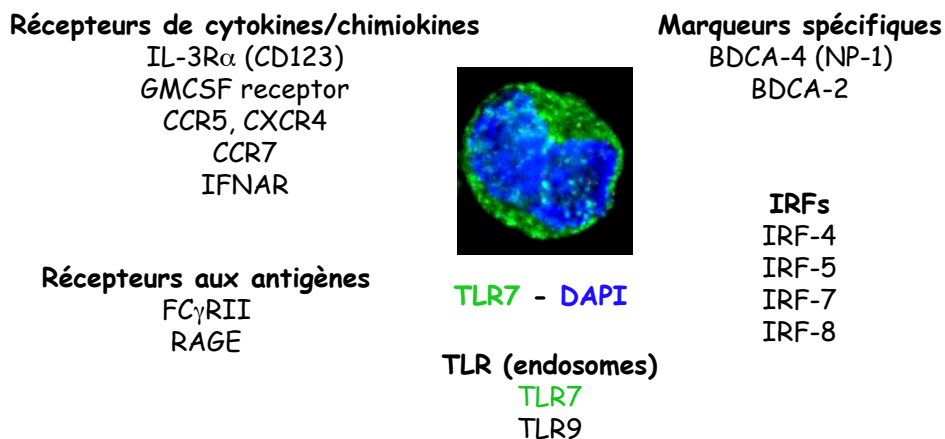


Figure 1 : Expression des marqueurs caractéristiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

Les pDC expriment également des molécules d'adhérence, telles CD11a, CD18, CD31, CD44, CD49e et CD54. De plus, les stimulations virales ou bactériennes induisent l'expression des marqueurs d'activation (CD40, TRAIL) et de maturation (CD80, CD83, CD86) ainsi que le marqueur de migration CCR7 à la surface des pDC (Forster et al., 1999) (Herbeuval, 2007).

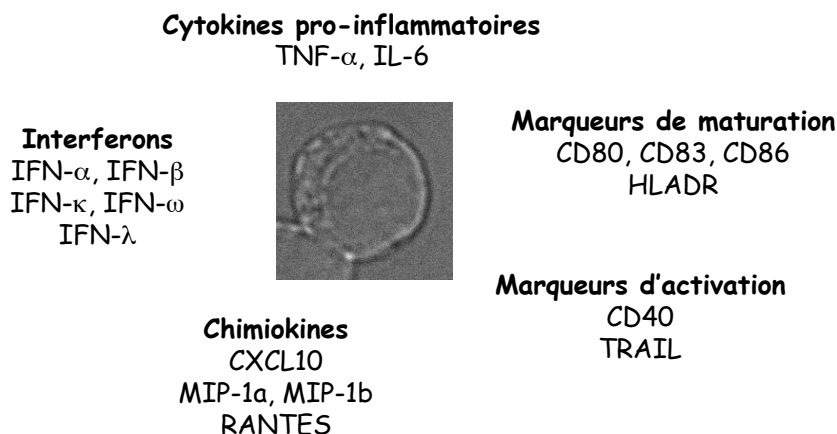


Figure 2 : Cytokines et chimiokines produites par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

➤ Marqueurs caractéristiques des pDC

Deux marqueurs spécifiques caractérisent les pDC, il s'agit des marqueurs BDCA-2 et BDCA-4 (Dzionek et al., 2000). L'identification de ces marqueurs a ainsi permis une caractérisation précise des pDC notamment pour les études en cytométrie en flux. BDCA-2 est une lectine C de type II qui joue un rôle dans l'internalisation des antigènes. Ce marqueur spécifique des pDC n'est pas exprimé par les lymphocytes B, T, les cellules NK ou les mDC. Il faut cependant souligner une régulation négative de BDCA-2 à la surface des pDC lorsque ces dernières sont stimulées par un virus (ici, dans nos études HTLV-1 ou VIH-1). BDCA-4, plus connu également sous le nom de neuropilin-1 (NP-1), est un récepteur neuronal appartenant à la classe des sémaphorines 3. BDCA-4 joue un rôle dans l'angiogenèse en étant le récepteur de facteurs de croissance de la famille des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). À la différence des mDC, les pDC n'expriment ni BDCA-1, ni BDCA-3 (Figure 3).

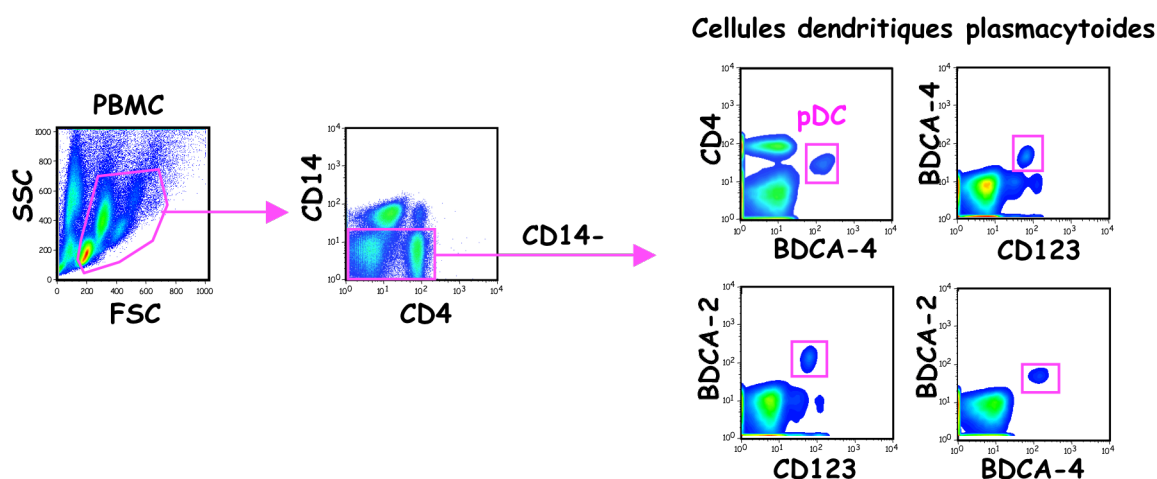


Figure 3 : Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes en cytométrie en flux.

➤ Localisation des pDC

Les pDC immatures sont présentes dans le sang (Grouard et al., 1997), la moëlle osseuse (Blom et al., 2000), le thymus (Marquez et al., 1998) et les organes lymphoïdes secondaires (Asselin-Paturel et al., 2003). Dans les ganglions, les pDC se localisent dans les zones T paracorticales.

Après stimulation par un virus, les pDC ont la capacité de migrer vers la peau, le liquide céphalorachidien, le liquide synovial, l'intestin, les muqueuses vaginales ou encore les poumons (Fitzgerald-Bocarsly, 2002). Les pDC sont également présentes dans le sang de cordon et le thymus (Marquez et al., 1998).

➤ **Génération des pDC *in vitro***

L'obtention de pDC *in vitro* est rendue possible après culture des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ d'origine médullaire, sanguine ou isolés de foie fœtal en présence de ligand FLT3 (FLT3-L) (Blom et al., 2000). FLT3 est un facteur de croissance hématopoïétique. Les pDC sont récupérées après 2 à 3 semaines de culture (Brawand et al., 2002).

Récemment il a été montré que le GM-CSF, facteur de croissance classiquement associé au développement des monocytes et des macrophages, pouvait induire la différenciation de pDC, indépendamment de FLT3-L (Fancke et al., 2008).

De plus, l'IL-3 est la cytokine indispensable à la survie des pDC et à leur maturation. La présence de virus permet aussi leur maintien et leur activation en culture. Sans ces facteurs, les pDC meurent rapidement par apoptose (Gibson et al., 2002).

3. Quelle(s) origine(s) donner aux pDC ?

L'origine lymphoïde ou myéloïde des pDC reste encore largement débattue. En effet, plusieurs études restent contradictoires. Certaines d'entre elles ont suggéré que les pDC étaient issues d'un progéniteur pluripotent lymphoïde (thymus et moelle osseuse) responsable de la formation des cellules lymphoïdes dont les lymphocytes T, B, NK et les pDC. Ce même progéniteur n'interviendrait pas dans la génération des cellules hématopoïétiques telles les érythroïdes, les mégacaryocytaires et les cellules myéloïdes. L'existence d'un progéniteur précoce CD34⁺ qui génère les précurseurs sanguins des pDC (pre-DC2) a également été décrit par Liu et Coll (Liu, 2005).

➤ Une origine lymphoïde

Les arguments suggérant une origine lymphoïde des pDC reposent entre autres sur le fait que le GM-CSF n'est pas indispensable pour la culture des progéniteurs lymphoïdes alors que l'IL-3, quant à lui, l'est (Gibson et al., 2002). Un autre argument est l'expression de CD2, CD7 et CD5, connus pour être des marqueurs lymphoïdes T, par les pDC issues du thymus. Enfin, de nombreux transcrits associés aux lignées lymphoïdes T, B et NK appuient le lien reliant les pDC aux lignées lymphoïdes.

➤ Une origine myéloïde

En opposition, différents arguments soulèvent une origine myéloïde, notamment l'expression des marqueurs CD36 et CD68, liés tous deux à la lignée myélomonocytaire, mais aussi l'expression du marqueur ILT3 qui est restreint à la lignée myéloïde comprenant les monocytes, macrophages et mDC. Canque et Gluckman ont développé une hypothèse suggérant une certaine plasticité concernant l'origine des pDC (Canque et al., 1997). En effet, les pDC seraient générées à la fois à partir de progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (Figure 4).

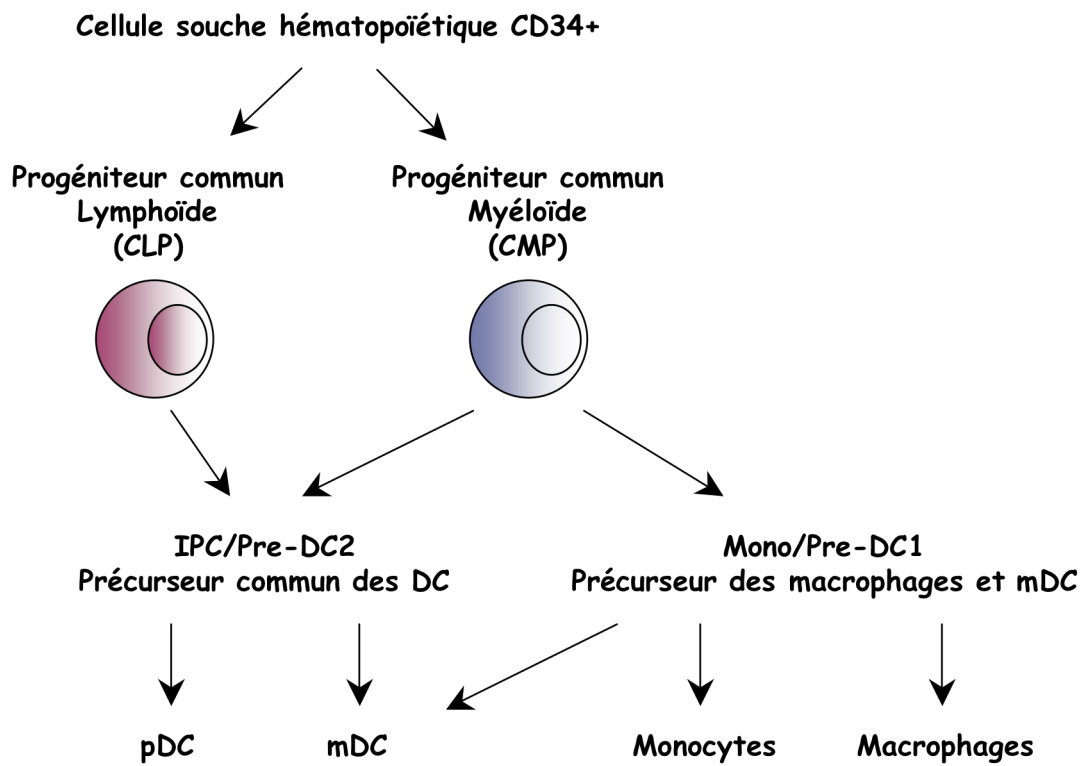


Figure 4: Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

4. Caractéristiques fonctionnelles des pDC

Les deux rôles fondamentaux des pDC sont d'induire d'une part une réponse directe antivirale associée à la production d'IFN- α et d'autre part la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Ainsi, les pDC induisent au travers de leur production d'IFN- α une réponse immunitaire protectrice en activant les DC, les cellules T, B et les cellules NK. Une fois activées, les pDC se différencient en DC et contribuent au développement de la réponse des cellules T (Figure 5).

➤ pDC et tolérance

Les pDC immatures sont incapables d'induire la prolifération des cellules T naïves (Krug et al., 2003) mais expriment constitutivement le ligand de costimulation ICOS-L contribuant à la survie, à l'expansion et à la production d'IL-10 des cellules T régulatrices FoxP3⁺ (ICOS⁺) (Gilliet and Liu, 2002; Ito et al., 2007). La polarisation des cellules T naïves en Treg dépend principalement de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Il a été montré que les pDC produisaient de l'IDO (Fallarino et al., 2007). Les pDC immatures suppriment les réponses inflammatoires aux allergènes (de Heer et al., 2004), inhibent la maladie du greffon versus hôte (Hadeiba et al., 2008) et contribuent à la tolérance des greffes solides en induisant les cellules T régulatrices (Ochando et al., 2006).

➤ pDC en tant que cellule présentatrice d'antigène (CPA)

Plusieurs études ont montré la capacité des pDC à présenter efficacement des antigènes endogènes dérivés de virus infectant les pDC comme le virus de la grippe (Fonteneau et al., 2003). Cependant, les pDC ont une capacité très faible à présenter des antigènes exogènes. Cela peut s'expliquer par le fait que les pDC ne sont pas capables de capturer les antigènes exogènes par phagocytose ou macropinocytose (Cella et al., 1999; Grouard et al., 1997; Niessner et al., 2006) et aussi que les pDC ne sont pas capables d'accumuler les complexes CMH-II à la surface cellulaire (LeibundGut-Landmann et al., 2004).

➤ **pDC et différenciation des cellules T**

Les pDC ont la capacité de capter et présenter des antigènes viraux et induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les pDC établissent ainsi une réponse antivirale adaptative (Fonteneau et al., 2004).

L'orientation des lymphocytes vers un profil Th1 ou Th2 reflète des signaux de maturation et de l'environnement dans lesquels se trouvent les pDC. Ainsi, les pDC activées par la voie des Toll-like receptors (TLR7/9) produisent des IFN- α et TNF- α et se différencient en DC matures qui vont permettre aux cellules T naives de produire des IFN- γ et de l'IL-10 (Kadowaki et al., 2000), induisant ainsi un profil de réponse Th1. Dans un autre cas de figure, les pDC humaines peuvent aussi devenir des DC matures en présence d'IL-3 et de CD40L. Cependant les pDC ne produisent pas d'IFN- α sous IL-3 et CD40L, mais expriment la molécule de co-stimulation OX40L qui entraîne l'activation des lymphocytes T vers un profil Th2 avec la production d'IL-4, IL-5 et IL-10 (Grouard et al., 1997).

➤ **pDC et différenciation des cellules B**

Les pDC interagissent également avec les lymphocytes B. Les pDC activées produisent des IFN de type I et de l'IL-6 qui vont contribuer à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (Jego et al., 2003). Une étude a également montré que les pDC augmentent la réponse des Ac aux Ag solubles, engendrant le développement d'une mémoire immunologique (Le Bon et al., 2001).

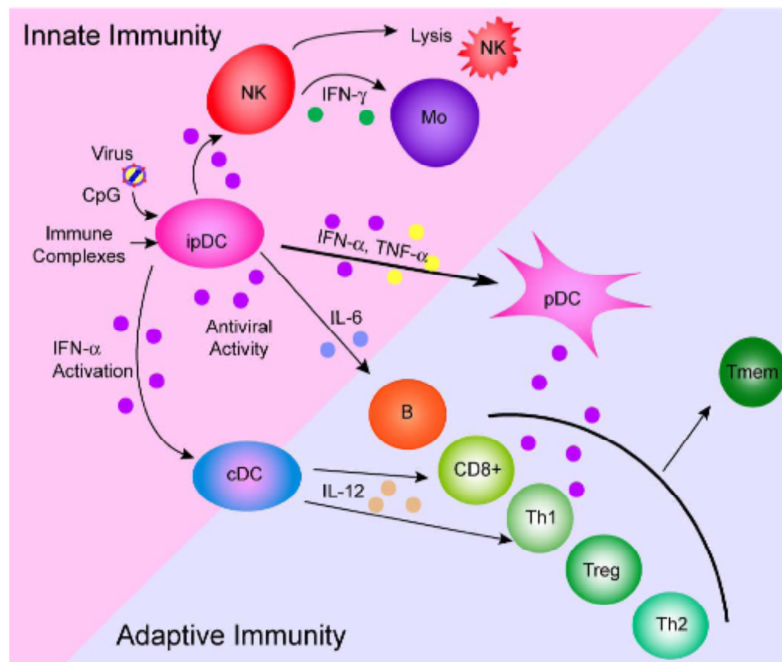


Figure 5 : Les pDC font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Les pDC répondent aux différents pathogènes (virus, CpG, complexes immuns contenant de l'ADN ou l'ARN) en produisant de grandes quantités d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires. Les pDC activées ensuite d'autres cellules de la réponse innée (les cellules NK, monocytes, DC myéloïdes). Les pDC activées ($CCR7^+$) migrent du sang vers les organes lymphoïdes secondaires, expriment les molécules de co-stimulation et présentent les antigènes aux cellules T CD4, T CD8 ou T reg. Selon la nature du stimulus, les pDC orientent un profil Th1 (en réponse aux virus) ou Th2. Les pDC sont également impliquées dans la maturation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et dans l'établissement d'une réponse mémoire (D'après *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 February; 19(1):3-19.Fitzgerald-Bocarsly).

Ainsi, les pDC ont des actions très diversifiées. Les pDC jouent un rôle dans l'établissement de la tolérance, développent une réponse innée en réponse à des stimulations virales et bactériennes. Les pDC font le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative en tant que cellule présentatrice d'antigène et orientent les réponses des cellules T effectrices.

5. Les pDC et les Toll-like Receptors (TLRs)

Les pDC possèdent un panel d'expression de PRR (Pattern recognition receptor) très varié qui leur permet de répondre à divers pathogènes. Plus précisément, les pDC sont capables de reconnaître les acides nucléiques viraux par l'intermédiaire des toll-like receptors (TLRs) TLR7 (spécifique de l'ARN simple brin) et TLR9 (spécifique de l'ADN et lysats bactériens). Les pDC expriment en effet de manière constitutive les récepteurs endosomaux TLR7 et TLR9 (Kadowaki et al., 2001). Cependant, le profil d'expression des pDC est restreint aux TLR7 et TLR9. En effet, les pDC humaines n'expriment pas tous les TLR et ne répondent pas au Lipopolysaccharide (LPS) ou au Poly I:C qui se fixent respectivement sur les TLR4 et TLR3.

Il faut noter que l'infection virale productive n'est pas nécessaire pour obtenir une réponse IFN des pDC. En effet, le virus Herpès simplex de type 1 inactivé par les ultra-violets (UV-inactivated HSV-1), le virus inactivé de la grippe par les UV ou la chaleur, ou encore le VIH inactivé par l'aldrithiol-2 (AT-2-inactivated HIV) sont tous capables d'induire la production d'IFN- α par les pDC (Beignon et al., 2005b; Siegal et al., 1999) et d'activer la voie des TLRs

5.1. Activation de la voie de signalisation TLR7

Pour qu'il y ait pénétration du virus dans la cellule, la fusion entre les membranes du virus et de la cellule nécessite une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale et son récepteur.

TLR7 (et TLR9) étant des récepteurs présents dans la cellule au niveau des endosomes et non à la surface des pDC, l'activation des TLR7 nécessite au préalable l'activation de la voie d'endocytose (Honda et al., 2005; Leifer et al., 2004; Yasuda et al., 2005). Dans le cas du VIH, l'entrée du virus dans les cellules cibles requiert l'expression du récepteur spécifique du VIH, en l'occurrence CD4. Le VIH pénètre dans la cellule. L'acidification des endosomes entraîne la dégradation des protéines de l'enveloppe virale par les protéases et la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. Les ARN viraux se fixent alors sur les TLR7 et activent les pDC. L'une des preuves apportées est que les particules du VIH dépourvues de leur ARN ne peuvent pas stimuler les pDC (Hardy et al., 2007).

L'induction d'IFN- α et des autres cytokines (TNF- α , IL-6) nécessite le recrutement de plusieurs molécules adaptatrices dont MyD88. Ce complexe est également formé des molécules TRAF6 (ubiquitin ligase TNF receptor-associated factor 6), d'IRAK-4 et IRAK-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase) et se nomme CTPP (cytoplasmic transductional-transcriptional processor) (Honda et al., 2004). IRAK-4 phosphoryle IRAK-1, qui, en retour, phosphoryle IRF-7 et permet la translocation d'IRF-7 dans le noyau entraînant ainsi l'expression des gènes d'IFN- α (Sato et al., 2000) (Figure 6 et 7).

IRF-7 est considéré comme étant le régulateur principal des voies d'induction d'IFN via TLR-7 et TLR-9. Notons que des souris déficientes pour IRF-7 (IRF-7^{-/-}) ne sont pas capables de produire d'IFN- α mais sont capables par contre d'induire les cytokines pro-inflammatoires, démontrant ainsi la spécificité de l'IFN dans la voie IRF-7 (Honda et al., 2005).

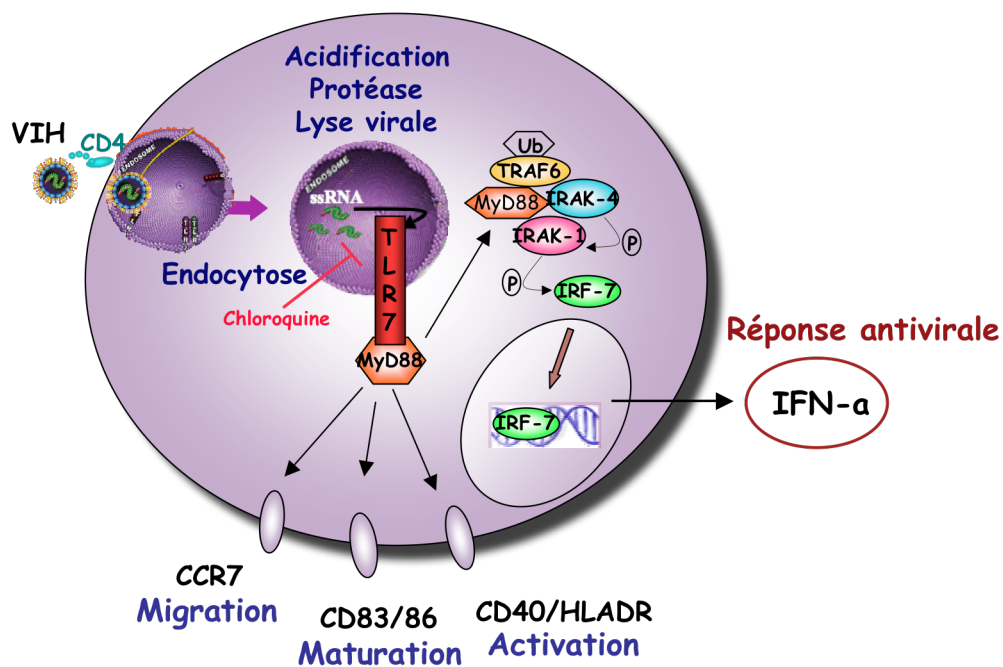


Figure 6: Activation de la voie TLR7 par les pDC stimulées par le VIH.

5.2. Activation de la voie de signalisation TLR9

L'ADN bactérien présente la capacité de stimuler le système immunitaire des mammifères.

Cela dépend de la présence de dinucléotides CG non méthylés dans leur ADN (motifs CpG) qui sont alors reconnus comme différents de l'ADN des mammifères (peu de motifs CpG et méthylés) (Hemmi et al., 2000). Ces motifs CpG sont reconnus par les TLR9. Des oligodésoxynucléotides synthétiques sont utilisés (CpG-ODN) pour mimer l'effet de l'ADN bactérien (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Il existe trois types de CpG-ODN :

- 1) les CpG de type A (CpG-A) induisent une forte sécrétion d'IFN- α par les pDC.
- 2) les CpG de type B (CpG-B) induisent des quantités faibles d'IFN- α qui favorisent la survie et la maturation des pDC.
- 3) les CpG de type C (CpG-C) combinent les effets des deux premiers groupes (CpG-A et CpG-B) (Vollmer J, Eur J Immunol 2004).

La nature de la réponse des pDC à l'activation du TLR9 dépendrait du compartiment intracellulaire dans lequel a lieu l'interaction CpG/TLR9. En effet, la fixation du CpG-A avec le TLR9 s'effectue dans les endosomes Transferrine (TfR⁺) mais pas dans les compartiments endosomaux LAMP-1⁺ (Lysosome-associated membrane protein), contrairement au CpG-B qui co-localisent avec les compartiments endosomaux LAMP-1⁺ (Guiducci et al., 2006).

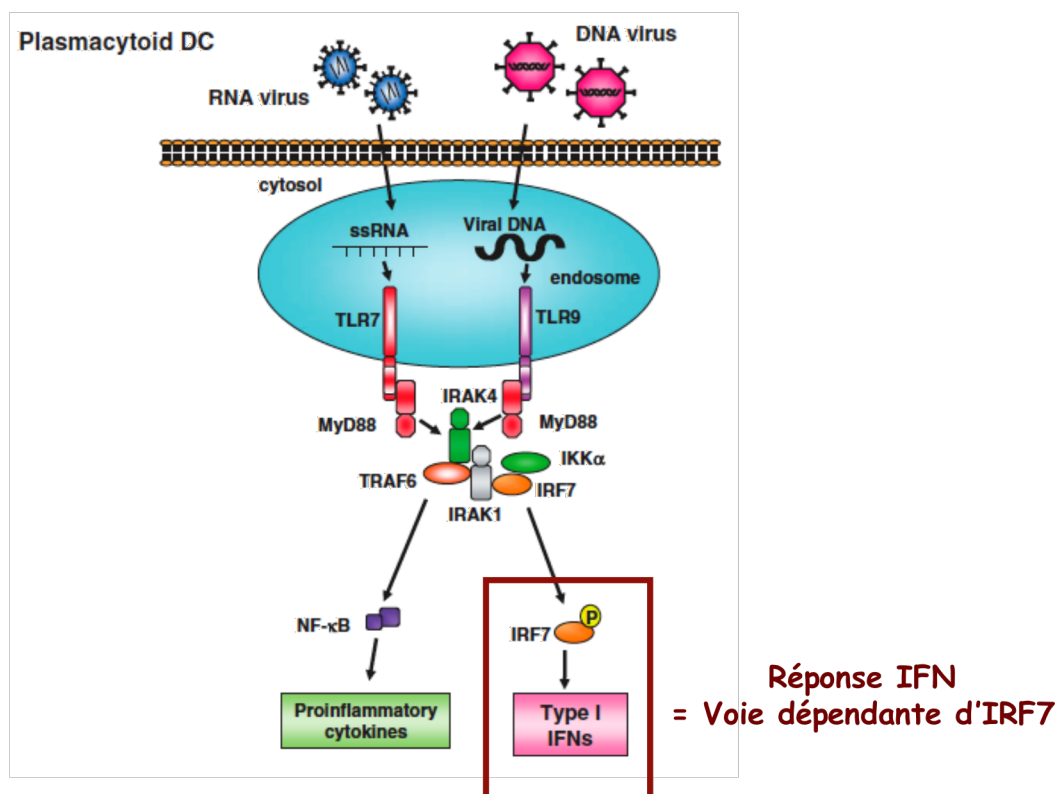


Figure 7: Activation des voies TLR7 et TLR9 par les pDC stimulées respectivement par les virus à ARN et ADN. D'après Akira, Proc. Jpn. Acad., 2009.

Aussi, certains virus comme le virus Herpes simplex contiennent aussi des motifs CpG capables de stimuler les pDC à produire de l'IFN- α *via* le TLR9 (Lund et al., 2003).

5.3. Autre mécanisme d'internalisation des virus : l'opsonisation

Les cellules expriment à leur membrane de nombreuses molécules permettant la fixation de particules étrangères dont les récepteurs pour les IgG (FcR). Les virus (enveloppés et non enveloppés) opsonisés par les anticorps peuvent utiliser ces FcR pour se fixer à la membrane de ces cellules.

Par définition, l'opsonisation est un processus dans lequel les agents pathogènes sont recouverts d'une substance appelée une opsonine, marquant l'agent pathogène pour sa reconnaissance par le système immunitaire. Plusieurs protéines peuvent agir comme des opsonines, par exemple, les anticorps IgG et IgA. IgG est active dans le sang et les tissus, et IgA est active dans les muqueuses telles les voies aériennes, le système urogénital et le tube digestif. Les pDC répondent aux virus à ADN et ARN en produisant de l'IFN- α . Dans le cas de la polio, un virus non-enveloppé, les récepteurs Fc γ RII présents à la surface des pDC vont permettre l'opsonisation du virus et faciliter sa présentation dans les compartiments endosomaux. Par ce mécanisme, les virus n'ont pas besoin d'être reconnus par leurs récepteurs spécifiques et peuvent activer les cellules (Palmer et al., 2000).

6. Les interférons

Découvert il y a environ 50 ans, les interférons (IFN) représentent la ligne de défense de l'immunité innée mise en place par le système immunitaire en réponse aux infections virales ou bactériennes. Les interférons ont également d'autres effets, dont la capacité à induire la différenciation cellulaire, inhiber la prolifération de certains types cellulaires, inhiber l'angiogenèse et participer à différents rôles immunorégulateurs (Figure 8).

Les pDC représentent les cellules majeures productrices d'IFN. Elles ont la capacité de produire des taux élevés d'IFN- α aussi bien en réponse aux virus à ARN ou ADN qu'aux ligands synthétiques TLR7 et TLR9. De plus, la production autocrine d'IFN- α par les pDC est également connue pour être un facteur de survie et parfois un facteur de maturation *in vitro* (Ito et al., 2001), nécessaire également pour l'activation et la migration des pDC *in vivo* (Asselin-Paturel et al., 2005).

6.1. Les différentes familles d'interférons

➤ Les interférons de type I

Il existe trois familles d'interférons (IFN), les IFN de type I, II et III. La famille des interférons de type I comporte 13 gènes IFN-alpha (IFN- α), un gène IFN-beta (IFN- β), un gène IFN-kappa (IFN- κ) codant une protéine préférentiellement exprimée dans la peau, un gène IFN- ϵ exprimé dans le placenta et les membranes du fœtus et un IFN- ω (Woelk et al., 2007).

Les IFN de type I ont un rôle central dans l'activité anti-virale et signalisent via le même récepteur. Il existe différents sous-types d'IFN- α , dont l'IFN- α 1, abondamment produit par les pDC, qui présente une faible activité anti-virale et semble avoir un rôle plus important au niveau de l'immunomodulation. Notons que l'IFN- β est produit en plus faible quantité par rapport à l'IFN- α (Izaguirre et al., 2003).

Il a longtemps été établi que les IFN- α et les IFN- β étaient respectivement produits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les fibroblastes, mais en réalité plusieurs cellules peuvent produire les deux types d'IFN. La nature de la production des IFN va essentiellement dépendre du contexte dans lequel se trouvent les cellules et aussi leur localisation.

L'IFN- β est majoritairement produit par les cellules synoviales et les kératinocytes, mais aussi les cellules stromales, et plus faiblement par les cellules dérivées des monocytes. Les pDC activées sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaires et au niveau des sites d'inflammation. Les pDC étant des cellules circulantes, la production d'IFN- α est systémique. Ainsi les deux points majeurs expliquant les différences fonctionnelles entre les IFN type I sont les lieux distincts de production des IFN- α et IFN- β (plus local pour les IFN- β et systémique dans le cas des IFN- α) et l'affinité des IFN avec leur récepteur. La complexité des IFN- α et IFN- β dans les défenses de l'hôte et la régulation du système immunitaire réside sur le fait que ces cytokines peuvent aussi bien jouer un rôle protecteur que pathogénique, ceux-ci étant dépendants du site de production et d'action des IFN et du contexte de la maladie.

➤ **Les interférons de type II et III**

La famille des interférons de type II est représentée par l'interféron gamma (IFN- γ) qui est produit par les lymphocytes T activés.

Les interférons de type III sont codés par trois gènes lambda (IFN- λ), IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28a) et IFN- λ 3 (IL-28b). Les IFN de type III sont exprimés sur un chromosome différents des IFN de type I et signalisent à travers un autre récepteur qui partage une des chaînes du récepteur de l'IL-10 (IL-10R2) (Kotenko et al., 2003).

➤ **Les récepteurs des interférons**

Chaque groupe d'IFN interagit avec leurs propres récepteurs. Les interférons de Type I interagissent avec les récepteurs IFNAR1 et IFNAR2. Les interférons de type II interagissent avec les récepteurs IFNGR1 et IFNGR2. Et les interférons de type III interagissent avec le récepteur IFNLR1 et l'IL-10R2. Ces récepteurs s'associent à deux kinases de la famille JAK (JAK1 et TYK2 pour les interférons de type I et III ; JAK1 et JAK2 pour les interférons de type II). (Borden et al., 2007) (Figure 8).

La différence entre les quantités d'IFN de type I et III produites par les pDC résulte du niveau d'expression des récepteurs associés. En effet, les IFNAR sont exprimés sur plusieurs types cellulaires contrairement au récepteur IFN- λ qui est exprimé par les pDC mais pas par les monocytes du sang périphérique.

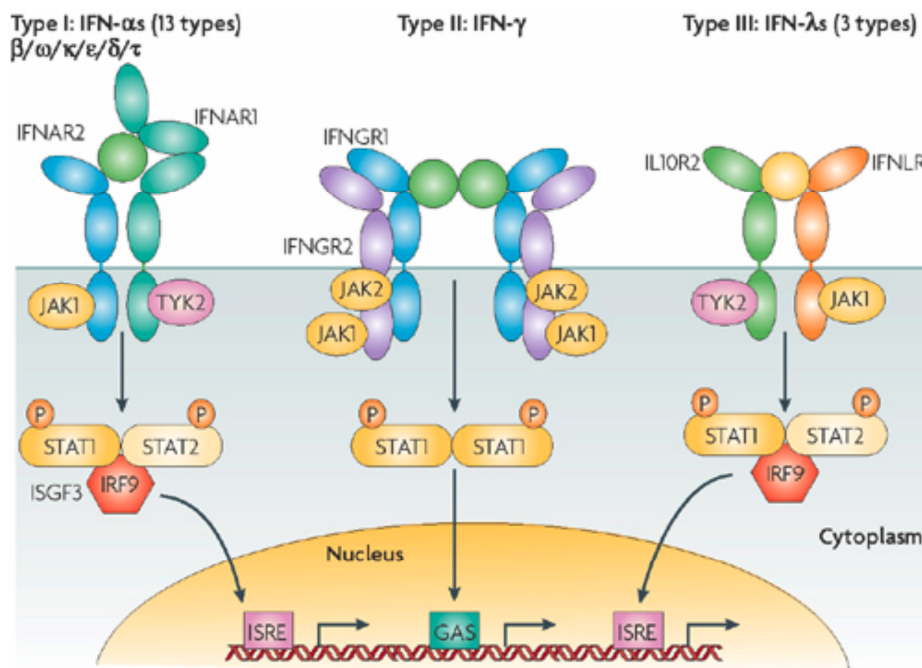


Figure 8: Activation des récepteurs des interférons de type I, II et III.

D'après Borden, Nature Reviews Drug Discovery 6, 975-990 (December 2007).

6.2. La régulation de la synthèse et de la réponse à l'interféron

L'IFN n'est pas produit de façon constitutive. La production des interférons est inducible et se fait toujours en réponse à une stimulation (virale ou bactérienne). La réponse IFN se compose de deux phases, une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce se traduit par l'activation de la voie des récepteurs Toll-like (TLR) résultant en la production de cytokines une fois que les pathogènes ont été reconnus par les TLR. La phase tardive correspond à l'activation des gènes stimulés par l'IFN (IFN-stimulated genes, ISGs) via les IFNAR et l'induction de la voie de signalisation des JAK/STAT (Figure 8 et 9).

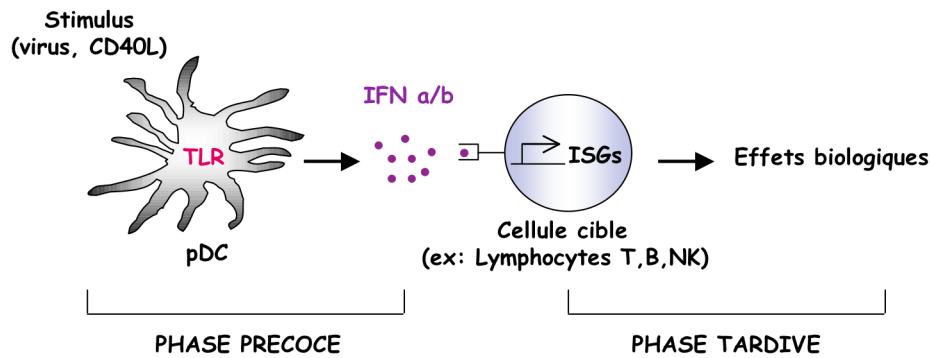


Figure 9: Schéma représentant la régulation de la réponse interféron.

La phase précoce consiste en l'activation de la voie des Toll-like receptors (TLRs) précédemment décrite (Partie 1).

La phase tardive implique l'activation de la voie IFNAR/STAT. Les IFN- α/β peuvent induire une réponse antivirale en se liant aux récepteurs IFNAR. Une fois liés, les IFN- α/β induisent l'activation de la voie JAK/STAT, qui, à son tour, induit la synthèse de divers gènes, les ISGs (IFN-stimulated genes). La transcription des ISGs se fait via l'activation des deux kinases appartenant à la famille Janus, Tyk2 et Jak1, permettant ainsi le recrutement de STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) au niveau de STAT2 qui est associé au récepteur. STAT1/STAT2 sont alors transloqués dans le noyau (Li, 1996) et vont s'associer à IRF9 pour former le complexe ISGF3 (IFN-stimulated Gene Factor 3). ISGF3 se fixe alors sur le promoteur des gènes inductibles par les IFN de type I (Ihle, 1994).

Les IFN régulent la transcription de centaines de gènes ISGs (de Veer et al., 2001; Katze et al., 2002) (Figure 10). Les ISGs ont diverses fonctions et agissent sur le remodelage du cytosquelette, l'induction de l'apoptose, les régulations post-transcriptionnelle (épissage, dégradation de l'ARN) et post-traductionnelle. Les ISGs peuvent agir au niveau des étapes du cycle viral (Borden et al., 2007; Liu, 2011).

L'ISG le plus étudié est probablement la protéine kinase PKR (dsRNA-activated serine/threonine protéine kinase), qui peut inhiber la réplication virale et induire l'apoptose des cellules infectées (Garcia et al., 2007).

Les protéines OAS (2',5'-oligoadenylate synthetase) peuvent détecter les ARN viraux dans le cytoplasme (Hoenen et al., 2007) et activent la RNaseL qui va dégrader les ARN viraux

(Clemens and Williams, 1978). Les protéines Mx (myxovirus-resistance) sont des GTPases inductibles par les IFN et bloquent la réplication virale en ciblant la nucléocapside. La fonction anti-virale des ADAR (RNA-specific adenosine deaminase) résulte de l'altération des RNA viraux (Martinez and Melero, 2002; Polson et al., 1996).

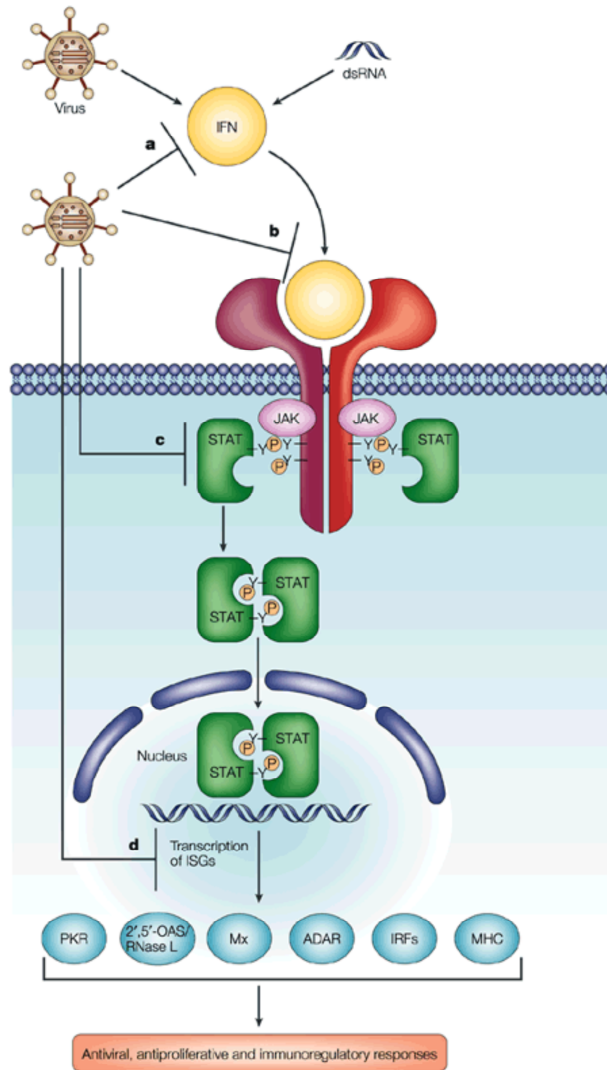


Figure 10: Activation de la transcription des ISGs par les interférons.

D'après Michael G. Katze, Nature Reviews Immunology 2, 675-687 (2002)

- PARTIE 2 -

Les Virus VIH-1 et HTLV-1

1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

Découvert en 1981 par L. Montagnier et F. Barré-Sinoussi (Barre-Sinoussi et al., 1983), le VIH est responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquis (SIDA). En 2010, on estime à plus de 34 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH et à près de 30 millions le nombre de personnes décédées de causes liées au Sida depuis l'annonce du premier cas le 5 juin 1981.

Le VIH conduit dans la majorité des cas à une infection chronique et entraîne une immunodéficience, ayant pour conséquence la mort du patient infecté suite au développement de maladies opportunistes ou de cancers.

Ce virus appartient à la famille des *retroviridae* et possède un génome à ARN. La réplication du VIH est orchestrée par la transcriptase inverse permettant la synthèse d'un ADN qui s'intègre alors dans le génome de la cellule hôte (Figure 11). Il existe deux types de VIH : le VIH de type 1 (VIH-1) et le VIH de type 2 (VIH-2). Les différences majeures entre les deux types de virus concernent le tropisme et la pathogénèse. Le VIH-1, plus virulent, est responsable de la pandémie mondiale, alors que l'infection par le VIH-2 est mieux contrôlée par le système immunitaire (Reeves and Doms, 2002).

1.1. La structure génomique du VIH

Les virions présentent une morphologie sphérique d'un diamètre d'environ 110-120 nm. Le génome viral présent dans la capsid est constitué d'un simple brin d'ARN en double exemplaire d'une longueur de 9,2 kbases. Le VIH est composé de neuf gènes (Figure 12). Les gènes *gag*, *pol* et *env* sont des gènes structuraux communs à tous les rétrovirus. Le gène *gag* code pour des protéines impliquées dans la formation de la capsid (p24, p17, p7). Le gène *pol* (polymerase) code pour des protéines nécessaires à la réplication du virus, la transcriptase inverse (p66), l'intégrase (p34) et la protéase (p12). et codent pour des protéines de l'enveloppe membranaire (gp120, gp41) (Figure 12).

Les six autres gènes sont *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* (ou *vpx* pour le VIH-2). Il s'agit de gènes de régulation qui jouent un rôle important dans le cycle viral. Ils stimulent la réplication du

virus, augmentent l'expression des gènes du virus et facilitent l'endocytose du virus par les cellules cibles (Pluta et al., 2009).

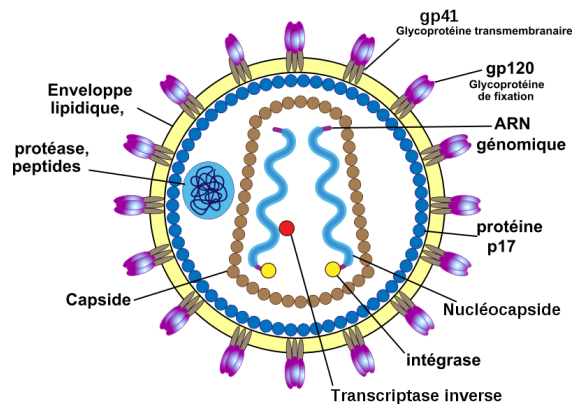


Figure 11: Représentation schématique d'une coupe du virion du VIH.

La gp41 est une molécule transmembranaire qui traverse la double couche lipidique de l'enveloppe virale. La gp120 est associée à la gp41 et sert de récepteur viral du CD4 des cellules hôte. L'enveloppe virale dérive de la cellule hôte et contient les molécules de classe I et II du CMH. Le core viral (ou nucléocapside) est situé sous l'enveloppe et contient les protéines p17 et p24. Le génome du VIH est composé de deux copies d'ARN simple brin.

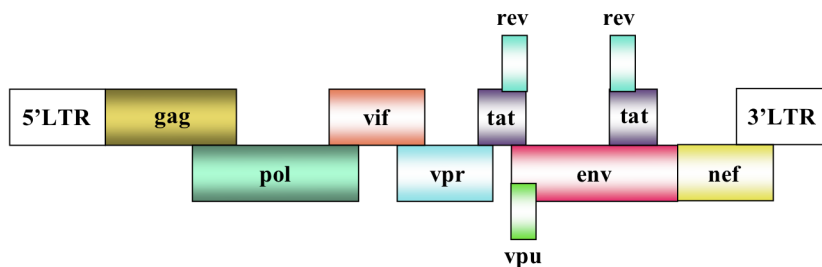


Figure 12: Organisation des neuf gènes du VIH.

Les trois principaux gènes (gag, pol, env) sont clivés pour donner les protéines de la nucléocapside, enzymes nécessaires à la réplication, et les protéines de l'enveloppe. Les trois gènes tat, rev et nef codent des protéines régulatrices, et les gènes vif et vpu codent des protéines nécessaires à la maturation du virion. Vpr code un activateur faible de la transcription de l'ADN proviral.

Je tiens à préciser que mon travail de thèse n'a pas porté sur l'étude de la structure du VIH. Le VIH a été utilisé comme un outil pour étudier la réponse innée induite par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

1.2. Le VIH-2

Deux souches ont été identifiées à ce jour : le VIH-1, responsable de la pandémie, et le VIH-2, moins virulent et principalement retrouvé au Portugal et au Guinée-Bissau (Poulsen et al., 1989). Le VIH-2 représente une minorité des infections par le VIH. Les principales différences entre les deux souches incluent une pathogénicité réduite du VIH-2 par rapport à celle du VIH-1 et une augmentation de la réponse immunitaire au VIH-2 (Reeves and Doms, 2002).

Le VIH-2 a été isolé chez des patients de l'Afrique de l'Ouest originaires de la Guinée-Bissau et du Cap Vert (Clavel et al., 1986). Le VIH-2 est plus proche au niveau phylogénétique du Virus de l'Immunodéficience Simienne du Sooty Mangabey (VISsm) que du VIH-1. Le VIH-2 présente des similarités dans l'organisation génomique, la géographie et le mode de transmission (Sharp et al., 1995). Ce rapprochement avec le VISsm laisse penser que le VIH-2 (comme le VIH-1) a été transmis par zoonose (du grec *zôon*, « animal » et *nosos*, « maladie »), autrement dit par des contacts entre le singe et l'homme (Gao et al., 1992; Hirsch et al., 1989). La pathogénicité du VIH-2 est plus faible que celle du VIH-1. Cela peut être expliqué par une fréquence de transmission du VIH-2 plus faible que celle du VIH-1, à une charge virale plus faible chez les patients et un contrôle de la réplication du VIH-2 plus efficace (Adjorlolo-Johnson et al., 1994; Simon et al., 1993).

Ainsi, le VIH-2 représente une forme atténuée du VIH-1 et son étude est donc une opportunité pour mieux comprendre les facteurs impliqués dans le contrôle de l'infection par le système immunitaire.

2. Pathologie : le VIH et le système immunitaire

2.1. Les phases de la maladie

La plupart des virus sont caractérisés par leur tropisme cellulaire. Contrairement aux primates d'Afrique (hôtes naturels du VIS), le VIH-1 chez l'Homme est pathogène et induit une infection chronique dont la déplétion des LTCD4⁺ est la signature immunologique de l'infection par le VIH. En effet, les LTCD4⁺ possèdent le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs CXCR4 et CCR5, nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule cible. La destruction progressive des LTCD4⁺ conduit à une immunodéficience majeure de l'individu. Un profil sérologique du processus infectieux peut cependant être établi bien que l'évolution de l'infection par le VIH-1 varie selon les patients. Trois phases caractérisent l'infection par le VIH et sont définies par la charge virale plasmatique (quantité de virus) et le nombre de LTCD4⁺ dans le sang (Figure 13).

- La phase de primo-infection (ou phase aigüe) est la période qui suit la transmission du virus. Elle comprend le moment à partir duquel l'ARN viral est détecté jusqu'à l'établissement d'anticorps spécifiques du VIH (3 à 4 semaines après l'infection) (Reeves and Doms, 2002). Cette phase est caractérisée par l'augmentation de la charge virale (réplication massive du virus) (Clark et al., 1991) qui atteint son pic après 21 à 28 jours suivant l'infection, et se traduit également par une diminution du nombre de LTCD4⁺ dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (Li et al., 2005). Le virus se dissémine dans les organes lymphoïdes secondaires tels le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphatiques associés à l'intestin. En réponse au virus, le système immunitaire développe une réponse spécifique aboutissant à la séroconversion et au développement de LT spécifiques du VIH (Regoes et al., 2004). Malgré un nombre de LTCD4⁺ circulants revenant à la normale, le nombre de LTCD4⁺ dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) diminue fortement (Veazey and Lackner, 1998).

- La phase asymptomatique (ou phase chronique): longue période (8 à 12 ans) variable selon les individus, où le système immunitaire combat l'infection. Malgré l'induction de

LTCD4⁺ helper spécifiques du VIH (T_H) et des LTCD8⁺ effecteurs (CTL), le virus persiste dans le sang et les organes lymphoïdes. Malgré l'activation du système immunitaire, une diminution constante des LTCD4⁺ est observée chez les patients. La charge virale est faible et le patient ne présente pas de symptômes (Fauci, 1988).

- La phase symptomatique (SIDA) est caractérisée par la destruction massive des LTCD4⁺, corrélée à une poussée significative de la virémie. A ce stade, le système immunitaire est fortement touché (mort de l'ensemble des cellules immunitaires : LTCD8, macrophages, cellules dendritiques). Malgré l'activation du système immunitaire, le VIH échappe progressivement aux défenses de l'hôte et une augmentation de la charge virale accompagnée par la destruction des LTCD4⁺ est alors observée. Lorsque les LTCD4⁺ sont inférieurs à 200/mm³, la sensibilité des patients immunodéprimés aux maladies opportunistes et au développement de cancers est augmentée et conduit au décès (Zhang et al., 1999).

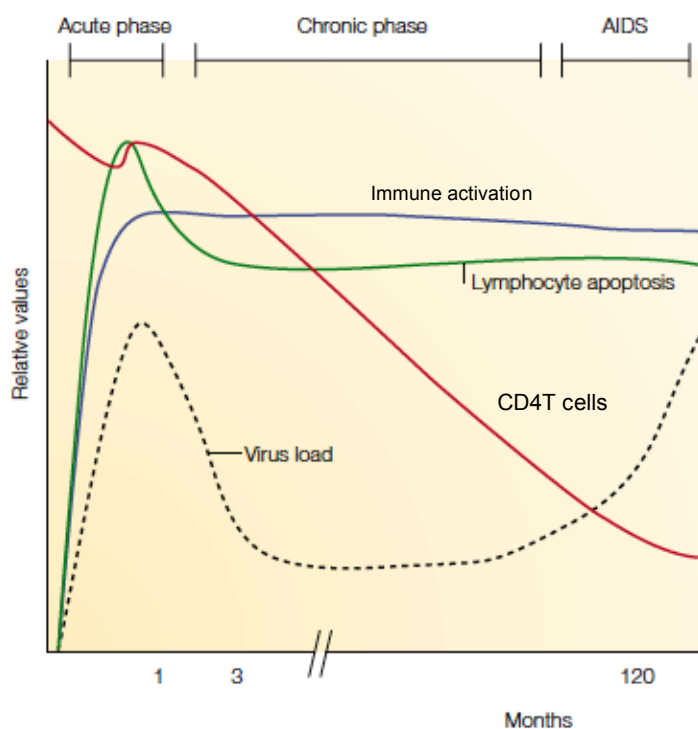


Figure 13: Relation entre l'activation immunitaire induite par le VIH, l'apoptose des cellules T et la progression vers le SIDA.

D'après Marie-Lise Gougeon, Nature Review Immunology, 2003 (Gougeon, 2003).

2.2. L'immunité cellulaire induite par le VIH

➤ Réponse des cellules T CD8⁺ et TCD4⁺

Les lymphocytes TCD8⁺ (LTCD8⁺) jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la réplication du virus. Similairement à l'infection des macaques par le VIS, les premières réponses des cellules T lors de l'infection par le VIH se forment au moment où le pic virémique est atteint. Une corrélation a été établie entre l'activité des LTCD8⁺ spécifiques du VIH-1 et le contrôle de la virémie (Borrow et al., 1994; Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999). Cependant, il a été montré que les LTCD8⁺ présentaient des défauts fonctionnels à mesure que l'infection progresse, associés à une diminution de la production des cytokines, de la prolifération et de la différenciation en cellules effectrices (Appay et al., 2000). Les LTCD4⁺ mémoires et les LTCD4⁺ spécifiques du VIH-1 sont particulièrement sensibles à l'infection par le VIH-1 (Douek, 2002). Bien que l'expansion des LTCD4⁺ spécifiques ait lieu lors de la primo-infection, cette réponse décline rapidement (Gloster et al., 2004) (Figure 14).

➤ Réponse des cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK jouent également un rôle important dans le contrôle de la virémie. Les cellules NK sont activées pendant la phase de primo-infection (Alter et al., 2007) et contrôlent la réplication du virus en lysant les cellules infectées et en produisant des cytokines et des chimiokines anti-virales (Qi et al., 2006).

➤ Réponse anticorps

Les premiers anticorps spécifiques du VIH-1 sont détectés 8 jours après la transmission du virus (Tomaras et al., 2008). Cependant, la séroconversion est établie 3 à 4 semaines après l'infection, au moment où la charge virale atteint son pic. Les anticorps qui neutralisent le virus autologue se développent lentement (environ 12 semaines après l'infection) (Gray et al., 2007; Richman et al., 2003).

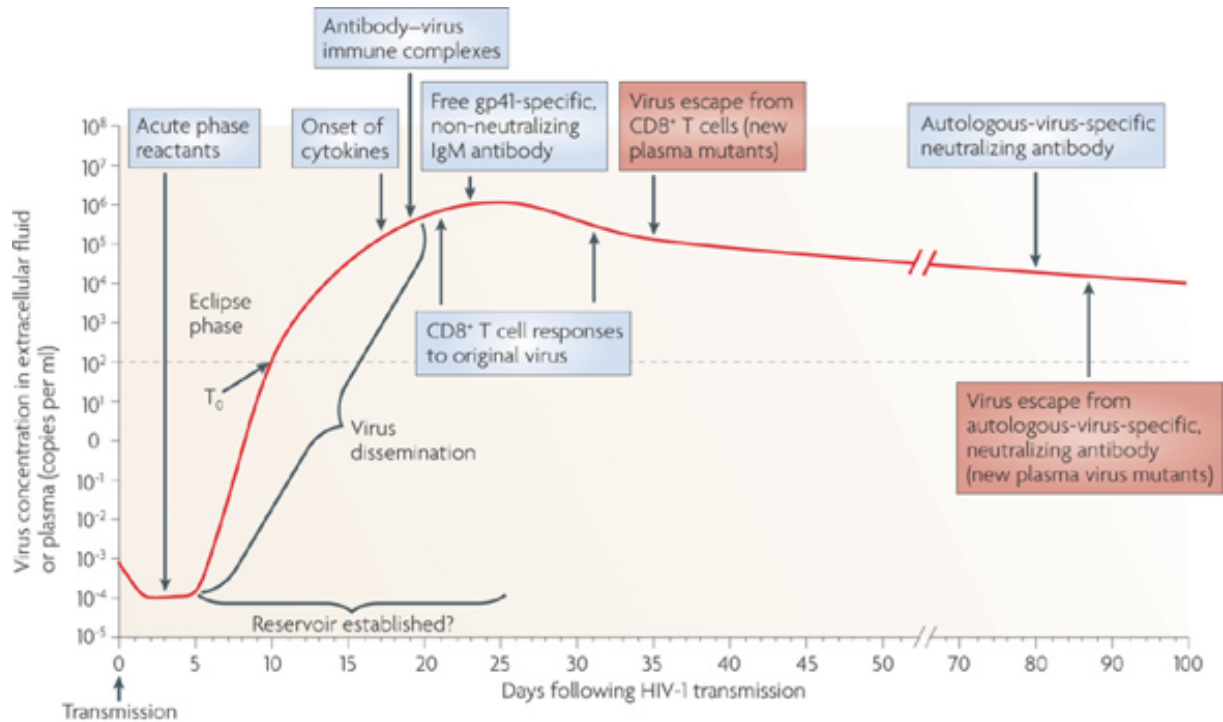


Figure 14: Réponses immunitaires précoces détectées après la transmission du VIH-1 .

D'après McMichael, Nature Review Immunology, 2010.

2.3. Le VIH et l'activation immunitaire chronique

Paradoxalement, l'immunodéficience induite par le VIH-1 n'est pas la conséquence d'une inactivité du système immunitaire mais plutôt d'une activation immunitaire chronique (Grossman et al., 2006). En effet, le système immunitaire est dans un état d'activation chronique lors des phases asymptomatiques et symptomatiques (Ford et al., 2009; Ho et al., 1995). L'activation immunitaire chronique est associée à la progression de la maladie (Deeks et al., 2004; Hazenberg et al., 2003). L'activation immunitaire chronique peut être associée au VIH-1 ne sont pas clairement définies. Il peut s'agir d'une infection virale directe des cellules immunitaires, de la production de cytokines par les cellules de la réponse innée (Boasso et al., 2007; Grossman et al., 2006), de co-infections, ou encore de la translocation de produits microbiens dans le sang qui vont générer des lésions de l'épithélium intestinal (Brenchley et al., 2006) (Figure 15). En effet, l'intestin est le site principal de l'infection par le VIH-1. Le VIH recrute les LTCD4⁺ dans l'intestin via l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Une majorité des LTCD4⁺ CCR5⁺ de l'intestin contribuent à la réplication virale (Arthos et al., 2008).

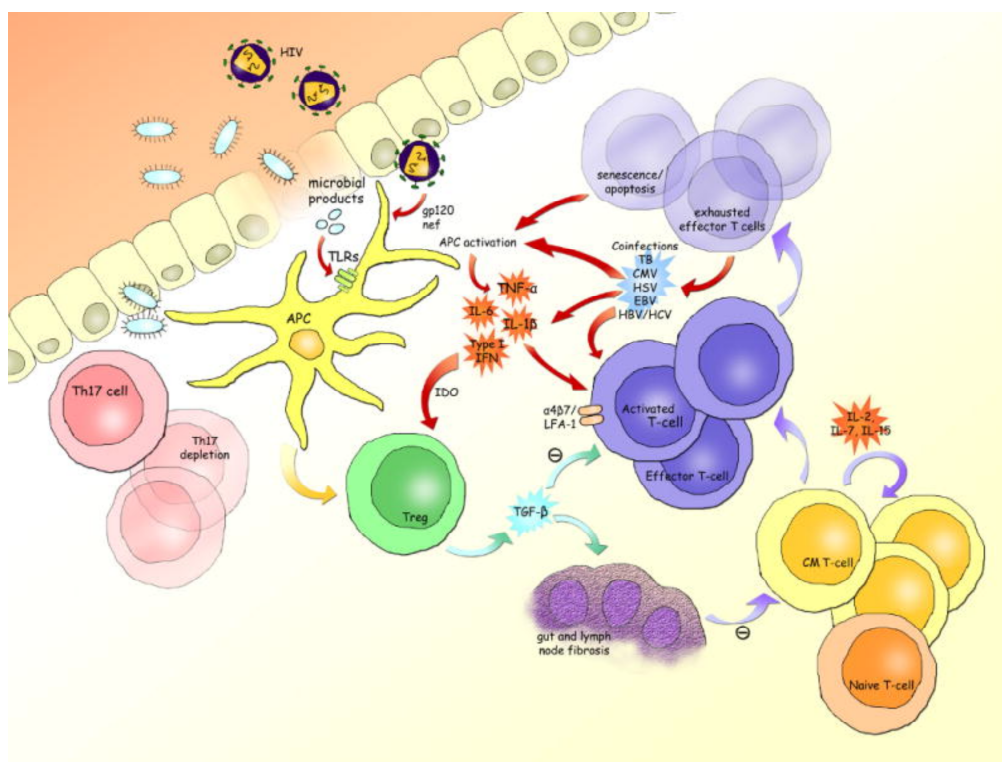


Figure 15: Représentation schématique de l'activation immunitaire chronique et de la dérégulation des réponses innées et adaptatives lors de l'infection par le VIH.

D'après Ford 2009, Curr Opin HIV AIDS, 2010.

L'étude du modèle simien est d'un intérêt majeur pour mieux comprendre le rôle de l'activation immunitaire chronique dans la progression de la maladie. En effet, les sooty mangabeys (SM) et les African green monkeys (AGM) qui sont les hôtes naturels du SIV ne développent pas le SIDA et leurs $LTCD4^+$ ne sont pas déplétés malgré une virémie élevée. Par opposition, les rhésus macaques, qui sont les hôtes non naturels du SIV, ont une virémie semblable à celle des SM et AGM mais développent le SIDA, associé à la perte des $LTCD4^+$. La différence majeure entre les RM et les SM/AGM est l'absence d'activation immunitaire chez ces derniers (Jacquelin et al., 2009; Silvestri et al., 2003).

Il est intéressant cependant de noter que la déplétion des $LTCD4^+$ dans l'intestin est observée chez les SM et les AGM infectés par le SIV (Pandrea et al., 2007). Néanmoins, par opposition aux patients infectés par le VIH-1 et aux RM, les SM/AGM maintiennent une population de cellules TCD4 mémoires qui produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse aux antigènes

bactériens et fongiques, il s'agit des cellules Th17 (Brenchley et al., 2008). La perte des cellules Th17 dans l'intestin des RM et des patients infectés par le VIH pourrait contribuer aux lésions de l'épithélium intestinal et favoriser l'augmentation de l'inflammation et de l'activation chronique (Brenchley et al., 2008).

Ainsi, il devient largement établi qu'une activation immune persistente contribue à l'immunopathogénèse du VIH-1 et à la progression vers le SIDA.

2.4. Le Yin et le Yang des interférons

L'utilisation des IFN en clinique a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques spécifiques permettant de moduler la réponse immunitaire (Baron et al., 1991). Cependant, l'effet des interférons semble complexe et la balance entre son rôle bénéfique et pathogène dépend de la pathologie (Figure 16).

➤ *IFN et activité antivirale*

La première réaction de l'organisme en réponse à une infection virale est de produire des interférons. Comme nous l'avons vu précédemment, les pDC sont la source majeure de la production d'IFN- α . Les IFN de type I contribuent à l'activité anti-virale et à la maturation des cellules T effectrices (Muller et al., 1994). Les IFN de type I participent à la mort des cellules infectées (Baron and Davignon, 2008), à l'activation des cellules NK et B (Prchal et al., 2009) et font le lien entre l'immunité innée et adaptative.

➤ *IFN et maladie inflammatoire*

Certaines pathologies sont associées aux interférons. En effet, la présence d'IFN- α et d'IFN- β a été observée dans les lésions de patients atteints d'une maladie inflammatoire, la sclérose en plaques (Al-Masri et al., 2009; Lande et al., 2008; Traugott and Lebon, 1988).

➤ **IFN et maladies autoimmunes**

L'IFN- α joue également un rôle pathogène dans des maladies autoimmunes, comme le lupus. En effet, le lupus, également nommé SLE (systemic lupus erythematosus), se caractérise par la production d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN de l'hôte et par l'induction de l'inflammation de multiples organes (la peau, les articulations ou le système nerveux central). Une production constante et forte d'IFN- α , ainsi qu'une sur-expression d'ISGs ont été observées chez les patients atteints de lupus et engendrent l'activation et la maturation des DC qui vont stimuler les cellules T autoréactives (Preble et al., 1983) (von Wussow et al., 1989). L'IFN- α est également associé à la maladie de la peau psoriasis (Nestle and Gilliet, 2005).

➤ **IFN et Cancers**

L'implication de l'IFN- α a également été établie dans certains cas de cancers. Des pDC ont été localisées dans plusieurs tumeurs solides incluant les cancers de la tête et du cou, le cancer du sein, des ovaires, des poumons et de la peau (Hartmann et al., 2003; Perrot et al., 2007; Treilleux et al., 2004). Une étude récente suggère que les pDC des ganglions drainant la tumeur expriment l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase catabolisant le tryptophane), créant alors un micro-environnement suppressif qui empêche la création d'une réponse T anti-tumorale (Sharma et al., 2007).

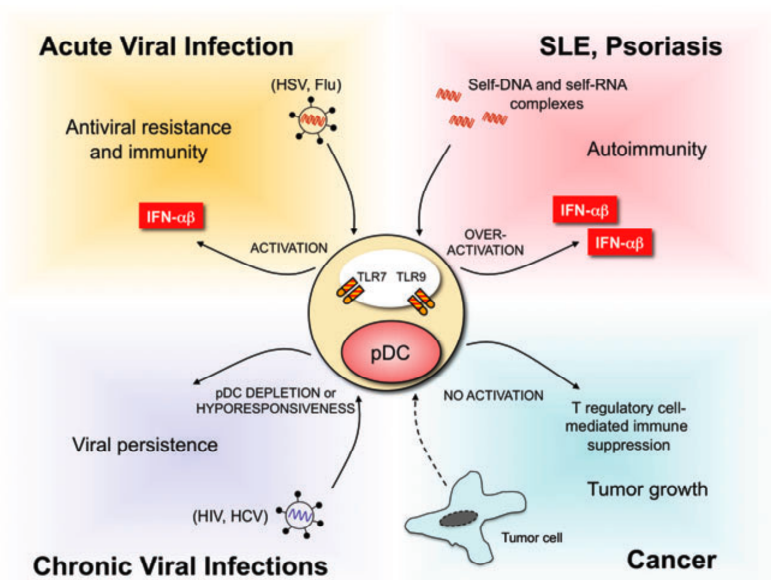


Figure 16 : Rôle des pDC et des interférons dans des maladies humaines.

D'après Roberto Lande, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2009 (Lande and Gilliet, 2009)

Il est clairement établi un rôle pathogène des IFN de type I dans des maladies auto-immunes et inflammatoires. Qu'en est-il dans le cas du VIH ? Les interférons pourraient-ils contribuer au développement de la maladie ?

➤ ***IFN et infection par le VIH***

En dépit de l'activité anti-virale des IFN, la réponse immune innée lors de l'infection par le VIH-1 serait un élément central dans l'activation immune chronique et la progression vers la maladie. Les IFN ne sont pas suffisants pour permettre le contrôle de l'infection par le VIH. De plus, il a été montré que des taux sériques d'IFN- α apparaissaient dans les phases tardives du SIDA, suggérant alors une participation de l'IFN- α à la pathologie associée au VIH. (Buimovici-Klein et al., 1986). De plus, l'IFN- α produit par les pDC lors de l'infection par le VIH contribue à l'apoptose *in vitro* des LTCD4⁺ (Herbeuval et al., 2006; Sivaraman et al., 2011) et au dysfonctionnement des cellules T (Boasso et al., 2007).

En dépit de taux élevés de virus plasmatiques et cellulaires, les LTCD4⁺ des SM infectés par le SIV ne sont pas déplétés et l'activation immune chronique est contrôlée. Ainsi, le contrôle de la réponse immune chronique pourrait expliquer la résistance des SM au SIDA par rapport aux RM (Jacquelin et al., 2009). De plus, il a été montré que la résistance des SM infectés par le SIV était associée à une diminution significative de la production d'IFN- α par les pDC (Mandl et al., 2008). La réponse innée semble donc jouer un rôle important dans la pathogenèse associée au VIH/SIV, en particulier lors de la primo-infection.

L'IFN- α produit par les pDC induit l'expression de la molécule apoptotique TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) à la surface des TCD4⁺. TRAIL principalement connue pour être une molécule antitumorale induisant l'apoptose des cellules qui expriment les récepteurs de mort du TRAIL, DR4 et DR5 (Death Receptor 4 et 5). Notons que TRAIL cible spécifiquement les cellules tumorales, étant donné que les cellules saines n'expriment pas les récepteurs de mort de TRAIL. Dans le cas du VIH, la fixation de la gp120 virale sur le CD4 des lymphocytes est suffisante pour induire l'expression de DR5 à leur surface. Ainsi, il n'est pas nécessaire que les LTCD4⁺ soient infectés par le VIH pour qu'ils expriment DR5 et pour que l'apoptose soit induite. L'IFN- α produit par les pDC induit l'expression de TRAIL à la surface des LT CD4⁺ et des monocytes (Herbeuval et al., 2005). L'IFN- α contribuerait ainsi à

la mort des $LTCD4^+$ par la voie d'apoptose TRAIL/DR5 (cette voie sera détaillée ultérieurement dans le manuscrit).

Ces résultats soulèvent l'effet contradictoire de l'IFN- α dans la pathologie du VIH (Figure 17). En effet, en régulant négativement l'expression de CXCR4 et la charge virale, l'IFN- α protège les cellules contre l'infection par le VIH, lui conférant un effet protecteur antiviral. Parallèlement, l'IFN- α induit l'expression de TRAIL à la surface des $LTCD4^+ DR5^+$, lui conférant alors un caractère cytotoxique.

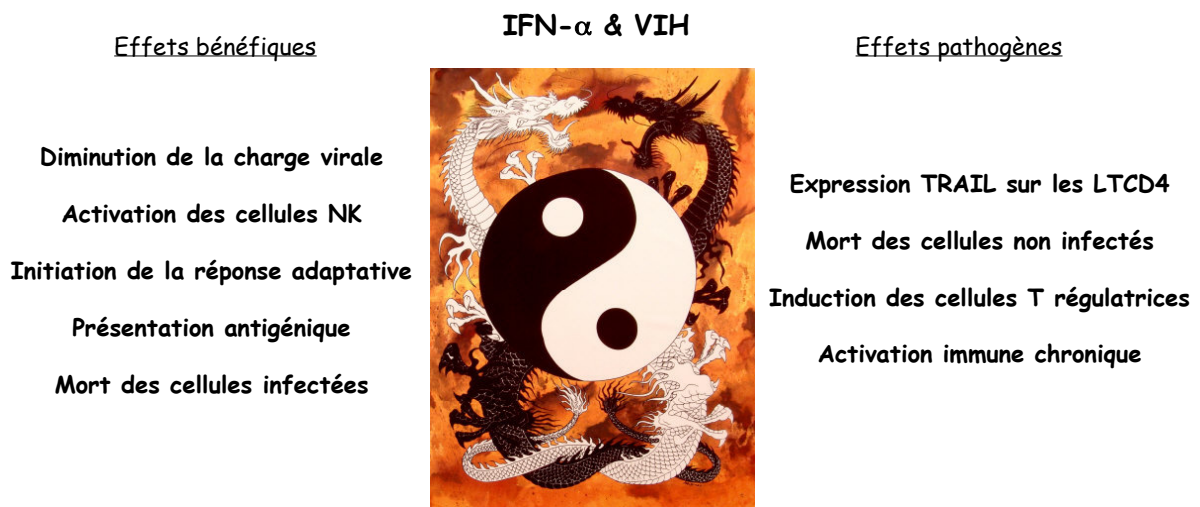


Figure 17: Le rôle des pDC et de l'interféron dans l'infection par le VIH.

2.5. Sites d'interaction des DC avec le VIH-1

Les cellules cibles principales du VIH sont les lymphocytes T $CD4^+$ ($LTCD4^+$). Cependant d'autres cellules, notamment les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les cellules microgliales du cerveau ou Langerhans de la peau interagissent avec le VIH (Figure 18).

➤ Infectabilité des pDC

Les pDC sont des cellules potentiellement infectables. L'infection par le VIH requiert cependant l'expression du récepteur du VIH $CD4$, ainsi qu'au moins l'un des deux

corécepteurs (CXCR4 ou CCR5) reconnus par les virus T tropique (X4, utilisant le CXCR4) et M tropique (R5, utilisant le CCR5) à la surface des cellules. Les pDC expriment tous les récepteurs du VIH, faisant d'elles une cible potentielle du virus (Patterson et al., 2001). Des pDC p24⁺ infectées par le VIH ont été trouvées dans le thymus et les amygdales de patients infectés par le VIH (Fong et al., 2002). De plus, Groot et al ont montré en 2006 que les pDC pouvaient infecter *in vitro* les cellules TCD4 (Groot et al., 2006). Cependant, les pDC ne sont pas considérées comme étant un réservoir majeur pour le VIH (Otero et al., 2003). De plus, il a été montré que les cellules infectées par le VIH (Schmidt et al., 2005) et les virus libres (Beignon et al., 2005a) sont capables d'induire la production d'IFN- α .

➤ Diminution du nombre de pDC sanguines dans le cas du VIH

Une diminution de la production d'IFN- α *in vitro* a été observée chez les patients infectés par le VIH (Lopez et al., 1983). Cette diminution d'IFN- α rend alors les patients susceptibles aux infections opportunistes (Siegal et al., 1986). Plusieurs études ont suggéré une déplétion des pDC dans le sang de patients infectés par le VIH et ont établi une corrélation positive entre le nombre de pDC et le nombre de lymphocytes TCD4, ainsi qu'une corrélation négative entre les pDC et la charge virale (Donaghy et al., 2001; Soumelis et al., 2001).

Néanmoins, la perte des pDC circulantes peut correspondre à la migration des pDC activées vers les organes lymphoïdes secondaires (Lehmann et al., 2010). Les pDC ont la capacité de migrer directement du sang vers les organes lymphoïdes via veinules endothéliales (HEV). Leur migration dépend de l'expression de CD62L et CCR7 qui interagissent avec les adhésines des ganglions lymphatiques et les chimiokines CCL19 et CCL21 exprimées par les HEVs et les cellules stromales (Cella et al., 1999; Penna et al., 2002). En effet, une accumulation des pDC dans la rate de patients infectés par le VIH a été associée à la charge virale (Nascimbeni et al., 2009). De plus, dans le cas du lupus, on observe une redistribution des pDC au niveau des lésions de la peau des patients (Baccala et al., 2007). Une redistribution similaire des pDC a également été observée chez les singes infectés par le VIS (Malleret et al., 2008). Une étude a par la suite montré que les pDC étaient localisées dans les amygdales de patients VIH (Stary et al., 2009). De plus, les grandes quantités d'IFN- α observées dans des amygdales de patients infectés par le VIH en comparaison aux amygdales de donneurs sains, suggèrent une migration des pDC vers les organes lymphoïdes secondaires (Herbeuval et al., 2005c).

➤ Migration des pDC

La perte des pDC dans le sang peut être expliquée par la migration de ces cellules vers les organes lymphoïdes secondaires ou une diminution de leur production dans la moelle osseuse. La fréquence des DC infectées par le VIH chez les patients étant faible, une mort directe par le virus ne peut probablement pas expliquer cette perte (Donaghy, 2003). De plus, une augmentation du nombre de DC dans les organes lymphoïdes secondaires a été observée chez les patients en primo-infection (Lore et al., 2002), suggérant ainsi plutôt une migration de ces cellules qu'une perte directe. Des macrophages et DC infectés ont également été décrits dans le cerveau de patients en phase asymptomatique ou en phase Sida (Chen et al., 2000). Il paraît donc essentiel d'étudier les sites d'interactions entre les DC et le VIH et leur contribution à la dissémination du VIH.

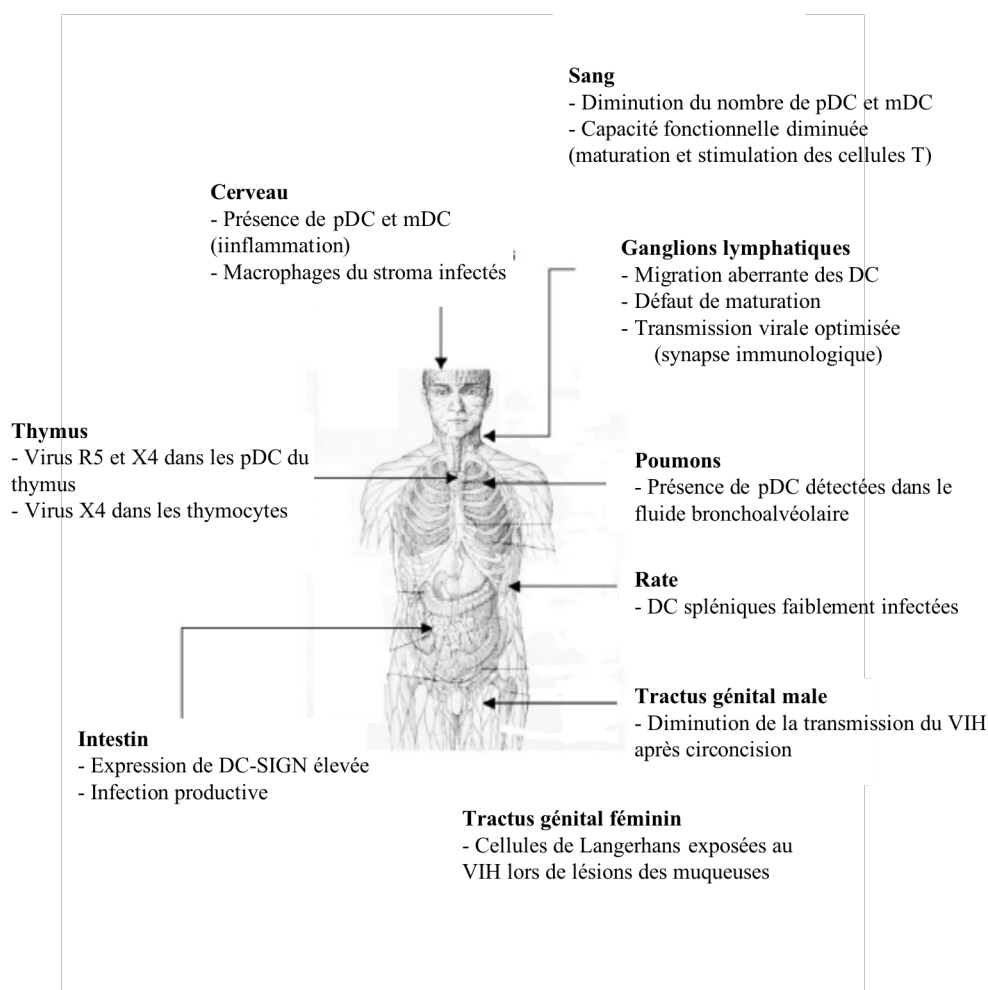


Figure 18: Sites d'interaction des cellules dendritiques avec le VIH dans différents organes.

D'après (Donaghy et al., 2006)

3. L'étude des patients HIV-Controllers

➤ Définition

En absence de thérapie antivirale, une grande majorité des personnes infectées par le VIH ne contrôlent pas leur charge virale et développent progressivement une immunodéficience conduisant à la phase SIDA. Cependant, il existe chez l'Homme des cas particuliers de résistance à l'infection. En effet, un très faible pourcentage d'individus infectés par le VIH (<1%) contrôlent spontanément la réplication virale en absence de traitement. Plusieurs noms sont attribués à ces patients. Aux Etats-Unis, on les nomme « elite controllers », « elite suppressors » ou « elite non progressors ». Tous ces termes décrivent des patients qui ont une virémie en dessous du seuil de détection (50 ou 75 copies/mL) depuis au moins 1 an. En France, on appelle ces patients plus généralement « HIV controllers » (ou HIC) lorsqu'ils sont capables de maintenir une charge virale <400 copies/mL depuis au moins 5 ans après leur infection (Lambotte et al., 2005). A la différence des patients asymptomatiques ou non-progressseurs à long terme (ALT ou LTNP) dont le nombre de CD4 est supérieur à 500/mm³ pendant plusieurs années en absence de traitement mais dont la charge virale est faible mais détectable (Okulicz et al., 2009), les patients HIC présentent un faible risque de progresser vers le SIDA.

Les patients HIC sont séropositifs et parfois quelques pics viraux ponctuels appelés « viral replication blip » peuvent être observés. De l'ADN viral peut être détecté dans les PBMC des HIC mais à des taux très éloignés de ceux observés chez les patients virémiques (Lambotte et al., 2005). La majorité de ces patients ne progressent pas vers le SIDA et maintiennent un haut niveau de LTCD4⁺.

Les patients HIC ne peuvent être distingués des autres patients infectés par le VIH du point de vue du sexe ou du mode de contamination, ce qui inclut la transmission hétérosexuelle ou homosexuelle, la voie intraveineuse ou la transfusion sanguine (Okulicz et al., 2009; Pereyra et al., 2009).

➤ **Résistance des patients HIC**

Plusieurs études ont décrit des facteurs génétiques associés au statut des patients HIC et ont mis en évidence un profil particulier chez ces patients exprimant des allèles protecteurs HLA B5701, B5703 et HLA B2705 (Migueles, 2000; Pereyra et al., 2010). La résistance des HIC est également associée à une meilleure réponse des LTCD4 et LTCD8 spécifiques du VIH, à une meilleure fonctionnalité des cellules NK, à une diminution de la fréquence des cellules T régulatrices ou encore à un polymorphisme du corécepteur CCR5 (Theze et al., 2011).

L'étude des patients HIC est donc cruciale car elle nous donne l'opportunité d'étudier un système immunitaire humain capable de contrôler naturellement le VIH. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la réponse innée des pDC chez les patients HIC. Nous avons testé si les pDC des patients HIC présentaient un défaut quantitatif ou qualitatif qui pourrait contribuer à une diminution de l'activation immune chronique observée chez les HIC et ainsi à la résistance de ces patients au VIH.

4. Le virus HTLV-1 (Human T cell leukaemia virus Type 1)

En 1980, le groupe de Robert C. Gallo caractérise pour la première fois le premier rétrovirus pathogène pour l'homme, le virus humain de la leucémie/lymphome T de type 1, HTLV-1 (Human T cell leukemia virus) (Poiesz et al., 1980). Ce virus a été isolé à partir des cellules mononuclées du sang périphérique d'un patient souffrant de leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL), une lymphoprolifération sévère de cellules T décrite en 1977 au Japon (Takatsuki, 1977) et qui présente quatre formes (leucémique, lymphomateuse, chronique et indolente). Par la suite, des études sérologiques et épidémiologiques réalisées aux Antilles françaises ont démontré que l'infection par HTLV-1 était aussi associée à la paraparésie spastique tropicale (TSP/HAM), une maladie neurologique chronique (Gessain et al., 1985).

4.1. La structure du virus

HTLV-I est un rétrovirus de la famille des Orthoretrovirinae. Le matériel génétique d' HTLV-1 est constitué d'ARN simple brin diploïde. La taille du virus est de 9 032 paires de base (pb). Et les gènes viraux (*gag*, *pol*, *env*) sont similaires à ceux des autres rétrovirus dont le VIH-1 précédemment étudié (Figure 19).

Comme tous les rétrovirus, la séquence du virus HTLV-1 contient un promoteur dans sa partie 5' (*long terminal repeat* ou LTR) et des cadres ouverts de lecture (ORF) permettant de coder les protéines de structure (Gag, Env) ou les protéines possédant une activité enzymatique (Pol, Pro). Cependant, HTLV-1 possède une région particulière pX qui comporte au moins 4 cadres de lecture ouverts (ORF) codant des protéines régulatrices parmi lesquelles Tax, Rex, p12, p13. La protéine régulatrice HBZ est codée à partir de la région LTR3' (Journo et al., 2009).

Les virus HTLV-1 sont enveloppés d'une membrane lipidique et d'une capsidie nucléaire qui protègent le matériel génétique (ARN viral). Les protéines de l' enveloppe sont constituées des glycoprotéines gp21 (sous-unité transmembranaire) et gp46 (sous-unité de surface) qui sont codées par *env* et intégrées à la membrane lipidique. Le gène *gag* code pour une

polyprotéine précurseur qui code pour les protéines de capsid (p24), de matrice (p19) et de nucléocapside (p15).

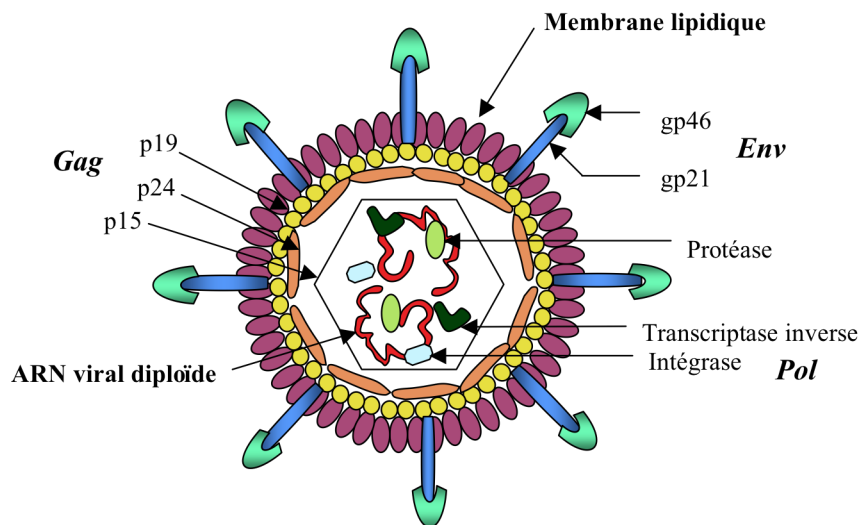


Figure 19: Structure génomique du virus HTLV-1.

La protéine transactivatrice Tax, qui ne possède pas d'équivalent dans le génome humain, est capable d'immortaliser les lymphocytes *in vitro* et de les transformer *in vivo* dans des modèles d'animaux transgéniques (Hasegawa et al., 2006). L'expression de Tax a des conséquences sur l'expression de protéines jouant un rôle dans la régulation de la division du cycle cellulaire, dans la division cellulaire, sur des suppresseurs de tumeurs et les mécanismes de réparation de l'ADN (Boxus and Willems, 2009; Marriott and Semmes, 2005). La protéine HBZ est impliquée dans le maintien de l'état tumoral des cellules infectées (Kuhlmann et al., 2007) (Figure 20). Les deux protéines Tax et HBZ jouent donc un rôle important dans la persistance virale et la pathogenèse.

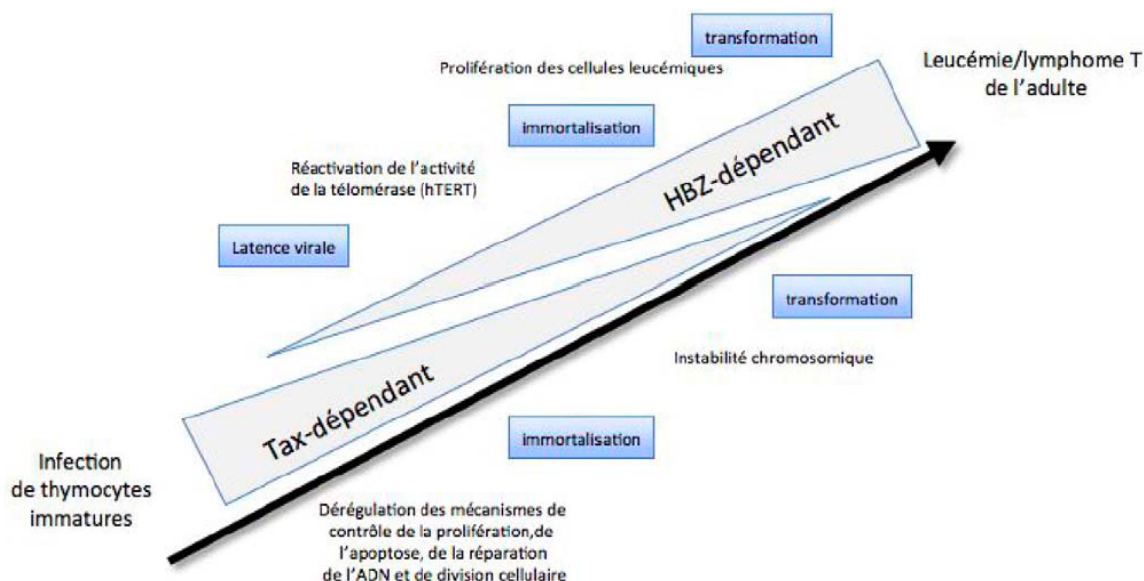


Figure 20: Modèle de l'histoire naturelle de l'infection par HTLV-1 et de la physiopathologie de la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL).

Lors de l'infection de cellules cibles *n vivo* (cellules dendritiques, lymphocytes T), l'expression précoce de la protéine transactivatrice Tax provoque la dérégulation des mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire, de la maturation des thymocytes, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN et participe à l'immortalisation des cellules T. L'expression de Tax décroît progressivement, tandis que la protéine HBZ est exprimée en permanence. L'expression d'HBZ induit la réactivation des fonctions de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) et permet aux cellules ainsi immortalisées de proliférer. Tiré de *Bull.Soc.Pathol.Exot.* 104 (2001) (Mahieux, 2011).

4.2. Epidémiologie

Le nombre de personnes infectées par HTLV-1 a été estimé récemment que 15 à 20 millions de personnes vivaient avec le virus. Des études épidémiologiques ont révélé que les régions les plus touchées par ce virus étaient la Malaisie, les Caraïbes, l'Afrique (Gabon, Cameroun), l'Amérique du Sud (Brésil, Guyane, Colombie) et le sud du Japon (Figure 21). Cependant, il ne s'agit ici que d'une prévision étant donné que le diagnostic est honéreux et complexe. Le nombre de personnes réellement infectées est probablement plus élevé.

Parmi les personnes infectées par le virus, 3 à 6% développent le syndrome d'ATLL. L'infection par HTLV-1 est très élevée notamment au sud du Japon où la prévalence peut atteindre 37% (Mueller et al., 1996; Yamaguchi, 1994). Pour ce qui est des régions non endémiques, HTLV-1 est principalement porté par les immigrants. La contamination s'effectue principalement par rapport sexuel. Cependant, la prévalence en Europe et en Amérique du Nord reste extrêmement faible et ne dépasse pas 0,01% (Proietti et al., 2005).

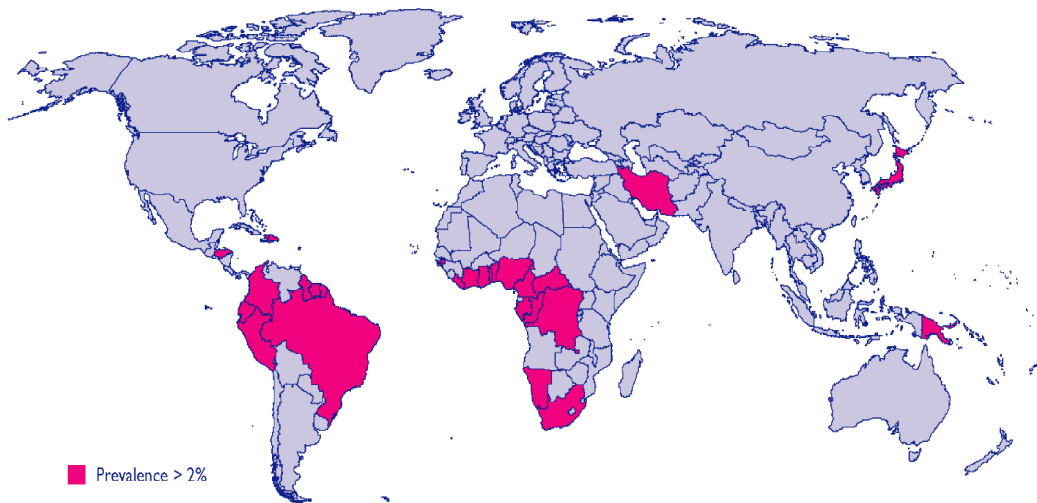


Figure 21: Régions les plus touchées par le virus HTLV-1 dans le monde.

HTLV-I est transmis selon trois modes : de la mère à l’enfant lors d’un allaitement prolongé, par voie sexuelle (préférentiellement dans le sens homme-femme), et via des produits sanguins contaminés (Roucoux et al., 2005; Ureta-Vidal et al., 1999). La transmission de la mère à l’enfant apparaît fréquemment (environ 20%) et est liée à la charge virale de la mère et à la durée de l’allaitement (Hino, 2011). Ainsi, l’allaitement a été diminué au Japon, diminuant alors la transmission du virus.

4.3. Etude de la réponse innée dirigée contre HTLV-1

➤ Les récepteurs du virus HTLV-1

L’entrée du virus nécessite les glycoprotéines de l’enveloppe virale (Env) et les sous-unités gp46 et gp21. Une seule mutation dans une de ces protéines ou l’utilisation d’anticorps bloquants diminue drastiquement l’infection par HTLV-1.

Une étude a montré que le récepteur à HTLV-1 était le transporteur de glucose GLUT-1 (Manel et al., 2003). GLUT-1 est exprimé dans les cellules T activées qui sont les cellules cibles d’HTLV-1. Aussi, il a été récemment démontré l’implication de deux autres molécules

dans l'infection par HTLV-1, il s'agit de la Neuropilin-1 (NRP-1, connue aussi sous le nom de BDCA-4) et des Héparanes Sulfates Proteoglycanes (HSPG) (Ghez et al., 2006). NRP-1 est un récepteur glycoprotéique de la Sémaphorine 3a et du VEGF (Vascular endothelial growth factor). Il a été montré que NRP-1 jouait un rôle clé dans l'angiogénèse et était aussi impliqué dans la régulation de la réponse immune (Tordjman et al., 2002). NRP-1 se lie directement au virus HTLV-1. De plus, des analyses confocales ont révélé une polarisation de NRP-1 avec la glycoprotéine virale Env à l'interface de la cellule infectée et de la cellule T cible (Ghez et al., 2006). Les HSPG favorisent l'infection en permettant l'attachement des particules virales sur les cellules cibles (Ghez et al., 2010).

Un modèle impliquant ces 3 partenaires et représentant ainsi le complexe multimoléculaire du récepteur à HTLV-1 a été proposé (Figure 22).

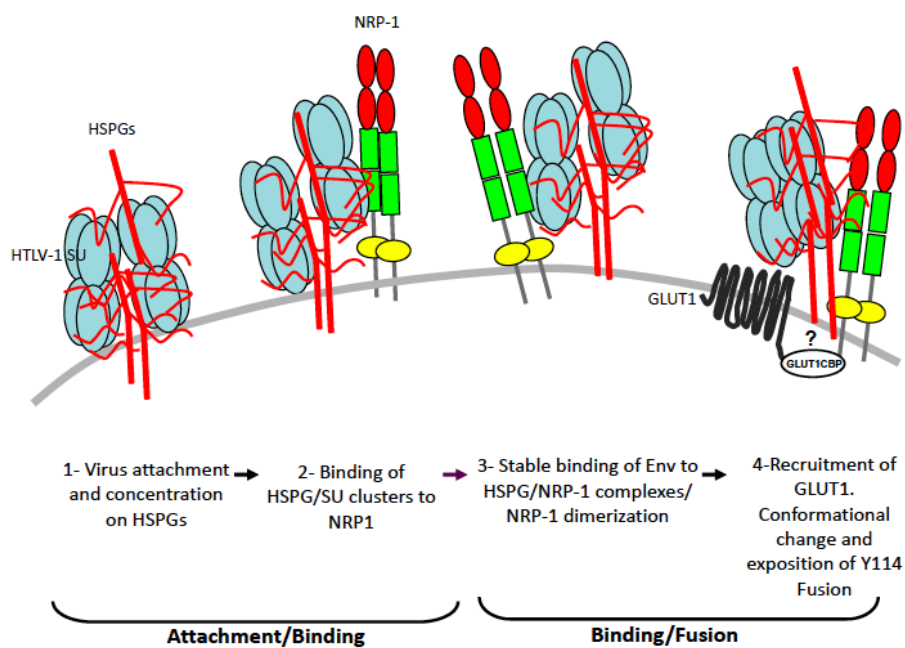


Figure 22: Modèle représentant le complexe multimoléculaire du récepteur à HTLV-1 pour expliquer l'entrée du virus dans les cellules.

L'attachement du virus est permis par des interactions entre la glycoprotéine d'enveloppe virale de surface (gp46) et les HSPG. Des complexes gp46/HSPG lieraient ensuite NRP-1. Des interactions entre ce complexe et Glut-1 permettraient la fusion et l'entrée virale (D'après Ghez et al., 2010).

➤ Le rôle des mDC et pDC

HTLV-1 est un rétrovirus reconnu par le système immunitaire (SI) comme un agent étranger. Lors de l'infection, le SI est alors activé et produit des anticorps dirigés contre HTLV-1. Les symptômes apparaissant après une longue période de latence, il est très difficile d'étudier l'infection aiguë. Ainsi, la plupart des études portent sur l'analyse d'échantillons de patients infectés depuis plusieurs années, et peu d'études traitent de la primo-infection.

Bien qu'il ait été largement démontré que les lymphocytes TCD4⁺ étaient les cibles privilégiées d'HTLV-1, notamment dans le sang périphérique, il a également été démontré qu'HTLV-1 pouvait infecter d'autres compartiments cellulaires *in vivo*, comme les lymphocytes T CD8⁺, les monocytes, les lymphocytes B, les astrocytes (Richardson et al., 1990) et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques expriment faiblement les gènes viraux, cependant, Makino et al. a suggéré que les DC infectées par HTLV-1 avaient la capacité de stimuler les cellules T spécifiques des antigènes (Makino et al., 1999). De plus, le nombre des DC HTLV-1+ présentes dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires est proportionnel à la charge de l'ADN proviral, mettant en évidence une corrélation positive entre la charge de l'ADN proviral et la fréquence des cellules T CD8⁺ effectrices/mémoires Tax- (Nagai et al., 2001).

Des études récentes ont montré un rôle central des mDC et pDC lors de l'infection par HTLV-1. Pendant longtemps, la communauté scientifique pensait que les virus libres des rétrovirus étaient faiblement infectieux (Donegan et al., 1994). Cependant, Jones et al. ont montré en 2008 que les mDC et les pDC isolées du sang périphérique avaient la capacité d'être infectées par les virus libres d'HTLV-1 (Jones et al., 2008). De plus, les mDC et les pDC étaient capables de transférer les virions aux cellules T autologues, démontrant clairement que les virus libres d'HTLV-1 peuvent cibler et infecter les cellules dendritiques.

Dans notre manuscrit, une partie des résultats sera consacrée à l'étude de la réponse innée des pDC après stimulation par HTLV-1, avec l'étude de l'expression du ligand pro-apoptotique TRAIL et la réponse IFN- α .

- PARTIE 3 -

La voie apoptotique TRAIL/DR5

L'apoptose est un processus de mort cellulaire (du grec apoptosis, qui désigne la chute des feuilles en automne) identifié par Kerr (Kerr et al., 1972). Il s'agit d'un processus induit et ordonné dans lequel la cellule participe activement à sa propre disparition.

L'apoptose est caractérisée par deux voies majeures : 1) la voie extrinsèque (fixation du ligand au récepteur de mort présent à la membrane plasmique des cellules) ; 2) la voie intrinsèque (en réponse à un stress cellulaire faisant intervenir la mitochondrie et le relargage du cytochrome C) (Figure 23).

Une caractéristique de la mort cellulaire par apoptose est l'implication de la famille des caspases des cystéines protéases qui clivent après un résidu acide aspartique. Le mot caspase incorpore tous ces éléments (**c**ystéine, **a**spartate, **p**rotéase). Les caspases sont présentes dans la cellule sous forme de pro-enzymes inactifs, les procaspases, qui requièrent un clivage protéolytique pour leur conversion en formes actives.

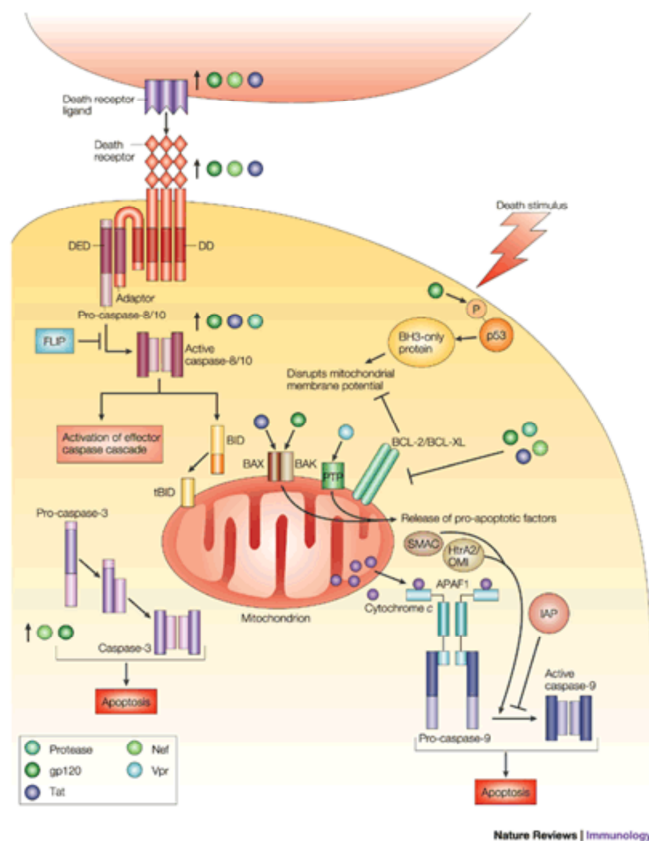


Figure 23: Différents modes d'induction de l'apoptose.

D'après Marie Lise Gougeon, Nature Rev Immunology. 2003

1. La famille des récepteurs du TNF

Les récepteurs du TNF (Tumor necrosis factor) sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant un domaine riche en cystéine dans leur domaine extracellulaire (CRD, Cystein rich domain), et qui sont constituées soit d'un domaine de mort (DD, Death domain), soit d'un site de liaison au facteur associé au TNFR (TRAF, TNF-R associated factor), soit d'un decoy receptor (DcR, récepteur leurre) (Polek et al., 2006).

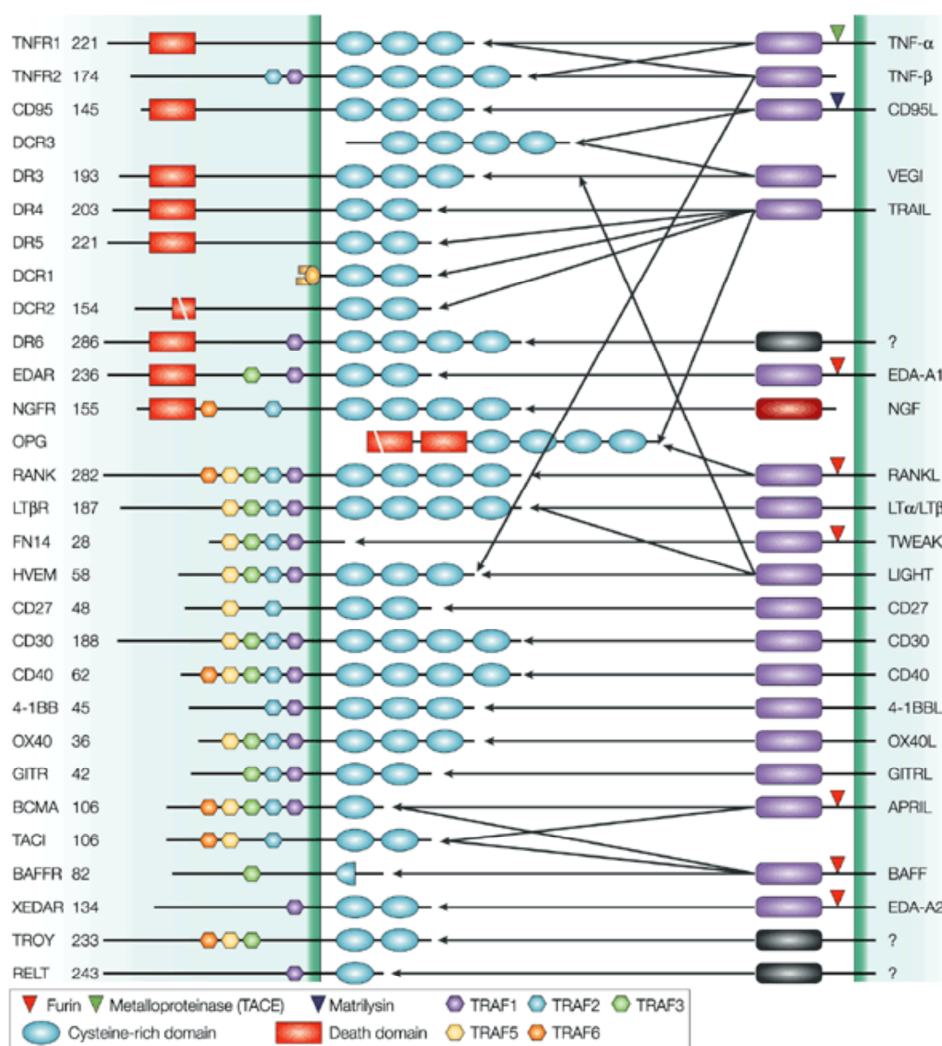


Figure 24: Représentation des ligands de la superfamille du TNF et de leurs récepteurs.

D'après Bharat B. Aggarwal, Nat Rev Immunol 2003.

En plus de leur capacité à induire l'apoptose, TRAIL et CD95L partagent la plus forte homologie parmi les membres de la famille du TNF. Les 19 ligands sont caractérisés par un domaine riche en cystéine (CRD) et induisent leur réponse cellulaire en se fixant sur les 29 récepteurs. La complexité de cette famille réside par le fait que différentes voies peuvent être activées : les voies de signalisation conduisant à l'apoptose (CD95L, TRAIL, TWEAK, LIGHT, VEGI), à la survie (RANKL, BAFF), à la différenciation (RANKL, DR6) ou à la prolifération (CD27L, CD30L, CD40L, APRIL, BAFF) à travers l'activation des voies NF- κ B, JUN N-terminal kinase (JNK), p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Figure 24) (Aggarwal, 2003).

2. Etude du ligand TRAIL et de ses récepteurs

C'est en 1995 que Wiley et al ont identifié et caractérisé pour la première fois un nouveau membre de la famille des cytokines du TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Wiley et al., 1995). La protéine TRAIL est différente selon les espèces : sa forme humaine est constituée de 281 acides aminés, alors que sa forme murine se compose de 291 acides aminés. Les deux protéines partagent cependant 65% d'homologie. TRAIL est une protéine membranaire de type II, dont le domaine extracellulaire C-terminal est similaire à celui d'autres membres de la famille du TNF.

TRAIL a pour rôles principaux de maintenir l'homéostasie des cellules T, des cellules NK et d'induire la mort des cellules transformées ou infectées par un virus (Hayakawa and Nakagawa, 2004).

2.1. Structure du gène codant TRAIL

Le gène du TRAIL est localisé sur le chromosome 3 à la position 3q26. Le locus du gène occupe environ 20 kb et est composé de cinq segments exoniques et de quatre introns (Figure 25) (Almasan and Ashkenazi, 2003).

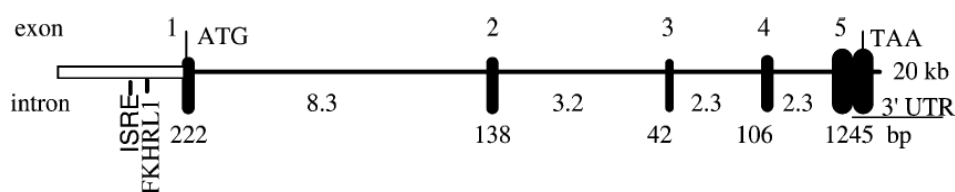


Figure 25 : Organisation du gène de TRAIL (Apo2L)..

Ce fragment de 20kb contient 5 exons (barres verticales) et 4 introns. ATG et TAA désignent les codons d'initiation et de terminaison. Les sites ISRE et FKHR sont importants pour la régulation des IFN. D'après Almasan, Cytokine & Growth Factor Review 14 (2003) 337-348.

2.2. Les transcrits de TRAIL

Les ARN messagers du TRAIL sont détectés dans divers organes, plus majoritairement dans la rate, les poumons et la prostate. Les ARNm ne sont pas présents au niveau du cerveau, du foie et des testicules.

Contrairement à FASL (ligand de FAS), dont les transcrits semblent être restreints aux cellules T stimulées (Suda et al., 1995; Suda et al., 1993), les transcrits du TRAIL sont détectés dans la plupart des tissus, suggérant que TRAIL n'est pas cytotoxique *in vivo* pour les tissus.

2.3. La protéine TRAIL

➤ Structure de la protéine TRAIL

TRAIL, appelée également Apo2L (Pitti et al., 1996), est une protéine membranaire de type II d'environ 32,5 kDa, formée d'un domaine extracellulaire, d'une tige extracellulaire, d'une hélice et d'un domaine transmembranaire. Cette protéine est caractérisée par deux feuillets β antiparallèles. La protéine TRAIL est constituée de 281 résidus d'acides aminés pour sa forme humaine et de 291 pour sa forme murine. La partie C-terminal est la partie active de TRAIL. TRAIL est constituée d'un domaine transmembranaire interne, d'un domaine N-terminal (cytoplasmique), et d'un domaine C-terminal (extracellulaire) conservé et contenant un domaine de fixation au récepteur (Smith et al., 1994).

La protéine TRAIL est exprimée sous deux formes, une forme membranaire (mTRAIL) ou une forme soluble (sTRAIL). Les deux formes induisent l'apoptose de cellules transformées mais aussi de cellules primaires. La forme soluble est obtenue après clivage d'une partie du domaine extracellulaire. Pour être active, TRAIL nécessite une trimérisation et son activité est établie par le domaine C-terminal de la protéine. TRAIL contient un résidu cystéine (Cys230) qui permet l'interaction entre les trois sous-unités de TRAIL. La présence d'un atome de zinc lié aux cystéines dans le ligand trimérique est essentiel pour la stabilité du trimère et l'activité biologique optimale (Hymowitz et al., 1999).

➤ Rôle physiologique de TRAIL

TRAIL est exprimée dans de multiples organes, tels le foie, les poumons, le placenta, les reins, la rate (Wiley et al., 1995), aussi bien au niveau protéique que messenger (Liabakk NB, Vitam Horm 2004).

TRAIL est exprimée et confère une activité cytotoxique à un grand nombre de cellules impliquées dans les défenses de l'hôte, telles les cellules NK (Sato et al., 2001), les cellules dendritiques (Fanger et al., 1999), les cellules T cytotoxiques (Jeremias et al., 1998), les monocytes/macrophages (Griffith et al., 1999). TRAIL est également exprimé par les lymphocytes du sang périphérique stimulés par des anti-CD3 et de l'IFN- γ (Kayagakin N, JEM 1999), les monocytes et neutrophiles traités par l'IFN- γ (Griffith et al., 1999), potentialisant ainsi leur effet cytotoxique sur les cellules infectées et les cellules transformées. TRAIL est principalement connue pour son rôle en cancérologie. En effet, TRAIL est une molécule capable d'éradiquer sélectivement des cellules tumorales, sans effet toxique sur les cellules normales. Des études *in vitro* ont montré l'implication de TRAIL dans la mort de cellules cancéreuses du colon par les macrophages (Herbeuval et al., 2003; Meurette et al., 2005), dans l'apoptose de cellules de mélanomes (Chawla-Sarkar et al., 2002) et de carcinomes ovariens (Morrison et al., 2002).

La forme soluble de TRAIL est relarguée dans la circulation dans le cas de stimulations virales (Han LH, World J Gastroenterol 2002), de maladies auto-immunes (Wandinger et al., 2003), inflammatoires (Robertson et al., 2002) et cancéreuses (Cretney et al., 2006).

3. Les récepteurs de TRAIL

Le ligand pro-apoptique TRAIL peut se lier à deux types de récepteurs :

- les récepteurs de mort TRAILR1/DR4 et TRAIL-R2/DR5 (Death receptor 4 and 5), considérés comme les récepteurs agonistes.
- les récepteurs decoy (ou récepteurs leurres) TRAIL-R3/DcR1 et TRAIL-R4/DcR2, ainsi que l'ostéoprotégérine (OPG), qui sont considérés comme les récepteurs antagonistes (Degli-Esposti et al., 1997a; Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1997).

L'existence de plusieurs récepteurs de mort distincts pour le même ligand (TRAIL), contrairement à FAS/FASL, démontre la complexité et la finesse de la fonction du TRAIL.

3.1. Les récepteurs de mort TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5

Il a été démontré que les récepteurs DR4 et DR5 étaient capables d'induire la mort de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Mitsiades et al., 2001), indépendamment de p53 (Almasan and Ashkenazi, 2003).

DR4, appelé également TRAIL-R1, est le premier récepteur du TRAIL à avoir été découvert (Pan et al., 1997). DR5, appelé également TRAIL-R2, a été identifié peu de temps après (Walczak et al., 1997) (MacFarlane et al., 1997) (Figure 27). DR4 et DR5 partagent 58% d'homologie de séquences. La fonction distincte de ces deux protéines n'est pas encore établie. Le gène DR5 est localisé sur le chromosome humain à la position 8p2-21 et l'ARNm de DR5 est très largement exprimé. DR5 contient deux motifs extracellulaires riches en cystéine, typique des membres de la famille des TNFR. Contrairement à DR4, DR5 engage la voie d'apoptose via la molécule adaptatrice FADD/MORT1.

Les récepteurs DR4 et DR5 possèdent dans leur région cytoplasmique des séquences homologues appelées « domaine de mort » (Death domain, DD). En réponse à l'interaction avec leur ligand TRAIL, les récepteurs se trimérisent, interagissent avec la protéine adaptatrice FADD et recrutent les caspases initiatrices (Caspase-8 et -10), pour former ainsi un complexe moléculaire appelé DISC (Death Inducing Signalling Complex) (Micheau et al.

2003). DISC permet alors l'activation des caspases responsables de l'apoptose (Boatright et al., 2003). Les caspases initiatrices sont alors relarguées dans le cytosol et déclenchent la cascade protéolytique aboutissant à l'apoptose (Figure 27).

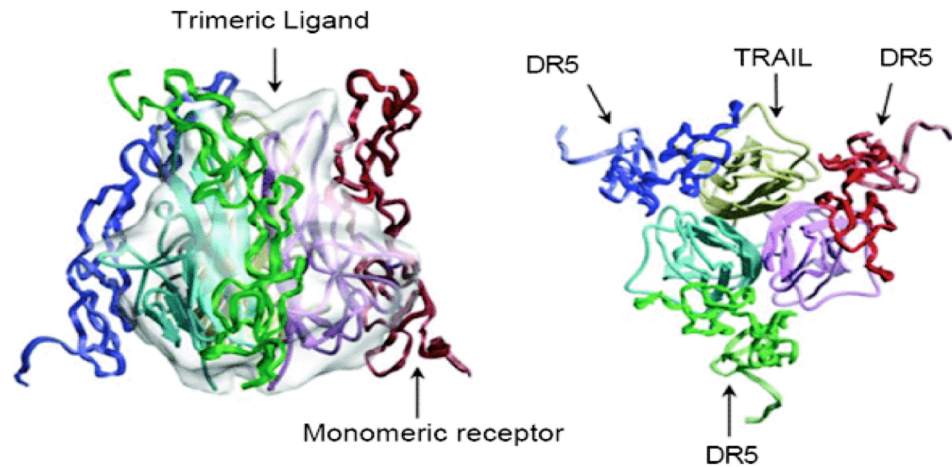


Figure 26 : Crystallisation du complexe formé par TRAIL et DR5.

Le ligand TRAIL est sous forme de trimère (jaune, violet et turquoise) et se fixe à trois récepteurs DR5 monomériques (bleu, vert et rouge).

Malgré des nombreuses études, le trafic intracellulaire de DR5 reste inconnu à ce jour.

3.2. Les récepteurs Decoy (DcR) ou « leurres »

De nombreuses recherches sont orientées sur la compréhension de la voie TRAIL-DR4/5 mais il reste également à éclaircir l'impact des récepteurs leurres sur la signalisation apoptotique induite par TRAIL (Merino et al. 2007). Pour généraliser, les decoy récepteurs du TRAIL sont dépourvus du domaine de mort et joueraient un rôle opposé à celui des récepteurs de mort DR4 et DR5, en inhibant l'apoptose induite par TRAIL. En effet, il a été suggéré que les DcR pouvaient entrer en compétition avec les récepteurs agonistes pour la fixation du TRAIL (Zhang et al., 2000).

➤ TRAIL-R3/DcR1

TRAIL-R3 (DcR1) est ancré à la membrane par une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI) et ne possède pas de DD (Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Il a été récemment montré que DcR1 séquestre TRAIL dans des rafts lipidiques, entrant ainsi en compétition avec TRAIL et empêchant la formation du DISC.

Notons que le récepteur DcR1 est incapable d'interagir avec les récepteurs agonistes (Merino et al., 2006).

➤ **TRAIL-R4/DcR2**

TRAIL-R4 (ou DcR2) est une protéine transmembranaire qui contient un DD mais celui-ci est tronqué et non fonctionnel. Le récepteur DcR2 permet la formation du DISC mais empêche l'activation de la caspase 8 (Degli-Esposti et al., 1997a). Contrairement au DcR1, le DcR2 est capable d'interagir avec DR5. Ainsi, il a été émis l'hypothèse que DcR2 induit une gêne stérique et empêche l'activation de la caspase 8 suite à la fixation de TRAIL à DR5. DcR2 entre ainsi en compétition avec DR5 et bloque l'activation de la voie d'apoptose. Ainsi, bien que les deux récepteurs DcR1 et DcR2 partagent la même fonction inhibitrice, les deux récepteurs sont structurellement différents et agissent différemment sur l'inhibition de l'apoptose induite par TRAIL (Merino et al., 2006).

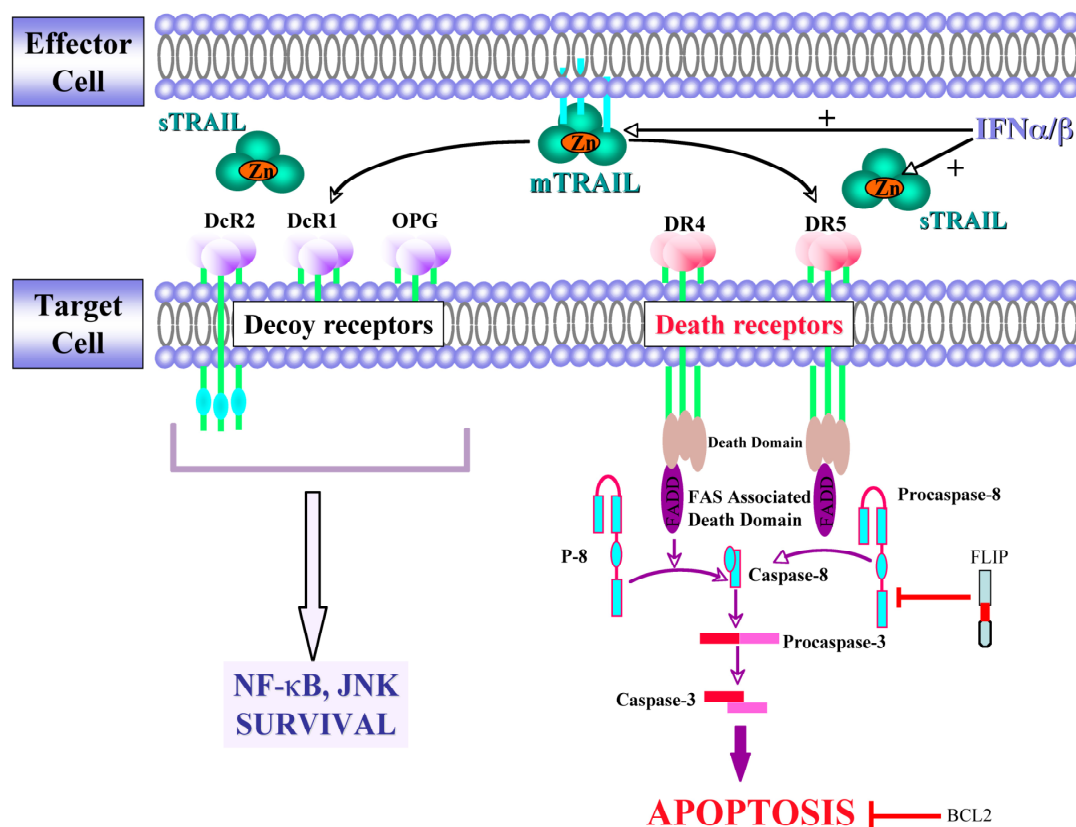


Figure 27: Modèle représentant l'activation de la voie apoptotique par TRAIL.

➤ Récepteurs Decoy et résistance à TRAIL

Par opposition aux récepteurs agonistes DR4 et DR5 exprimés préférentiellement par les cellules tumorales, il a été suggéré que les DcR étaient surexprimés dans les cellules normales et régulés négativement dans les cellules tumorales (par exemple les neuroblastomes, les cellules cancéreuses du poumon et du sein) (Spierings et al., 2004).

D'autres études ont montré l'implication de DcR1 et DcR2 dans la résistance à TRAIL. En effet, DcR1 et DcR2 sont exprimés de manière plus importante dans les tumeurs primaires. Leur expression a été retrouvée dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ainsi que dans des carcinomes de poumon résistants à TRAIL (Riccioni et al., 2005). Cependant, il existe une grande controverse concernant la corrélation entre l'expression des decoy récepteurs et la résistance à TRAIL.

4. TRAIL en cancérologie

➤ Utilisation de TRAIL en thérapie

L'utilisation de TRAIL en thérapie est prometteuse car cette cytokine semble spécifique des cellules cancéreuses (Ashkenazi and Herbst, 2008) et très bien tolérée lorsqu'elle est administrée par voie générale chez la souris, le singe ou l'homme (Ashkenazi and Dixit, 1999; Camidge et al., 2010; Herbst, 2008; Kelley et al., 2001; Younes, 2010). Cependant, les essais cliniques de phase I et II visant à tester l'efficacité thérapeutique de TRAIL ou de ses dérivés associés ou non à des agents chimiothérapeutiques se sont la plupart du temps soldés par des résultats mitigés, voire décevants (Leong et al., 2009; Mom et al., 2009).

➤ Utilisation de TRAIL recombinant

Plusieurs études placent TRAIL comme un agent prometteur dans la lutte contre le cancer. En effet, l'injection de TRAIL recombinant sous sa forme soluble (rTRAILs) dans des animaux xenogreffés est à l'origine de l'induction d'une régression des tumeurs sans effet cytotoxique de rTRAILs sur les animaux (Ashkenazi and Dixit, 1999).

➤ Utilisation de variants de TRAIL recombinant

Des variants de TRAIL recombinant ciblant exclusivement DR5 ont été développés (van der Sloot et al., 2006). Des expériences *in vitro* ont montré une meilleure efficacité de ces variants par rapport au TRAIL recombinant seul pour induire la machinerie d'apoptose de cellules de lignée cancéreuse ovarienne. Dans le but de vouloir cibler les cellules tumorales, une forme chimérique de TRAIL a été développée. Cette chimère est activable par des métalloprotéinases, protéases essentiellement présentes dans les sites de tumeurs humaines (Shin et al., 2006).

➤ Utilisation d'anticorps dirigés contre DR4 et DR5

L'utilisation d'anticorps agonistes ciblant DR4 et DR5 semblent être plus efficaces que le TRAIL recombinant du fait que ces anticorps ciblent sélectivement les récepteurs agonistes. Il a été démontré que ces anticorps induisent l'apoptose des cellules de lignées cancéreuses humaines et primaires *in vitro* (Georgakis et al., 2005). Certains de ces anticorps dirigés contre DR4 et DR5 sont en essais cliniques (exemple, le Mapatumumab (ou HGS-ETR1) ciblant DR4 (Younes A, 2005, 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology) et le Lexatumumab (ou HGS-ETR2). En comparaison à TRAIL recombinant, ces anticorps ont une demi-vie plus longue dans le plasma des patients et leur cytotoxicité est nulle (Hotte et al., 2005).

L'exploitation de la voie TRAIL en thérapeutique pourrait permettre de traiter des patients atteints de cancers ou d'autres maladies faisant intervenir TRAIL et DR5. Il reste à comprendre précisément quels sont les mécanismes moléculaires majeurs permettant de contrôler cette voie d'apoptose.

5. TRAIL dans le contexte de l'infection par le VIH

L'apoptose semble être la voie principale de destruction des LTCD4⁺ lors de l'infection. Différentes études ont établi l'implication de TRAIL dans l'infection par le VIH. En effet, il a été montré que les LTCD4⁺ et LTCD8⁺ des patients infectés par le VIH étaient plus susceptibles *in vitro* à la mort induite par TRAIL que les donneurs sains (Jeremias et al., 1998; Katsikis et al., 1997; Lum et al., 2001). Aussi, Miura et al. ont montré dans un modèle murin hu-PBL-NOD-SCID (HIV-1 infected human peripheral blood leukocyte-nonobese diabetic-severe combined immunodeficient) que TRAIL induisait sélectivement la mort des LTCD4⁺ non-infectés (Jeremias et al., 1998; Katsikis et al., 1997; Lum et al., 2001; Miura et al., 2001).

Des macrophages et des neurones exprimant respectivement TRAIL et des récepteurs de mort du TRAIL ont également été mis en évidence dans des tissus de cerveaux (encéphale) de patients infectés par le VIH (Yang et al., 2003).

5.1. Rôle du ligand TRAIL chez les cellules NK

Les cellules NK (Natural Killer) sont des cellules qui produisent diverses chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) et cytokines (IFN- γ , TNF- α) (Robertson, 2002) L' IFN- γ sécrété par les cellules NK oriente une réponse immunitaire de type Th1 (Mocikat et al., 2003), en activant les CPA et les molécules de CMH de classe I (Wallach, 1982).

Il a été établi un rôle primordial du dialogue entre les cellules NK et les DC dans l'induction d'une réponse immunitaire efficace (Fernandez et al., 1999). Les cellules NK peuvent aussi exercer leur activité cytotoxique en induisant l'apoptose des cellules DC infectées par le VIH par la voie TRAIL/DR4 (Fernandez et al., 1999). En effet, les DC infectées expriment le récepteur DR4, alors que les cellules NK expriment le ligand de mort TRAIL. Cependant, les DC infectées ont mis en place un mécanisme d'échappement à l'apoptose. En effet, l'interaction NK-DC entraîne l'augmentation de l'expression de deux molécules inhibitrices de la voie TRAIL, cIAP (cellular Inhibitor of Apoptosis) et cFLIP (cellular-Flice Like Inhibitory Protein). Il a été prouvé que l'alarmine HMGB-1 (High mobility group box 1) était impliquée dans la régulation de c-IAP et c-FLIP et ainsi dans le mécanisme de résistance à la mort induite par TRAIL/DR4 et la survie des DC (Melki et al., 2010).

Un dialogue entre les NK et les pDC a également été démontré. Les NK activées par l'IL-2 améliorent la maturation et la production d'IFN- α par les pDC (Gerosa et al., 2005). Il a aussi été montré lors de l'interaction pDC-NK que les pDC permettent l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation CD69 sur les NK, ayant pour conséquence une meilleure cytotoxicité anti-tumorale de ces dernières (Romagnani et al., 2005)..

5.2. Rôle de l'interaction TRAIL/DR5 au niveau des pDC

Les interférons de type 1 (IFN- α/β) sont des cytokines qui exercent des actions pléiotropes, notamment antivirales, et inhibent *in vitro* la réplication du VIH (Yamamoto, J.K, J Interferon Res 1986). En parallèle, l'IFN- α sécrété par les pDC induit l'expression de TRAIL par les lymphocytes T CD4⁺, infectés ou non, induisant l'apoptose des cellules DR5⁺ (Herbeuval, PNAS, 2005). Ce phénomène expliquerait la diminution massive du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants, signant la progression vers la phase SIDA (Herbeuval, Blood 2005). Dans notre modèle, l'IFN α aurait un rôle double : un effet antiviral protecteur d'une part, avec un rôle des IFN- α dans le contrôle de la réplication virale et la diminution du corécepteur du VIH CXCR4 à la surface des pDC, et un rôle délétère avec l'induction du ligand TRAIL à la surface des lymphocytes T (Hardy, PNAS 2007), potentialisant l'apoptose de ces derniers (Herbeuval, Clinical Immunol 2006). Ainsi nous avons démontré que lors de l'infection par le VIH, le rôle des IFN semble complexe et ne se limite pas à une action antivirale protectrice.

➤ Etude *in vitro* de l'interaction TRAIL-DR5

Le VIH pénètre dans les pDC après s'être fixé sur son récepteur CD4 présent à la surface des pDC. La voie d'endocytose est alors activée, le virus est dégradé et l'ARN viral active les TLR7 présents dans les endosomes des pDC (Hardy et al., 2007; Herbeuval et al., 2005d). Une fois activées, les pDC circulantes expriment les marqueurs de maturation CD80/CD83/CD86, d'activation CD40 et TRAIL. Parallèlement, les pDC produisent de grandes quantités d'IFN- α . Les pDC se transforment alors en cellules tueuses, les IkpDC. Lors de la stimulation par le VIH, les pDC expriment aussi le marqueur de migration CCR7, qui leur permet alors de migrer du sang vers les organes lymphoïdes secondaires (Beignon et al., 2005b; Fonteneau et al., 2004; Herbeuval et al., 2006). La particularité du VIH est d'induire l'expression du récepteur du TRAIL DR5 à la surface des lymphocytes T CD4. De plus, l'IFN- α produit par les pDC induit l'expression du ligand proapoptotique TRAIL à la

surface de ces memes lymphocytes. Ainsi, les LTCD4⁺ DR5⁺ deviennent les cibles des cellules exprimant TRAIL, c'est-à-dire à la fois les IkpDC et les LTCD4⁺ eux-memes. Selon notre modèle d'étude, la voie TRAIL/DR5 médiée par les pDC pourrait expliquer la mort massive des LTCD4⁺ observée chez les patients infectés par le VIH (Hardy et al., 2007; Stary et al., 2009) (Figure 28).

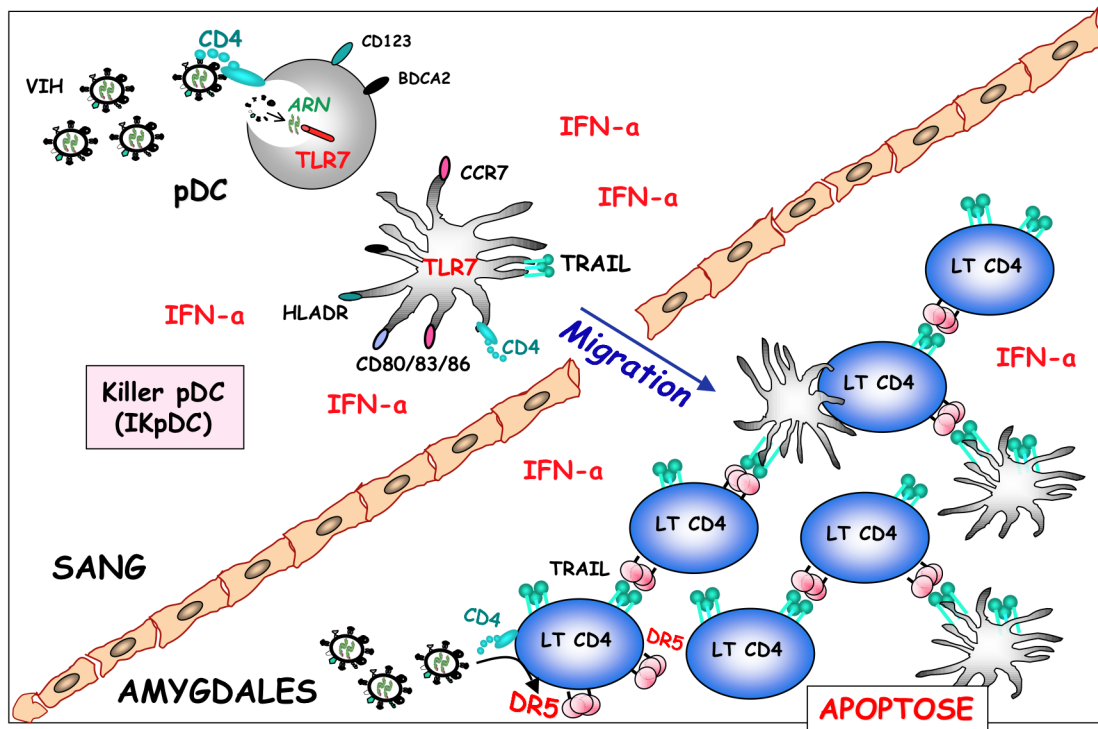


Figure 28: Modèle d'étude *in vitro* de la mort massive des LTCD4⁺ chez les patients VIH.

Une étude très récente a montré que les IFN de type I produits par les pDC lors de l'infection par le VIH contribuaient à la déplétion des cellules TCD4 dans le thymus humain (Sivaraman et al., 2011). Cette étude *in vitro* dans le thymus humain vient appuyer notre hypothèse du rôle primordial des pDC et des interférons dans la mort des LTCD4⁺ dans l'infection par le VIH..

➤ Expression de TRAIL chez les patients infectés par le VIH

Le dosage sérique des patients a mis en évidence une concentration de TRAIL 3 à 4 fois plus élevées chez les patients infectés par le VIH que chez les donneurs sains (Herbeuval et al., 2005a; Herbeuval et al., 2005b). De plus, l'augmentation de TRAIL sérique corrèle

positivement avec la charge virale suggérant l'implication de TRAIL dans la déplétion massive des LT CD4⁺ chez les patients en phase SIDA. Notons également que le traitement antirétroviral diminue le taux plasmatique de TRAIL et également la charge virale. Ainsi, le dosage sérologique de TRAIL peut être considéré comme facteur de progression vers la maladie.

Une étude récente a clairement démontré que les pDC présentes dans les amygdales de patients en phase SIDA exprimaient TRAIL (phénotype IKpDC) et induisaient l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ (Stary et al., 2009). En effet, les auteurs ont caractérisé dans cette étude *in vivo* la présence de pDC (BDCA-2⁺) et leur implication dans la mort des LTCD4⁺. Ils ont identifié dans les amygdales de patients virémiques des pDC exprimant TRAIL et montré que TRAIL corrélait positivement avec la charge virale. Par opposition, les amygdales de patients non virémiques et de donneurs sains ne présentaient pas de pDC TRAIL⁺. De plus, des marquages par immunofluorescence ont permis de localiser pour la première fois chez l'homme *in vivo* un contact direct entre les pDC TRAIL⁺ et les LTCD4⁺ en apoptose dans des amygdales de patients infectés par le VIH (Figure 29). Cette étude appuie donc nos études *in vitro* sur le rôle des pDC tueuses dans la déplétion massive des LTCD4⁺ observée chez les patients infectés par le VIH. Cependant, nous pensons que l'utilisation des anticorps R&D a engendré une confusion puisque nous avons observé que ces anticorps dirigés contre DR4 et DR5 croisaient. Une étude antérieure a démontré que les amygdales de patients virémiques exprimaient TRAIL, DR5 et IFN- α en comparaison aux patients HIV-controllers et donneurs sains (Herbeuval et al., 2006).

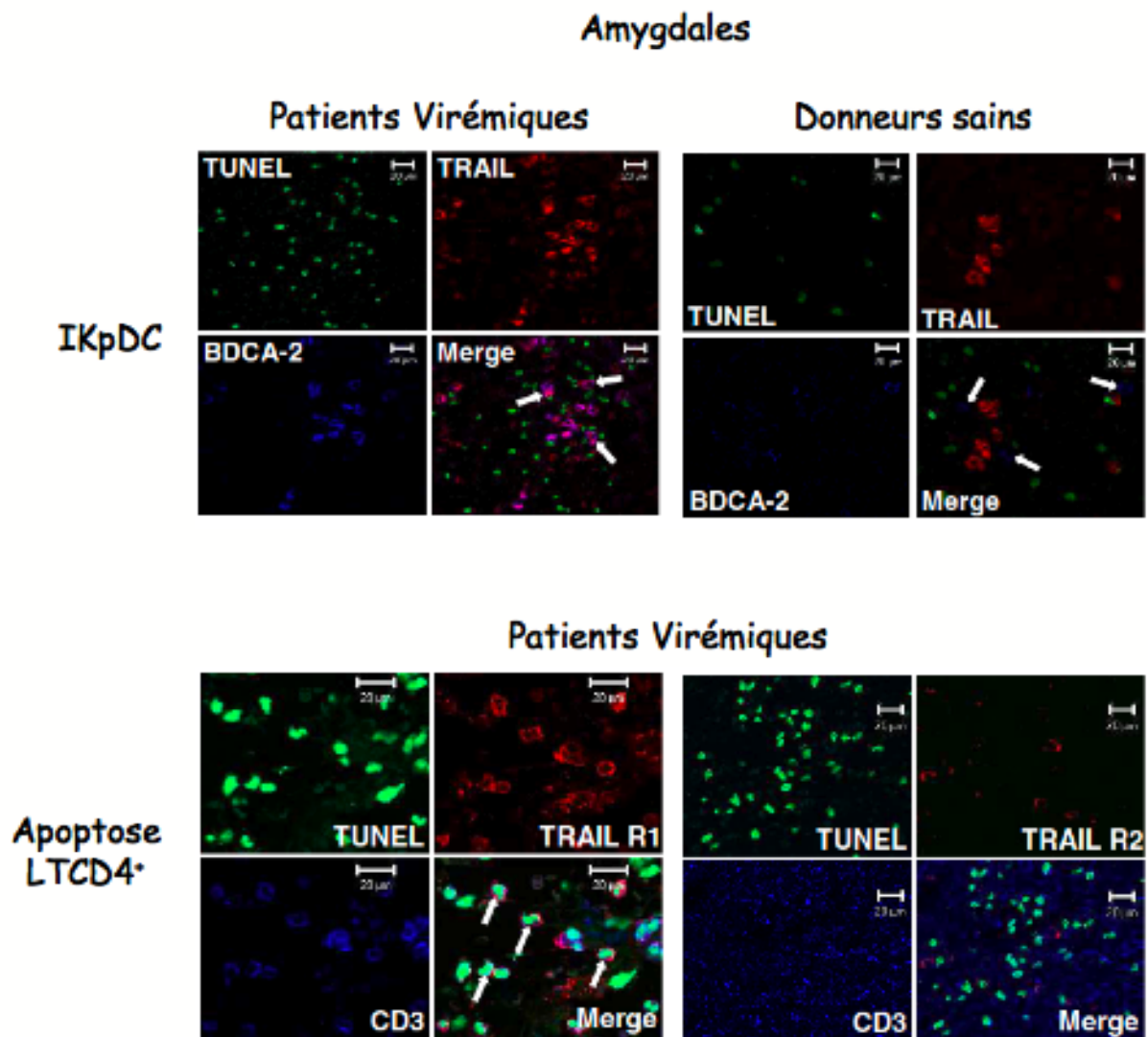


Figure 29: Mise en évidence d'une proximité entre les pDC TRAIL⁺ et les LTCD4⁺ en apoptose dans les amygdales de patients virémiques, en comparaison avec des amygdales de donneurs sains.

Les deux panels du haut identifient la présence de pDC BDCA-2⁺ (bleue) et TRAIL⁺ (Cy5), en contact avec des cellules en apoptose (TUNEL-FITC) dans les amygdales de patients virémiques, contrairement aux donneurs sains. Les deux panels du bas représentent les LTCD4⁺ en apoptose (TUNEL-FITC) exprimant le récepteur TRAIL-R1 (Cy5) chez les patients virémiques (Stary et al., 2009).

5.3. TRAIL dans l'infection des singes par le VIS

Le rôle délétère de l'IFN- α produit par les pDC dans le modèle simien a également été établi dans le modèle macaque, où de fortes concentrations d'IFN- α ont été dosées. Par opposition, une production réduite d'IFN- α a été montrée dans le modèle simien non pathogénique (Sooty Mangabey, SM et African Green Monkey, AGM).

	African Green Monkey (AGM)	Rhesus Macaque (RM)
Activation immune	NON	OUI
Développement SIDA	NON	OUI
Charge virale	OUI	OUI
Déplétion des LTCD4+	NON	OUI

Figure 30: Modèle African Green Monkey (AGM) versus Rhesus Macaque (RM).

De plus, il a été montré que le nombre de pDC augmenté dans les organes lymphoïdes des macaques, corrèle positivement avec la charge virale (Dillon et al., 2008) et le taux d'IFN- α (Malleret et al., 2008).

L'étude comparative des modèles simiens résistant (AGM et SM) et sensible (RM) au SIV a permis d'établir une réponse IFN α différente entre les deux modèles. En effet, Jacquelin et al. a montré l'existence d'une réponse innée forte et rapide *in vivo* chez les AGM et les RM, mais contrôlée uniquement chez les AGM. En réponse au SIV, les AGM sont capables de produire de l'IFN- α et d'exprimer les ISGs (Jacquelin et al., 2009). Cependant, la réponse des ISGs est transitoire chez les AGM, probablement liée à des mécanismes de régulation qui n'existent pas ou qui sont inhibés chez les RM.

Ainsi, des résultats contradictoires ont été observés pour expliquer la résistance des sooty mangabey en comparaison à la progression vers la maladie des rhesus macaques. En effet, une étude a suggéré qu'un polymorphisme IRF7 (Mandl et al., 2008) identifié chez les singes résistants (sooty mangabey) empêcherait les pDC de produire de l'IFN- α . Cette absence d'activation immune, qui est à l'inverse fortement présente chez les rhesus macaques, contribuerait à la résistance des SM à la progression de la maladie. En opposition, d'autres études suggèrent que les singes résistants (SM, AGM) répondent fortement au SIV en produisant de l'IFN- α mais que cette activation immune est ensuite régulée 8 semaines après l'infection par des mécanismes encore inconnus (Jacquelin et al., 2009; Silvestri et al., 2005) (Figure 31).

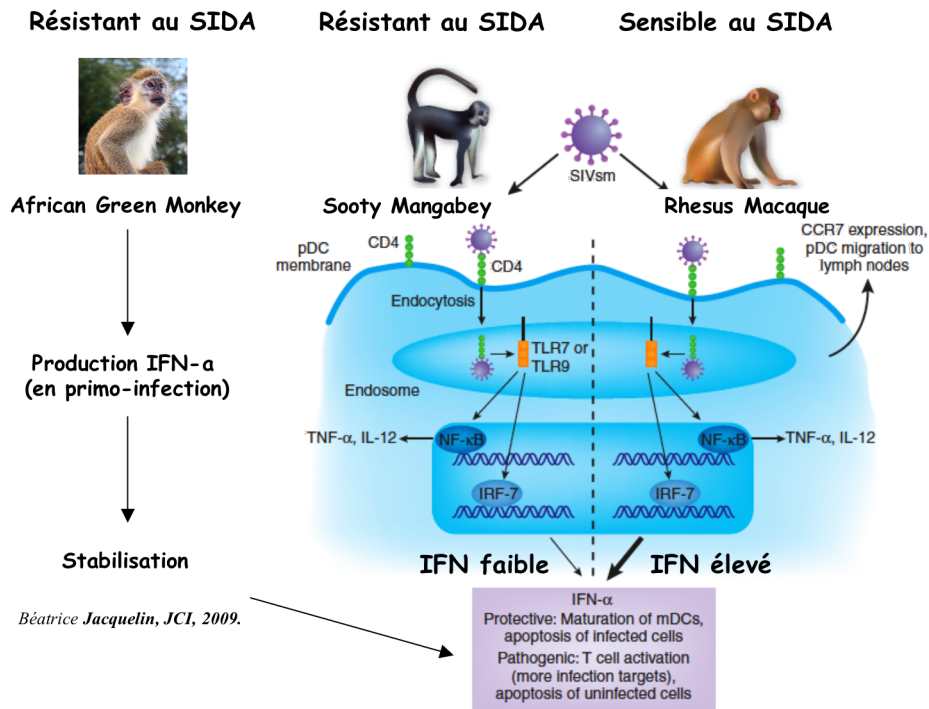


Figure 31: Schéma expliquant les différences entre les modèles simiens sensibles (Rhésus macaques, RM) et résistants (African Green Monkey (AGM), et Sooty mangabey (SM)) au SIDA.

5.4. Effet de la trithérapie sur la voie TRAIL/DR5 chez les patients/singes infectés par le VIH/VIS

Le traitement antirétroviral (HAART) a permis de réduire de manière drastique le nombre de morts chez les patients infectés par le VIH en diminuant la réplication virale (Gulick et al., 1997) et la mort des LT CD4⁺ (Badley et al., 1998; Dyrhol-Riise et al., 2001). La trithérapie réduit également l'activation immunitaire dans le sang et les amygdales (Dyrhol-Riise et al., 1999). De plus, il a été montré que le traitement HAART réduit de manière significative l'expression de TRAIL et DR5 par les LT CD4⁺ sanguins des patients traités comparés aux patients non traités (Herbeuval et al., 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle simien. La déplétion lymphocytaire se faisant essentiellement dans les organes lymphoïdes, la voie TRAIL/DR5 a été étudiée dans les amygdales. Comme cela a été observé

dans le sang, la trithérapie réduit significativement l'expression de TRAIL dans les amygdales humaines et simiennes.

L'étude de DR5 fut plus surprenante. Contrairement à ce qui avait été observé dans le sang, les amygdales de patients sous trithérapie expriment autant de DR5 que les amygdales de patients non traités (Herbeuval et al., 2009). Le modèle simien a confirmé ces résultats. Cette étude a révélé la capacité de la trithérapie à réduire l'expression des ligands apoptotiques TRAIL et FasL, ce qui est suffisant pour arrêter la mort des LT CD4⁺. En revanche, l'expression des récepteurs de mort étant inchangée dans les organes lymphoïdes, l'hypothèse d'une seconde infection virale ou bactérienne capable d'induire TRAIL pourrait réactiver le processus de déplétion des lymphocytes T CD4⁺ chez des patients traités.

Objectifs de la thèse

L'activation immunitaire chronique joue un rôle essentiel dans la progression vers le SIDA. Mes travaux de thèse se sont orientés sur l'étude des patients HIV contrôlés qui ont la particularité de contrôler naturellement le virus. Nous nous sommes demandés si la réponse innée des cellules dendritiques plasmacytoïdes de ces patients était altérée (comme chez les singes résistants). Mes différents projets de recherche, échelonnés sur une période de 5 ans dans l'équipe de Jean-Philippe Herbeuval, et qui incluent également l'étude d'un autre rétrovirus, le virus HTLV-1, ont porté sur l'étude de la voie IFN- α /TRAIL/DR5 et sa régulation.

Les objectifs de ma thèse sont les suivants:

1) L'étude de la réponse innée des pDC induite par HTLV-1.

Tout d'abord, nous nous sommes demandés si le virus HTLV-1 était capable d'induire une réponse innée par les pDC. En effet, étant donné que les pDC sont les seules cellules exprimant de manière constitutive le récepteur d'HTLV-1, la neuropilin-1 (NRP-1), plus connue sous le nom de BDCA-4 (marqueur spécifique des pDC), il était donc intéressant d'étudier le rôle des pDC dans HTLV-1. Pendant longtemps, il a été établi que les virus libres d'HTLV-1 ne pouvaient pas infecter les cellules, et que l'infection se faisait par contact cellule-cellule. Récemment, Jones et al. ont démontré que les mDC et les pDC pouvaient être infectées par les virus libres d'HTLV-1. Aucune donnée dans la littérature ne traitait de la réponse innée induite par les pDC sous HTLV-1. Le but de notre étude a donc été de mettre en évidence une réponse innée des pDC en caractérisant leur phénotype sous stimulation virale et d'établir si les pDC pouvaient acquérir le phénotype tueur des IKpDC. Un autre défi lors de cette étude a été de concentrer des virus HTLV-1 à partir de lignées MT-2 (cellules T infectées par HTLV-1) afin d'optimiser nos conditions de stimulations en culture, les surnageants de lignées n'étant pas assez concentrés pour induire une réponse efficace des pDC. Enfin, cette étude a été le point de départ de l'apprentissage de la microscopie en 3 dimensions.

2) L'étude des pDC chez les patients HIV-Contrôlés.

Cette étude a été menée en collaboration avec l'INSERM U1012 au Kremlin-Bicêtre. Les Pr Jean-François Delfraissy et Olivier Lambotte coordonnent la cohorte de patients infectés par le VIH-1, incluant des patients HIV-Contrôlés (HIC). Dans le modèle simien, il a été montré qu'une diminution de l'activation immunitaire chronique, associée à un défaut de production

d'IFN- α pourrait expliquer la non-progression vers la phase SIDA des Sooty Mangabeys, contrairement aux Rhesus Macaques qui sont sensibles au SIV. Il nous a donc paru primordial de regarder si dans notre modèle humain, les patients HIV-Controllers présentaient ce même défaut qui permettrait d'expliquer en partie leur résistance face au VIH-1. Notre but a donc été, en comparant nos résultats avec des donneurs sains et des patients virémiques, de caractériser les pDC chez les patients HIC afin de déterminer s'il existait un défaut quantitatif et/ou qualitatif des pDC, et de tester leur réponse *in vitro* au VIH-1 en dosant l'IFN- α et en caractérisant le phénotype des pDC activées (analyses en cytométrie en flux, microscopie 3D).

3) L'étude des LTCD4⁺ et de la voie TRAIL/DR5 chez les patients HIV-Controllers.

Prallèlement, nous avons étudié si les HIC présentaient un défaut d'activation de la voie TRAIL/DR5. Ce projet consistait à étudier l'expression du ligand apoptotique TRAIL et de son récepteur DR5, afin de déterminer si un défaut d'expression au niveau de ces deux molécules pouvait expliquer la résistance des LTCD4⁺ des patients HIC. Il avait été précédemment établi dans une étude *in vitro* menée par notre équipe l'implication de la voie TRAIL/DR5 dans la mort massive des LTCD4⁺ observée chez les patients infectés par le VIH-1. Ainsi, notre étude a consisté à étudier au niveau messager et protéique l'expression du récepteur de mort DR5 par des techniques de cytomètre de flux et de microscopie 3D. Cette étude menée sur 3 ans nous a amené à séquencer le gène DR5 et à collaborer avec l'équipe d'Andrea Cimarelli à l'ENS-Lyon afin d'étudier l'expression des différentes formes de DR5 par des approches de génétique et de mutagenèse.

4) L'étude d'inhibiteurs de la production d'IFN- α et de l'activation des pDC.

L'origine de ce projet remonte à mon Master 2, où nous cherchions à développer des inhibiteurs qui permettraient de réguler l'activation des IkpDC. En effet, dans le cas du VIH, l'IFN produit par les pDC joue un rôle délétère et contribue à la mort des LTCD4⁺ qui expriment le récepteur associé DR5. D'après une étude menée par Mazzoni et al, nous avons testé l'effet de l'histamine et plus particulièrement d'un ligand synthétique de l'histamine, le clobenpropit (CB), sur les pDC stimulées par le VIH-1. Nous avons observé une diminution de la production d'IFN- α par les pDC stimulées et une régulation négative générale de l'état d'activation des pDC. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du CB, nous avons synthétisé en collaboration avec Isabelle McCort à la faculté des Saint-Pères, une amine

fluorescente (False Fluorescent Neurotransmitters, FFN 511) mimant les effets du CB. Notre but était alors de localiser le FFN 511 dans les pDC par microscopie 3D et d'étudier son niveau d'action sur les molécules intervenant dans la voie TLR7.

Matériels et Méthodes

Prélèvements sanguins. 12 patients HIV-1 controllers de la cohorte ANRS Co18 (Lambotte et al., 2005; Saez-Cirion et al., 2007) ont été sélectionnés selon les caractéristiques suivantes: patients infectés par le VIH-1 depuis plus de 10 ans, n'ayant jamais reçu de traitement antiretroviral, avec plus de 90% des mesures d'ARN viral plasmatique inférieures à 400 copies/mL (Amplicor Monitor, Roche Diagnostics, Meylan, France). En groupe témoin, 14 patients virémiques non traités et chroniquement infectés (VIR) ont été sélectionnés à l'hôpital Bicêtre. De plus, 15 donneurs sains testés séronégatifs pour le VIH-1 provenant de l'Établissement Français du Sang" (convention # 07/CABANEL/106, Paris, France) ont également servi comme témoins négatifs.

Isolation et culture des leucocytes sanguins. Les expériences *in vitro* ont été réalisées à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) isolées par centrifugation à l'aide d'un milieu de séparation des leucocytes du sang périphérique (Cambrex, Gaithersburg, MD). Les lymphocytes TCD4⁺ ont été purifiés en utilisant le kit de purification (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Les cellules ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone, Logan, UT) et 1% de Pen-Strep-Glut (Invitrogen) dans une plaque 48 puits avec 1.10⁶ LTCD4⁺/puits/1mL de milieu. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été sélectionnées négativement en utilisant le kit de séparation des pDC (Stem Cell).

Stimulations virales. Les PBMC, LTCD4⁺ des donneurs sains, des patients HIV-1 controllers ou virémiques ont été mis en culture dans des plaques 48 puits à 10⁶ cellules pour 1 mL. Les pDC ont, quant à elles, été mises en culture dans une plaque 96 puits à 50 000 cellules/puits/100µL de milieu. En fonction des conditions de stimulations souhaitées suivant nos différentes études, les cellules ont été cultivées sur la nuit avec du virus non infectieux VIH-1 AT-2 (souche MN) à une concentration de 60 ng/mL p24, du virus de la grippe *Influenza* (Flu, souche PR8), HSVou SeV. Les cellules ont alors été utilisées pour des analyses de cytométrie en flux (FACS), de PCR et de microscopie à 3 dimensions (3D).

Cytométrie en flux. Les cellules cultivées ont été incubées pendant 20 mins à 4°C avec des anticorps d'intérêt (voir tableau des anticorps). Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS ou du tampon Annexin V et analysées à l'aide du cytomètre en flux FACSCanto à 7 couleurs en utilisant le logiciel FACSDiva (BD Biosciences). Enfin, le logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, OR) a permis d'analyser les données obtenues au FACS.

Anticorps	Fonction	Cellule Ciblée	Fournisseur
DR4	Récepteur de mort	LTCD4 ⁺	Alexis
DR5	Récepteur de mort	LTCD4 ⁺	Alexis
DcR1, DcR2	Récepteur leurre	LTCD4 ⁺	Sigma-Aldrich
Tweak-R	Récepteur de mort	LTCD4 ⁺	Sigma-Aldrich
FAS (CD95)	Récepteur de mort	LTCD4 ⁺	BD Pharmingen
BDCA-2	Marqueur de pDC	pDC	Miltenyi
BDCA-4	Marqueur de surface	pDC	Miltenyi
CD123	Marqueur de surface	pDC	Miltenyi
CD4	Marqueur membranaire	pDC et LTCD4 ⁺	Miltenyi
CD14	Marqueur de surface	Monocytes	BD Pharmingen
CD3	Marqueur de surface	Cellules T	BD Pharmingen
CD80	Marqueur de maturation	pDC	BD Pharmingen
CD83	Marqueur de maturation	pDC	BD Pharmingen
CD86	Marqueur de maturation	pDC	BD Pharmingen
HLA-DR	Marqueur de maturation	pDC	BD Pharmingen
CD40	Marqueur d'activation	pDC	BD Pharmingen
TRAIL	Marqueur d'activation	pDC et LTCD4 ⁺	BD Pharmingen
CD69	Marqueur d'activation	LTCD4 ⁺	BD Pharmingen
Annexin-V	Marqueur d'apoptose	LTCD4 ⁺	Miltenyi
TOPRO-III	Marqueur d'apoptose	LTCD4 ⁺	Invitrogen
7 AAD	Marqueur d'apoptose	LTCD4 ⁺	BD Pharmingen

Transfection par siRNA. Les LTCD4⁺ ont été cultivés à 10⁵ cellules pour 100ml de milieu dans des plaques de 96 puits et incubés à 37°C. 3µl de réactif de transfection Hiperfect (Qiagen, Courtaboeuf, France) ont été ajoutés avec la concentration appropriée de siRNA et complétés à 100µl de milieu dépourvu de sérum. Ensuite, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Après incubation, le mélange a été mis en culture avec les cellules sur la nuit. Les cellules ont ensuite été mises en culture 24h en présence ou non du VIH-1. Parallèlement, un contrôle a été réalisé en utilisant un siRNA scramble et l'efficacité de la transfection testée par FACS en utilisant un siRNA scramble couplé à Alexa-

488 (Qiagen). L'apoptose a été mesurée par marquage avec l'Annexin-V (BD Bioscience) et analysée ensuite par FACS.

Extraction d'ARN. 500mL de Trizol (Sigma) sont ajoutés aux culots des LTCD4⁺, puis les cellules sont mélangées pendant 1 minute et incubées à température ambiante pendant 5 minutes. 100mL de chloroforme sont ensuite ajoutés et le mélange est centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 min. La phase supérieure est retirée et 500mL d'isopropanol (Sigma) sont ajoutés et incubés pendant 1 hour at 4°C. Le mélange est alors centrifugé pendant 10 mins à 13 000 rpm. 500mL d'éthanol 75°C sont ajoutés aux culots après avoir retiré l'isopropanol (13 000 rpm during 15 mins). Enfin, les culots sont repris dans 5 mL of H₂O-DEPC (Sigma). Les ARN peuvent être alors stockés à -80°C.

Transcription inverse. La quantité d'ARN est dosée et 1mg d'ARN par échantillon est utilisé pour réaliser la transcription inverse. Nous préparons un mixe de 12 mL composé d'ARNm, des hexa-primers et d'H₂O-DEPC. Les échantillons sont incubés à 65°C pendant 5 mins. Un mélange contenant du tampon 5X, un mixe des dNTP, un RT enhancer et une enzyme Verso est préparé (Verso cDNA Kit, Thermo Fisher Scientific, abgene, UK). Les échantillons sont alors incubés 5 mins à température ambiante pendant 1h à 42°C et 2 mins à 95°C.

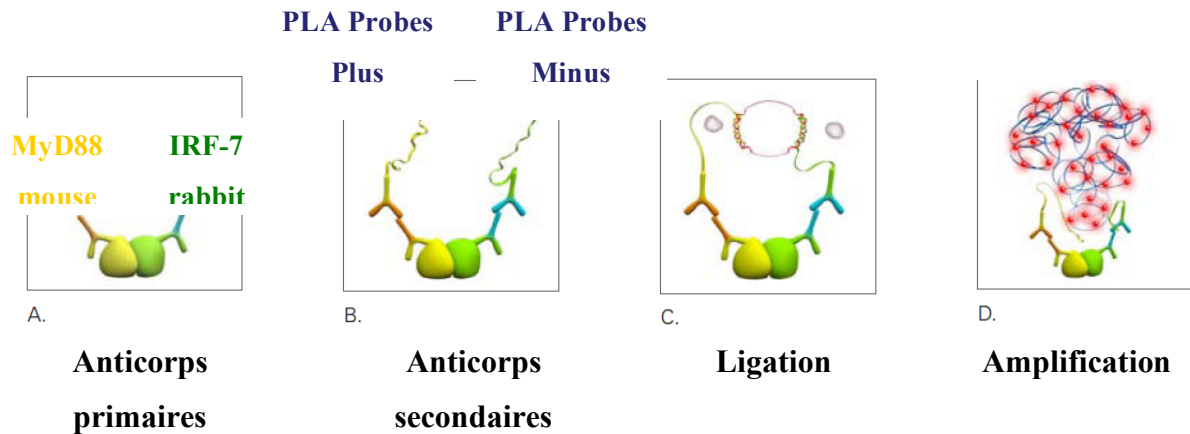
PCR. Les amorces sont synthétisées par Invitrogen (amorce sens DR5 : 5' AGGTGAAGTGGAGCTAAGTC 3', antisens DR5 : 5' TCACTCCAGGGTGTACAATC 3' ; amorce b2-microglobuline sens : 5' CCAGCAGAGAATGGAAAGTC, b2-microglobuline antisens : GATGCTGCTTACATGTCTCG). La réaction d'amplification est réalisée par la machine Mastercycler Eppendorf suivant le programme suivant : Tm 55°C, Lid 110°C, 5 mins at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min 30 at 72°C, 1 min at 94°C (35 cycles) et enfin 10 mins at 72°C. Les échantillons sont déposés sur électrophorèse gel d'électrophorèse d'agarose 1% pendant 2h à 80V.

Microscopie à 3 dimensions (3D). Après culture, les cellules sont adhérentes pendant 1h à 37°C sur des lamelles préalablement incubées pendant 1h à température ambiante (TA) avec de poly-L-lysine (Sigma), puis lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées avec de la paraformaldehyde à 4% pendant 20 mins, lavées à nouveau deux fois avec du PBS 1X et incubées 5mins à TA avec 0.1 M glycine. Les cellules sont alors incubées avec les anticorps d'intérêts mélangés dans du milieu contenant de la saponine pendant 30 mins à TA, puis lavées deux fois dans du PBS-SVF 2%. Le montage des lames se fait à l'aide du Fluoroshield comprenant le marqueur nucléaire DAPI. L'acquisition des lames se fait à l'aide du microscope Nikon Eclipse 90i Upright (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands). Les résultats acquis sont ensuite déconvolués (algorithme Meinel) et enfin analysés à l'aide du logiciel Metamorph® (MDS Analytical Technologies, Warriner, UK). Les analyses de la reconstruction 3D des cellules se fait à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Les expériences ont été réalisées sur des pDC et des LTCD4⁺ de donneurs sains, de patients virémiques et controllers.

Anticorps Primaire	Fournisseur (primaire)	Anticorps secondaire	Fournisseur (secondaire)	Cellule Ciblée
IRF7 rabbit	Abcam	anti-rabbit AF647	Invitrogen	pDC
MD88 mouse	Clinisciences	anti-mouse 488	Jackson Immunoresearch	pDC
TLR7 rabbit	Clinisciences	anti-rabbit AF647	Invitrogen	pDC
TRAIL mouse	ebiosciences	anti-mouse 488	Jackson Immunoresearch	pDC et LTCD4 ⁺
DR5 mouse	ebiosciences	anti-mouse 488	Jackson Immunoresearch	LTCD4 ⁺
CD4	BD Biosciences	AlexaFluor 547		LTCD4 ⁺
(DAPI)	Sigma-Aldrich	-	-	Noyau

Duolink. Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier par microscopie des interactions entre deux protéines (MyD88 et IRF7) dans les pDC. Après culture, les cellules sont adhérentes pendant 1h à 37°C sur des lamelles préalablement incubées pendant 1h à température ambiante (TA) avec de poly-L-lysine (Sigma), puis lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées avec de la paraformaldehyde à 4% pendant 20 mins, lavées à nouveau deux fois avec du PBS 1X et incubées 5mins à TA avec 0.1 M glycine. Les cellules sont alors incubées avec les anticorps primaires dirigés contre MyD88 (mouse) et IRF7 (rabbit) avec de la saponine pendant 30 mins à TA, puis lavées deux fois dans du PBS-SVF 2%. Ensuite, les anticorps secondaires (anti-mouse et anti-rabbit) couplés avec les oligonucléotides (PLA probe MINUS et PLA probe PLUS) sont incubés pendant 1h à 37°C.

Une solution de ligation, composée de deux oligonucléotides et d'une ligase, est ajoutée et les oligonucléotides vont alors s'hybrider avec les PLA probes et se rejoindre pour former un cercle s'ils sont très proches l'un de l'autre (incubation 30 mins à 37°C). Une solution d'amplification composée d'oligonucléotides fluorescents est ajoutée en présence de la polymérase et incubée pendant 1h40 à 37°C. Le signal amplifié est visible et se distingue par un spot bien défini lors de l'acquisition des cellules au microscope.



Séquençage du gène DR5. L'ADN des cellules des patients HIV-1 controllers et des virémiques a été extrait à partir de 0.5×10^6 PBMC (QIAmp Blood Kit Qiagen, Hilden, Germany) et les 10 exons du gène DR5 ont été amplifiés à l'aide de 8 paires d'amorces en utilisant le KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen®). Pour chaque PCR, 20 ng d'ADN ont été nécessaires. Les produits de PCR ont été séquencés en utilisant le BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, US) et ont ensuite été déposés sur un gel ABI 3730XL DNA capillary-gel sequencer (Applied Biosystems). Les produits de séquence ont été analysés en utilisant le logiciel Mutation Surveyor – Version 3.24 – (SoftGenetics, adresse). Les échantillons ont été analysés en dupliquata. La séquence de référence du NCBI est NM_147187.2 et le Transcript Ensembl: TNFRSF10B-002 (ENST00000347739).

Clonage de DR5. Le gène DR5 sauvage (WT) tagué au niveau de la région C-terminal (database sequence NM_003842.4) a été obtenu après amplification par RT-PCR d'ARN extrait de lymphocytes primaires du sang, puis cloné par des techniques de biologie moléculaire dans un vecteur de transfert pAIP (Neagu et al., 2009). Ce vecteur représente le génome viral du vecteur lentiviral basé sur le VIH-1 (Naldini et al., 1996) dépourvu de la région open reading frame mais conduisant à l'expression de DR5 avec sélection par la

Puromycine. Le clonage de DR5 dans cette construction permet une expression stable de DR5. La mutation P32L a été introduit *de novo* par mutagenèse standard.

Lignées cellulaires stables. Les vecteurs lentiviraux codant pour DR5 ont été produits par transfection (calcium phosphate) des cellules HEK293T avec 3 constructions d'ADN codant: les protéines structurales et non-structurales du VIH-1 (Gag-Pro-Pol+ protéines accessoires); la protéine d'enveloppe du virus VSVg (Vesicular Stomatitis Virus G envelope protein), le plasmide de transfert codant la forme WT et mutante de DR5. Les vecteurs codant pour les formes WT et mutante de DR5 ont alors été produits et transduits dans des cellules HEK293T cells. Les cellules stables ont été sélectionnées en présence constante de Puromycine.

Western blot. Pour réaliser les analyses de Western blot, un nombre équivalent de cellules sont lysées et analysées par SDS-PAGE en utilisant un anti-Flag (SIGMA) ou un anticorps anti-DR5 (Cell Signaling, Ozyme Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines France).

ELISA. Cette technique permet de quantifier la production de protéines par reconnaissance d'Ac. Les surnageants de cellules sont incubés pendant 1h avec l'Ac primaire qui se fixe sur la protéine à doser. L'Ac primaire est ensuite fixé par un Ac secondaire couplé à une enzyme qui, en présence de son substrat, modifie l'intensité de coloration des puits. Afin de doser l'Hu-IFN α (Interféron-alpha humain), les surnageants des cultures cellulaires sont testés par ELISA sur une plaque de 96 puits avec un Ac couplé à la peroxydase HRP (Horseradish peroxidase). Le substrat utilisé est le TMB (Tetramethyl-benzidine). On se réfère à la gamme étalon (dosage d'interféron recombinant humain à différentes concentrations) afin de déterminer la quantité de protéines détectées en fonction de la densité optique (DO). Chaque dosage est fait en duplicata. La DO de chaque puits est enfin analysée par absorbance à 450 nm.

Analyses statistiques. Les expériences ont été répétées au moins 4 fois. Les P values (p) ont été déterminées en utilisant le test two-tailed Student's t ou Mann-Whitney. Les résultats sont statistiquement significatifs lorsque $p < 0.05$.

Résultats

Résultat 1 : Etude de la réponse innée des pDC
par le virus HTLV-1

But : Les pDC expriment le récepteur du virus HTLV-1, la neuropilin-1 (NP-1), plus connue sous le nom de BDCA-4 qui est le marqueur spécifique des pDC. Notre but a été de déterminer si les pDC étaient capables d'induire une réponse innée lors d'une stimulation par des virus libres d'HTLV-1.

Méthodes : Les pDC ont été purifiées par tri magnétique (sélection négative) et cultivées en présence de virus libres d'HTLV-1. Les virus présents dans les surnageants de culture des lignées MT-2 (lignées de lymphocytes TCD4 d'une patiente atteinte d'une leucémie/lymphome T de l'adulte) n'étant pas suffisants pour activer les pDC, nous avons mis au point une technique qui permet de concentrer les virus afin d'obtenir une concentration de virus suffisante pour activer les pDC. Les surnageants de culture des lignées MT2 sont centrifugés une première fois afin d'éliminer les cellules et les résidus (10 mins à 4 000 rpm). Les surnageants sont ensuite ultracentrifugés (27 000 rpm pendant 2h) et les virus concentrés sont ainsi récupérés. Les pDC sont alors cultivées en présence des virus HTLV-1 concentrés.

Objectifs : Dans un premier temps, les pDC ont été stimulées par les virus libres d'HTLV-1 et les surnageants de culture ont été récupérés dans le but de doser la production d'IFN- α . De plus, l'expression des marqueurs d'activation (CD40 et TRAIL) et de maturation (CD83, CD86) a été analysée par cytométrie en flux. Nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie d'endocytose (chloroquine) et de la voie TLR7 (A151) afin de déterminer l'implication de ces deux voies dans l'activation des pDC. Les pDC ont été visualisées par microscopie à fluorescence dans le but de détecter les virus dans les pDC et de visualiser également la transformation des pDC en cellules tueuses (IKpDC) par l'étude de l'expression du ligand pro-apoptotique.

La réponse innée lors de l'infection par le rétrovirus HTLV-1, Human T-cell leukemia virus 1 est peu documentée. Une étude récente a démontré que des virus libres d'HTLV-1 pouvaient infecter les mDC et les pDC. Les pDC sont caractérisées par l'expression de **BDCA-4** aussi appelé **neuropilin-1 (NP1)** qui a été montré comme étant un corécepteur du virus HTLV-1. Nous nous sommes alors orientés sur l'étude de la réponse innée induite par les pDC dans le cas d'une stimulation par ce rétrovirus. Nous avons cherché à savoir si, comme le VIH, HTLV-1 était capable de transformer les pDC en cellules tueuses exprimant TRAIL.

Nous avons démontré que **les virus libres d'HTLV-1** induisaient une **réponse innée** se traduisant par une **forte production d'IFN- α par les pDC stimulées**. Cette production d'IFN- α **spécifique** était **inhibée en présence d'anticorps neutralisants HTLV-1** (anticorps dirigés contre l'enveloppe virale ou en présence de sérum de patients qui ont développé des anticorps spécifiques d'HTLV-1). HTLV-1 induit également les **molécules de maturation (CD83, CD86) et d'activation (CD40)**, ainsi que l'expression rapide du **ligand pro-apoptotique TRAIL** (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) **par les pDC**, générant alors un phénotype de cellules tueuses, **les IKpDC** (Interferon producing killer pDC).

Nous nous sommes alors intéressés au mécanisme par lequel HTLV-1 active les pDC et si la voie d'endocytose est requise. Nous avons montré que la **chloroquine**, un inhibiteur de l'acidification des endosomes, et **A151**, un bloqueur spécifique de TLR7, **inhibaient la réponse des pDC à HTLV-1**. En effet, la chloroquine **inhibe de façon significative la production d'IFN- α et l'expression de TRAIL**. De plus, la chloroquine **inhibe également l'expression de CD40, CD83 et CD86** par les pDC stimulées par HTLV-1. Afin de démontrer l'implication de TLR7 dans l'activation des pDC par HTLV-1, nous avons utilisé un inhibiteur compétitif de TLR7, l'A151. Nous avons montré que l'A151 inhibe la production d'IFN- α , ainsi que l'expression du TRAIL par les pDC stimulées par HTLV-1. Ainsi, nous avons montré que la dégradation endosomale et la voie TLR7 étaient impliquées dans la transformation des pDC en IkpDC après stimulation par HTLV-1.

Enfin, l'analyse par microscopie en 3 dimensions a révélé que les pDC non stimulées étaient dans un état de quiescence mais avec des taux de TRAIL intracellulaire très élevés, rapidement mobilisés à la surface des pDC sous activation de la voie du TLR7 par HTLV-1. De plus, la chloroquine inhibait de façon significative la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC, appuyant ainsi nos résultats précédents.

Nous avons démontré que les pDC répondaient aux virions libres HTLV-1 en produisant de grandes quantités d'IFN- α et en exprimant TRAIL à leur surface après activation de la voie TLR7 par HTLV-1. C'est la première fois qu'une réponse innée induite par les particules libres d'HTLV-1 a été mise en évidence.

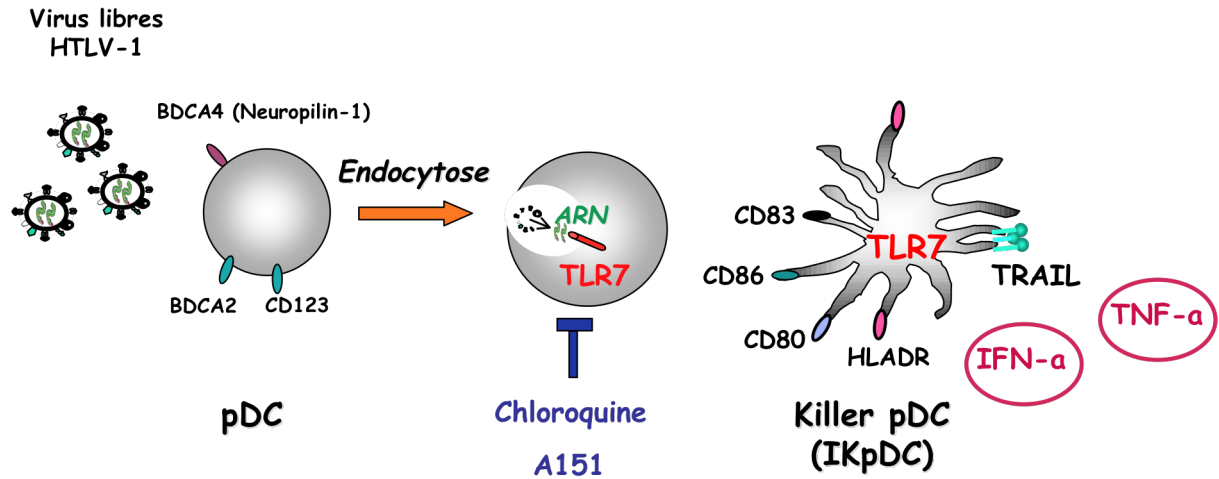


Schéma représentant l'activation des pDC par le virus HTLV-1

blood

JOURNAL OF
THE AMERICAN
SOCIETY OF
HEMATOLOGY

VOLUME 115
NUMBER 11
18 MARCH 2010

Targeting the
translational machinery
in hematologic
malignancies (p 2127)

Regulation of NK-cell
cytokine production by
target cells (p 2167)

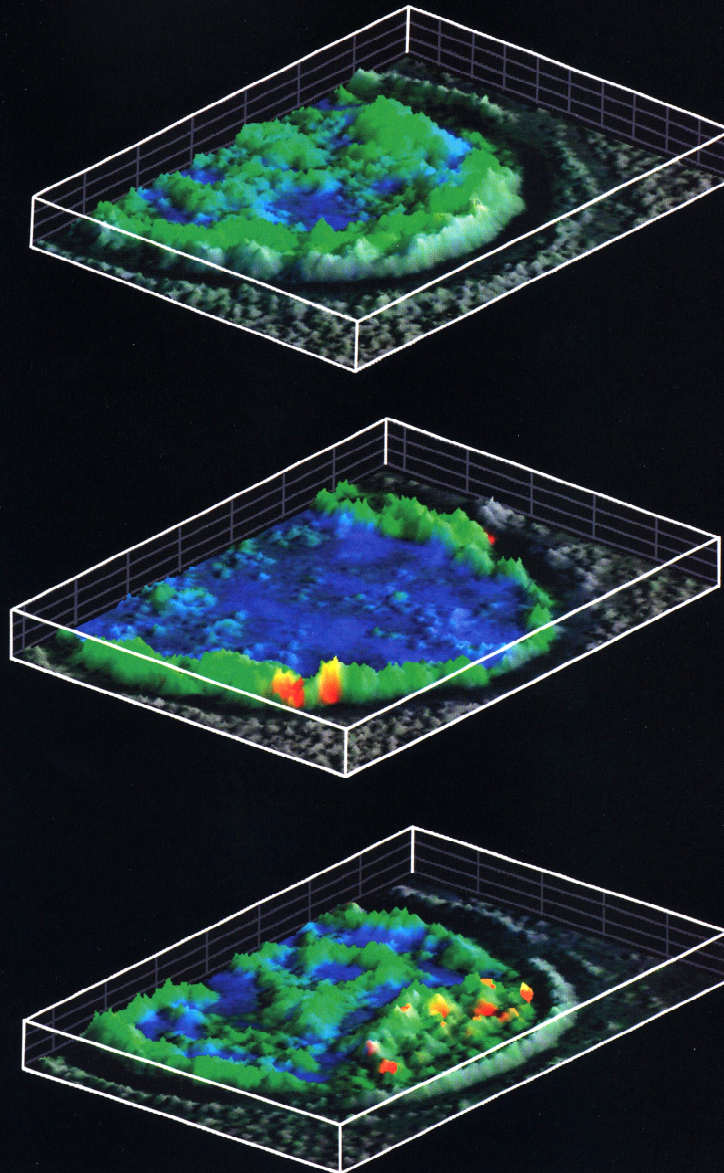
DLK1 imprinting in AML
(p 2260)

Blocking the alternative
pathway of complement
in PNH (p 2283)

The potential of
hydroxychloroquine
as treatment for
antiphospholipid
antibody syndrome
(p 2292)

Cover:
HTLV1-induced TRAIL
relocalization (p 2177)

www.bloodjournal.org



Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, Hermine O, Lepelletier Y, Herbeuval JP. Blood 2010.

•co-first authorship

Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells

*Renaud Colisson,^{1,2} *Lucie Barblu,¹ Christophe Gras,¹ Françoise Raynaud,³ Reda Hadj-Slimane,³ Claudine Pique,⁴ Olivier Hermine,¹ *Yves Lepelletier,¹ and *Jean-Philippe Herbeuval¹

¹Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS) Unite Mixte de Recherche (UMR) 8147, Université Paris Descartes, Paris; ²Inserm U932, Institut Curie; ³Inserm U648, Université Paris Descartes, and ⁴CNRS UMR 8104, Inserm U567, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris, France

A recent report demonstrated that free human T-cell leukemia virus 1 (HTLV-1) could infect plasmacytoid dendritic cells (pDCs). The major role of pDCs is to secrete massive levels of interferon- α (IFN- α) upon virus exposure; however, the induction of IFN- α by HTLV-1 remains unknown. We demonstrate here that cell-free HTLV-1 generated a pDC innate immune response by producing massive levels of IFN- α that were inhibited by anti-HTLV-1 antibodies. HTLV-1 induced costimulatory molecules and rapid expres-

sion of the apoptotic ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Furthermore, HTLV-1 stimulated pDC-induced apoptosis of CD4⁺ T cells expressing DR5, transforming pDCs into IFN-producing killer pDCs. We also observed that an endosomal acidification inhibitor and a Toll-like receptor-7 (TLR7)-specific blocker drastically inhibited pDC response to HTLV-1. Three-dimensional microscopy analysis revealed that unstimulated pDCs were "dormant" IFN-producing killer pDCs with high levels of

intracellular TRAIL that could be rapidly mobilized to the surface in response to TLR7 activation. Inhibition of viral degradation in endosomes by chloroquine maintained viral integrity, allowing virus detection by 3-dimensional microscopy. We demonstrate that pDCs respond to cell-free HTLV-1 by producing high levels of IFN- α and by mobilizing TRAIL on cell surface after TLR7 triggering. This is the first demonstration of an innate immune response induced by free HTLV-1. (Blood. 2010;115:2177-2185)

Introduction

Human T-cell leukemia virus 1 (HTLV-1), the first characterized human retrovirus,¹ has been identified as the causative agent for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL)^{2,3} and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis,⁴ uveitis, and infective dermatitis in children.⁵ HTLV-1 virions infect CD4⁺ T cells, which represent the main target for HTLV-1 infection in peripheral blood. HTLV-1-associated diseases occur after long periods of virus latency.⁶ For years it has been thought that unlike other retroviruses, free virions were poorly infectious.⁷ However, Jones et al⁸ recently reported that freshly isolated myeloid dendritic cells (mDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are efficiently and productively infected by cell-free HTLV-1. Furthermore, infected mDCs and pDCs were able to transfer virions to autologous CD4⁺ T cells, clearly demonstrating that cell-free HTLV-1 can be infectious and target DCs.⁸

pDCs participate in innate and adaptive immunity,^{9,10} are located in blood and lymphoid organs,^{10,11} and produce up to 1000-fold more interferon- α (IFN- α) than other cell types in response to virus exposure.¹² Three molecules have been characterized for HTLV-1 entry into cells, heparan sulfate proteoglycans¹³ and BDCA-4 (also called neuropilin-1)¹⁴ for the initial virus binding to target cells¹⁵ and glucose transporter 1 for the postattachment and the viral fusion.^{16,17} Interestingly, BDCA-4 is expressed by mDC and T cells^{18,19} but cells expressing the greatest level of BDCA-4 in blood are pDCs,²⁰ strongly suggesting that HTLV-1 could interact with pDCs.

Nevertheless, HTLV-1-induced immune response by professional "sentinel" pDCs has not been reported. Viral activation of pDCs can be regulated by either of 2 Toll-like receptors (TLRs), TLR7 or TLR9,²¹ which are considered to be the receptors that human pDCs use for recognition of RNA/retroviruses^{22,23} and DNA,²⁴ respectively. Virus-activated pDCs were recently reported to express the tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).²⁵ TRAIL, a TNF superfamily member,²⁶ has been shown to induce apoptosis of cancer and infected cells expressing death receptor-4 or -5 (DR4, DR5).²⁷⁻³⁰ Virus-stimulated pDCs expressing TRAIL acquired cytotoxic activity, transforming them into a new subset of killer innate immune cells,^{25,31} which may play a central role in viral immunopathogenesis.

We show in this study that cell-free HTLV-1 virions generated pDC innate immune response. Indeed, HTLV-1-stimulated pDCs produced massive levels of IFN- α , which were inhibited by neutralizing HTLV-1 antibodies (HTLV-1 patients' serum or anti-envelope antibody). HTLV-1 induced costimulatory molecules and rapid expression of TRAIL and down-regulated chemokine receptors. Furthermore, HTLV-1-stimulated pDCs induced apoptosis of CD4⁺ T cells expressing DR5 via their expression of membrane TRAIL, characterizing the IFN-producing killer plasmacytoid dendritic cells (IKpDCs). Thus, we investigated the mechanism by which HTLV-1 turned pDCs into IKpDCs. We observed that an endosomal acidification inhibitor (chloroquine) and TLR7-specific blocker (A151) drastically inhibited pDC response to HTLV-1.

Submitted June 3, 2009; accepted November 13, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 10, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-06-224741.

*R.C., L.B., Y.L., and J.-P.H. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

Three-dimensional (3D) microscopy analysis revealed that resting pDCs were “dormant” IKpDC with high levels of intracellular TRAIL that could be rapidly mobilized at the surface in response to TLR7 activation. Inhibition of viral degradation in endosomes by chloroquine maintained viral integrity, allowing virus detection in pDCs by 3D microscopy. In chloroquine-treated pDCs, intact particles were unable to stimulate the TLR7 pathway and consequently prevent TRAIL relocalization and IKpDC generation. Therefore, our study demonstrates that cell-free HTLV-1 virions induce pDC innate immune response, transforming them into functional IKpDCs.

Methods

Blood from HIV-1-seronegative blood bank donors was obtained from Etablissement Français du Sang (convention no. 07/CABANEL/106). Experimental procedures with human blood was reviewed and approved by the Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki.

Isolation and culture of blood leukocytes

In vitro experiments were performed by the use of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated by density centrifugation from peripheral blood lymphocyte separation medium (Cambrex). Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone). Fresh pDCs were isolated from healthy donor PBMCs by the use of the negative selection pDC untouched isolation kit (Miltenyi Biotec), allowing purification without any cell stimulation.

Stimulation and culture of pDCs

Purified pDCs were cultured alone, with influenza A virus, with supernatants from HTLV-1 virus-producing T-cell line (MT-2), or purified HTLV-1 from MT-2 supernatant. MT-2 cells were seeded at 10^6 /mL overnight in culture medium, then supernatants were collected and ultra centrifuged for 2 hours at 100 000g. HTLV-1 viruses were resuspended in 100 μ L of culture media and quantified by the use of the HTLV-1-p19 Elisa Kit (Gentaur). Several concentrations of p19-equivalent (0-1800 ng/mL) were used to stimulate pDCs in vitro. Blocking HTLV-1 envelope (gp-46) antibody (10 μ g/mL; Zeptomatrix) and sera-containing blocking HTLV-1 antibodies from HTLV patients (serum 1, serum 2) were used to block HTLV-1 virions.

TLR blocking assays

pDCs were cultured with HTLV-1 or CpG-A (Invivogen) in the presence of endosomal acidification inhibitor chloroquine diphosphate salt (0.1-1 μ M; MP Biomedical) or with TLR7 oligodinucleotide A151 blocker (T*T*A*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G; Integrated DNA Technologies Inc). IFN- α production, TRAIL, CD40, CD83, CD86, CXCR4, and CCR5 expression by purified pDCs stimulated or not by HTLV-1 were quantified after chloroquine and A151 treatment overnight.

Flow cytometry

After stimulation in culture, pDCs were incubated for 20 minutes at room temperature with fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody anti-human CD123 (MBL International), allophycocyanin (APC)-conjugated monoclonal anti-BDCA-2 antibody (Miltenyi Biotec), and APC-Cy7-conjugated anti-CD14 (BD Biosciences); VioBlue-conjugated anti-CD4 (Miltenyi Biotec); or with isotype-matched control antibodies (at 5 μ g/mL each; BD Biosciences) in phosphate-buffered saline containing 2% mouse serum (Sigma-Aldrich). Cells were washed twice in ice-cold Dulbecco phosphate-buffered saline and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed on a FACSCanto 7-color flow cytometer by

the use of FACSDiva software (BD Biosciences). CD4⁺CD123⁺BDCA-2⁺CD14⁻-gated cells were then tested for the expression of surface markers by the use of phycoerythrin (PE)-labeled anti-TRAIL (eBioscience), peridinin chlorophyll protein-conjugated anti-CXCR4, PE-Cy5 anti-CD83 or PE-Cy5 anti-CD86, APC-Cy7-conjugated anti-CCR5, and APC-Cy7 anti-CD40 (conjugated antibodies from BD Biosciences unless noted). FlowJo software (TreeStar Inc) was used to analyze flow cytometry data.

Cytotoxic activity assay

Fresh purified pDCs (effector) and CD4⁺ T cells (target) were cocultured. Purified pDCs were incubated with or without HTLV-1 for 6 hours, supernatants were removed, and cells were washed. In a 96-well plate, 5×10^3 target cells per well were incubated with pDCs at cell ratio effector/target 2:1. After 6 hours of coculture, cells were assayed for apoptosis by annexin-V/Topro-3 by flow cytometry. Annexin V/Topro-3 was measured on BDCA-2⁻CD3⁺CD4⁺ cells, which represent T cells.

Cytokine detection

Supernatants of cultured pDCs were tested for soluble IFN- α (Cell Sciences), or TNF- α (R&D Systems) by enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions.

Three-dimensional microscopy

pDCs were purified from healthy donor blood by the use of negative selection (Miltenyi Biotec) and were cultured overnight in the presence or absence of HTLV-1, HTLV-1 plus chloroquine, and HTLV-1 plus serum from HTLV-1-infected patients. pDCs were plated on poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-coated slides and then fixed in 4% paraformaldehyde, quenched with 0.1M glycine. Cells were incubated in permeabilizing buffer containing 1% saponin with mouse anti-TRAIL (clone RIK-2, eBioscience) and HTLV-1 patient's serum. Staining was revealed by goat anti-mouse IgG-Alexa488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and goat anti-human IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), respectively. Nucleus was stained by the use of DAPI (Molecular Probes). Mounted slides were scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe) by the use of a 100 \times Plan Apo VC piezo objective (NA 1.4) and Chroma bloc filters (ET-DAPI, ET-GFP, ET-Cy3) and were subsequently deconvoluted with a Meinel algorithm and 8 iterations and analyzed by the use of Metamorph (MDS Analytical Technologies). Specifications were as follows: Trail/DAPI/virus/Overlay/Confocal plane: representative 2D focal plan. XZ/YZ view of Confocal plane: XZ/YZ projection of the XY focal plan along the red cross axis. Overlay with bright: DIC. Projection overlays: 2D projections of the maximum intensity pixels along the Z axis. 3D: 3D reconstruction analysis of the total cell by the use of ImageJ64 software (National Institutes of Health) and Imaris 6.2 software (Bitplane; also used to generate videos).

Statistical analysis

Experiments were repeated at least 4 times. *P* values were determined by the use of a 2-tailed Student *t* test. Univariate distributions of flow cytometric data were performed by probability binning, in 300 bins by the use of FlowJo software (TreeStar).³²

Results

IFN- α response to HTLV-1 stimulation

Because cell-free HTLV-1 could target immune cells and especially BDCA-4 (neuropilin-1) expressing pDCs,⁸ we studied the pDC response to this virus. The main characteristic of pDC viral stimulation is massive production of IFN- α that we followed by using an HTLV-1-infected CD4⁺ T-cell line (MT-2) as virus-producing cells. Low levels of IFN- α were secreted by HTLV-1-activated PBMCs and pDCs compared with influenza A virus

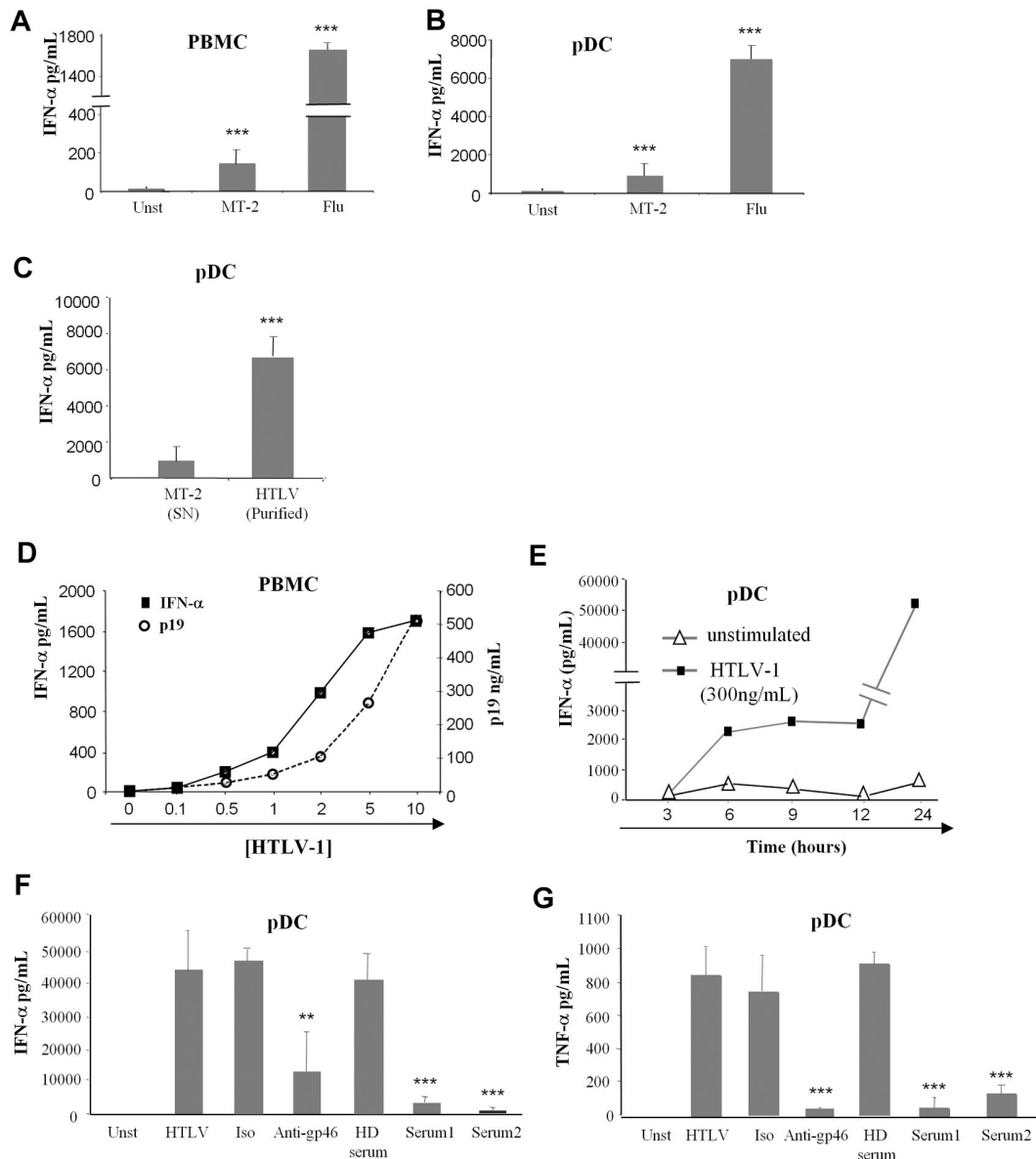


Figure 1. Cytokine production by HTLV-1-activated pDCs. IFN- α production by 10^6 PBMCs (A) and 10^5 purified pDCs (B) from healthy blood donors cultured alone in the presence of supernatants from HTLV-1 virus producing T-cell line (MT-2) or with influenza virus (Flu) as positive control. (C) Overnight IFN- α production by pDCs were assessed by the use of purified HTLV-1 virions (purified HTLV) from ultracentrifuged MT-2 supernatants (MT-2 SN). (D) IFN- α production by PBMCs in response to various HTLV-1 (p19-equivalent) concentrations (0-500 ng/mL). (E) Kinetic secretion of IFN- α by HTLV-1-stimulated pDCs (300 ng/mL of p19-equivalent) compared with unstimulated pDCs. HTLV-1 capacity to turn pDC into IFN- α (F) and TNF- α (G) producing pDCs was inhibited by sera containing blocking HTLV-1 antibodies from HTLV patients (Serum 1, Serum 2) or by blocking HTLV-1 envelope (gp46) antibody (10 μ g/mL) but not using irrelevant antibody (10 μ g/mL) or uninfected healthy donor serum (HD serum). Data shown are representative of at least 4 independent experiments. ** $P < .01$; *** $P < .001$.

stimulation (Figure 1A and B, respectively). Thus, we developed a purification method for HTLV-1 viruses by using ultracentrifugation of the MT-2 supernatants. Purified HTLV-1 virions (HTLV-1) induced greater levels of IFN- α by pDCs compared with MT-2 supernatants (Figure 1C). We also verified that ultracentrifuged supernatants from noninfected T-cell lines (supplemental Table 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) did not induce pDC IFN- α production (data not shown).

We then quantified purified virions by using HTLV-1 p19 protein titration (Figure 1D). IFN- α production by PBMCs was strictly dependent on the quantity of HTLV-1 (p19 equivalent; Figure 1D). The optimal HTLV-1 concentration (300 ng/mL) was used in subsequent experiments. To better characterize IFN- α secretion by pDC, we performed time-course experiments. IFN- α secretion by HTLV-1-

stimulated pDCs was quantified at 3-hour intervals. HTLV-1 induced rapid, as soon as 6 hours, IFN- α secretion (Figure 1E).

Furthermore, IFN- α secretion by pDCs was strictly mediated by HTLV-1 particles. Purified pDCs were cultured with HTLV-1 in the presence or absence of anti-gp46 or serum from HTLV-1-infected patients (containing HTLV-1 neutralizing antibodies). Both anti-gp46 and patients' serum significantly reduced IFN- α secretion by pDC (Figure 1F). Moreover, HTLV-1 also induced TNF- α production by pDCs that could be blocked by HTLV-1 neutralizing antibodies (Figure 1G). Serum from uninfected healthy blood donors and irrelevant antibody were used as negative controls and did not have any effect on IFN- α and TNF- α secretion by activated pDC. Taken together, these results demonstrated that cell-free purified HTLV-1 induced a virus-dependent cytokine-mediated response by innate immune cells.

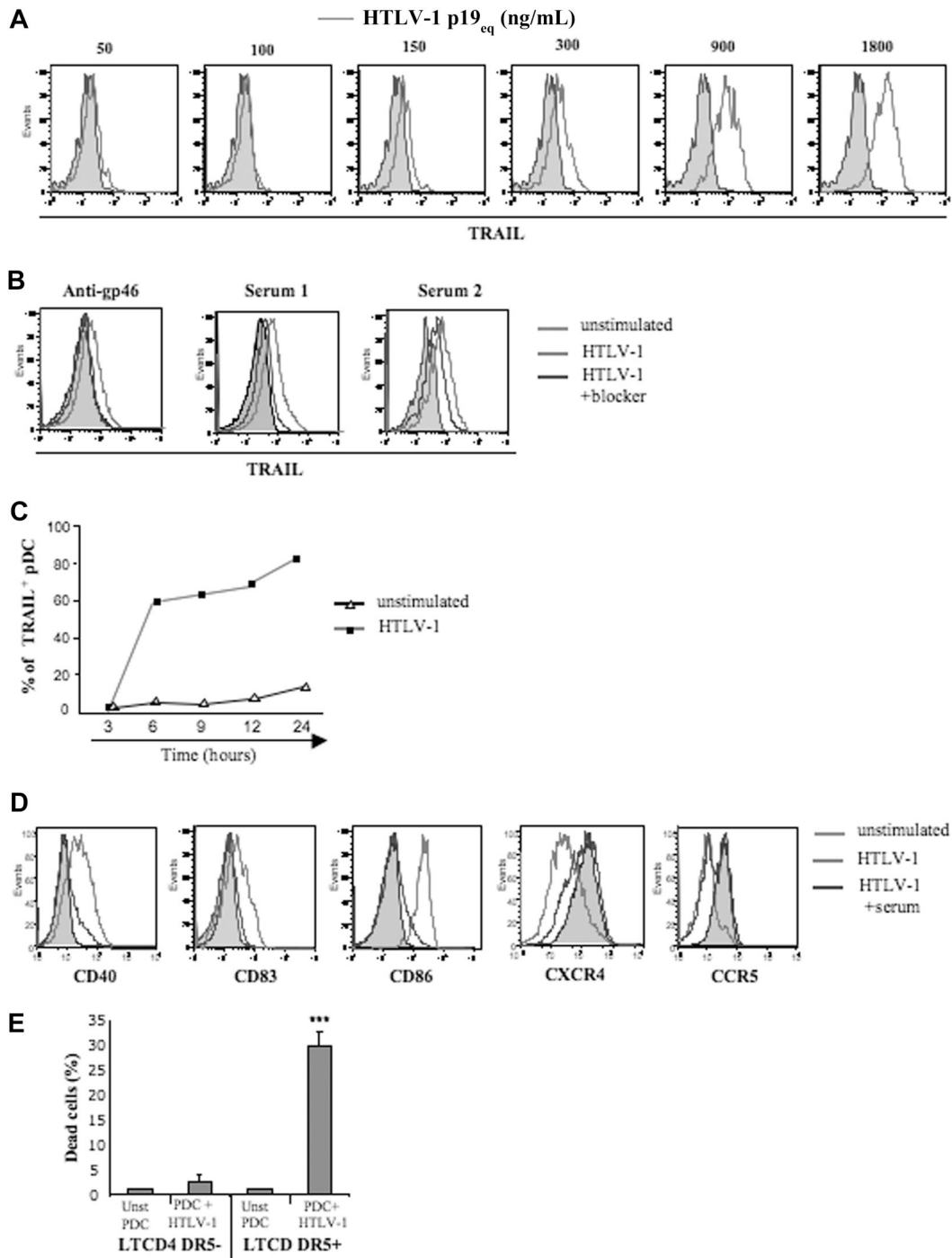


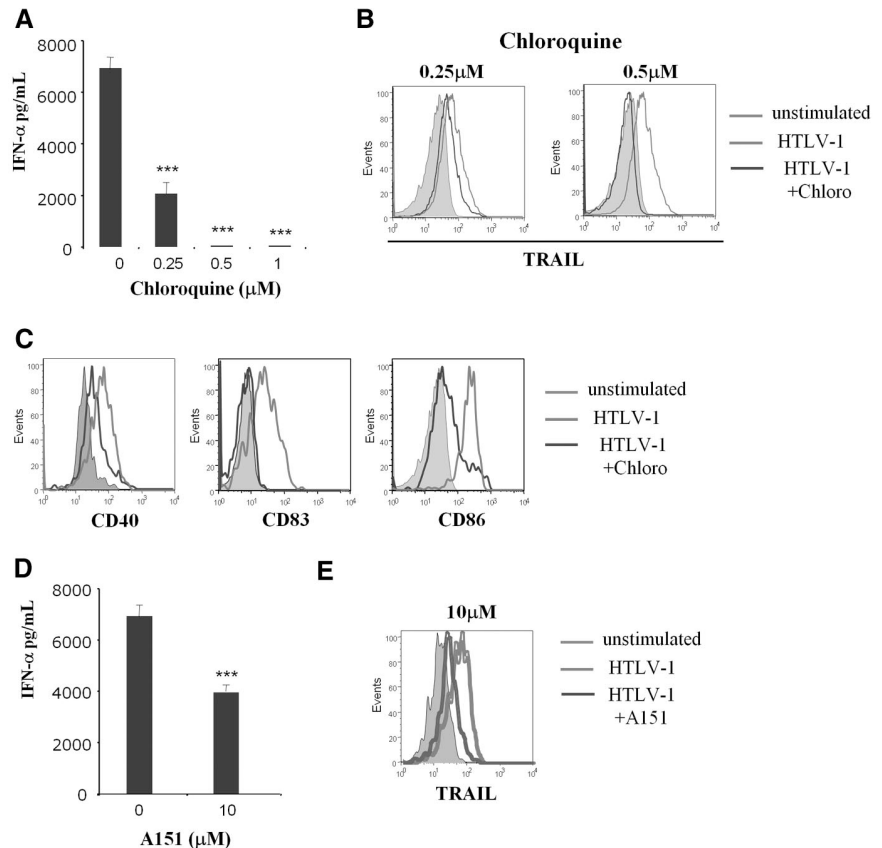
Figure 2. Cell-free HTLV-1 virions induced TRAIL and activation marker expression by pDCs. (A) Purified pDCs were cultured in the absence (solid gray histograms) or presence of several concentrations of HTLV-1 (p19-equivalent, open gray histograms), and membrane TRAIL expression was measured by FACS. (B) Inhibition of membrane TRAIL expression by pDC activated by HTLV-1 virions (light gray histograms) by the use of HTLV-1 blockers (dark gray histograms) such as blocking HTLV-1 envelope antibody (anti-gp46, left) and sera containing blocking HTLV-1 antibodies from HTLV patients (Serum 1 and Serum 2, middle) and healthy donor serum (HD serum) as negative control (right). (C) Kinetics of expression of TRAIL by HTLV-1–stimulated pDCs (300 ng/mL p19-equivalent) compared with unstimulated pDCs. (D) Inhibition of activation markers expression (CD40, CD83, CD86) and chemokine receptors (CXCR4, CCR5) on pDCs stimulated by HTLV-1 virions (light gray histograms) with the use of HTLV-1 blockers (sera from infected HTLV patients and anti-gp46; dark gray histograms). (E) Apoptosis assay (annexin V/Topro-3 staining) of unstimulated (Unst pDC) and HTLV-1–activated pDCs (pDC + HTLV-1) in the presence of CD4⁺CD3⁺DR5⁻ or CD4⁺CD3⁺DR5⁺ T-cell target (ratio 1:2). Data shown in each panel are representative of at least 3 independent experiments.

Phenotypic and functional characterization of HTLV-1–stimulated pDCs

We recently demonstrated that HIV-1 induced transformation of pDCs into IFN- α –producing and TRAIL–expressing killer pDC (IKpDCs).³¹ Thus, we tested whether TRAIL was induced by HTLV-1–stimulated pDCs. A wide range of purified HTLV-1

concentrations was tested on pDC. TRAIL expression by pDC was strictly dependent on the quantity of HTLV-1 (p19 equivalent; Figure 2A). To validate HTLV-1 specificity, HTLV-1 blocking antibodies (HTLV-1 patients’ sera or anti-gp46) significantly inhibited TRAIL expression on pDC exposed to HTLV-1 (Figure 2B). Serum from uninfected healthy blood donors did not reduce TRAIL

Figure 3. HTLV-1 pDC stimulation was TLR7 dependent. IFN- α secretion (A), TRAIL (B), and activation marker expressions CD40, CD83, CD86 (C) by HTLV-1-activated pDCs were inhibited by the use of the inhibitor of endosomal acidification (chloroquine) in a dose-response manner (0.25-1 μ M). TRAIL expression and activation markers (light gray histograms in B and C) compared with unstimulated pDCs (solid gray histograms) are significantly reduced by chloroquine at 0.5 μ M (dark gray histograms). IFN- α secretion (D) and TRAIL expression (E) by HTLV-1-activated pDCs were blocked by use of the TLR7 inhibitor (A151) in a dose-response manner. TRAIL expression (light gray histograms in E) compared with unstimulated pDC (solid gray histograms) is significantly reduced in the presence of A151 at 10 μ M (dark gray histograms). Data shown in each panel are representative of at least 3 independent experiments.



expression by virus-exposed pDCs. As we observed for the IFN- α secretion time course, pDCs expressed TRAIL in response to HTLV-1 between 3 and 6 hours (Figure 2C).

To investigate whether HTLV-1-induced complete pDC activation, we followed expression of costimulatory molecules and chemokine receptors on pDC. CD40, CD83, and CD86 activation markers were up-regulated on HTLV-1-stimulated pDCs and were dramatically inhibited in the presence of patients' serum (Figure 2D). Similarly, HTLV-1 induced down-regulation of both CCR5 and CXCR4 on pDC that was also blocked by patients' serum (Figure 2D).

Finally, to determine whether HTLV-1-induced functional TRAIL expression by pDC, we performed a cytotoxicity assay with purified pDCs as effector and fresh CD4⁺ T cells as target cells. Thus, resting or HTLV-1-activated pDCs were cocultured (ratio 1:2) with DR5⁻ or DR5⁺ CD4⁺ T cells, and apoptosis was tested by measuring Annexin-V/Topro-3 on CD4⁺CD3⁺ T cells (Figure 2E). Massive death was observed only when HTLV-1-activated pDCs were exposed to DR5⁺ T cells. In contrast, resting pDCs did not induce apoptosis of DR5⁺CD4⁺ T cells nor of DR5⁻ T cells (Figure 2E). These results, therefore, demonstrated that HTLV-1 induced the transformation of pDCs into fully functional IKpDCs.

Mechanism of pDC activation by HTLV-1

Recent studies^{22,25} showed that single-strain RNA viruses stimulated pDCs via the TLR7 pathway. To determine whether endocytosis is or is not required for HTLV-1 induction of IKpDC, we used the endosomal acidification inhibitor chloroquine. Chloroquine significantly inhibited IFN- α production and TRAIL expression by pDC in a dose-dependent manner (Figure 3A and B, respectively). Chloroquine also significantly reduced CD40, CD83, and CD86 expression by HTLV-1-stimulated pDCs (Figure 3C). Because the

functional activity of endosome consists in viral degradation to release nucleic acid stimulating TLR, we investigated this mechanism in HTLV-1-stimulated pDCs. TLR7 is an endosomal receptor mainly expressed by pDCs that recognizes viral RNA.^{23,33} We used the oligonucleotide A151, a competitive inhibitor of TLR7, to demonstrate the involvement of this pathway in HTLV-1 pDC stimulation.²² A151 significantly reduced IFN- α secretion (Figure 3D) and TRAIL expression (Figure 3E) by HTLV-1-activated pDCs. To better demonstrate the involvement of TLR7 in HTLV-1-mediated pDC activation and the specificity of the inhibitor A151, we tested whether or not TLR7-independent stimulation would be blocked by A151. Purified pDCs were cultured in the presence of —C—phosphate—G— (CpG)—A and CpG-oligodeoxynucleotide (negative control). We found that CpG-A (used at 1, 2, or 5 μ M) was able to induce TRAIL expression on pDC in contrast to CpG-oligodeoxynucleotide. However, A151 reduced TRAIL expression on HTLV-1-activated pDCs but not on CpG-stimulated pDCs. Greater doses of A151 (10 μ M) was still not able to reduce TRAIL expression on CpG-stimulated pDCs (supplemental Figure 1). Therefore, our findings demonstrate that lytic endosomal degradation and the TLR7 pathway are involved in HTLV-1-mediated transformation of pDCs into IKpDC.

Microscopic study of HTLV-1 viruses and TRAIL localization in pDCs

To better characterize TRAIL expression by HTLV-1-activated pDCs, we performed 3-dimensional (3D) microscopy experiments. Purified pDCs were cultured in media alone (unstimulated), with HTLV-1, HTLV-1 plus chloroquine, and HTLV-1 plus serum from HTLV-1-infected patients. pDC culture conditions used for microscopy experiments were simultaneously analyzed by FACS. As shown in Figure 4A, HTLV-1 induced TRAIL expression on pDCs

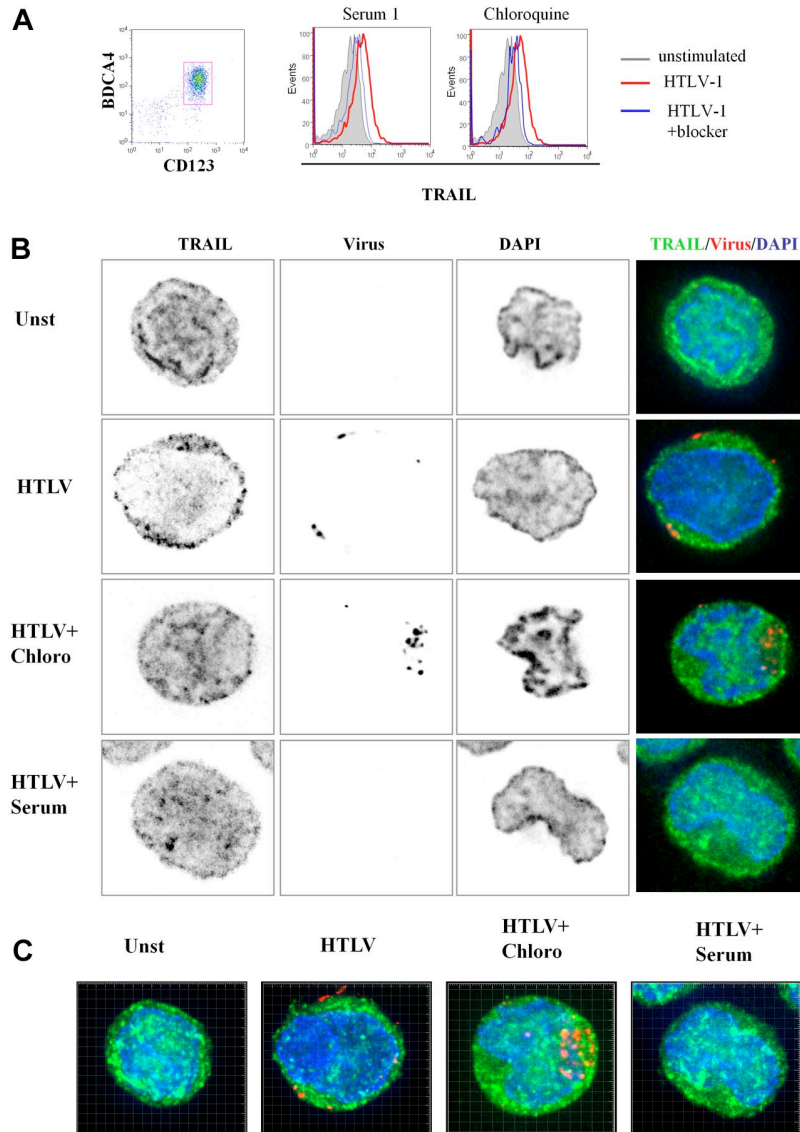


Figure 4. 3D analysis of TRAIL localization by HTLV-1-activated pDCs. (A) Freshly purified CD123⁺BDCA4⁺ pDCs (96%, left) stimulated by HTLV-1 express TRAIL on their membrane (middle and right, red histograms) that is significantly reduced by both HTLV-1-infected patient serum containing HTLV-1 blocking antibody (middle, blue histogram) and chloroquine (right, blue histogram). (B) Unstimulated pDCs (Unst), HTLV-1-stimulated pDC (HTLV-1) treated with chloroquine (HTLV-1 + Chloro) or with blocking HTLV-1-infected patient serum (HTLV-1 + Serum) were stained with anti-TRAIL (green) and anti-HTLV-1 virus (red). pDC stainings (green and red) were merged with DAPI (blue)-colored nucleus (Overlay) or with phase contrast (Bright). HTLV-1-activated pDCs (HTLV-1) showed a TRAIL relocation to cell surface in contrast to unstimulated pDCs (Unst). TRAIL surface localization (green) induced by HTLV-1 was inhibited in the presence of the HTLV-1 blockers (HTLV-1 + Chloro and HTLV-1 + Serum). Inhibition of endosomal acidification (chloroquine) allowed easier detection of HTLV-1 virions (HTLV-1 + Chloro) in contrast to few HTLV-1 particles detected in HTLV-1-stimulated pDCs. Blocking HTLV-1 serum inhibited HTLV-1 entry (HTLV-1 + Serum) and TRAIL localization on the membrane (analyzed by Metamorph software). (C) pDCs in different culture conditions (Unst, HTLV-1, HTLV-1 + Chloro, HTLV-1 + Serum) were observed in several plane (Z-stack) by the use of a 3D microscope. Panels shown here were the results of image compilation allowing entire cell observation in a 2D representation to refine plane analysis. Whole 3D cell acquisition was performed and the entire Z-stack was projected in 2D (analyzed by Imaris 6.2 software).

(a representative experiment). Both chloroquine and patients' serum significantly inhibited TRAIL expression on the pDC cell surface. Surprisingly, we also found high levels of intracellular TRAIL expression in unstimulated pDCs (Figure 4B), suggesting that the very rapid expression of TRAIL on the cell surface of stimulated pDCs (Figure 2C) was caused by TRAIL relocation from cytoplasm to the membrane. Permeabilized pDCs were stained with TRAIL-Alexa 488 (green), nuclear staining DAPI (blue), and HTLV-1 viral proteins-cy3 (red) to study protein localization by 3D microscopy. Focal plane analysis revealed that TRAIL from HTLV-1-stimulated pDCs appeared to be decreased in the cytoplasm at the expense of membrane TRAIL expression (Figure 4B) compared with unstimulated pDC (unst). This TRAIL membrane repartition induced by HTLV-1 was strongly inhibited by both chloroquine (HTLV + Chloro) and patient's serum (HTLV + serum). Free-virus HTLV-1 detected by viral staining was observed in the proximity of the cell membrane but not in the cytoplasm, in contrast to chloroquine-treated cells (HTLV + Chloro). By using chloroquine, which blocks viral degradation, we observed high virus density demonstrating that HTLV-1 entered the pDCs by endocytosis. These results were confirmed in 3D recon-

struction (Z-stacks compilation; Figure 4C) and associated videos (supplemental Figure 2A-C).

To better characterize HTLV-1 virion entry and TRAIL localization in pDC, 3D reconstruction (focal plane, XZ, and YZ-stacks) analysis was performed. In Figure 5A, YZ and XZ stacks showed the relocation of TRAIL at the membrane of HTLV-1-stimulated pDCs (Figure 5Aii) in contrast to intracytoplasmic TRAIL repartition of unstimulated pDCs (Figure 5Ai). We also confirmed that the HTLV-1 blockade by chloroquine and anti-HTLV-1 serum abolished membrane TRAIL expression by pDCs (Figure 5Aiii and Aiv, respectively). Two-dimensional pixel intensity analysis with the use of interactive surface plot of ImageJ software permitted visualization with precision, internal or external localization of both TRAIL and virus, combined with phase-contrast acquisition (membrane delimitation; Figure 5B). This 3D-2D combined analysis clearly demonstrated that HTLV-1-stimulated pDCs harbored TRAIL and membrane colocalization (Figure 5Bii) in contrast to the restrictive intracellular TRAIL expression of unstimulated pDCs (Figure 5Bi). Similar intracellular TRAIL sequestration was obtained in the presence of HTLV-1 blockers (Figure 5Biii and Biv, respectively).

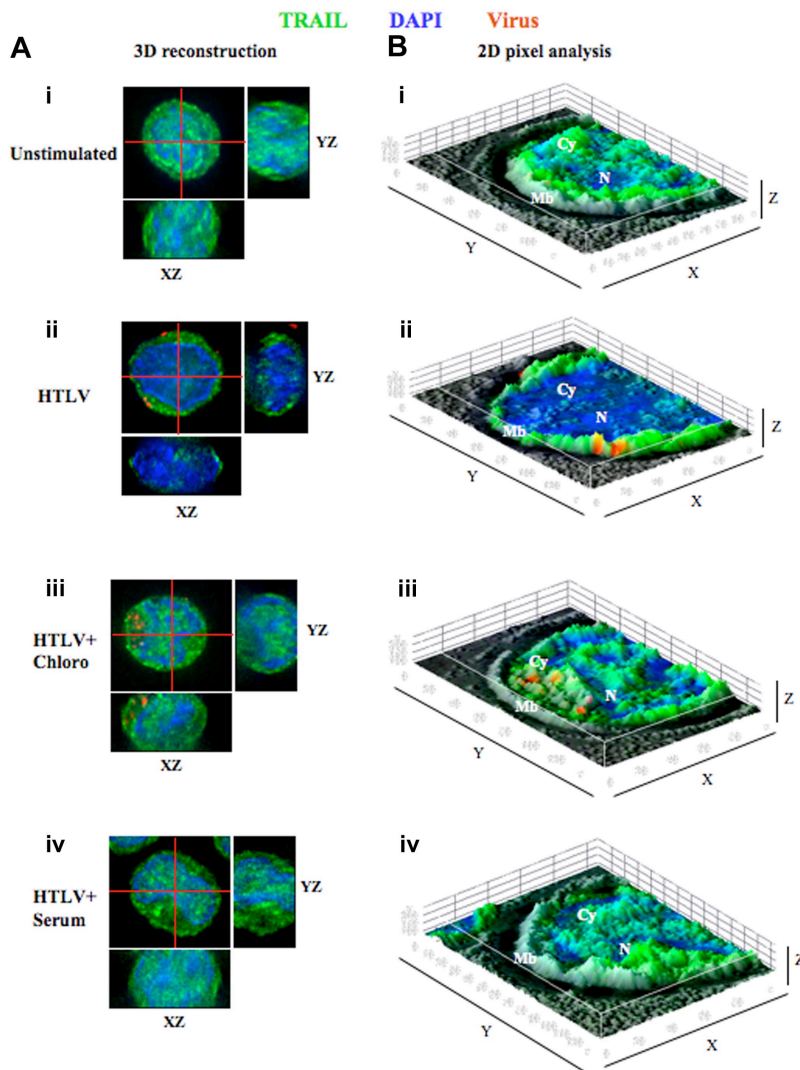


Figure 5. Microscopy analysis of TRAIL localization in pDCs. (A) Deconvolution overlays of representative 2D red cross axis XY focal plane with XZ/YZ view of focal plane and projection overlay of cell stainings (analyzed by Metamorph software). Unstimulated pDCs (i), HTLV-1–stimulated pDCs (HTLV-1; ii), treated with chloroquine (HTLV-1 + Chloro; iii), or with blocking HTLV-1–infected patient serum (HTLV-1 + Serum; iv) were stained with anti-TRAIL (green), anti-HTLV-1 virus (red), and DAPI (nucleus staining). (B) Deconvolution of representative 2D XY focal plane was treated to allow Z scaling of pixel intensity (analyzed by Metamorph and ImageJ software). Each staining (anti-TRAIL [green], anti-HTLV-1 virus [red], and DAPI [nucleus staining]) was merged together with phase contrast (gray, defined cell surface). This representation was used to enhance the observation of TRAIL localization in the cytoplasm (Cy) or its relocalization to the membrane (Mb). Unstimulated pDCs (i) or HTLV-1–stimulated pDCs (ii) treated with inhibitors (HTLV-1 + Chloroquine; iii) or with blocking HTLV-1–infected patient Serum (HTLV-1 + Serum; iv) restrictively expressed TRAIL (green) in the cytoplasm in contrast to HTLV-1–activated pDCs that expressed TRAIL at the cell surface. Inhibitor of endosomal acidification (HTLV-1 + Chloroquine) allowed detection of HTLV-1 particles (red) in the cytoplasm (Cy) in contrast to the cell-surface detection of HTLV-1 virions in HTLV-1–activated pDCs. HTLV-1 virion loading was poorly detected in the presence of serum that directly blocked the virus before the pDC contact.

HTLV-1 virion detection was limited to the cell membrane in HTLV-1–stimulated pDCs (Figure 5Aii–Bii), probably because of rapid endosomal viral degradation that abolished any viral protein detection. The detection of high intracellular density of HTLV-1 particles upon neutralization of endosomal viral degradation by chloroquine (Figure 5Aiii–Biii) strongly supports our hypothesis that cell-free HTLV-1–activated pDCs via TLR7 stimulation resulting in IFN- α and TRAIL production defining innate immune response.

Discussion

pDC innate immune response is defined by massive IFN- α production after stimulation of viral TLR7/9 receptors, leading to antiviral activity.^{10,11,34,35} In this study, we show that pDCs exposed to cell-free HTLV-1 particles secrete IFN- α and TNF- α . Furthermore, HTLV-1–activated pDCs rapidly express proapoptotic ligand TRAIL on the membrane, providing a killer activity, transforming them into IKpDC. Our results highlight a potential key role of pDC in primary HTLV-1 infection.

Because pDCs express high levels of BDCA-4, their activation might be mediated by 2 distinct pathways consisting in endocytosis/TLR activation versus infection. HTLV-1 is an RNA retrovirus that potentially activates the TLR7 pathway. TLR7 is a sensor molecule

of the innate immune system that recognizes the ribonucleic acid of infectious agents.^{33,36} We found that an inhibitor of endosome activity (chloroquine) significantly reduced HTLV-1–induced IFN- α production and TRAIL expression, demonstrating that pDC stimulation is dependent on lysosomal degradation of viral particles. We then showed that TLR7 was responsible for pDC activation into IKpDC. The specific inhibitor (A151) of TLR7 largely reduced IFN- α and TRAIL mediated by HTLV-1. Similarly, activation of the TLR7 pathway by HTLV-1 induces costimulatory molecules (CD40, CD83, CD86) expression on pDC as well as down-modulation of chemokine receptors (CXCR4 and CCR5). Our results demonstrate that HTLV-1 stimulates the TLR7 pathway after endocytosis and induces innate immune response by pDC.

To better characterize HTLV-1–induced pDC activation, we developed 3D microscopy technology to simultaneously follow the localization of both viruses and TRAIL. This 3D analysis revealed an important stock of intracellular TRAIL in immature unstimulated pDCs, favoring a rapid response of these cells against viral infection reflected in the TRAIL surface expression we observed within 6 hours. We found that HTLV-1 induced relocalization of intracellular TRAIL to the cell surface. We also confirmed the involvement of an endocytotic TLR pathway by using chloroquine, which inhibited the relocalization phenomenon. By using 3D

microscopy, our study visualized, for the first time to our knowledge, HTLV-1 particles in fresh human innate immune cells. This approach allowed us to generate 3D videos showing the presence of HTLV-1 and TRAIL localization in pDCs. The addition of chloroquine to our cultures facilitated HTLV-1 virus detection into pDC because of the inhibition of viral degradation. This observation contrasts with HTLV-1–exposed pDCs, in which only virions localized in close proximity to the cell membrane could be detected.

Apoptotic induction of virus-infected cells may serve as a beneficial host defense mechanism to limit virus spread.³⁷ TRAIL plays an important role in virus-induced apoptosis of CD4⁺ T cells in acute HIV-1 infection.^{38,39} HTLV-1 induces continuous cell mutation, providing emergence of clones as the causal viral mechanism for ATLL.⁴⁰ Conversely, because HTLV-1 replicates mainly through clonal expansion, it is advantageous for the virus to prolong infected cell life. The HTLV-1 Tax protein is the viral transforming factor that confers clone emergence.⁴¹ Tax has been shown to confer resistance to the TRAIL apoptotic pathway in HTLV-1–infected T cells.^{42,43} Our study suggests that IKpDCs may induce the death of uninfected CD4⁺ T cells in the acute phase and may consequently participate in clone emergence of TRAIL-resistant Tax-positive cells, leading to ATLL. An important challenge would be to link the pDC phenotype to the different HTLV-1–associated pathologies (ATLL or HTLV-1–associated myelopathy/tropical spastic paraparesis). It would be interesting to determine whether IKpDCs persist during chronic infection to generate new HTLV-1 progression markers.

The characterization of IKpDCs in vivo opens a new area of DC research in HTLV-1 and other retrovirus-induced immunopathogenesis and in tumor cell biology. Considered together, our data highlight a dual role for pDCs in HTLV-1 disease. pDCs that become infected may participate in viral spread in the host⁸ and concomitantly express TRAIL, which may select the transformed CD4⁺ T-cell clone, leading to ATLL years later. In this context, it will be of great interest to test TRAIL sensitivity of the persistent clones after HTLV-1 infection that may subsequently be transformed to lymphoma/leukemia. Thus, pDC investigation in HTLV-1 disease will be crucial for understanding complex HTLV-1–associated pathologies. However, detection of primary infection in humans is currently not feasible because of the high latency of HTLV-1 virus before disease symptoms appearance. An alternative way to characterize and understand the early steps of HTLV-1

infection is the development of the pathogenic simian model (simian T-lymphotropic virus-1). However, in addition to selection of TRAIL-resistant clones, one could hypothesize that similar to HIV-1 infection, pDCs may participate in and contribute to the immune suppression that occurs in ATLL.

In this report we demonstrate that HTLV-1–free particles generate an immune response by professional virus “sentinel” pDC. We then identify and describe the mechanism by which purified HTLV-1 virions stimulate pDCs and transform them into functional killer cells. We show that pDC response and activation to HTLV-1 is strictly virus dose dependent. Finally, purified HTLV-1 particles induced TLR7-mediated relocalization of intracellular TRAIL to the pDC membrane. In conclusion, the physiologic function of pDC during the different stages of HTLV-1 infection will represent a new field of investigation and may lead to new therapeutic strategies.

Acknowledgments

We thank Gene Shearer (Experimental Immunology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health) for comments and manuscript critiques.

We also thank the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) for its financial support. We greatly acknowledge the Nikon Imaging Center@curie.fr (Institut Curie-CNRS, <http://nimce.curie.fr>) and the PICT-IBISA Imaging Facility (<http://pict-ibisa.curie.fr>).

Authorship

Contribution: J.-P.H. and Y.L. designed research; R.C., L.B., and C.G. performed research; R.C., L.B., J.-P.H., Y.L., and C.G. analyzed research; R.H.S, F.R., and C.P. contributed new reagents; O.H. contributed to writing the paper; and J.-P.H. and Y.L. wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Dr Jean-Philippe Herbeuval, UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France; e-mail: herbeuval@necker.fr.

References

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Mier JW, Woods AM, Gallo RC. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(11):6815-6819.
- Robert-Guroff M, Nakao Y, Notake K, Ito Y, Sliiski A, Gallo RC. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T-cell leukemia. *Science*. 1982;215(4535):975-978.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanaraman VS, Gallo RC. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature*. 1981;294(5838):268-271.
- Jacobson S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13(suppl 1):S100-S106.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985;2(8452):407-410.
- Hermine O, Wattel E, Gessain A, Bazarbachi A. Adult T-cell leukaemia: a review of established and new treatments. *BioDrugs*. 1998;10(6):447-462.
- Donegan E, Lee H, Operskalski EA, et al. Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion*. 1994;34(6):478-483.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med*. 2008;14(4):429-436.
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997;185(6):1101-1111.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284(5421):1835-1837.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1219-1226.
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med*. 2000;192(2):219-226.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4⁺ T cells. *J Virol*. 2005;79(20):12692-12702.
- Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol*. 2006;80(14):6844-6854.
- Lambert S, Bouttier M, Vassy R, et al. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin 1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*. 2009.
- Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter

- GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449-459.
17. Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, et al. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 2007;81(3):1506-1510.
 18. Lepelletier Y, Moura IC, Hadj-Slimane R, et al. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1782-1793.
 19. Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, et al. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol*. 2002;3(5):477-482.
 20. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1133-1148.
 21. Crozat K, Beutler B. TLR7: a new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):6835-6836.
 22. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. 2005;115:3265-3275.
 23. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis E, Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303(5663):1529-1531.
 24. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(3):796-805.
 25. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(1):248-255.
 26. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-682.
 27. Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, et al. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res*. 1998;58(8):1593-1598.
 28. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-821.
 29. Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*. 1997;17(2):141-143.
 30. Herbeuval JP, Lambert C, Sabido O, et al. Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(8):611-621.
 31. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, Herbeuval JP. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(44):17453-17458.
 32. Roederer M, Treister A, Moore W, Herzenberg LA. Probability binning comparison: a metric for quantitating univariate distribution differences. *Cytometry*. 2001;45(1):37-46.
 33. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-1529.
 34. Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors*. 2004;22(4):243-251.
 35. Pitha PM. Multiple effects of interferon on the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res*. 1994;24(2-3):205-219.
 36. O'Neill LA. Immunology. After the toll rush. *Science*. 2004;303(5663):1481-1482.
 37. Vilcek J. Boosting p53 with interferon and viruses. *Nat Immunol*. 2003;4(9):825-826.
 38. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*. 2005;105(6):2458-2464.
 39. Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, et al. CD4⁺ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005;106(10):3524-3531.
 40. Mahieux R, Gessain A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003;7(4):336-361.
 41. Mansky LM. In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J Virol*. 2000;74(20):9525-9531.
 42. Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, et al. Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Br J Haematol*. 2005;128(2):253-265.
 43. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, et al. Resistance to Apo2 ligand (Apo2L)/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis and constitutive expression of Apo2L/TRAIL in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines. *J Virol*. 2005;79(3):1367-1378.

Résultat 2 : Etude des pDC chez les patients HIV-Controllers

Contexte : Un défaut de la réponse IFN- α des pDC chez les singes African Green monkey (AGM) et sooty mangabey (SM) pourrait contribuer à la résistance de ces singes à la maladie induite par le virus du SIV, contrairement aux Rhesus macaques qui, eux, progressent vers la maladie.

But : Le but de cette étude est d'analyser la réponse des pDC humaines de patients infectés par le VIH-1 et qui ont la particularité de contrôler la maladie sans aucun traitement antirétroviral. On les nomme les patients contrôleurs du VIH-1 (ou HIV controllers, HIC).

Méthodes : 12 patients HIV-Controllers (HIC), infectés par le VIH-1 depuis plus de 10 ans, n'ayant jamais reçu de traitement anti-rétroviral et qui contrôlent la déplétion de leurs lymphocytes TCD4 ainsi que leur charge virale (concentration d'ARN viral plasmatique inférieure à 400 copies/mL), ont été sélectionnés dans la cohorte CO18 de l'Hôpital Bicêtre. Parallèlement, 14 patients virémiques (VIR) non traités et chroniquement infectés par le VIH-1 ont été également sélectionnés. Nous avons utilisé comme groupe témoin 15 donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang testés séronégatifs pour le VIH-1.

Les pDC des patients contrôleurs, des patients virémiques et des donneurs sains sont purifiées par tri magnétique (sélection négative) et sont testées pour leur capacité à produire de l'IFN- α , ainsi qu'à acquérir un phénotype tueur IKpDC sous stimulation par le VIH-1. Les techniques utilisées pour étudier le phénotype des pDC des différents groupes de patients seront la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence.

Une diminution du nombre de pDC circulantes a été observée chez les patients infectés par le VIH (patients virémiques) par rapport aux donneurs sains. Une des hypothèses émises est qu'en présence du VIH, les pDC expriment le marqueur de migration CCR7 et migrent alors du sang vers les organes lymphoïdes secondaires, notamment les amygdales, où une forte production d'IFN- α a été mise en évidence. Il a été récemment démontré que l'absence de lymphopénie chez les singes ne développant pas de SIDA était due à un défaut de réponse de leurs pDC. Ces singes résistants présenteraient un polymorphisme au niveau du gène IRF7, ayant pour conséquence une diminution de leur réponse IFN- α (Mandl et al., 2008). Ainsi, selon notre modèle d'étude, en l'absence de production d'IFN- α , TRAIL ne serait pas induit à la surface des LTCD4⁺ et la résistance des LTCD4⁺ à la mort pourrait s'expliquer par une déficience fonctionnelle des pDC et donc de la voie IFN-TRAIL-DR5. Nous nous sommes alors demandés si un défaut qualitatif ou quantitatif des pDC humaines pourrait expliquer la résistance à la mort des LTCD4 observée chez les patients HIV-Controllers. Notre étude n'a révélé aucun défaut quantitatif ni qualitatif des pDC des HIC. Contrairement aux pDC des patients virémiques, les pDC des HIC et des donneurs sains n'expriment pas de TRAIL membranaire *in vivo* (dû au contrôle de la charge virale des HIC contrairement aux VIR). En revanche, les pDC des HIC, comme pour les pDC de donneurs sains, produisent de grandes quantités d'IFN- α en réponse à différents stimuli viraux, comme le VIH ou le virus de la grippe (Flu). Les pDC stimulées expriment alors le ligand apoptotique TRAIL. Les analyses par microscopie 3D montrent que les pDC des patients HIC expriment TRAIL en intracellulaire, rapidement relocalisé à la membrane sous stimulation *in vitro*.

Aucun défaut quantitatif ou qualitatif des pDC des patients HIV-Controllers n'a été mis en évidence (Figure 32). Ce résultat démontre que contrairement au modèle simien, les pDC de patients controllers sont parfaitement fonctionnelles. Il semble donc que la résistance des patients controllers à la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ne soit pas due à un défaut de réponse de leurs pDC, qui sont capables d'acquérir le phénotype IKpDC et de produire de l'IFN- α .

	Donneurs sains (HD)	HIV-Controllers (HIC)	Patients virémiques (VIR)
<i>In vivo</i>			
% pDC dans le sang	0,5-0,6%	0,5%	0,1%
TRAIL membranaire	20%	25%	70%
TRAIL intracellulaire	80%	75%	30%
<i>In vitro (stimulation VIH)</i>			
TRAIL membranaire	70%	70%	60%
Production d'IFN α	5 000 pg/mL	5 000 pg/mL	2 000 pg/mL
Phénotype	IkpDC ✓	IkpDC ✓	IkpDC ✓

Figure 32 : Comparaison de l'activation des cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) des donneurs sains, patients virémiques (VIR) et HIV-Controllers (HIC).

L'expression de TRAIL a été mesurée au cytomètre en flux et la production d'IFN- α a été dosée par Elisa à partir des surnageants de culture.

Plasmacytoid dendritic cells from HIV controllers produce IFN-alpha and differentiate into functional IKpDC under HIV activation

Running title: Characterization of pDC from HIC

Lucie Barblu, ^{*}, Kawthar Machmach [•], Christophe Gras ^{*}, Jean-François Delfraissy ^{§¶}, Farouly Boufassa ^{§¶}, Manuel Leal [•], Ezequiel Ruiz-Mateos [•], Olivier Lambotte ^{§¶}, Jean-Philippe Herbeuval ^{*} for the ANRS EP36 HIV Controllers study group.

^{*} CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Paris, France

[•] Laboratorio de Inmunovirología, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)/ Hospitales Universitarios Virgen del Rocío

[§] INSERM U1012, Bicêtre, [¶]AP-HP, [¶]Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Bicêtre Hospital, Bicêtre, ⁵ Université Paris-Sud, U1012, Bicêtre, France,

Address for corresponding author: Dr Jean-Philippe Herbeuval, UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris, CEDEX 15 France, jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr, Tel: 01 44 49 53 87, Fax: 01 44 49 06 76

Text pages: 19

Number of Figures: 5

Table: 1

Text words: 3459

Abstract word: 195

References: 46

Abbreviations: HIV-1, interferon alpha (IFN- α), Toll-like receptor (TLR), Plasmacytoid dendritic cell (pDC), TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), TRAIL-expressing interferon-producing killer pDC (IKpDC), Death Receptor 5 (DR5).

Key words: HIV-infected controllers, DR5, TRAIL, pDC, apoptosis.

Author contributions: L.B., K.M. and C.G. performed and analyzed research. J.P.H designed and analyzed research and wrote the paper. J.F.D., F.B, M.L., E. RM, O.L. provided patient samples and analyzed the research.

The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Background: HIV controllers (HIC) spontaneously control viremia and CD4⁺ T cells depletion in contrast to viremic patients (VIR). After HIV exposure, plasmacytoid dendritic cells (pDC) produce high levels of interferon alpha (IFN- α), expressed the apoptotic ligand TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Simian models showed that prolonged high levels of IFN- α production could be responsible for AIDS progression.

Methods: Thus, we study HIC pDC activation in response to HIV using flow cytometry and 3 dimensional microscopy.

Results: We show here that pDC from HIC produced higher levels of IFN- α in response to HIV than pDC from VIR but similar levels than pDC from HD. Because binding of HIV to CD4 is essential for pDC activation, the low CD4 expression by pDC from VIR may explain the weak IFN- α response to HIV. 3D microscopy revealed that pDC from HIC and HD expressed intracellular TRAIL that is relocalized to the membrane after HIV exposure. In contrast, pDC from VIR expressed membrane TRAIL without any stimulation.

Conclusion: We demonstrate here that HIV controllers pDC are functional and respond to HIV by producing IFN- α , expressing membrane TRAIL turning them into IKpDC and inducing apoptosis of T cells line.

Introduction

HIV-1 pathogenesis is characterized by high viral load and massive CD4 T cell depletion [1, 2] in the vast majority of patients. However, a subset of HIV-1-positive individuals has been identified that does not progress and spontaneously maintains an undetectable viral load. This infrequent patients population is defined as HIV-1 controllers (HIC) [3-5] and represents less than 1% of HIV-1-infected patients [6, 7]. The majority of HIC is also defined by the absence of massive CD4 T cell depletion, even after 10 years of infection [5, 8].

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are innate immune cells [9, 10] and play a central role in host defense against viruses [11, 12] by producing high levels of IFN- α [13-16]. Simian models showed that prolonged Interferon-stimulated genes expression could be involved in AIDS progression [17] and that a reduced IFN- α production by pDC in response to SIV could explain the resistance to AIDS progression in sooty mangabey model [18]. In HIC, a reduced IFN- α production by pDC could also contribute to the limited CD4 T cell depletion. This point has not been investigated yet. *Ex vivo*, a severe decrease of pDC in blood from HIV-infected viremic patients (VIR) is observed [19, 20]. This apparent blood depletion is probably due to migration of HIV-activated pDC from blood to lymphoid organs [21, 22] where massive CD4 T cell depletion occurs [23, 24]. Indeed, IFN- α was demonstrated to contribute to the increased depletion of T cells in human thymus [25]. Furthermore, HIV activated pDC also express the apoptotic ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) providing them potential killer activity (Interferon-Producing Killer plasmacytoid Dendritic Cells, IKpDC) [15]. These TRAIL-expressing IKpDC were demonstrated to be in close proximity to apoptotic CD4 T cells in tonsils from HIV-infected viremic patients [21].

TRAIL selectively induces apoptosis of human HIV-exposed CD4 T cells *in vitro* [26]. TRAIL induces apoptosis of death receptor 5 (DR5)-expressing cells [27, 28]. The percentage of CD4 T cells co-expressing TRAIL and DR5 are elevated in the blood of VIR [29, 30] and are reduced by successful Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) [31]. The study of TRAIL regulation reveals that type I interferon (IFN α/β) produced by pDC after HIV endocytosis regulates TRAIL on CD4 T cells [16]. IFN- α

production by HIV-induced TLR7 activation of pDC correlates with disease progression and is sex dependent [32].

Only limited information is available about pDC in controllers [33], and because it has not been yet reported, we investigate here pDC response to HIV and TRAIL expression by HIC patients.

Materials and Methods

Patient blood samples. HIV controllers came from the French national cohort ANRS CO18 and from the Spanish cohort HUVR of HIV-Controllers, previously described [34]. The controller cohorts were selected as HIV-1-infected patients without any antiretroviral treatment with a follow-up longer than 10 years and with HIV RNA measurements lower than 400 copies/mL in the plasma [35, 36] (Amplicor Monitor, Roche Diagnostics, France).

Viremic chronically-infected untreated patients with CD4 count above 400 cells/mm³ were selected at the Bicêtre Hospital in Paris (France) and at Virgen del Rocio University Hospital in Seville (Spain) for apoptosis assays (Table 1). Blood from 30 healthy donors was obtained from “Etablissement Français du Sang” (convention # 07/CABANEL/106), Paris, France.

Ethics Statement

The study was promoted by the Agence Nationale de Recherche pour le Sida (ANRS) under number ANRS Study EP36 and approved by the Comité de Protection des Personnes Ile de France VII under number 05-22. Experimental procedures with human blood have been approved by the Bicêtre and Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki.

Isolation and culture of blood leukocytes. *In vitro* experiments were performed using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) freshly isolated by density centrifugation from peripheral blood lymphocyte separation medium (Cambrex, Gaithersburg, MD). To preserve cell integrity and function no frozen cells had been used. CD4 T cells and pDC were purified using CD4 purification kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and Human plasmacytoid DC Negative Isolation Kit (StemCell Technologies), respectively. Then, cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and 1% Pen-Strep-Glut (Invitrogen).

Viral stimulation. Cells from HD, HIC or VIR were seeded at $5.10^4/100\mu\text{l}$ and cultured overnight with inactivated HIV-1_{MN} AT-2 at 20 ng/mL p24^{CA} equivalent kindly provided by J.D. Lifson (SAIC-NCI, Frederick, MD) or Flu. Supernatants were collected for cytokine detection. HIV-1/pDC interaction was inhibited using soluble CD4 (2 $\mu\text{g/ml}$) and recombinant gp120 (2 $\mu\text{g/ml}$) obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID.

Flow cytometry. Cells were incubated for 20 min at 4°C with FITC-CD123 (MBL International, Woburn, MA), APC-BDCA-2/4 and Vioblue-CD4 (Miltenyi), and APC-Cy7-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA) or with appropriate isotype-matched control antibodies (5 $\mu\text{g/ml}$ each) in PBS containing 2% mouse serum (Sigma, Saint Louis, MO). pDC were tested for PE-TRAIL (eBioscience, San Diego, CA). FACS analysis were performed on a flow cytometer (FACSCanto 7 colors) using FACSDiva software (BD Biosciences). Cells were analyzed by FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

Cytokine detection. Supernatants of pDC were tested for multispecies soluble IFN- α by ELISA (Cell Sciences, Canton, MA) according to the manufacturer's instructions.

Apoptosis assays. Purified pDC were stimulated overnight or not with 1 μM CpG ODN 2216 (Invivogen). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 1% Pen-Strep-Glut (Invitrogen). Freshly purified CD4 T cells or HIV-infected H9 T cell lines were used as target cells and cocultured with pDC. Unstimulated and CpG-stimulated pDC were cocultured with the H9 T cells at cell ratio effector/target 2:1, in a 96-well plate. After 24h of coculture the supernatants were collected, the cells were washed with Annexin buffer and incubated 15 minutes with AnnexinV/Topro-III and CD123 antibodies at 4°C. AnnexinV/Topro-3 was measured on CD123⁺ H9 T cells.

3 Dimensional microscopy. Purified pDC from HD, VIR and HIC were plated on poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO)-coated slides and then fixed in 4% paraformaldehyde, quenched with 0.1 M glycine. Cells

were incubated in permeabilizing buffer containing 1% saponin with mouse anti-TRAIL (clone RIK-2, ebioscience) and Alexa547 labeled anti-CD4 (BD bioscience). TRAIL staining was revealed using a secondary goat anti-mouse IgG-Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Nucleus was stained using DAPI (Molecular Probes, Paisley, UK). Mounted slides were scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) and were subsequently deconvoluted (Meinel algorithm) and analyzed using Metamorph® (MDS Analytical Technologies, Wincobury, UK). ImageJ 3D viewer was used on overlay stack on pDC stained with TRAIL/CD4/DAPI.

Statistical analysis. Experiments were repeated four times. P values (*P*) were determined using a two-tailed Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Univariate distributions of flow cytometry data were performed by probability binning, in 300 bins using FlowJo software.

Results

Quantitative and qualitative pDC analysis

pDC blood depletion is a serologic marker for AIDS progression [19, 37]. We determined the percentage of pDC, among PBMC, characterized by CD4⁺ CD123⁺ CD11c⁻ BDCA-2⁺ BDCA4⁺ (Figure 1A) in blood from 11 untreated HIV-1-infected patients (VIR) and 13 controller patients (HIC) (Table 1) compared to 30 healthy control donors (HD). In contrast to the pDC depletion observed in VIR, HIC did not exhibit a statistically significant pDC percentage or absolute number decrease in blood compared to HD. Also, the percentage and number of pDC in HIC was significantly higher than in VIR (Figure 1B). We then tested whether purified pDC from HIC or VIR were able to produce IFN- α when cultured with either HIV or Flu (influenza A virus).

HIV-stimulated pDC from HIC produced similar levels of IFN- α than HD (Figure 1C). However, HIV-1-induced pDC response of VIR was significantly lower than HD ($p=0.01$) and HIC (Figure 1C). pDC from HIC statistically produced higher levels of IFN- α in response to Flu than pDC from HD or VIR (Figure 1D). Thus, we demonstrate here that pDC from HIC are able to produce IFN- α in response to both viruses, demonstrating that pDC present no quantitative nor qualitative default in IFN- α pathway, suggesting a functional innate immune response.

TRAIL expression and regulation in pDC from HIC

For a complete functional analysis, pDC from HD, VIR and HIC were purified from fresh blood and TRAIL expression was studied. Cytometry analysis revealed that less than 10% of freshly purified pDC from HD or HIC expressed membrane TRAIL (mTRAIL) *in vivo* in contrast to the 30% of TRAIL-positive pDC from VIR (Figure 2A). However, *in vitro* stimulation of pDC by HIV induced significant mTRAIL expression by pDC from HIC ($70\%\pm 10$, $p=0.002$) at similar levels to HIV-stimulated pDC from HD ($69\%\pm 9$, $p=0.001$). Surprisingly, HIV-mediated mTRAIL expression was lower on pDC from VIR ($55\%\pm 9$, $p=0.004$) than on pDC from HD or HIC.

Thus, we performed 3D microscopic experiments to study TRAIL expression and localization in unstimulated and HIV-activated pDC from HD (n=3), HIC (n=3) and VIR (n=3). As shown in Figure 2, cytometry analysis revealed no expression of mTRAIL by unstimulated pDC from HD. Surprisingly, image plan analysis revealed that unstimulated pDC from HD expressed TRAIL (green) in the intracellular compartment (Figure 2B and C, upper panels). In this setting, TRAIL localization of pDC from HIC was similar to HD (Figure 2B and C, second panel from top). In contrast, pDC from VIR expressed both intracellular and extracellular TRAIL (Figure 2B and C, third panels from top), confirming FACS analysis (Figure 2A and B). Similarly, intracellular TRAIL expression of HIV-1-stimulated pDC from HIC and HD appeared to be decreased in the favor of the membrane compared to unstimulated pDC from HD or HIC (Figure 2B and C, lower panels).

To better characterize TRAIL localization in pDC, 3D reconstruction analysis was performed (Figure 3, left panels). YZ and XZ stacks showed the relocalization of TRAIL at the membrane of HIV-1-stimulated pDC from HD and HIC (Figure 3C and D, left panel) in contrast to intracytoplasmic TRAIL repartition of unstimulated pDC from HIC or HD (Figure 3A and B left panel). 3D interactive surface plot of ImageJ software allowed us to visualize with precision internal or external localization of TRAIL combined with phase contrast acquisition (membrane delimitation) (Figure 3, middle panels). The number of cells expressing membrane or intracellular TRAIL was quantified by counting a total of 50 pDC per condition from HD (n=3), HIC (n=3), HD+HIV (n=3) and HIC+ HIV (n=3) (Figure 3, right panels). It should be noticed that cells expressing both intracellular and membrane TRAIL were counted as membrane TRAIL positive cells. Our results clearly demonstrated that HIV-1-stimulated pDC from HIC harbored membrane TRAIL localization (Figure 3C and D) in contrast to the restrictive intracellular TRAIL expression of the vast majority pDC from unstimulated HD and HIC (Figure 3A and B, right panels). We also found that *ex vivo* pDC from VIR expressed membrane TRAIL in contrast to pDC from HD or HIC (sup Fig. 1).

Thus, these results demonstrate that pDC from HIC are able to respond to HIV *in vitro* by expressing TRAIL and activation markers such as HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40, and CCR7 (data not shown).

CD4 expression on pDC from HD, VIR and HIC

We showed in Figure 1C that pDC from VIR produced less IFN- α than pDC from HD or HIC in response to HIV while they responded equally to Flu stimulation (Figure 1D). We and others previously reported that the binding of viral gp120 to cellular CD4 expressed by pDC was essential to activate the endocytosis pathway and the TLR response [15, 38, 39]. Thus, we quantified CD4 expression on pDC freshly purified from all individuals groups. CD4 expression was significantly lower on unstimulated pDC from VIR than HIC or HD. In contrast, CD4 expression was similar on pDC cell surface from HIC and HD (Figure 4A). Thus, purified pDC were stained *ex vivo* with anti-CD4 (red), anti-TRAIL (green) and DAPI (blue) (Figure 4C). Similar levels and repartition of CD4 were observed on pDC from HIC and HD. CD4 was homogeneously expressed at the cell surface, while TRAIL was localized into the cell. However, pDC from VIR clearly showed membrane TRAIL and reduced CD4 expression. Confirming our results from Figure 3, we found that TRAIL was stored into intracellular compartment under the CD4 “cover”. In contrast, pDC from VIR showed very low CD4 expression and high membrane TRAIL expression, as expected.

We tested whether CD4 blocking by soluble CD4 (sCD4) or recombinant gp120 reduced IFN- α production by pDC. Figure 4D shows that both sCD4 and gp120 significantly reduced IFN- α production by HIV-stimulated pDC. IFN- α production by Flu-stimulated pDC was not affected by sCD4 nor gp120. In contrast to HIV, Flu does not require cellular CD4 to activate pDC.

Efficiency of apoptosis induction by pDC from HD, VIR and HIC

Blood pDC were purified from 8 VIR, 9 HIC (Table 1) and 8 HD individuals. To compare the efficiency of pDC we cultured them with CD4 T cell line (H9) chronically infected by HIV and expressing TRAIL death receptors (DR4 and DR5) but not membrane TRAIL (Figure 5A). However, coculture with pDC induced mTRAIL expression by H9 cells (Fig. 5B). This cell line allowed us to standardize the activity of killer pDC, thereby avoiding variability of T cell death due to differences in patient disease stage. CD4 T

cells from VIR died faster *in vitro* than cells from HD [30]. We show that recombinant TRAIL induced H9 cells apoptosis in a dose- and time-dependent manners, and the addition of soluble DR5 (TRAIL inhibitor) dramatically inhibited TRAIL-induced H9 cell death (Figure 5C). These results clearly established H9 cell line as target for IKpDC activity.

Our previous results show that the level of pDC activation by HIV was dependent on CD4 expression on cell surface (Figure 4). Thus, we cocultured H9 cells with stimulated or unstimulated pDC (Figure 5D) using a CD4 independent activator, the TLR9 stimulatory molecule CpG. We verified that CpG induced TRAIL expression on pDC (Figure 5E) and that CpG-stimulated pDC induced infected-H9 cell apoptosis was significantly inhibited by TRAIL blocker soluble DR5. It should be noted that unstimulated pDC were able to induce significant apoptosis of H9 cells (Figure 5F) due to the release of viruses from HIV-infected H9 cells.

Thus, we pre-stimulated (or not) pDC from HD, VIR and HIC with CpG overnight and then cultured them with HIV-infected H9 cells. Unstimulated pDC induced significant apoptosis of H9 cells, irrespective of their origin (Figure 5G). As expected, CpG-stimulated pDC induced higher levels of apoptosis by H9 cells compared to unstimulated pDC, in all groups of patients (Figure 5H). Interestingly, pDC from HIC seemed to induce stronger H9 cells apoptosis compared with pDC from HD. In summary, we found that pDC from HIC are functional and both HIV and CpG-activated pDC can efficiently kill HIV-infected CD4 T cells.

Discussion

pDC produce IFN- α in response to viral infection [12, 13, 16, 40]. There is now a debate in the literature concerning the activation of pDC in AIDS-resistant simian models. One study showed that the resistance to AIDS progression in sooty mangabey model was explained by a deficient IFN- α production by pDC in response to SIV [18]. In contrast, it was recently shown that pDC could be activated by SIV [41] and produce high levels of type I IFN similarly in AIDS-resistant and AIDS susceptible simian models [17, 42, 43]. The kinetic study of acute and chronic SIV infection demonstrated that the difference between pathogenesis resistant African green monkey (AGM) and susceptible Rhesus macaque (RM) resides in the kinetics of Interferon-stimulated genes (ISG) expression. Resistance was associated with a peak at around 2 weeks post-infection, followed by a decline to near-baseline levels by 4 weeks [17, 43]. In contrast, RM followed a generally similar kinetics until the decline, which leveled off well above the baseline to become chronic [42]. In humans, the role of IFN- α in HIV pathogenesis seems to be complex, and it has been recently demonstrated that activated pDC and IFN- α contribute to chronic immune activation and CD4 T cell depletion [21, 25].

Thus, we studied pDC to clarify whether human pDC response to HIV is altered in HIV controllers. In accordance to simian models, we found that HIC patients maintained high blood number of pDC, which were producing high levels of IFN- α in response to HIV exposure. In contrast, we found that pDC from VIR statistically produced less IFN- α than pDC from HIC or HD in response to HIV, but surprisingly produced similar levels of IFN- α in response to Flu as HIC and HD. Furthermore, we also found that CpG exposure induced similar levels of IFN- α by pDC from VIR and HIC or HD (data not shown). Thus, our data support the recent findings of an hyperfunctionality of blood pDC from VIR [33]. Furthermore we found that pDC from HIC did not expressed activation (CD40, HLA-DR), maturation (CD80, CD83, CD86) nor migration markers (CCR7) *in vivo*, but expressed them after *in vitro* HIV exposure (data not shown).

Previous studies hypothesized that HIV-mediated pDC activation was dependent of viral gp120 binding to cellular CD4 [38, 44]. We demonstrate here that soluble CD4 or recombinant gp120 strongly abrogated IFN- α production by HIV-activated pDC. Thus, we quantified CD4 expression on the pDC cell surface. Cytometry and microscopic study clearly demonstrate that pDC from VIR statistically express lower levels of surface CD4 than pDC from HD. Furthermore, CD4 expression on pDC from HIC was similar to pDC from HD. This could be explained by the very low levels of HIV-1 particles in these patients. Thus, the reduced expression of CD4 by pDC from VIR could explain that pDC from these patients produce less type I IFN in response to HIV than HIC or HD, but similar levels when stimulated by a CD4-independent virus, such as Flu.

In addition to type I IFN production, we previously showed that HIV transform pDC into IKpDC [15]. Thus, we tested whether HIV could induce activation of pDC into IKpDC in HIC. Our results showed that most of pDC from HIC did not express TRAIL on their membrane *in vivo* contrasting with the 30% of TRAIL-expressing pDC from VIR. Microscopic analysis revealed that pDC from HD possessed an intracellular pool of TRAIL, that is relocalized to the cell membrane under HIV activation transforming pDC into IKpDC. pDC from HIC exhibit an intracellular pattern and a same relocalization of TRAIL expression after viral exposure as pDC from HD. In contrast, *ex vivo* pDC from VIR showed high levels of membrane TRAIL expression. In addition, 3D microscopy analysis of circulating pDC from VIR revealed the existence of IKpDC, confirming the *in vivo* generation of this cell subset during HIV infection [21].

We thus demonstrated that pDC from HIC are functional defined by IFN- α production and membrane TRAIL expression after viral stimulation, transforming them into IKpDC. The fact that pDC from HIC, in contrast to pDC from viremic patients, do not express TRAIL *ex vivo* suggests that they are less stimulated *in vivo*, probably due to the nearly absence of HIV particles in the blood. Thus, pDC are not activated and probably do not migrate to lymphoid organs, explaining the elevated number of pDC in blood from HIC compared to VIR patients. These results are consistent with our previous study showing that tonsils from controllers do not exhibit IFN- α staining in contrast to tonsils from VIR [45].

Finally, we performed functional assays to test whether IKpDC could induce apoptosis of CD4 T cells. It has been shown that HIV induced TRAIL expression by pDC, however these TRAIL expressing pDC could not induce lysis of autologous HIV-infected CD4 T cells measured by ⁵¹chrome release after 6 hours of culture [46]. We did not investigate lysis in our study, but apoptosis using early (Annexin V) and late (Topro-III) markers to precisely determine apoptosis levels. Indeed, it is now clearly accepted that the vast majority of CD4 T cells undergoes massively death by apoptosis in HIV-infected patients. We previously demonstrated that HIV-1-exposed CD4 T cells expressed high levels of DR5 after 24h of culture and consequently became sensible to TRAIL-mediated apoptosis [30]. We show here that, in coculture, TRAIL-expressing pDC, and probably TRAIL-expressing H9 cells induced apoptosis of the DR5 positive CD4 T cell line H9. This result combined with TRAIL expression and the high levels of IFN- α produced by pDC from HIC suggest that, in contrast to some simian model, pDC from controllers are fully functional and acquire a killer profile (IKpDC). However, HIV controllers maintain high CD4 T cell counts, which can not be explained by a lack of killer activity from pDC but rather from a particularity of CD4 T cells that remained to be investigated.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) and Sidaction. This work was also supported by a grant of the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge the Nikon Imaging Centre@curie.fr (Institut Curie-CNRS (<http://nimce.curie.fr>), Paris, France) and the PICT-IBiSA Imaging Facility (<http://pict-ibisa.curie.fr>). The authors thank Pr. Laurence Meyer, Aurélia Lamine, Pr. Daniel Séréni, Dr. Caroline Lascoux, Dr. Olivier Taulera, Jeannine Delgado, Pr. François Bricaire, Michèle Pauchard, Marie-Thérèse Rannou, Dr. David Zucman, Nadège Velazquez, all the other physicians, nurses and patients. We also thank the Centro Regional de Transfusiones Sanguineas Sevilla-Huelva y Banco de Tejidos for its kind support. This work

was supported by Redes Telemáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS; 2006, Red de SIDA RD06/0006/0021, 2007–2010), Consejería Salud Junta de Andalucía grants CS2008/PI0270 and CS2009/PI0066, Fondo de Investigación Sanitaria grant PS09/00126. E. R-M. was supported by Fondo de Investigación Sanitaria grant CP08/00172. K.M. was supported by RETICS; 2006, Red de SIDA RD06/0006/0021, 2007–2010. The NIH: H9/HTLV-IIIb NIH 1983 was obtained from Dr Robert Gallo.

References

1. O'Shea S, Rostron T, Hamblin AS, Palmer SJ and Banatvala JE. Quantitation of HIV: correlation with clinical, virological, and immunological status. *J Med Virol* 1991;35:65-9
2. Venet A, Lu W, Beldjord K and Andrieu JM. Correlation between CD4 cell counts and cellular and plasma viral load in HIV-1-seropositive individuals. *Aids* 1991;5:283-8
3. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 2007;15:134-6
4. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007;27:406-16
5. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* 2009;200:1714-23
6. Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A and Lambotte O. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol* 2007;28:532-40
7. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005;41:1053-6
8. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008;197:563-71
9. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-7
10. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J and Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-11
11. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-23
12. Colonna M, Trinchieri G and Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-26
13. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004;78:5223-32
14. Siegal F. Interferon-producing plasmacytoid dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *Res Initiat Treat Action* 2003;8:10-3
15. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM and Herbeuval JP. 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 U S A* 2007;104:17453-8
16. Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13974-9
17. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 2009;119:3544-55
18. Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, et al. Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* 2008;14:1077-87
19. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001;98:906-12
20. Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002;168:4796-801
21. Stary G, Klein I, Kohlhofer S, et al. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 2009;114:3854-63

22. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, et al. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 2008;112:4598-608
23. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003;77:11708-17
24. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:749-59
25. Sivaraman V, Zhang L and Su L. Type I interferon contributes to CD4+ T cell depletion induced by infection with HIV-1 in the human thymus. *J Virol* 2011;85:9243-6
26. Lichtner M, Maranon C, Vidalain PO, et al. HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:175-82
27. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-21.
28. Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 1997;17:141-3
29. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 2005;105:2458-64
30. Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, et al. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 2005;106:3524-31
31. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, et al. HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Aids* 2009;23:35-40
32. Meier A, Chang JJ, Chan ES, et al. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* 2009
33. Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 2010;116:3839-52
34. Ruiz-Mateos E, Ferrando-Martinez S, Machmach K, et al. High levels of CD57+CD28- T-cells, low T-cell proliferation and preferential expansion of terminally differentiated CD4+ T-cells in HIV-elite controllers. *Curr HIV Res*;8:471-81
35. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix ML, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *Aids* 2007;21:1043-5
36. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol* 2007;81:13904-15
37. Lichtner M, Rossi R, Rizza MC, et al. Plasmacytoid dendritic cells count in antiretroviral-treated patients is predictive of HIV load control independent of CD4+ T-cell count. *Curr HIV Res* 2008;6:19-27
38. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest* 2005
39. Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol*;87:609-20
40. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:248-55
41. Brown KN, Wijewardana V, Liu X and Barratt-Boyes SM. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000413
42. Diop OM, Ploquin MJ, Mortara L, et al. Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 2008;82:5145-52
43. Bosinger SE, Li Q, Gordon SN, et al. Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. *J Clin Invest* 2009;119:3556-72

44. Herbeuval JP, Shearer GM. Are blockers of gp120/CD4 interaction effective inhibitors of HIV-1 immunopathogenesis? *AIDS Rev* 2006;8:3-8
45. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, et al. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7000-5
46. Chehimi J, Papasavvas E, Tomescu C, et al. Inability of plasmacytoid dendritic cells to directly lyse HIV-infected autologous CD4+ T cells despite induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol*;84:2762-73

Figure Legends

Figure 1. Quantitative and qualitative characterization of pDC from HIC. (A). Characterization of pDC using CD14 exclusion and CD4, BDCA-2, BDCA-4 and CD123 stainings. (B). pDC quantification. Percentage and pDC number of pDC (BDCA-2⁺, BDCA-4⁺, CD123⁺ and CD4⁺) contained in blood from healthy individuals (HD), viremic (VIR) and controller (HIC) patients. Statistical analysis of pDC number in blood from HD (n=30), VIR (n=11) and HIC (n=13). (C-D). IFN- α secretion by viruses-stimulated pDC. IFN- α production was measured in supernatants of pDC among PBMC from HD (n=13), VIR (n=9) and HIC (n=11) cultured with HIV-1 MN AT2 (C) or influenza A virus (Flu) (D). P values (*p*) were determined using Mann-Whitney (A-B) and two-tailed Student's *t* test (C-D). (NS: not significant; *P*<0.05 was considered statistically significant). * indicates *p*< 0.05; ** indicates *p*< 0.01.

Figure 2. Cytometry and 3D analysis of TRAIL localization in pDC. (A). Freshly purified pDC from HD, VIR and HIC individuals were cultured with (HIV) or without (Unst) HIV overnight. Cells were stained with anti TRAIL antibody and analyzed by FACS. Panels represent percentage of mTRAIL positive pDC. (B) pDC from HD, HIC, VIR and pDC from HD and HIC cultured *in vitro* with HIV (HD+HIV) were analyzed for TRAIL expression by flow cytometry and simultaneously by 3D microscopy (C). pDC from HD, HIC, VIR and HIV-activated pDC from HD (HD+HIV) and HIC (HIC+HIV) were stained with anti-TRAIL (green) and DAPI (nucleus staining) and analyzed by 3D microscopy. pDC stainings (green and blue) were merged (right panels). pDC from VIR and HIV-activated pDC showed a different TRAIL localization compared to unstimulated pDC from HD or HIC (C).

Figure 3. Microscopy analysis of TRAIL localization in pDC. To better characterize TRAIL localization, images were analyzed using 3D interactive surface plot analysis. (A). Deconvolution overlays of representative 2D red cross axis XY focal plan with XZ / YZ view of focal plane and projection overlay of cell stainings (analyzed by Metamorph software). pDC from HD (A), HIC (B), HIV-stimulated pDC from HD (C) and HIV-stimulated pDC from HIC (D) were stained with anti-TRAIL (green) and DAPI (nucleus staining). Deconvolution of representative 2D XY focal plane was treated to allow Z scaling of

pixel intensity (Interactive 3D surface plot analyzed by ImageJ software). Each staining, anti-TRAIL (green) and DAPI (nucleus staining) were merged together with phase contrast (grey, defined cell surface). This 3D surface plot representation was used to enhance the observation of intracellular TRAIL localization or its relocation to the membrane (Mb). The vast majority of pDC from HD and HIC statistically expressed intracellular TRAIL (green) in contrast to pDC from VIR and HIV-stimulated pDC that expressed TRAIL at cell surface. 50 cells per condition, (HD (n=3), HIC (n=3), HD+HIV (n=3) and HIC+ HIV (n=3)) were quantified regarding their expression of membrane or intracellular TRAIL expression. NS: not significant; $P < 0.05$ was considered statistically significant). * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$.

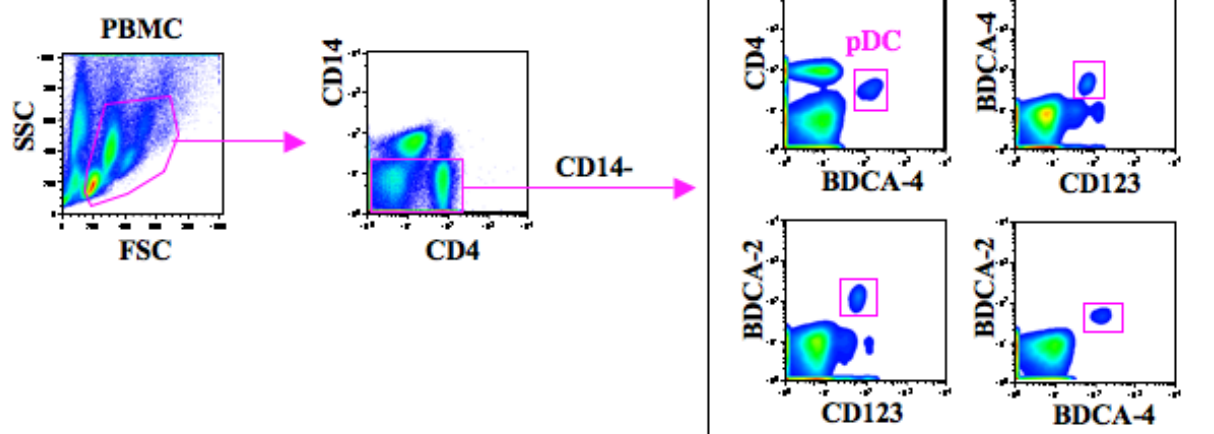
Figure 4. CD4 expression by pDC. (A). CD4 cell surface expression by pDC from 12 HD (HD), , 11 VIR (VIR) and 10 HIC (HIC) was quantified by FACS and expressed in mean fluorescence intensity (MFI). (B). 3D microscopy of CD4 and TRAIL expression by pDC. pDC from HD, HIC, VIR were stained with anti-TRAIL (green), CD4 (pink) and DAPI (blue). pDC stainings (green, pink and blue) were merged and analyzed using 3D viewer by ImageJ. CD4 expression by the same pDC was also analyzed by FACS (left panels). (C). purified pDC were cultured in presence of HIV, with or without soluble CD4 (sCD4), recombinant gp120 (gp120) and with Flu with or without sCD4 and gp120. IFN- α levels were measured by ELISA after 12h of culture.

Figure 5. Apoptosis of H9 cells by pDC. (A). HIV-infected H9 cell line was characterized by FACS for TRAIL and TRAIL death receptor (DR4 and DR5) expressions. (B). Membrane TRAIL expression on H9 cells cultured without (left panel), with pDC (middle panel) or CpG-activated (left panel) pDC. (C). HIV-infected H9 cells were cultured 24h in presence of increasing concentration of recombinant TRAIL (upper panel) and apoptosis was quantified by FACS using Annexin V/Topro III stainings. H9 cells were cultured 24h in presence of recombinant TRAIL (200 ng/ml) and apoptosis was measured using AnnexinV/Topro III every 3 hours (middle panel). H9 cells were cultured in presence of TRAIL and soluble DR5 (sDR5) for 24h and apoptosis was evaluated by AnnexinV/Topro III (bottom panel). (D-E). H9 cells were

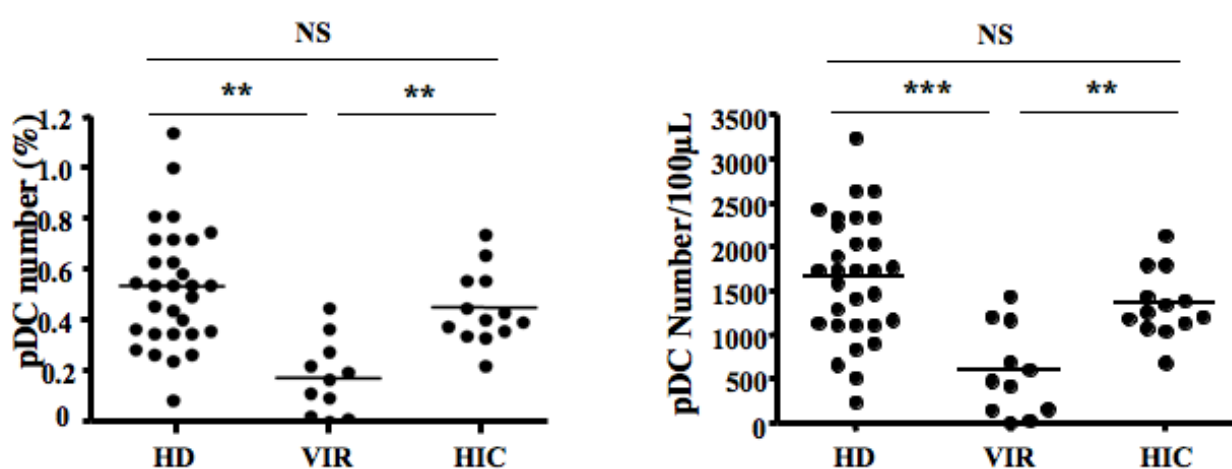
cocultured 24h with purified unstimulated or CpG-stimulated pDC from HD (**F**). Cells were discriminated using CD123-SSC parameters, and apoptosis was quantified by FACS. (**F**). TRAIL expression by unstimulated or CpG stimulated CD123⁺ cells (pDC) was quantified by FACS. (**G-H**) pDC were purified from 8 HD, 8 VIR and 9 HIC and stimulated or not overnight with CpG. Unstimulated pDC (**G**) and overnight CpG-stimulated (**H**) pDC from 8 HD, 8 VIR and 9 HIC were then cocultured 24h in presence of H9 cells at ratio 2:1. Left panels represented Annexin V positive H9 cells and right panels Topro III positive H9 cells. NS: not significant; $P < 0.05$ was considered statistically significant). * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$.

Figure 1

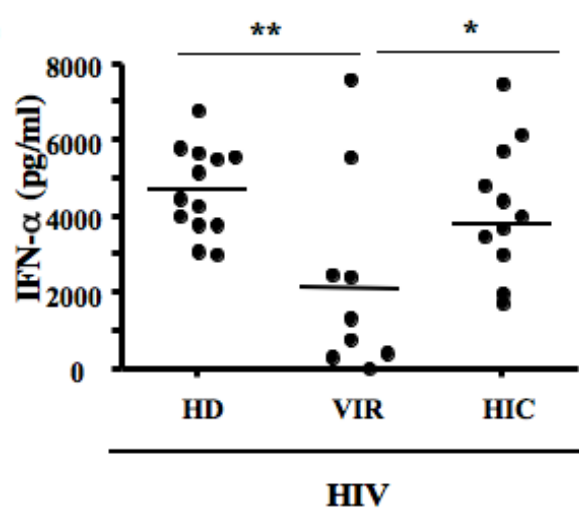
A



B



C



D

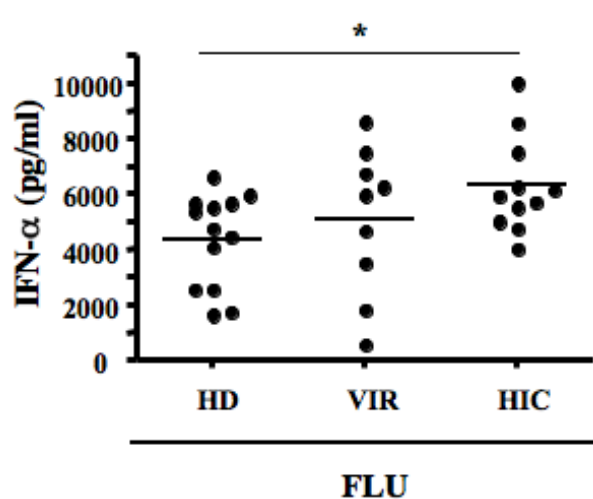


Figure 2

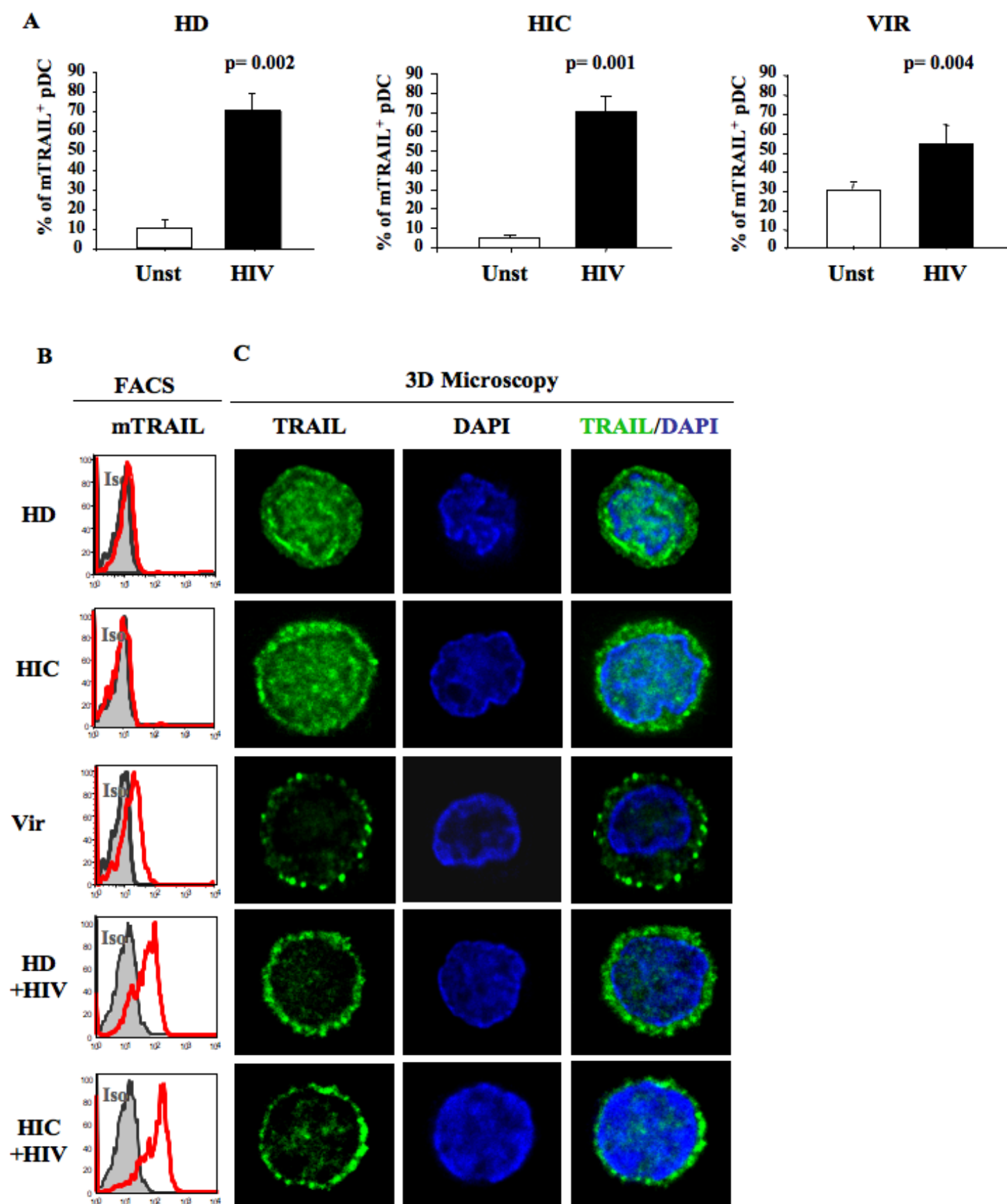


Figure 3

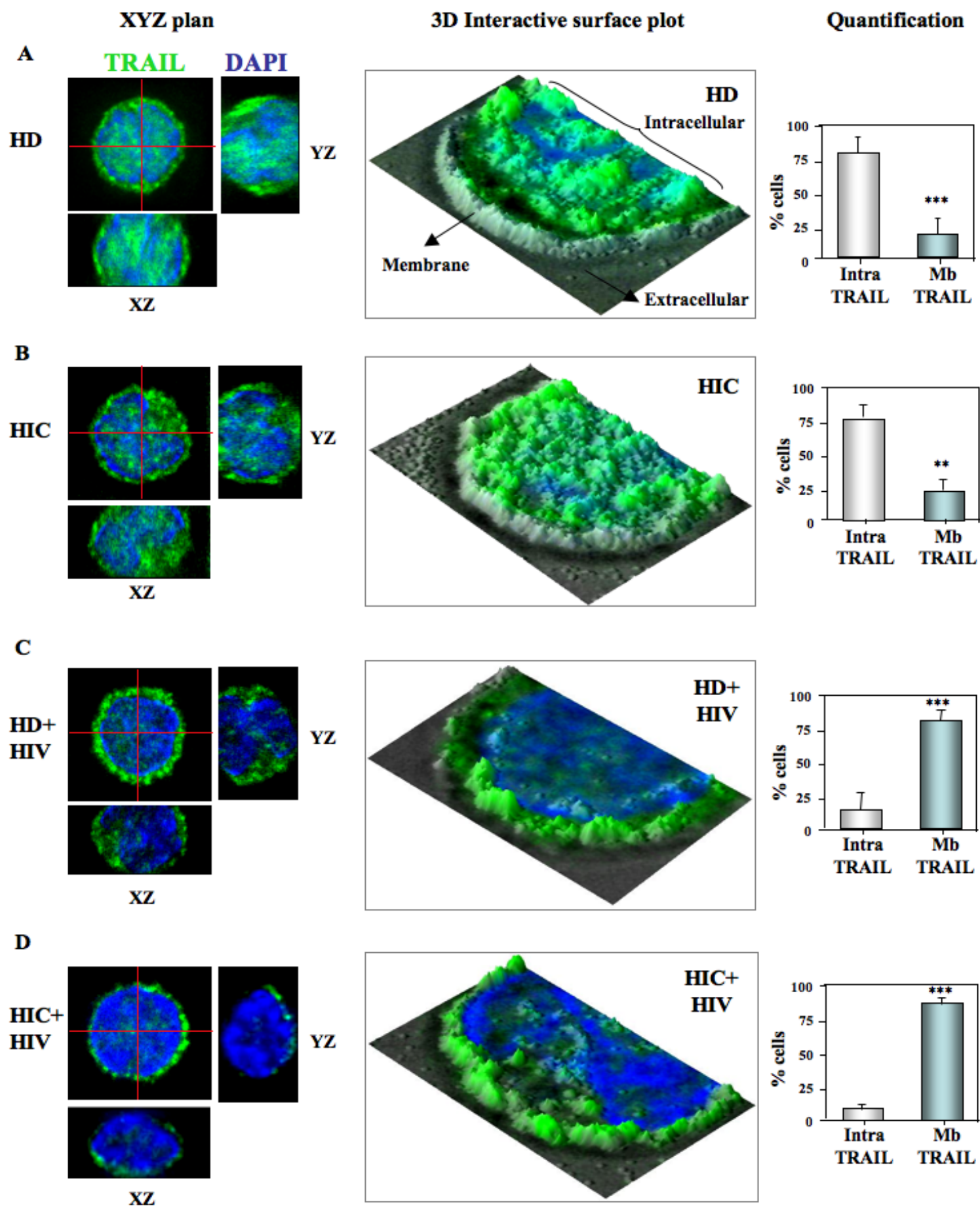
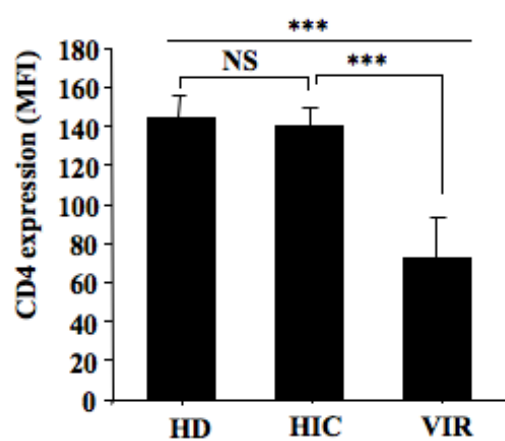
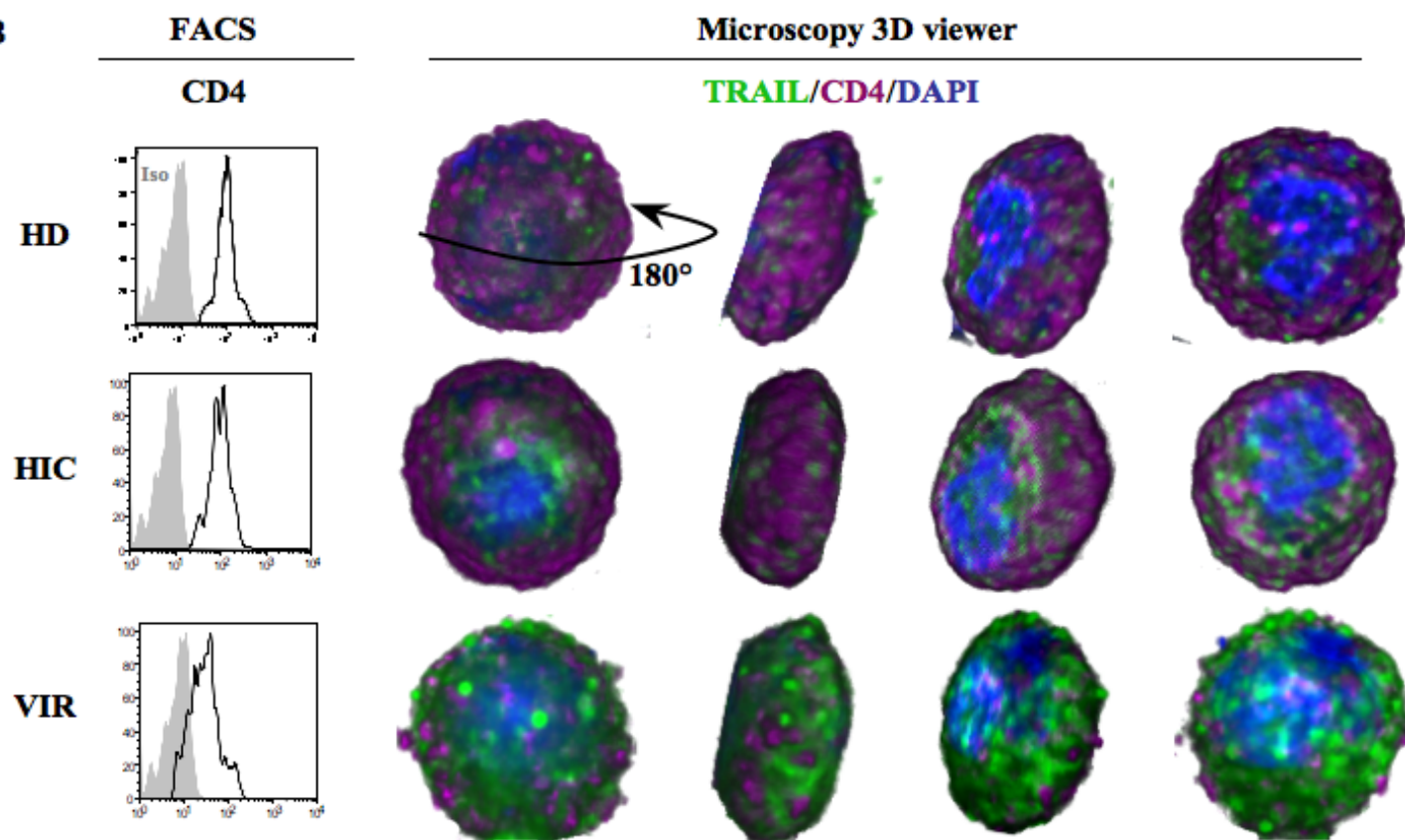


Figure 4

A



B



C

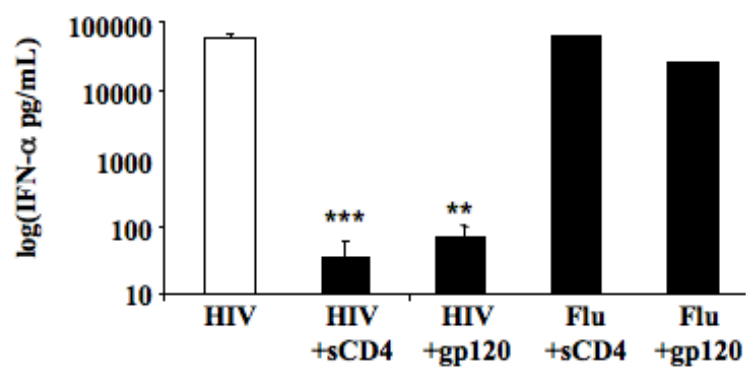
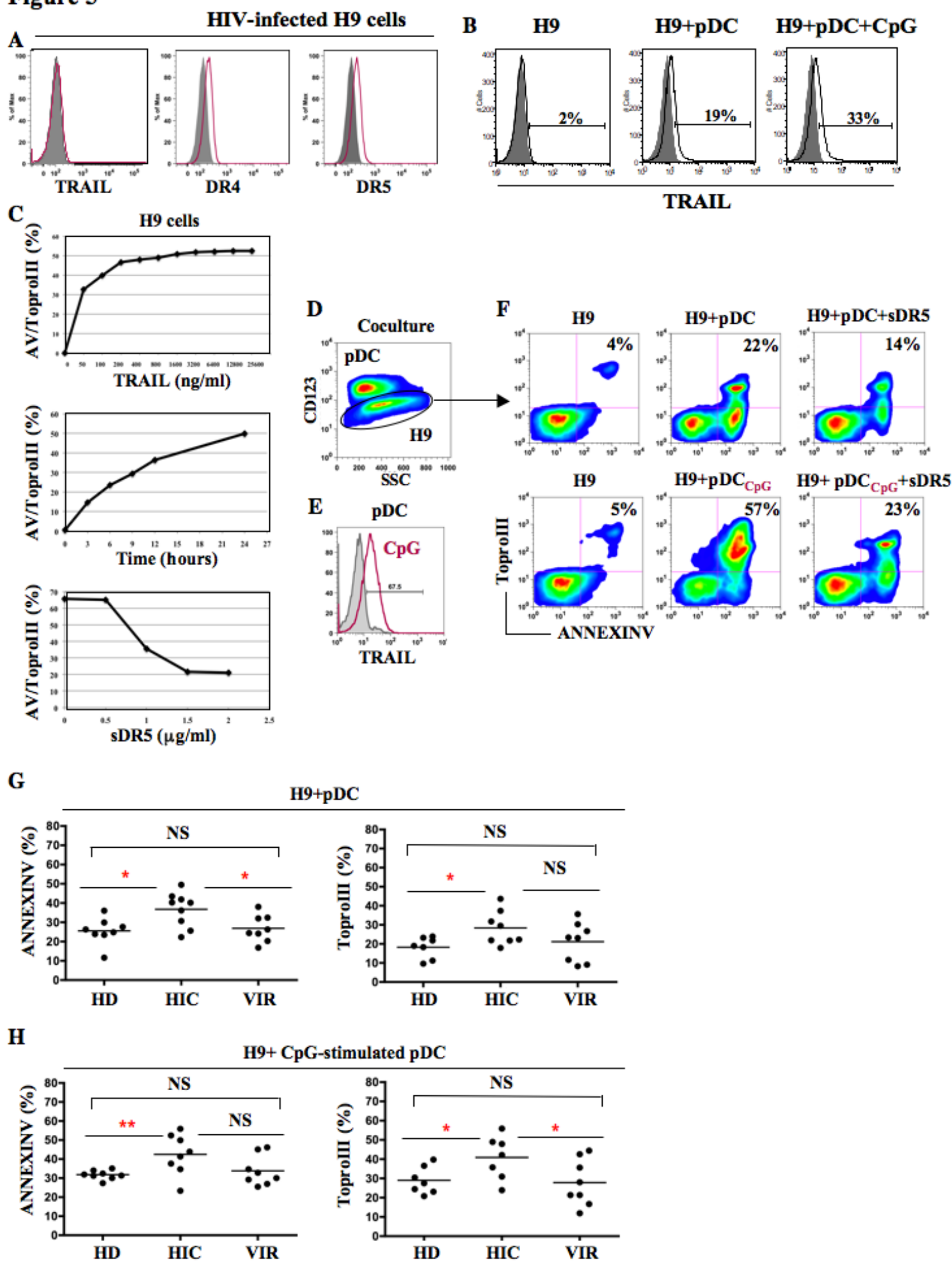
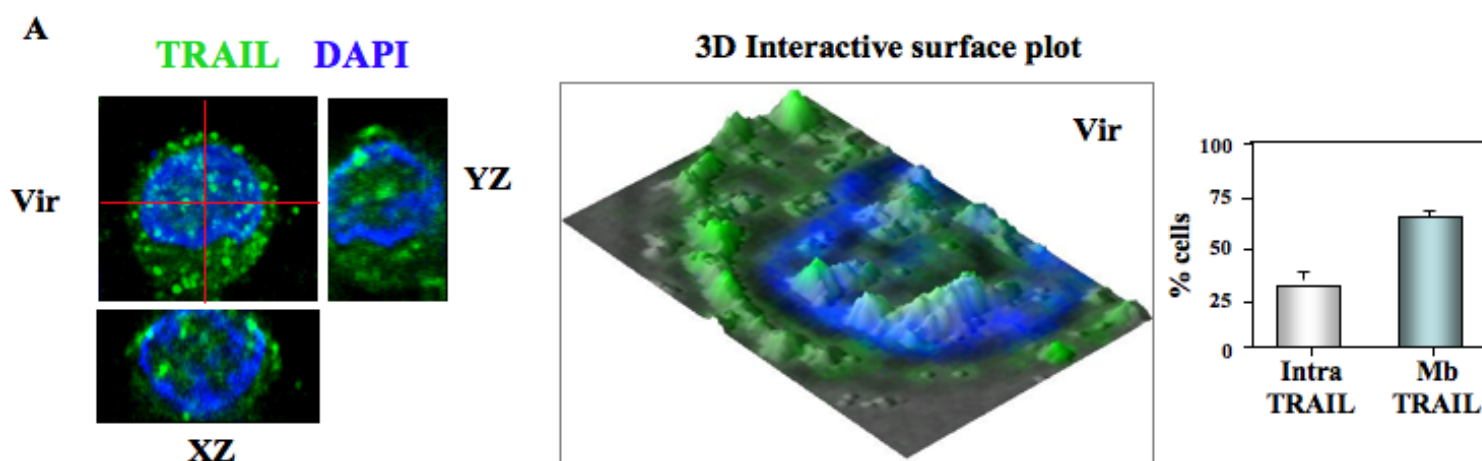


Figure 5



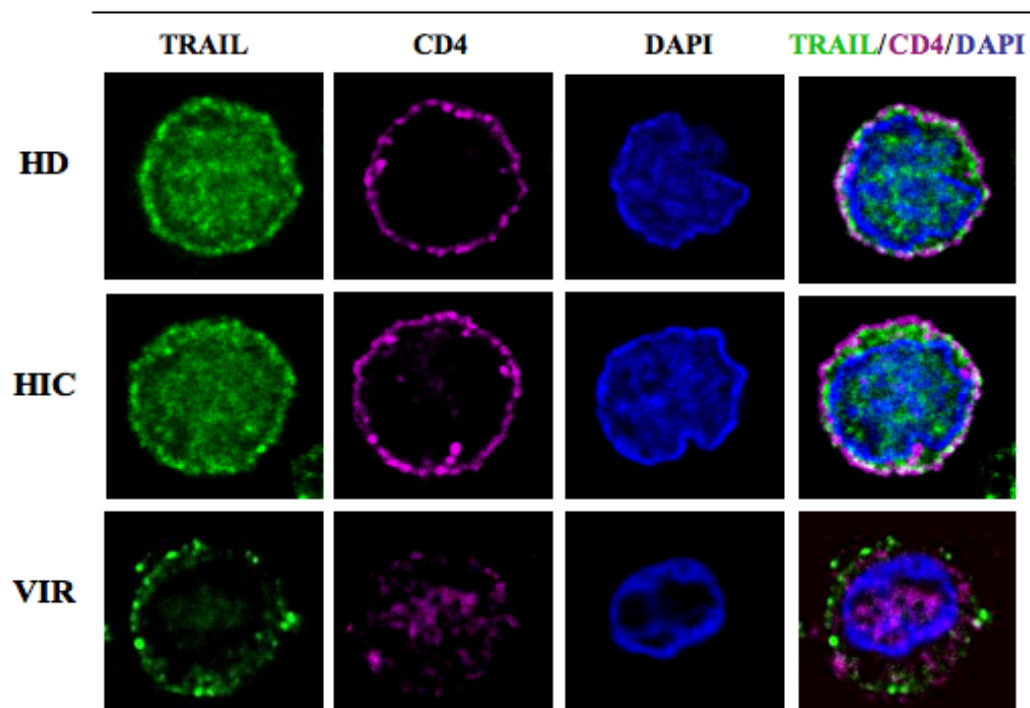
Sup Figure 1



Supplemental Figure 1. Deconvolution overlays of representative 2D red cross axis XY focal plan with XZ / YZ view of focal plane and projection overlay of cell stainings (analyzed by Metamorph software). pDC from VIR were stained with anti-TRAIL (green) and DAPI (nucleus staining). Deconvolution of representative 2D XY focal plane was treated to allow Z scaling of pixel intensity (Interactive 3D surface plot analyzed by ImageJ software). Each staining, anti-TRAIL (green) and DAPI (nucleus staining) were merged together with phase contrast (grey, defined cell surface). pDC from VIR expressed intracellular and membrane TRAIL. 50 cells from 3 different patients were quantified regarding their expression of membrane or intracellular TRAIL expression.

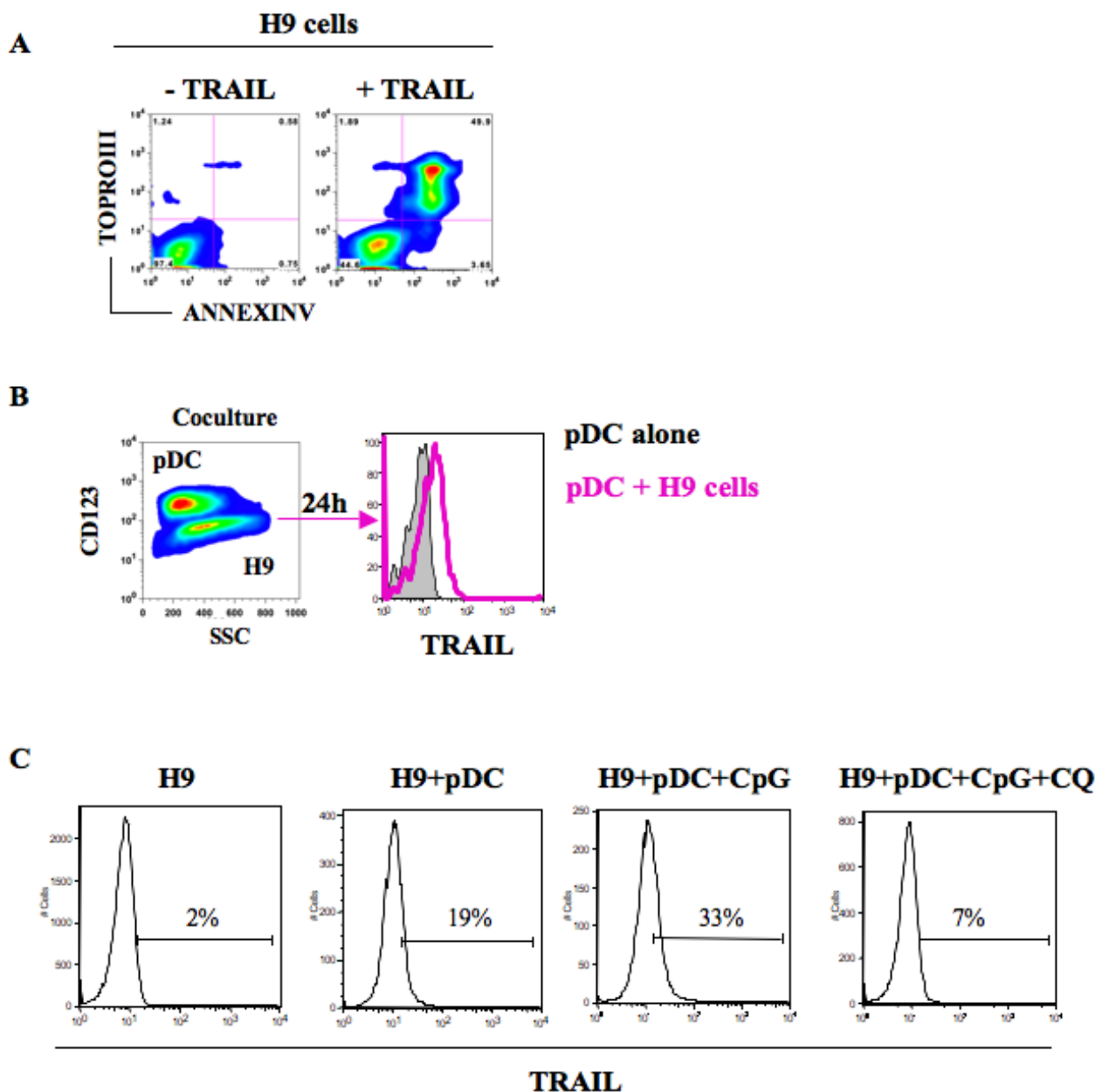
Sup Figure 2

3D Microscopy of purified pDC



Supplemental Figure 2: 3D microscopy of CD4 and TRAIL expression by pDC. pDC from HD (HD), HIC (HIC), VIR (VIR) were stained with anti-TRAIL (green), CD4 (pink) and DAPI (blue). pDC stainings (green, pink and blue) were merged and analyzed using 3D viewer by ImageJ. CD4 expression by the same pDC was also analyzed by FACS (left panels).

Sup Figure 3



Supplemental Figure 3: (A) HIV-infected H9 cells were cultured in presence of 200 ng/ml of recombinant TRAIL. Apoptosis was quantified by FACS using Topro III and Annexin V markers. (B) Purified pDC from HD were cocultured 24h in presence of HIV-infected H9 cells (ratio 2:1). TRAIL expression on pDC was quantified by flow cytometry and compared to unstimulated pDC cultured without HIV-infected H9 cells for 24h. Results shown are representative of 4 independent experiments. (C) TRAIL expression on HIV-infected H9 cells. Cells were cultured in presence of pDC, CpG-activated pDC or CpG-activated pDC with chloroquine. TRAIL expression was measured by FACS. Dot plots are representative of 4 experiments.

Résultat 3 : Etude des LTCD4⁺ et de la voie
TRAIL/DR5 chez les patients HIV-Controllers

Contexte : Des études *in vitro* ont montré l'implication potentielle de la voie TRAIL/DR5 dans la mort des LTCD4⁺. Cette voie d'apoptose pourrait contribuer à la mort massive des LTCD4⁺ observée chez les patients infectés par le VIH-1.

But : Le but de cette étude consiste à étudier l'expression du ligand apoptotique TRAIL et de son récepteur DR5, afin de déterminer si un défaut d'expression au niveau de ces deux molécules pourrait expliquer la résistance des LTCD4⁺ des patients contrôleurs du VIH-1.

Méthodes : 12 patients HIV-Controllers (HIC) qui contrôlent la déplétion de leurs lymphocytes TCD4 et également leur charge virale (concentration d'ARN viral plasmatique inférieure à 400 copies/mL) ont été sélectionnés dans la cohorte CO18 de l'Hôpital Bicêtre. Parallèlement, 14 patients virémiques (VIR) non traités et chroniquement infectés par le VIH-1, ont été également sélectionnés. Nous avons utilisé comme groupe témoin, 15 donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang testés séronégatifs pour le VIH-1.

Les LTCD4⁺ des patients contrôleurs, des patients virémiques et des donneurs sains ont été purifiés par tri magnétique (sélection négative). Les cellules ont été stimulées *in vitro* par le VIH-1 et l'expression du ligand de mort TRAIL et des récepteurs de mort DR5, DR4, DcR1 et DcR2, ainsi que FAS a été analysée. Les principales techniques utilisées pour étudier le phénotype des LTCD4⁺ des différents groupes de patients ont été la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence.

Nous avons dans un premier temps analysé l'expression membranaire de TRAIL sous stimulation par le VIH. L'analyse *in vivo* en cytométrie de flux des LTCD4⁺ montre une absence d'expression de TRAIL à la surface des LTCD4⁺ des patients controllers, semblable à celle de donneurs sains, alors que la totalité des LTCD4⁺ des patients virémiques expriment un niveau élevé de TRAIL membranaire. La stimulation *in vitro* par le VIH induit l'expression de TRAIL membranaire chez les controllers et donneurs sains. Ainsi, **la réponse TRAIL *in vitro* n'est pas altérée chez les patients controllers.**

Puis dans un second temps, nous avons analysé l'expression membranaire de DR5. Nous avons alors analysé l'expression de DR5 par les LTCD4⁺. Le phénotype *in vivo* des LTCD4⁺ montre une grande similitude entre les donneurs sains et controllers, n'exprimant que peu ou pas de DR5 à leur surface, contrairement aux patients virémiques qui expriment des taux élevés de DR5. En revanche, la stimulation *in vitro* par le VIH a permis de mettre en évidence une caractéristique des LTCD4⁺ des patients controllers. Alors que l'expression de DR5 membranaire est augmentée par les LTCD4⁺ de donneurs sains ou virémiques en réponse au VIH, **la stimulation des LTCD4⁺ de patients controllers n'entraîne pas d'expression membranaire de DR5.**

Par conséquent, nous avons voulu savoir si l'absence d'expression de DR5 à la surface des LTCD4⁺ des patients controllers était due à une mutation. Nous avons alors séquencé le gène DR5 de 13 patients controllers et 24 patients virémiques. Nous avons identifié **une nouvelle mutation homozygote** non répertoriée dans GenBank, **dans la séquence codant pour la région leader de DR5.** 76% des 13 patients HIC arborent la mutation qui change une Proline en Leucine. En revanche, seulement 20% des 24 patients virémiques étaient porteurs de cette mutation.

Enfin, nous avons alors cloné la forme mutée (P32L) et la forme sauvage (WT) de DR5 dans un vecteur tagué (Flag). Les deux formes ont ensuite été exprimées dans des cellules 293T. Par Western Blot, en utilisant des anti-Flag et anti-DR5, nous avons identifié **deux formes de DR5 de poids moléculaires distincts : 40 kD (WT) et environ 50 kD (P32L).**

L'analyse par microscopie 3 dimensions nous a permis de mettre en évidence la présence de DR5 dans les cellules de patients controllers. Ainsi l'absence d'expression de DR5 à la surface des LTCD4⁺ de patients controllers ne provient pas d'un défaut de synthèse de la protéine mais d'un défaut de relocalisation. La forme sauvage de DR5 est exportée à la

membrane des LTCD4⁺ sous stimulation par le VIH alors que **la forme mutée P32L de DR5 exprimée par les patients controllers reste intracellulaire et est séquestrée dans les LTCD4⁺.**

Ainsi, d'après notre modèle d'étude, nous émettons l'hypothèse que l'absence d'expression de DR5 à la surface des LTCD4⁺ chez les patients HIV-Controllers pourrait contribuer à l'absence de lymphopénie observée chez ces patients.

Identification and characterization of a homozygous substitution (P32L) in the human Death Receptor 5

Lucie Barblu, ¹ Stéphanie Durand, ² Christophe Gras, ¹ Yves Lepelletier, ¹ Alain Venet, ³ Farouly Boufassa, ⁴ Jean-François Delfraissy, ^{3,4,5} Andrea Cimarelli, ² Olivier Lambotte, ^{3,4,5}¶ Jean-Philippe Herbeuval ¹¶*.

¹ CNRS UMR 8147; Université Paris Descartes, Paris, France, ² Retro Human Virology, Ecole Normale Supérieure de Lyon; INSERM, U758; Université Lyon1, ³ INSERM, U1012, Bicêtre, ⁴ AP-HP, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Bicêtre Hospital, Bicêtre, ⁵ Université Paris-Sud, Bicêtre, France

¶ Both authors contributed equally to the work

*Address for corresponding author: Dr Jean-Philippe Herbeuval, UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris, CEDEX 15 France, jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr, Tel: 01 44 49 53 87, Fax: 01 44 49 06 76

Number of Figures: 5

Table: 3

Word count:

Abbreviations: HIV-1 infected controllers (HIC), interferon alpha (IFN- α), plasmacytoid dendritic cell (pDC), TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), Death Receptor 5 (DR5).

Key words: HIV infected controllers, DR5, TRAIL, apoptosis, CD4⁺ T cell, mutation.

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) drives HIV-mediated apoptosis by engaging the death receptor 5 (DR5) at the surface of CD4⁺ T cells. Reduced HIV-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells could contribute to explain the HIV controller phenotype. CD4⁺ T cells from controllers, and healthy donors express *ex vivo* limited amounts of TRAIL and barely detectable membrane DR5 contrasting with high expression of both molecules in CD4⁺ T cells from viremic patients. CD4⁺ T cells were cultured with HIV AT-2 and TRAIL-induced apoptosis was quantified. Significant lower apoptosis was detected in CD4⁺ T cells from HIV controllers with lower expression of membrane DR5. We then identified a novel recessive homozygous substitution in DR5 gene leading to a Proline-to-Leucine change (P32L) in the leader peptide. This mutation results in the intracellular sequestration of DR5 and confers resistance to TRAIL-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells. Homozygous P32L genotype was statistically more frequent in HIC (10/12) than viremic patients (3/14). Furthermore, membrane DR5 expression negatively correlates with the number of CD4⁺ T cells in all groups of patients. Thus, detection of homozygous P32L genotype in HIV-infected patients could be a new prognostic marker associated with preservation of CD4⁺ T cells.

Introduction

TNF-Related Apoptosis Ligand (TRAIL), a TNF- α family member¹, induces apoptosis by binding to its death receptors, DR4 and DR5^{2,3}. Numerous studies showed that TRAIL pathway seems to be largely implicating in immune cell dysregulation and apoptosis during HIV-1 infection⁴⁻¹⁶. Plasma TRAIL has been reported to be an early pathogenic marker in acute HIV-1 infection and is correlated to viral load in chronic disease¹⁰. HIV-1 upregulates DR5 expression on the membrane of CD4⁺ T cells *in vitro*¹⁷ making them prone to TRAIL-mediated apoptosis⁴. Furthermore, the percentage of CD4⁺ T cells co-expressing TRAIL and DR5 are elevated in the blood of viremic progressors⁴. TRAIL-expressing plasmacytoid dendritic cells induce apoptosis of CD4⁺ T cells *in vitro*^{18,19} and in tonsils of patients progressing to AIDS²⁰. Taken together, these reports support the idea that the TRAIL pathway is a major contributor of HIV-infected but also non-infected HIV-1-exposed CD4⁺ T cell depletion during AIDS progression.

The majority of HIV-1-infected individuals progress to AIDS characterized by massive CD4⁺ T cell depletion and high viral load^{21,22}. However, a subset of HIV-1-positive individuals has been identified that does not progress, but generally maintain spontaneously high CD4⁺ T cell levels and an undetectable viral load. These patients are termed HIV controllers (HIC), Elite Controllers, Elite Suppressors or Long-Term Non Progressors²³⁻²⁷. We questioned whether the CD4⁺ T cells from HIC are resistant to HIV-1-induced apoptosis by studying the TRAIL/DR5 pathway. Such a resistance could have been valuable especially during primary infection, a period during which early HIV control has been observed²⁸. Indeed, we observed HIV-induced apoptosis was significantly reduced in CD4⁺ T cells in HIC compared with viremic progressors (VIR). This reduction of apoptosis was associated with an unexpected very low expression of membrane DR5 on HIV-1 activated CD4⁺ T cells. This leads to the identification of a novel recessive homozygous substitution in DR5 gene leading to a Proline-to-Leucine change (P32L) in the leader peptide. This mutation results in the intracellular sequestration of DR5 protein and confers resistance to TRAIL-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells. This mutation is over-represented in HIC (83%) but exists

also in VIR (21%) and could be associated with a lower CD4⁺ T cell count decrease and slower HIV infection course.

METHODS

Blood samples. 12 HIV-1 controllers (HIC) enrolled from the French ANRS CO18 HIV Controller cohort, were selected on the following characteristics: HIV-1-infected patients, never treated with any antiretroviral treatment, with a follow-up longer than 10 years and with more than 90% of plasma HIV-1 RNA measurements lower than 400 copies/mL (Amplicor Monitor, Roche Diagnostics, Meylan, France). 14 viremic chronically-infected untreated patients (VIR) were selected at the Bicêtre University Infectious Diseases Clinic, and 15 healthy HIV-1-seronegative blood bank donors (HD) was obtained from Etablissement Français du Sang (convention # 07/CABANEL/106, France). The study was promoted by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS, number 05-22). All participants gave written informed consent prior to blood sampling. Experimental procedures have been approved by the Bicêtre and Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki.

Isolation and culture of blood leukocytes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation using lymphocyte separation medium (Cambrex, Gaithersburg, MD). CD4⁺ T cells from HD, HIC and VIR PBMC were purified by using the CD4⁺ purification (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were cultured overnight in RPMI medium 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing 10% FBS (HyClone, Logan, UT) and 1% Pen-Strep-Glut (Invitrogen) in the presence of AT-2 HIV-1 (MN) at 60 ng/mL p24^{CA} equivalent.

Flow cytometry. Cells were incubated for 20 min at 4°C with FITC-conjugated anti-DR4, -DR5 (Alexis, San Diego, CA) or Annexin-V (MBL International, Woburn, MA), PE-conjugated TRAIL and APC-Cy7-conjugated anti-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA), Vioblue-conjugated anti-CD4 (Miltenyi) or with appropriate isotype-matched control antibodies (at 5 mg/mL each) in PBS (Sigma, Saint Louis, MO) and Fc-Receptor blockers (BD, Biosciences). Cells were washed twice in ice-cold PBS or Annexin V buffer

and FACS analysis was performed on a FACS Canto (7 colors) using FACS Diva software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

SiRNA transfection. 3 μ l of Hiperfect transfection reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) were added to appropriate siRNA concentration and adjusted at 100 μ l with serum-free medium. The solution was gently mixed, incubated at room temperature (RT) during 30 minutes and then added to cells in culture overnight (10⁵ cells per 100 μ l in 96 well/plates). Cells were then cultured 24h with or without HIV-1. Control was performed using scramble siRNA. Transfection efficiency using Alexa-488 tagged scramble siRNA (Qiagen) and apoptosis were analyzed by flow cytometry.

RNA extraction. 500 μ L of Trizol (Sigma) were added to the pellet of CD4⁺ T cells, then mixed and incubated at RT during 5 min. 100 μ L of chloroform were added and centrifuged at 13 000 rpm (15 min). The upper phase were recovered and 500 μ L of isopropanol (Sigma) was added and mixed at 4°C (1h). The mix were then centrifuged 13 000 rpm (10 mins) and isopropanol were removed. 500 μ L of 75°C ethanol were added and centrifuged (13 000 rpm, 15 mins). Finally, RNA were recovered in 5 μ L of H₂O-DEPC (Sigma) and stored at -80°C.

Reverse transcription. 1 μ g of RNA was used to perform the reverse transcription according to the manufacturer's instructions (Verso cDNA Kit, Thermo Fisher Scientific, abgene, UK).

PCR. Primers were synthesized by Invitrogen (primer DR5 sens 5' AGGTGAAGTGGAGCTAAGTC 3', DR5 antisens: 5' TCACTCCAGGGTGTACAATC 3'; primer β 2-microglobuline sens: 5' CCAGCAGAGAATGGAAAGTC, β 2-microglobuline antisens GATGCTGCTTACATGTCTCG). Amplification reaction were realized with a Mastercycler Eppendorf machine according to the following program (T_m 55°C): Lid 110°C (5 mins, 94°C), 1 min (55°C) and 1 min 30 (72°C), 1 min (94°C), 35 cycles and finally 10 mins (72°C). Samples were run on an eletrophoresis gel agarose 1% (2h, 80V).

Three dimensional microscopy. Cultured CD4⁺ T cells from HD and HIC were plated on poly-L-lysine (Sigma)-coated slides, fixed in 4% paraformaldehyde and then quenched with 0.1 M glycine. Cells were incubated in permeabilizing buffer containing 1% saponin with mAb DR5 (ebioscience) and with Alexa547 labeled anti-CD4 (BD bioscience). DR5 staining was revealed by a goat anti-mouse IgG-

Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Nucleus was stained using DAPI (Molecular Probes, Paisley, UK). Mounted slides were scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) using a 100x Plan Apo VC piezo objective (NA 1.4) and Chroma bloc filters (ET-DAPI, ET-GFP) and were subsequently deconvoluted with a Meinel algorithm and 8 iterations and analyzed using Metamorph® (MDS Analytical Technologies, Wincobury, UK) and ImageJ64 software (NIH, Bethesda, MD, USA).

DR5 gene sequencing. DNA was extracted from PBMC (QIAamp Blood Kit Qiagen, Hilden, Germany) and the 10 exons of DR5 gene were amplified using eight pairs of primers (Supplemental Table 1) by the KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen ®). Products of PCR were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, US) and then run on an ABI 3730XL DNA capillary-gel sequencer (Applied Biosystems). Sequences products were analyzed using the software Mutation Surveyor (SoftGenetics, adresse). A two directional analysis was performed for all samples. The NCBI Reference Sequence is NM_147187.2 and the Ensembl Transcript: TNFRSF10B-002 (ENST00000347739).

DR5 Cloning. Full length C-terminus Flag-tagged WT DR5 (database sequence NM_003842.4) was obtained by RT-PCR amplification from RNA extracted from primary blood lymphocytes, then cloned by standard molecular biology techniques into the HIV-1 based transfer vector pAIP²⁹. The latter is translated from the same transcript of DR5 from an internal ribosome entry site (IRES). The cloning of DR5 allows for the stable expression of DR5 after lentiviral mediated transduction of recipient cells and Puromycin selection. The P32L DR5 mutation was introduced *de novo* by standard mutagenesis. Both constructs were verified by sequencing.

Stable cell lines. DR5-coding lentiviral vectors were produced by transient calcium phosphate transfection of HEK293T cells with 3 DNA constructs coding: the structural and non-structural proteins of HIV-1 (Gag-Pro-Pol+ accessory proteins); the Vesicular Stomatitis Virus G envelope protein (VSVg), the transfer plasmid coding WT and mutant DR5. As a result of the transfection, viral particles are produced that can be used to stably express the transgene of interest in target cells as a result of integration³⁰. WT

and mutant DR5-coding vectors were produced, normalized by protein content and used to transduce recipient HEK293T cells. Stable cells were selected with Puromycin.

Western blot. Cells were lysed and analyzed by SDS-PAGE using either anti-Flag (SIGMA) or anti-DR5 antibodies (Cell Signaling, Ozyme Technology, Saint-Quentin-en-Yvelines France).

Statistical analysis. Experiments were repeated at least four times. P values (p) were determined using a two-tailed Student's t test or Mann-Whitney. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Unvaried distributions of flow cytometry data were performed by probability binning, in 300 bins using FlowJo software³¹.

Results

Similar TRAIL expression on CD4⁺ T cells in HIC and HD

We studied TRAIL pathway in CD4⁺ T cells from cohort of HIV controllers (HIC), viremic (VIR) patients (Table 1) and healthy donors (HD). Levels of membrane TRAIL expression (mTRAIL) were similar between cells from HD and HIC. Indeed, mTRAIL was expressed by 19% and 22% of freshly purified CD4⁺ T cells from HD and HIC, respectively (Figure 1A). In contrast, number of CD4⁺ T cells expressing TRAIL was higher in VIR (48%) than in HD (P = 0.006) and HIC (P = 0.02).

In vitro exposure to HIV-1 significantly increased the number of CD4⁺ T cells expressing mTRAIL from all groups of patients (Figure 1B). The number of CD4⁺ T cells expressing mTRAIL was multiplied by 2.6 in HD (P = 0.0010), 1.4 in VIR (P = 0.0013) and 3.3 in HIC (P = 0.0005).

We also tested the expression of TRAIL receptors DR4, Decoy R1 and R2 (DcR1 and DcR2). DR4, DcR1 and DcR2 were weakly expressed *in vivo* by CD4⁺ T cells and we did not observe any statistical difference in these TRAIL receptor expression between HD, VIR and HIC. Furthermore, HIV-1 did not statistically upregulated these receptors on CD4⁺ T cell surface (Supplemental Figure 1A and 1B).

We also tested Fas expression by unstimulated and HIV-exposed CD4⁺ T cells from all groups of patients. We discriminated between CD45RO⁺ and CD45RA⁺ CD4⁺ T cells for Fas expression. We found that the vast majority of CD45RO⁺ cells from all groups of patients expressed membrane Fas but it was not statistically upregulated by exposure to HIV-1 (Supplemental Figure 2). In contrast, membrane Fas expression was statistically upregulated by CD45RA⁺ CD4⁺ T cells in HD, VIR and HIC after HIV exposure. Thus, Fas expression was normally regulated by CD4⁺ T cells from HIC.

Ex vivo and *in vitro* expression of membrane DR5 on CD4⁺ T cells from HIC, HD and VIR

We thus examined membrane expression of DR5 (mDR5) that we previously reported to be strongly involved in HIV-1-induced CD4⁺ T cell apoptosis^{4,18}. Purified CD4⁺ T cells from HD and HIC express barely detectable mDR5 (2% and 4%, respectively), in contrast to high mDR5 levels on CD4⁺ T cells from VIR (38%) (Figure 1C). The percentage of DR5 expressing CD4⁺ T cells was statistically higher in VIR than in HD (P = 0.002) and HIC (P = 0.0003).

In vitro exposure to HIV-1 significantly increased the proportion of CD4⁺ T cells expressing mDR5 from HD (7% to 26%, P = 0.001). The number of mDR5 expressing CD4⁺ T cells from VIR was high but was not statistically increased by HIV-1 (37% to 39%, P = 0.7), probably due to the high level of mDR5 expression *in vivo* (Figure 1D). However mDR5 levels on CD4⁺ T cells from VIR, quantified by mean fluorescence intensity (MFI), were significantly increased (32 to 62 MFI, P = 0.004) upon exposure to HIV-1 (Figure 1F). In contrast, the number of mDR5 expressing CD4⁺ T cells (Figure 1D) and mDR5 levels (Figure 1F) from HIC were not statistically increased after *in vitro* exposure to HIV-1 (5% versus 6% of DR5⁺ CD4⁺ T cells and 4 versus 4.5 MFI, respectively). Surprisingly, DR5⁺ CD4⁺ T cells from two HIC, A21 and A24 were more numerous under HIV-1 stimulation than other HIC (19% and 12%, respectively) (Figure 1E). Thus, to determine the reason for the reduced membrane expression of DR5 in HIC CD4⁺ T cells, we investigated whether DR5 mRNA levels were differently expressed by CD4⁺ T cells from HD and HIC. Surprisingly, we observed constitutive DR5 mRNA expression by unstimulated and HIV-1-activated CD4⁺ T cells from HIC similarly to HD (Figure 1G). Thus a defect of mRNA synthesis cannot explain the very low expression of DR5 at the CD4⁺ T cell surface from HIC.

To test whether the lower mDR5 expression by CD4⁺ T cells from HIC was due to a limited T cell response to HIV activation *in vitro*, we measured the expression of the activation marker HLA-DR. *Ex vivo* CD4⁺ T cells from VIR expressed higher levels of HLA-DR than cells from HIC or HD as previously published³² (Supplemental Figure 3A). However, *in vitro* HIV-1 exposure statistically upregulated HLA-DR expression on CD4⁺ T cells from HIC and HD (Supplemental Figure 3B) demonstrating that CD4⁺ T cells responded to HIV-1 activation. The HIV-mediated HLA-DR upregulation by CD4⁺ T cells was not statistically significant in VIR, probably due to high levels of activation observed *in vivo*. Thus, because CD4⁺ T cells from HIC expressed HLA-DR after HIV exposure, the absence of DR5 expression cannot be explained by a lack of response to HIV-1 activation.

We also activated CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC using anti-CD3-CD28 antibodies. CD4⁺ T cells from HD and HIC (A6) expressed high levels of the activation marker CD69 under anti CD3-CD28 stimulation demonstrating a strong response of cells from HIC (Supplemental Figure 3C). We thus tested

membrane DR5 expression by activated CD4⁺ T cells. Anti CD3-C28 and HIV-1 stimulation induced mDR5 expression by CD4⁺ T cells from HD, VIR, and the two HIC patients A21 and A24. In contrast, and similarly to HIV-1 stimulation, anti-CD3-CD28 activation did not statistically induce mDR5 expression by CD4⁺ T cells from HIC (Supplemental Figure 3D). Thus, the lack of mDR5 expression by HIC cannot be due to a lack of T cell activation.

Finally, we tested whether a reduced mDR5 expression *in vivo* could be associated with higher CD4⁺ T cell count. We observed a negative correlation between mDR5 expression *ex vivo* and CD4⁺ T cell count from HIC ($r^2=0.6878$, $p=0.0005$) and VIR ($r^2=0.4535$, $p=0.0083$) patients (Figure 1H). These clinical correlations support that limited mDR5 expression is associated with higher CD4⁺ T cell count.

Apoptosis study of CD4⁺ T cells under HIV-1 stimulation

To determine whether the low membrane expression of DR5 observed in CD4⁺ T cells from HIC could mediate resistance to HIV-1 induced apoptosis, we first silenced DR5 mRNA in CD4⁺ T cells from HD (Figure 2A-B). We tested the efficiency of T cell transfection and obtained 70% of positively transfected cells when using Alexa-488 scrambled RNA (Supplemental Figure 4A). We thus tested the efficiency of DR5 downregulation by DR5 siRNA. 60% ($P = 0.004$) of DR5 protein were downregulated in transfected CD4⁺ T cells (Figure 2A) resulting in a significant resistance to HIV-1-induced apoptosis compared to cells transfected with scrambled RNA (32% to 14%, $P = 0.002$) (Figure 2B and Supplemental Figure 4B). Therefore, we tested HIV-mediated CD4⁺ T cell apoptosis in HD, in A21 patient that express mDR5 on HIV-activated CD4⁺ T cells and in A6 patient showing very low mDR5 expression on CD4⁺ T cells. We used the late marker of apoptosis Topro III to determine cell death. We showed that CD4⁺ T cells from A21 patient were undergoing apoptosis under HIV-1 activation in a similar way than cells from HD. In contrast CD4⁺ T cells from A6 patient did not significantly undergo apoptosis when exposed to HIV-1 (Figure 2C).

Thus, we compared CD4⁺ T cell apoptosis from HD, VIR and HIC that do not express significant DR5 under HIV-1 stimulation (10/12) (Figure 2D). Purified CD4⁺ T cells were cultured with inactivated AT-2

HIV-1 (MN) and tested for apoptosis using Annexin V. HIV-1 induced 31% ($P = 0.003$) and 40% ($P = 0.001$) of Annexin V expression by $CD4^+$ T cells from HD and VIR, respectively. In contrast, basal apoptosis was not statistically increased in $CD4^+$ T cells from HIC after HIV-1 exposure (Figure 2D). Above results suggested that mDR5 expressing cells were undergoing apoptosis after HIV exposure, and that absence of mDR5 is protective from cell death.

Identification of a homozygous substitution DR5^{P32L} in the peptide leader sequence.

Then we performed sequencing of the 10 exons of the DR5 gene localized on chromosome 8p22-21³³ from the 12 HIC patients. We identified a novel homozygous substitution of a cytosine (C) by a thymine (T) (Figure 3A) on exon 1 at position 222 (rs1129424) for 10/12 HIC patients. This homozygous substitution induces a Proline to a Leucine amino acid change at position 32 (that we called P32L) in the leader region of DR5 protein (Figure 3A). Interestingly, the 10 HIC patients who express very low levels of mDR5 (Figure 1D) harbored the homozygous substitution (TT) (Table 2) and the two HIC that expressed significantly mDR5 were either heterozygous (C/T) (A21) or homozygous WT (CC) (A24), indicating that the P32L mutation is recessive. It should be noticed that P32L was not associated with major histocompatibility allele protective haplotypes *HLA-B* 27 or 57 expression^{34,35} (Table 2).

Because of its localization, the P32L punctual mutation could potentially modify the processing of DR5 leader peptide and thus affect the ability of DR5^{P32L} to reach the cell surface. *In silico* prediction of the spatial conformation of the DR5 leader region indicated a reduced flexibility of the DR5^{P32L} leader peptide compared to DR5^{WT}, suggesting a modification in DR5 processing due to abnormal spatial 3 dimensional conformations (Figure 3B).

To obtain functional insight on the presence of the P32L substitution, DR5^{WT} and DR5^{P32L} were cloned in the context of an HIV-1-based lentiviral vector and used to stably transduce DR5 in HEK293T cells (Figure 3C). The DR5 forms were Flag-tagged at their C-terminus not to interfere with the N-terminal processing of DR5. When stably transduced HEK293T cells were analyzed by western-blot, a clear difference in migration was observed for WT and P32L mutant with both anti-DR5 and anti-flag

antibodies (Figure 3D). Indeed, while the DR5^{WT} migrated at a size corresponding to the mature and membrane-bound form of DR5 (around 40 kDa) after the cleavage of the leader peptide, the DR5^{P32L} form migrated around 48 kDa protein, which corresponds to the immature form of DR5, prior to leader peptide processing³³.

We also sequenced DR5 gene of 14 VIR patients. We found that 7 VIR harbored a heterozygous genotype (wild type phenotype), 4 VIR were wild type genotype (WT) and 3 VIR were P32L homozygous (P32L phenotype) (Table 3). Nevertheless, frequency of the homozygous P32L substitution is therefore higher among HIC (10/12) versus VIR (3/14) (Fisher's exact p=0.005). Interestingly, when VIR and HIC are considered together, patients harboring P32L homozygous substitution have significantly higher median CD4⁺ T cell counts (p=0.001) (Figure 3E).

DR5 localisation by 3D microscopy

Finally, to illustrate the consequence of the P32L substitution in DR5 protein at the cellular level, we studied its localization in CD4⁺ T cells using 3D microscopy. Image plane analysis showed that CD4⁺ (red) delineated T cell membrane (Figure 4). We tested DR5 expression (green) in unstimulated and HIV-exposed CD4⁺ T cells from 3 HD (DR5^{WT}), 3 HIC with DR5^{P32L}, and A21 (heterozygous DR5 genotype but WT phenotype) (Figure 4 and Supplemental Figure 5). We detected intracellular localization of DR5^{WT} and DR5^{P32L} in non-activated CD4⁺ T cells from all subjects (Figure 4 line 1, 3 and 5). However, HIV-1 stimulation of CD4⁺ T cells induced a relocalization of DR5^{WT} at the plasma membrane along with CD4⁺ in HD and in A21 (Figure 4 line 2 and 4). In contrast, the DR5^{P32L} did not colocalize with CD4⁺, but was sequestered intracellularly in CD4⁺ T cells from HIC harbouring the P32L mutation (Figure 4 line 6). These results were supported by 3D interactive surface plot (ImageJ) (Figure 5A), which allows a better delimitation of intracellular compartment and cell membrane. Statistical analysis (Figure 5B) was performed counting DR5 expression in 20 unstimulated or HIV-1-exposed CD4⁺ T cells from each HD and HIC previously studied in 3D microscopy. We found that 72% ($\pm 10\%$) of DR5^{WT} was localized in the intracellular compartment and 22% on the membrane of CD4⁺ T cells from HD (P=0.01). In contrast,

HIV-1-exposed CD4⁺ T cells expressed 74% of membrane DR5^{WT} and 10% of intracellular DR5^{WT} (p=0.002). Unstimulated CD4⁺ T cells from HIC^{P32L} expressed 83% of intracellular DR5^{P32L} and 9% of membrane DR5^{P32L}. In contrast to CD4⁺ T cells from HD, exposure to HIV did not induce significant DR5^{P32L} relocalization from cytoplasm to membrane, confirming our flow cytometry data (Figure 1C-F).

Discussion

Among the different mechanisms potentially involved in CD4⁺ T cell depletion, TRAIL/DR5 pathway may participate to death of infected but also HIV-exposed uninfected CD4⁺ T cells^{4,19,20,36}. Thus, we studied TRAIL apoptotic pathway in an HIV controller cohort that harbor reduced CD4⁺ T cell depletion. HIC patients did not exhibit any impairment of TRAIL profile expression in accordance with the nonprogressor simian model³⁷, and *ex vivo* CD4⁺ T cells from HIC did not express significant membrane DR5 (mDR5). This observation could not be due only to the absence of viral particles in HIC patients, because *in vitro* HIV-1 stimulation did not statistically upregulate mDR5 on CD4⁺ T cells from 10/12 HIC in contrast to cells from HD. Interestingly, an inverse correlation between CD4⁺ T cells mDR5 expression and CD4⁺ T cell count was found in both VIR and HIC suggesting that a reduced mDR5 expression could be associated with a control of CD4 count. This hypothesis was supported by DR5 siRNA experiments, which showed that the massive reduction of DR5 expression at the cell membrane dramatically reduced HIV-1-induced apoptosis of CD4⁺ T cells.

Our data indicate that HIV-mediated apoptosis *in vitro* is strongly reduced in CD4⁺ T cells from the 10/12 HIC patients that harbored very low mDR5. In our system, we measured apoptosis of uninfected CD4⁺ T cell cultured with inactivated AT-2 HIV-1. Our data are consistent with better persistence of CD4⁺ T cells in HIC as already described. Indeed, one study found that memory CD4⁺ T cells persisted longer in HIC than in VIR through FOXO3a-mediated pathway³⁸. A recent study showed that infected CD4⁺ T cells died faster than uninfected CD4⁺ T cells from HIC, HD and VIR after 6 days post infection²⁷. However, in the same study uninfected CD4⁺ T cells from HIC died slower than cells from VIR in accordance with our data from Figure 2D. Nevertheless, in our study we focused on early apoptosis of uninfected CD4⁺ T cells

that is partially dependent of TRAIL pathway. Indeed, it has been showed that release of TRAIL during the onset of plasma viremia in HIV-1 transmission may initiate or amplify early HIV-1-induced cell death¹⁰.

RT-PCR experiments showed that the reduced mDR5 expression was not due to a defect of mRNA synthesis. Thus, we hypothesized that a mutation in DR5 gene could lead to an abnormal protein with limited access to the membrane. DR5 gene sequencing in cells from HIC led to the identification of a homozygous substitution (C→T) at position 222 of *DR5*. This DR5 genotype (TT) is not referenced in GenBank, although high polymorphisms (CC) or (CT) had been reported (rs1129424). In our study, the (TT) genotype was detected in 10/12 HIC and only in 3/14 VIR, indicating a clear overrepresentation of the (TT) genotype in HIC. Furthermore, this genomic substitution changed a Proline into a Leucine (P32L) in the leader region of the protein. This change leads to the synthesis of a heavier molecule, which could be due to the lack of removal of the leader peptide. Thus, this mutation could result to the sequestration of DR5 in the intracellular compartment of activated CD4⁺ T cells and lead to lower membrane expression. Indeed, a low mDR5 expression was found only in cells from HIC patients harboring the P32L homozygous substitution (10/12).

Thus, we performed 3D microscopic analysis of CD4⁺ T cells to better characterize the consequence of P32L homozygous substitution. We found intracellular stockade of DR5 protein in non-activated CD4⁺ T cells irrespectively of the presence of P32L. We subsequently demonstrated that DR5^{WT} was translocated to the membrane in CD4⁺ T cells upon HIV-1 exposure, in contrast to DR5^{P32L}, which remained in intracellular compartment. Intracellular sequestration of DR5 was only observed in patients harboring homozygous P32L. Patients who harbored the heterozygous genotype showed membrane DR5 expression on HIV-1-activated CD4⁺ T cells demonstrating that P32L substitution is recessive.

We showed that DR5^{P32L} substitution is statistically over-represented in HIC compared to VIR. However, 3/14 VIR patients harbored DR5^{P32L} but also exhibited high CD4⁺ T cell counts. This means that this new substitution is not specific but is over-represented in HIC patients as it has been shown for HLA B57 phenotype^{39,40}. Above data suggest that harboring the DR5^{P32L} homozygous phenotype, as HLA B57²³ or

the CCR5 Delta 32 mutation ^{41,42}, could be one of the marker of the HIV controller phenotype. This hypothesis is supported by the negative correlation between mDR5 expression and CD4⁺ T cell count in HIC but also in VIR described in this study. Thus, the presence of DR5^{P32L} may be associated with preserved CD4⁺ T cells *in vivo* and good prognosis. In accordance to these findings, our previous clinical study showed that successful HAART decreased DR5 expression on circulating CD4⁺ T cells concomitantly with increased CD4⁺ count and clinical benefit ⁴³.

Nevertheless, we also found that 2 HIC patients (A21 and A24) did not harbor DR5^{P32L} homozygous substitution and expressed membrane DR5 on CD4⁺ T cells under HIV-1 exposure. This confirms the heterogeneity among HIV controller population (related to different causal mechanisms) as it has been previously described ^{35,44,45,46}.

Interestingly, the DR5^{P32L} phenotype does not appear to have deleterious consequences in the normal physiology of the immune system. This might be explained by the fact that TRAIL can signal through DR4 ^{47,48}. The presence of the DR5^{P32L} homozygous substitution could provide an advantage only in HIV-1 context by reducing TRAIL-mediated apoptosis.

Thus the presence of DR5^{P32L} phenotype could contribute to the limited CD4⁺ T cell depletion in HIC allowing the development and persistence of HIV-specific CD4⁺ T cells ³². A potent HIV specific CD4⁺ T cell response may help to maintain a strong protective HIV specific CTL response, which has been involved in the HIC phenotype ^{24,25}. Larger studies involving different HIV cohorts should be designed to support this hypothesis. Therefore, DR5^{P32L} detection in HIV-infected patients could provide a new biological prognostic marker.

REFERENCES

1. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3:673-682.
2. Herbeuval JP, Lambert C, Sabido O, et al. Macrophages From Cancer Patients: Analysis of TRAIL, TRAIL Receptors, and Colon Tumor Cell Apoptosis. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:611-621.
3. Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*. 1997;17:141-143.
4. Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, et al. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005;106:3524-3531.
5. Jeremias I, Herr I, Boehler T, Debatin KM. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*. 1998;28:143-152.
6. Lichtner M, Maranon C, Vidalain PO, et al. HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:175-182.
7. Miura Y, Koyanagi Y, Mizusawa H. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy. *J Med Dent Sci*. 2003;50:17-25.
8. Miura Y, Misawa N, Maeda N, et al. Critical Contribution of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) to Apoptosis of Human CD4(+) T Cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID Mice. *J Exp Med*. 2001;193:651-660.
9. Ryan LA, Peng H, Erichsen DA, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates human neuronal apoptosis: links to HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmunol*. 2004;148:127-139.
10. Gasper-Smith N, Crossman DM, Whitesides JF, et al. Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J Virol*. 2008;82:7700-7710.
11. Balestrieri E, Grelli S, Matteucci C, et al. Apoptosis-associated gene expression in HIV-infected patients in response to successful antiretroviral therapy. *J Med Virol*. 2007;79:111-117.
12. Babu CK, Suwansrinon K, Bren GD, Badley AD, Rizza SA. HIV induces TRAIL sensitivity in hepatocytes. *PLoS One*. 2009;4:e4623.
13. Miura Y, Misawa N, Kawano Y, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2777-2782.
14. Huang Y, Erdmann N, Peng H, et al. TRAIL-mediated apoptosis in HIV-1-infected macrophages is dependent on the inhibition of Akt-1 phosphorylation. *J Immunol*. 2006;177:2304-2313.
15. Zhu DM, Shi J, Liu S, Liu Y, Zheng D. HIV infection enhances TRAIL-induced cell death in macrophage by down-regulating decoy receptor expression and generation of reactive oxygen species. *PLoS One*;6:e18291.
16. Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, et al. HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathog*;7:e1002087.
17. Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, et al. CD4+ T cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type I interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005.
18. Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13974-13979.

19. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, Herbeuval JP. 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 U S A*. 2007;104:17453-17458.
20. Strydom G, Klein I, Kohlhofer S, et al. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood*. 2009;114:3854-3863.
21. O'Shea S, Rostron T, Hamblin AS, Palmer SJ, Banatvala JE. Quantitation of HIV: correlation with clinical, virological, and immunological status. *J Med Virol*. 1991;35:65-69.
22. Venet A, Lu W, Beldjord K, Andrieu JM. Correlation between CD4 cell counts and cellular and plasma viral load in HIV-1-seropositive individuals. *Aids*. 1991;5:283-288.
23. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007;27:406-416.
24. Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol*. 2007;28:532-540.
25. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol*. 2002;3:1061-1068.
26. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis*. 2009;200:1714-1723.
27. O'Connell KA, Rabi SA, Siliciano RF, Blankson JN. CD4+ T cells from elite suppressors are more susceptible to HIV-1 but produce fewer virions than cells from chronic progressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:E689-698.
28. Goujard C, Chaix ML, Lambotte O, et al. Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is "HIV controller" status established? *Clin Infect Dis*. 2009;49:982-986.
29. Neagu MR, Ziegler P, Pertel T, et al. Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components. *J Clin Invest*. 2009;119:3035-3047.
30. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11382-11388.
31. Roederer M, Treister A, Moore W, Herzenberg LA. Probability binning comparison: a metric for quantitating univariate distribution differences. *Cytometry*. 2001;45:37-46.
32. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol*. 2007;81:13904-13915.
33. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J*. 1997;16:5386-5397.
34. Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*;330:1551-1557.
35. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008;197:563-571.
36. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*. 2005;105:2458-2464.
37. Kim N, Dabrowska A, Jenner RG, Aldovini A. Human and simian immunodeficiency virus-mediated upregulation of the apoptotic factor TRAIL occurs in antigen-presenting cells from AIDS-susceptible but not from AIDS-resistant species. *J Virol*. 2007;81:7584-7597.
38. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med*. 2008;14:266-274.

39. Miura T. HLA-B57/B*5801 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Controllers Select for Rare Gag Variants Associated with Reduced Viral Replication Capacity and Strong Cytotoxic T-Lymphocyte Recognition. *Journal of Virology*. 2009;83(6): 2743–2755.
40. Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*. 2010;330:1551-1557.
41. Wang B, Palasanthiran P, Zeigler J, Cunningham A, Saksena NK. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet*. 1997;350:742.
42. Smith MW, Dean M, Carrington M, Huttley GA, O'Brien SJ. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet*. 1997;350:741; author reply 742.
43. Herbeval JP, Nilsson J, Boasso A, et al. HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Aids*. 2009;23:35-40.
44. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *Aids*. 2009;23:897-906.
45. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29:1009-1021.
46. Saez-Cirion A, Sinet M, Shin SY, et al. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol*. 2009;182:7828-7837.
47. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*. 1997;7:821-830.
48. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277:818-821.

Acknowledgments We thank the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) and Sidaction for its financial support. The authors greatly acknowledge the Nikon Imaging Centre@curie.fr (Institut Curie-CNRS (<http://nimce.curie.fr>), Paris, France) and the PICT-IBiSA Imaging Facility (<http://pict-ibisa.curie.fr>). We greatly appreciate the help of Dr. J. D. Lifson and Julian Bess (SAIC-NCI, Frederick, MD) for providing HIV-1_{MN} particles. The authors thank Dr. Laurence Meyer, Aurélie Lamine, Pr. Daniel Séréni, Dr. Caroline Lascoux, Dr. Olivier Taulera, Jeannine Delgado, Pr. François Bricaire, Michèle Pauchard, Marie-Thérèse Rannou, Dr. David Zucman, Nadège Velazquez, all the other physicians, nurses, and patients.

Author contributions L.B., S.D. and C.G. performed and analyzed research. J.P.H designed and analyzed research, JPF and OL wrote the paper. A.C. provided new technologies. A.V., O.L., M.S. and J.F.D. provided patient samples. The authors declare no conflict of interest.

Figure Legends

Figure 1. Membrane TRAIL and DR5 expression by CD4⁺ T cells. (A) Percentage of mTRAIL expressing CD4⁺ T cells purified from HD, VIR and HIC. (B) Fold increase index analysis of mTRAIL expression by CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC after overnight HIV-1 exposure. P values (*p*) were determined using Mann-Whitney. (C) Percentage of CD4⁺ T cells from HD (n=15), VIR (n=11) and HIC (n=12) expressing mDR5. Irrelevant isotype antibody was used as control. (D) Flow cytometry analysis of HIV-1-activated CD4⁺ T cells (grey) from HD (n=15), VIR (n=11) and HIC (n=12) expressing mDR5 compared to unstimulated conditions (white). (E) Analysis of HIV-1-induced mDR5 expression by CD4⁺ T cells from HIC. Number of DR5⁺ CD4⁺ T cells from two HIC patients A21 and A24 are higher. (F) mDR5 level (MFI) on CD4⁺ T cells cultured in absence (white) or presence (grey) of HIV-1. (G) DR5 mRNA expression by CD4⁺ T cells from HD and HIC patients in absence or presence of HIV-1 analyzed by RT-PCR. (H) Correlation between CD4⁺ counts and membrane DR5 expression by CD4⁺ T cells was calculated in HIC (green) and VIR (red) patients separately. P values (*p*) were determined using Mann-Whitney.

Figure 2. Silencing DR5 RNA and apoptosis in CD4⁺ T cells. (A) Overnight transfection with DR5 siRNA significantly inhibited DR5 expression by HIV-1-stimulated CD4⁺ T cells in contrast to scrambled (Scr) siRNA. (B) Inhibition of DR5 expression at the surface of HIV-1-stimulated CD4⁺ T cells using DR5 siRNA dramatically inhibited apoptosis (Annexin-V) mediated by HIV-1 compared to Scr siRNA. Experiments A and B were repeated 3 times. P values (*p*) were determined using Mann-Whitney. (C) Dot-plot analysis of DR5/Topro III expression by CD4⁺ T cells from unstimulated and HIV-1 exposed CD4⁺ T cells from HD, A6 and A21 HIC patients. (D) Annexin-V staining of CD4⁺ T cells from HD (n=15) and VIR (n=11) exposed to HIV-1 were undergoing apoptosis in contrast to CD4⁺ T cells from HIC (n=12). P values (*p*) were determined using two-tailed Student's *t* test (NS: not significant; *p*<0.05 was considered statistically significant).

Figure 3. DR5 gene sequencing of HIC patients. (A) The 10 exons of DR5 were sequenced in 12 HIC patients from PBMC. Homozygous substitution of a cytosine into a thymine was found in exon 1 position 222 (rs1129424). This mutation changes a Proline into a Leucine at position 32 in the DR5 leader. (B) DR5^{WT} and DR5^{P32L} chain flexibility of leader region. P32L substitution induces a reduced chain flexibility compared to WT. (C) Full length C-terminus Flag-tagged WT and P32L DR5 were cloned into the vector pAIP and were used to stably transduce HEK293T cells selected by puromycin. (D) Western blot analysis of DR5^{WT} and DR5^{P32L} using anti-Flag or anti-DR5 antibody. (E) Statistical analysis of CD4⁺ counts in DR5 P32L homozygous patients compared to heterozygous or wild type genotype patients. HIC and VIR are not discriminated.

Figure 4. 3D microscopy analysis of DR5. 3D microscopic analysis of CD4⁺ T cells harboring WT or P32L DR5 forms cultured in absence or presence of HIV-1. Cells were stained using CD4⁺ (red, column 1), DR5 antibodies (green, column 2) and DAPI (blue, column 3). Column 4 and Zoom represents the overlay of the different stainings. Under HIV-1 stimulation, DR5^{WT} is exported to membrane where it colocalized with CD4⁺ (yellow, line 2 and 4). In contrast, DR5^{P32L} is sequestered in the intracellular compartment (line 6).

Figure 5. Quantification and DR5 localisation in CD4⁺ T cells. (A) 3D interactive surface plot analysis of microscopic images of CD4⁺ T cells cultured in absence or presence of AT-2 HIV-1. CD4 (red), DR5 (green) and DAPI (blue) stainings are merged. This 3D representation allowed a clear discrimination between membrane and intracellular cell compartments. Unstimulated CD4⁺ T cells expressed intracellular DR5 (HD) that is relocalized to membrane where it colocalized with CD4⁺ after HIV-1 exposure. DR5^{P32L} is not significantly expressed on cell membrane after HIV-1 exposure of CD4⁺ T cells from HIC. (B) 3D quantification: 3D interactive surface plot representations were used to enhance the observation and avoid false positive of intracellular DR5 (Intra) localization or its relocalization to the

membrane (Mb). Expression of membrane or intracellular DR5 expression was quantified in 20 cells per condition: (HD (n=3), HIC (n=3), HD+HIV (n=3) and HIC+HIV (n=3)) . P values (p) were determined using Mann-Whitney (**B**) and two-tailed Student's t test. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$ and *** indicated $p < 0.001$.

Table 1: Characteristics of the patients studied

	HIV Controllers N=12	Viremic patients N=14
Male	8	5
Median age	46	40
Median year of HIV diagnosed	1988	2006
Median CD4 ⁺ T cell count (/mm ³)	748	384
Median years of viral follow-up	11	1.5
Median RNA viral load (copies/mL)	<50	86156

Table 2: Study of DR5 genotype in HIC

Controllers	Mutation (P32L)	Median CD4⁺ count [first-last] (cells/ml)	HLA-B 57 / 27
A1	Homozygous P32L	1035 [960-912]	+ / +
A2	Homozygous P32L	709 [599-696]	+ / -
A3	Homozygous P32L	819 [788-920]	+ / -
A4	Homozygous P32L	597 [583-797]	- / +
A6	Homozygous P32L	667 [696-559]	+ / +
A7	Homozygous P32L	613 [601-408]	+ / -
A5	Homozygous P32L	769 [964-918]	+ / -
A13	Homozygous P32L	727 [653-828]	- / -
A18	Homozygous P32L	896 [665-877]	+ / -
A21	Heterozygous	504 [390-556]	+ / -
A24	WT	654 [654-634]	+ / -
A25	Homozygous P32L	861 [731-844]	+ / -

Table 3: Study of DR5 genotype in VIR

Viremic	Mutation (P32L)	Median CD4+ count [first-last] (cells/ml)
VIR 1	Heterozygous	573 [540-362]
VIR 2	Heterozygous	427 [620-234]
VIR 3	Heterozygous	789 [789-578]
VIR 4	Homozygous P32L	522 [558-486]
VIR 5	WT	500 [819-244]
VIR 6	WT	360 [613-224]
VIR 7	Heterozygous	400 [800-600]
VIR 8	Heterozygous	670 [502-347]
VIR 9	Heterozygous	821 [813-402]
VIR 10	Heterozygous	519 [467-386]
VIR 11	WT	473 [585-340]
VIR 12	Homozygous P32L	637 [696-318]
VIR 13	Homozygous P32L	1396 [1316-1387]
VIR 14	WT	320 [430-220]

Figure 1

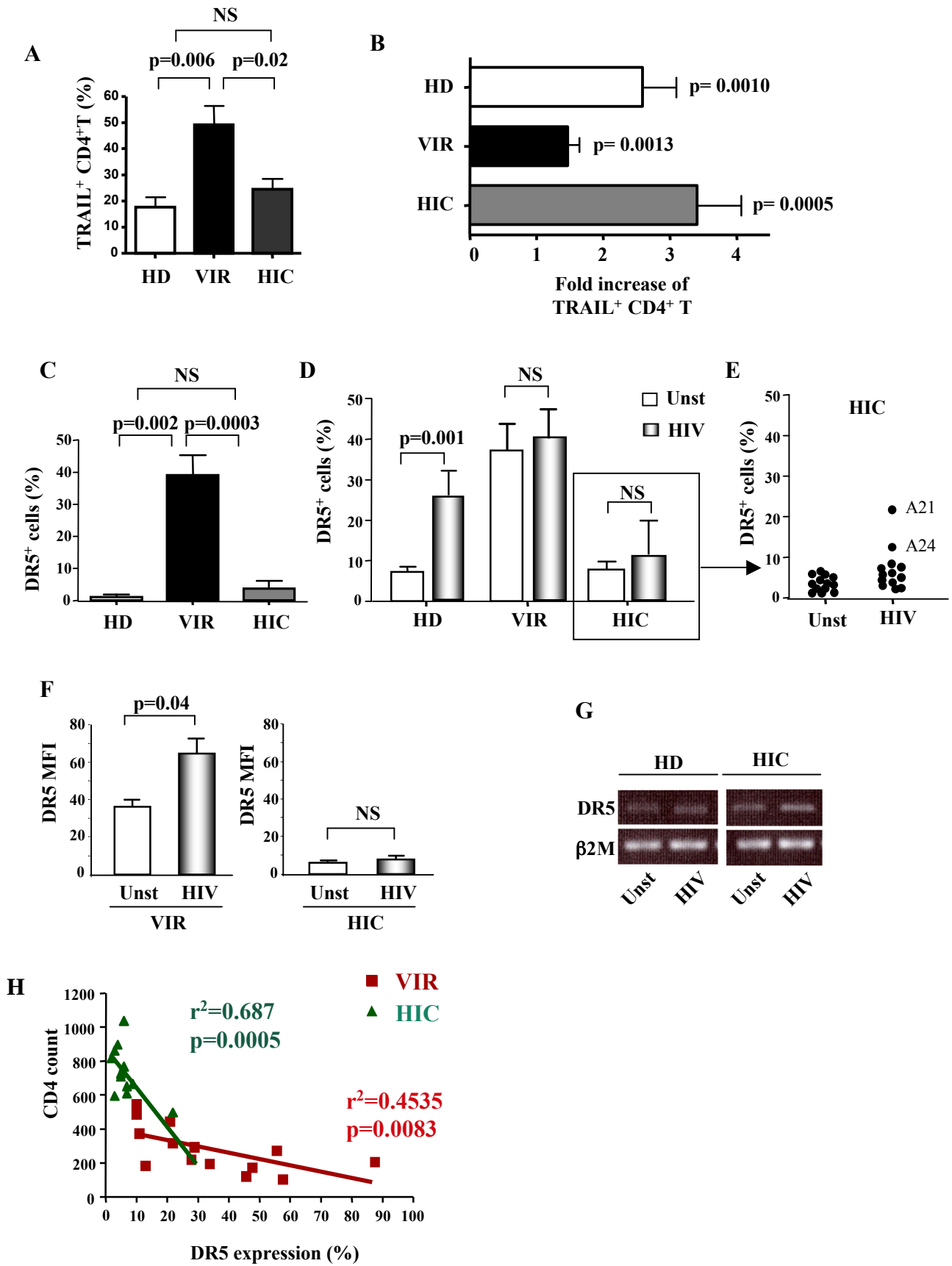


Figure 2

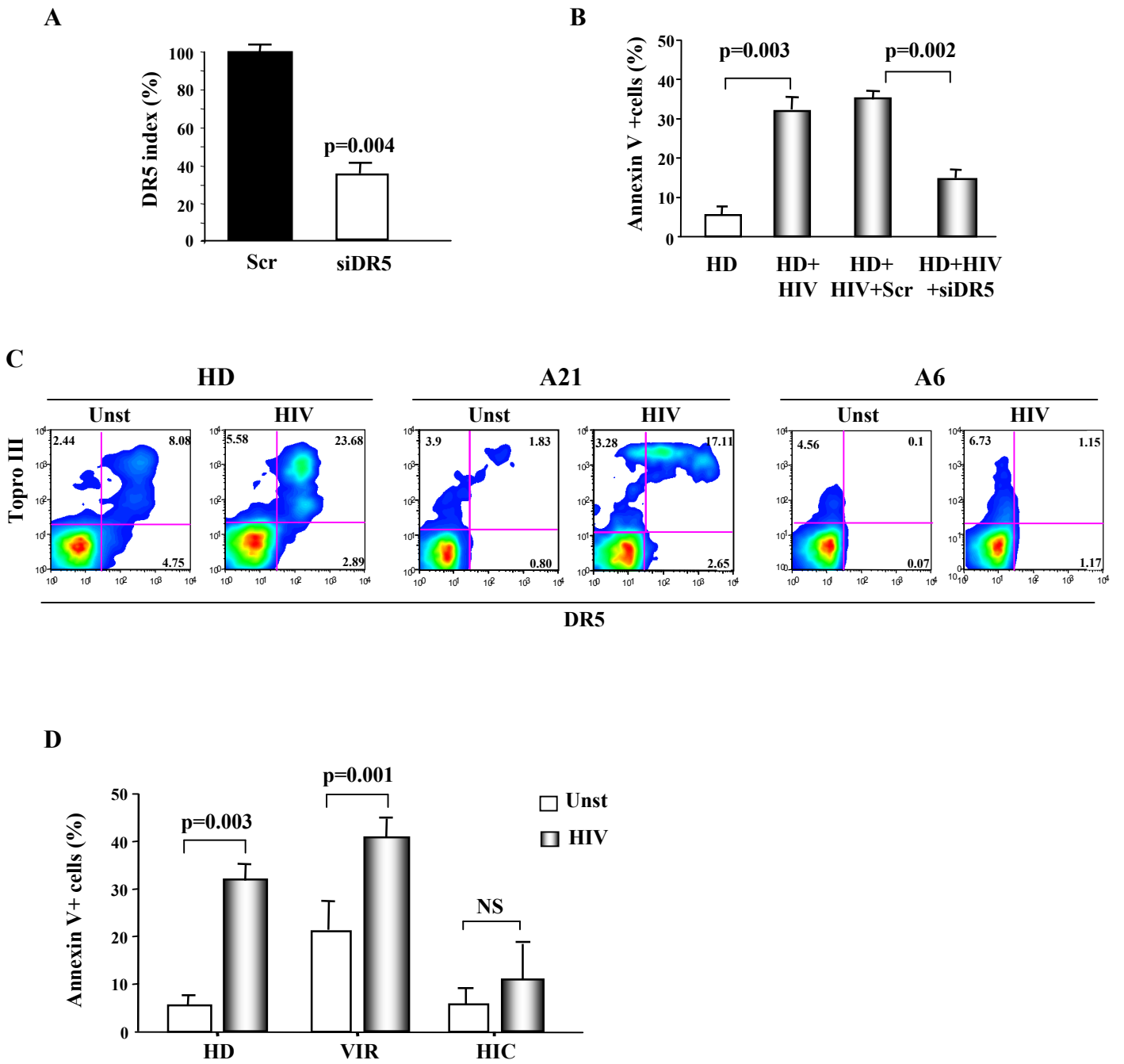


Figure 3

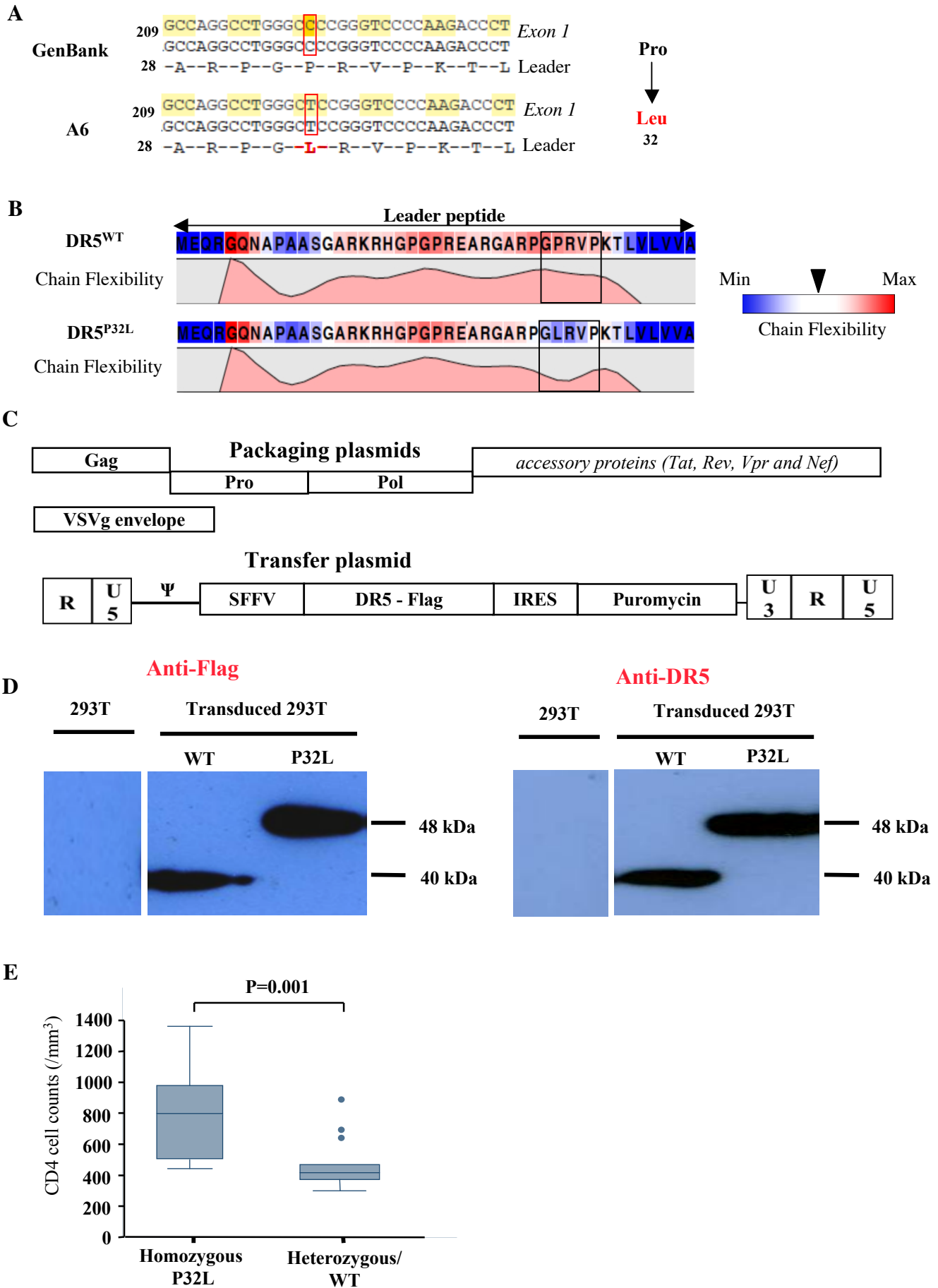


Figure 4

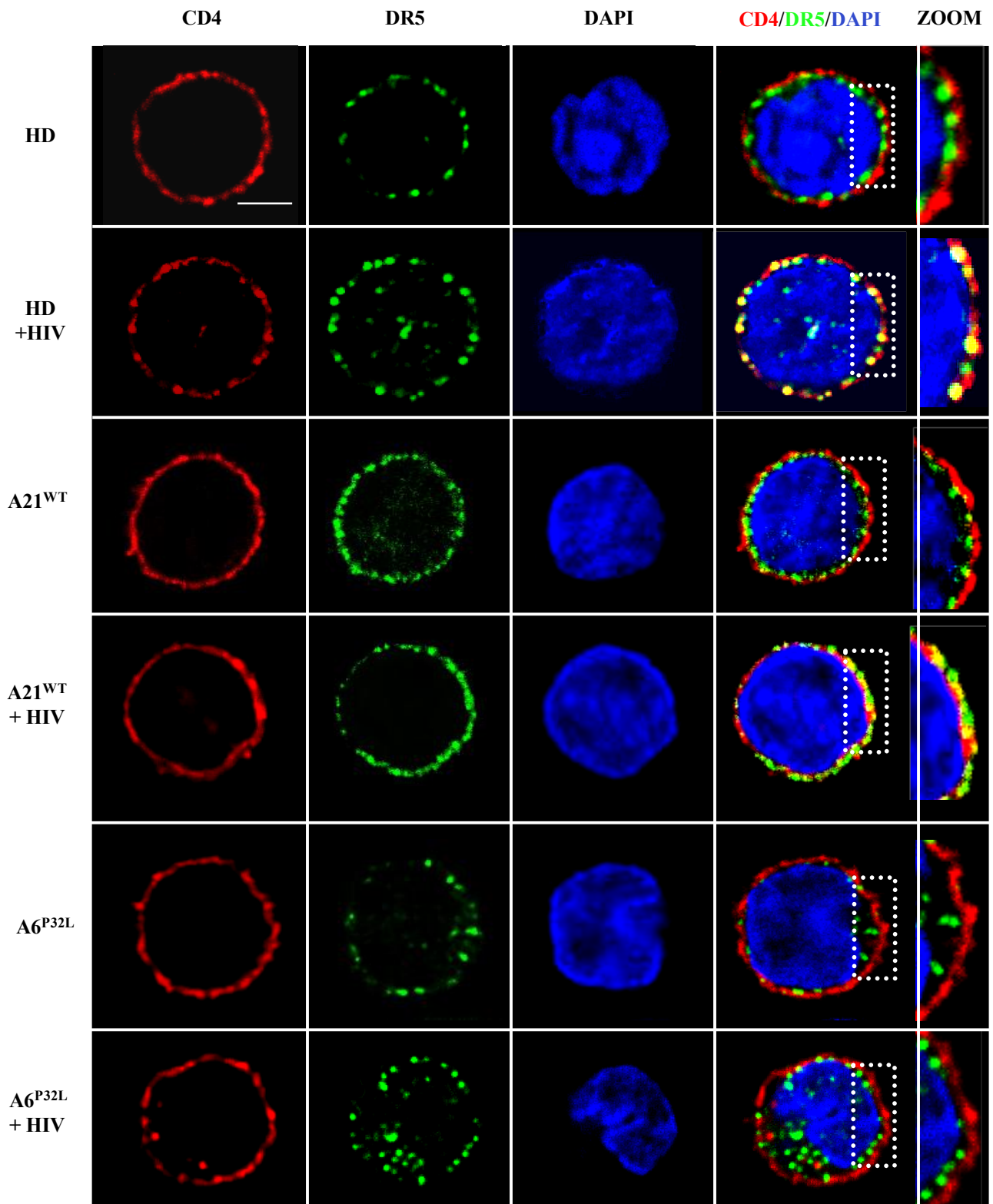
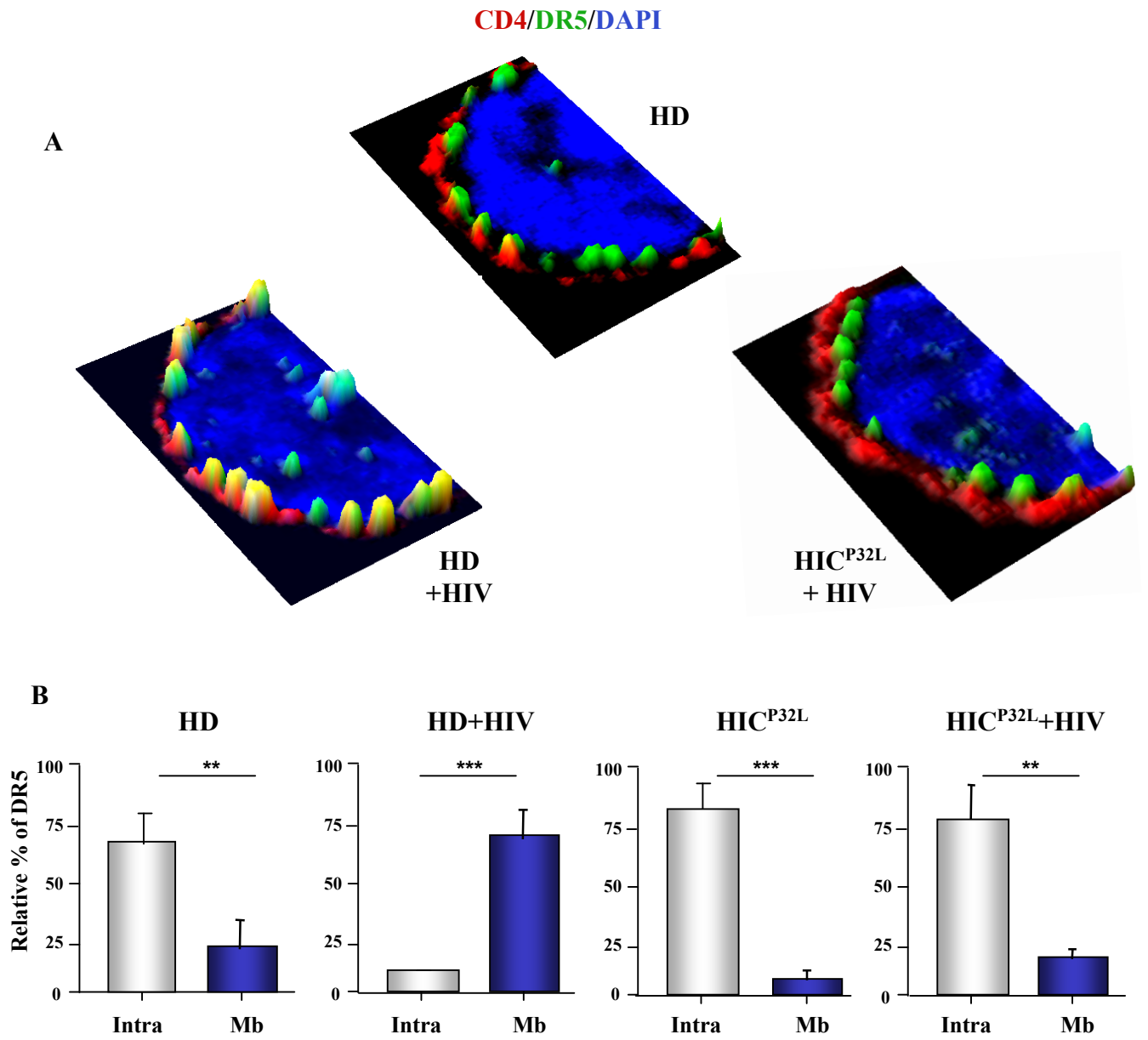


Figure 5



Supplemental legends

Supplemental Figure 1. TRAIL receptor characterization (A) TRAIL receptors DcR1, DcR2 and DR4 *ex vivo* expression by freshly isolated CD4⁺ T cells from HD (n=15), VIR (n=11) and HIC (n=12). (B) DcR1, DcR2 and DR4 membrane expressions were analyzed on unstimulated (Unst) and HIV-1 exposed CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC individuals. P values were determined using a Mann-Whitney (A) and two-tailed Student's *t* test (B). None of the data were statistically significant.

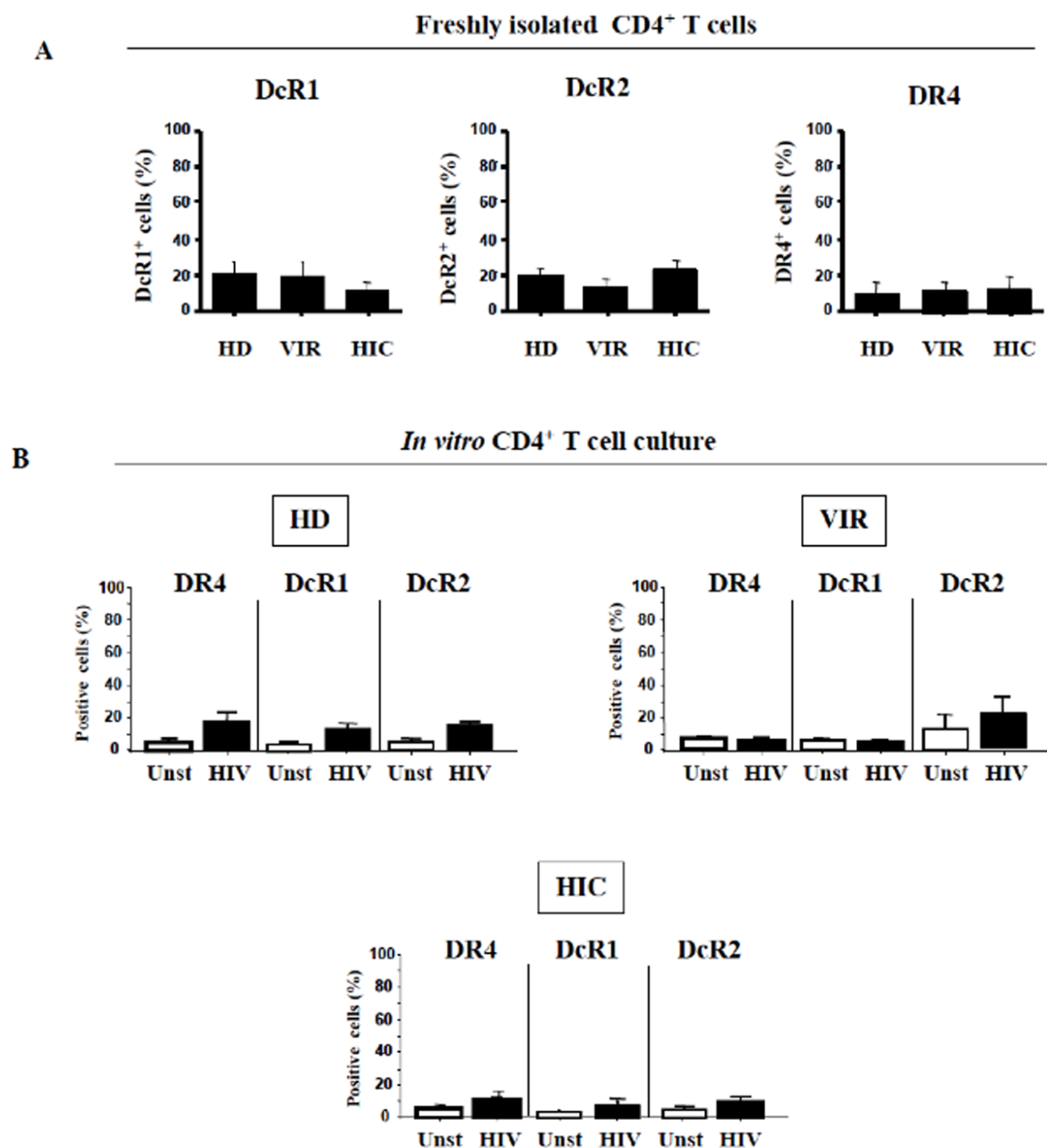
Supplemental Figure 2. Fas expression by CD4⁺ T cells. Flow cytometry analysis of membrane Fas expression was analyzed on unstimulated (Unst) and HIV-1 exposed CD45R0⁺ or CD45RA⁺ CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC individuals. P values were determined using a Mann-Whitney (A) and two-tailed Student's *t* test.

Supplemental Figure 3. CD4⁺ T cell activation (A) Flow cytometry analysis of HLA-DR expression by freshly purified CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC. (B) HLA-DR expression by unstimulated (Unst), or HIV-activated CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC patients. (C) Anti CD3-CD28 activation of CD4⁺ T cells. Activation was tested using the activation marker CD69. The vast majority of CD4⁺ T cells from HD and HIC expressed CD69 under anti CD3-CD28 activation. (D). Flow cytometry analysis of mDR5 expression by purified CD4⁺ T cells from HD, VIR, a representative HIC (A6) compared to A21 and A24 patients. CD4⁺ T cells from A21 and A24 were expressing surface DR5 when stimulated with HIV or anti-CD3-CD28 contrasting with A6.

Supplemental Figure 4. DR5 expression and CD4⁺ T cell apoptosis (A) siRNA transfection of CD4⁺ T cells. Freshly purified CD4⁺ T cells were transfected with unlabelled or Alexa-488 scramble siRNA. Dot plots show transfection efficiency (left panels) of CD4⁺ T cells (70%) by live cells (right panel). (B) Dot plots show apoptosis revealed by Annexin-V staining of DR5 expressing CD4 T cells. HIV-1 induced both DR5 expression and apoptosis of CD4⁺ T cells from scrambled transfected cells (30%). Inhibition of DR5 expression at the surface of HIV-1-stimulated CD4⁺ T cells using DR5 siRNA dramatically inhibited apoptosis (12%) mediated by HIV-1.

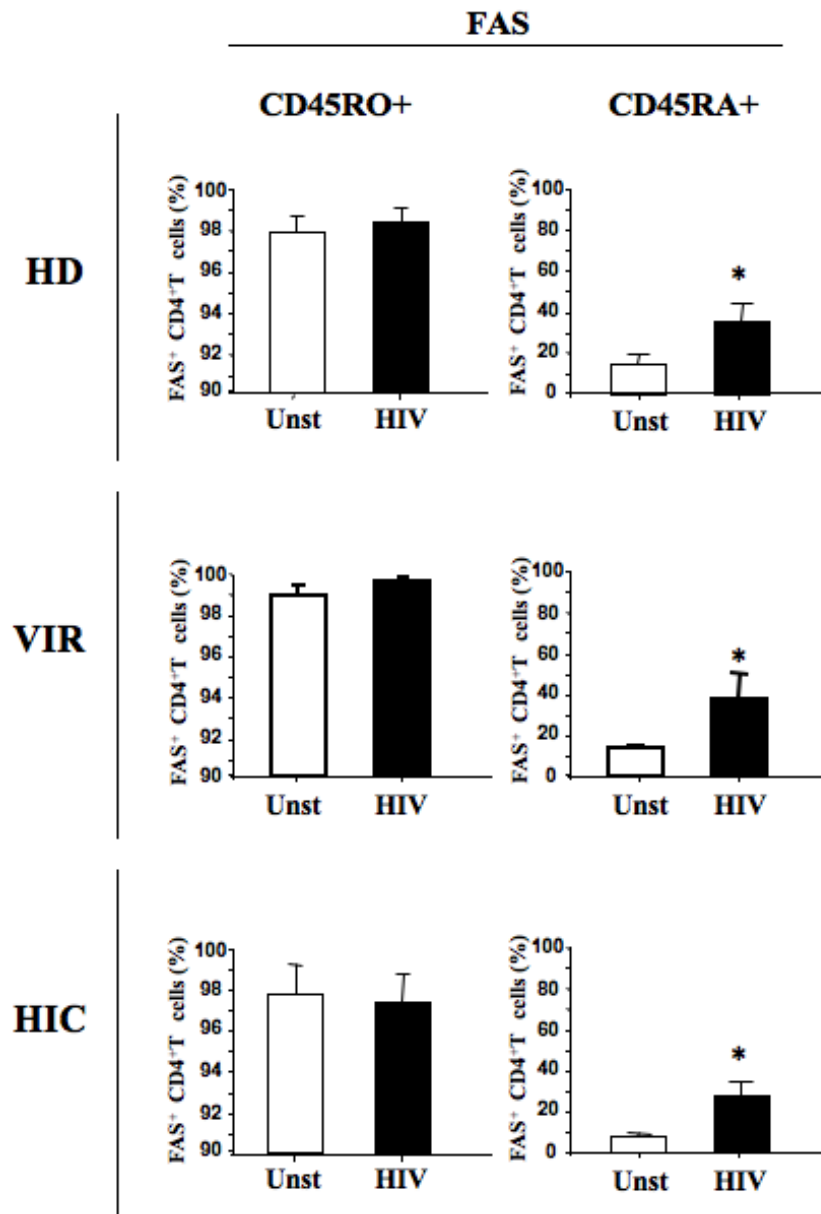
Supplemental Figure 5. DR5 study by 3D microscopy. 3D microscopic overlays of CD4 (red), DR5 (green), DAPI (blue) of CD4⁺ T cells from HD, A4, A6 and A25 individuals cultured with HIV-1. Under HIV-1 stimulation, DR5^{WT} from HD is exported to membrane where it colocalized with CD4. In contrast, DR5^{P32L} from A4, A6 and A25 is sequestered in intracellular compartment.

Supplemental Figure 1



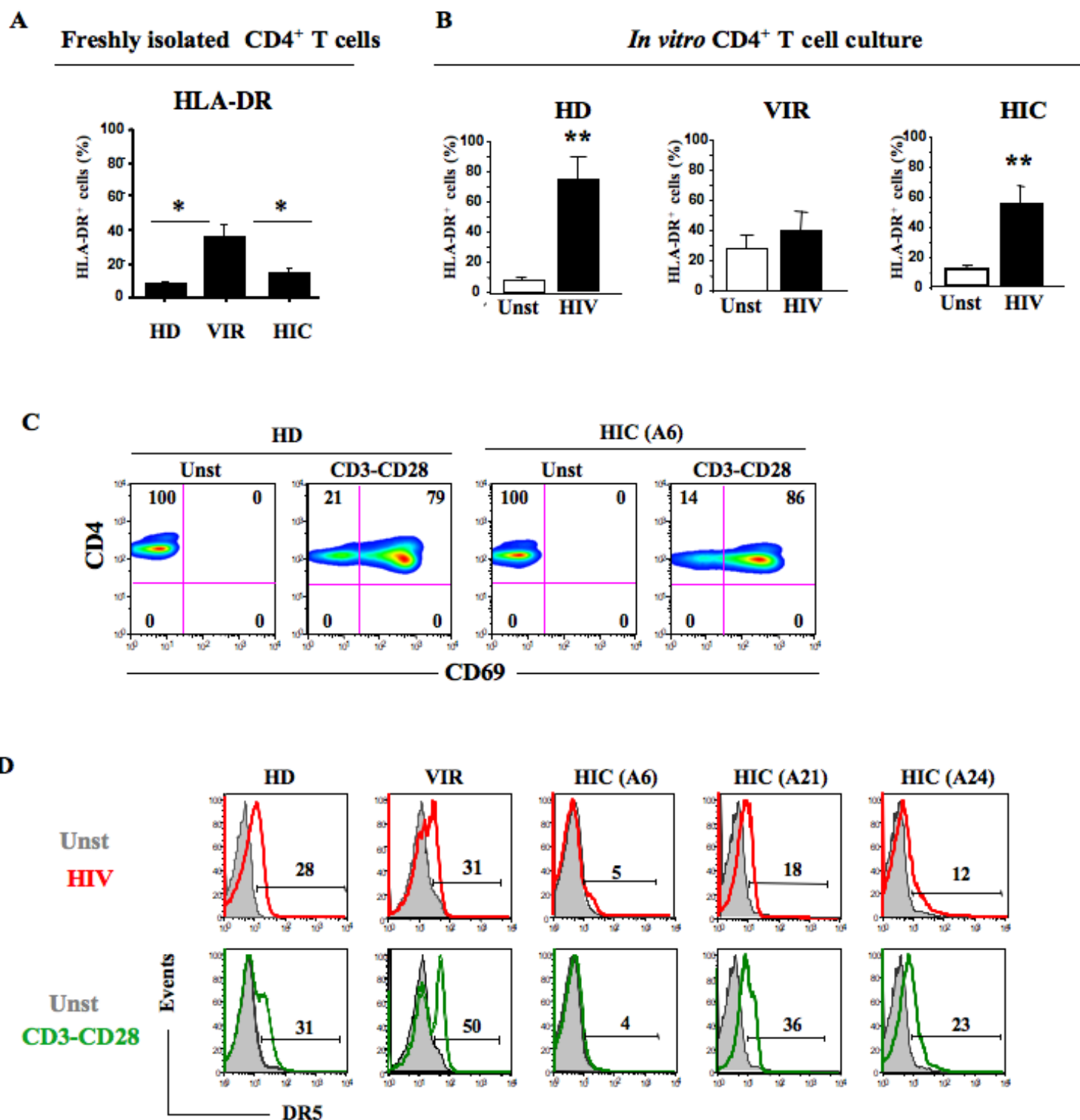
Supplemental Figure 1. TRAIL receptor characterization (A) TRAIL receptors DcR1, DcR2 and DR4 *ex vivo* expression by freshly isolated CD4⁺ T cells from HD (n=15), VIR (n=11) and HIC (n=12). (B) DcR1, DcR2 and DR4 membrane expressions were analyzed on unstimulated (Unst) and HIV-1 exposed CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC individuals. P values were determined using a Mann-Whitney (A) and two-tailed Student's *t* test (B). None of the data were statistically significant.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. Fas expression by CD4⁺ T cells. Flow cytometry analysis of membrane Fas expression was analyzed on unstimulated (Unst) and HIV-1 exposed CD45RO⁺ or CD45RA⁺ CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC individuals. P values were determined using a Mann-Whitney (A) and two-tailed Student's *t* test.

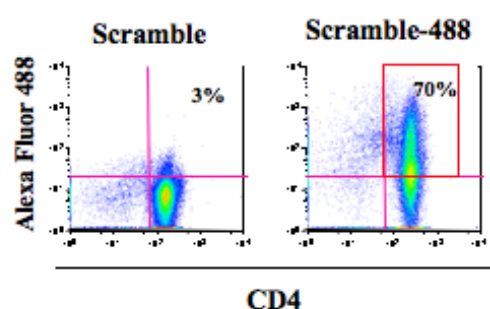
Supplemental 3



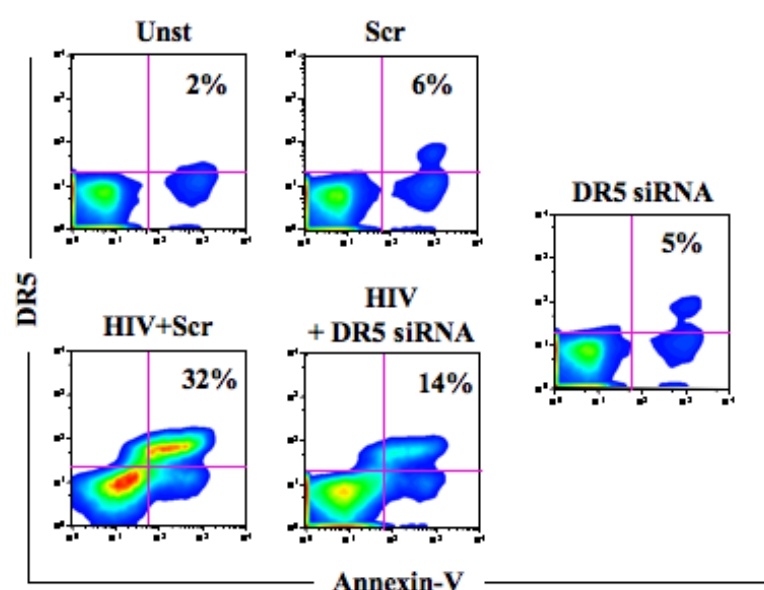
Supplemental Figure 3. CD4⁺ T cell activation (A) Flow cytometry analysis of HLA-DR expression by freshly purified CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC. (B) HLA-DR expression by unstimulated (Unst), or HIV-activated CD4⁺ T cells from HD, VIR and HIC patients. (C) Anti CD3-CD28 activation of CD4⁺ T cells. Activation was tested using the activation marker CD69. The vast majority of CD4⁺ T cells from HD and HIC expressed CD69 under anti CD3-CD28 activation. (D). Flow cytometry analysis of mDR5 expression by purified CD4⁺ T cells from HD, VIR, a representative HIC (A6) compared to A21 and A24 patients. CD4⁺ T cells from A21 and A24 were expressing surface DR5 when stimulated with HIV or anti-CD3-CD28 contrasting with A6.

Supplemental Figure 4

A



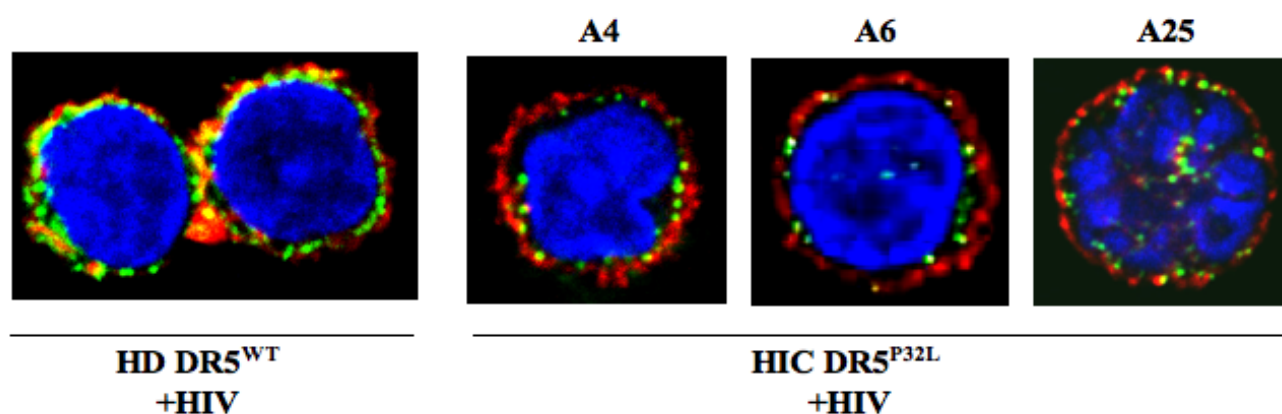
B



Supplemental Figure 4. DR5 expression and CD4⁺ T cell apoptosis (A) siRNA transfection of CD4⁺ T cells. Freshly purified CD4⁺ T cells were transfected with unlabelled or Alexa-488 scramble siRNA. Dot plots show transfection efficiency (left panels) of CD4⁺ T cells (70%) by live cells (right panel). (B) Dot plots show apoptosis revealed by Annexin-V staining of DR5 expressing CD4 T cells. HIV-1 induced both DR5 expression and apoptosis of CD4⁺ T cells from scrambled transfected cells (30%). Inhibition of DR5 expression at the surface of HIV-1-stimulated CD4⁺ T cells using DR5 siRNA dramatically inhibited apoptosis (12%) mediated by HIV-1.

Supplemental Figure 5

CD4/DR5/DAPI



Supplemental Figure 5. DR5 study by 3D microscopy. 3D microscopic overlays of CD4 (red), DR5 (green), DAPI (blue) of CD4⁺ T cells from HD, A4, A6 and A25 individuals cultured with HIV-1. Under HIV-1 stimulation, DR5^{WT} from HD is exported to membrane where it colocalized with CD4. In contrast, DR5^{P32L} from A4, A6 and A25 is sequestered in intracellular compartment.

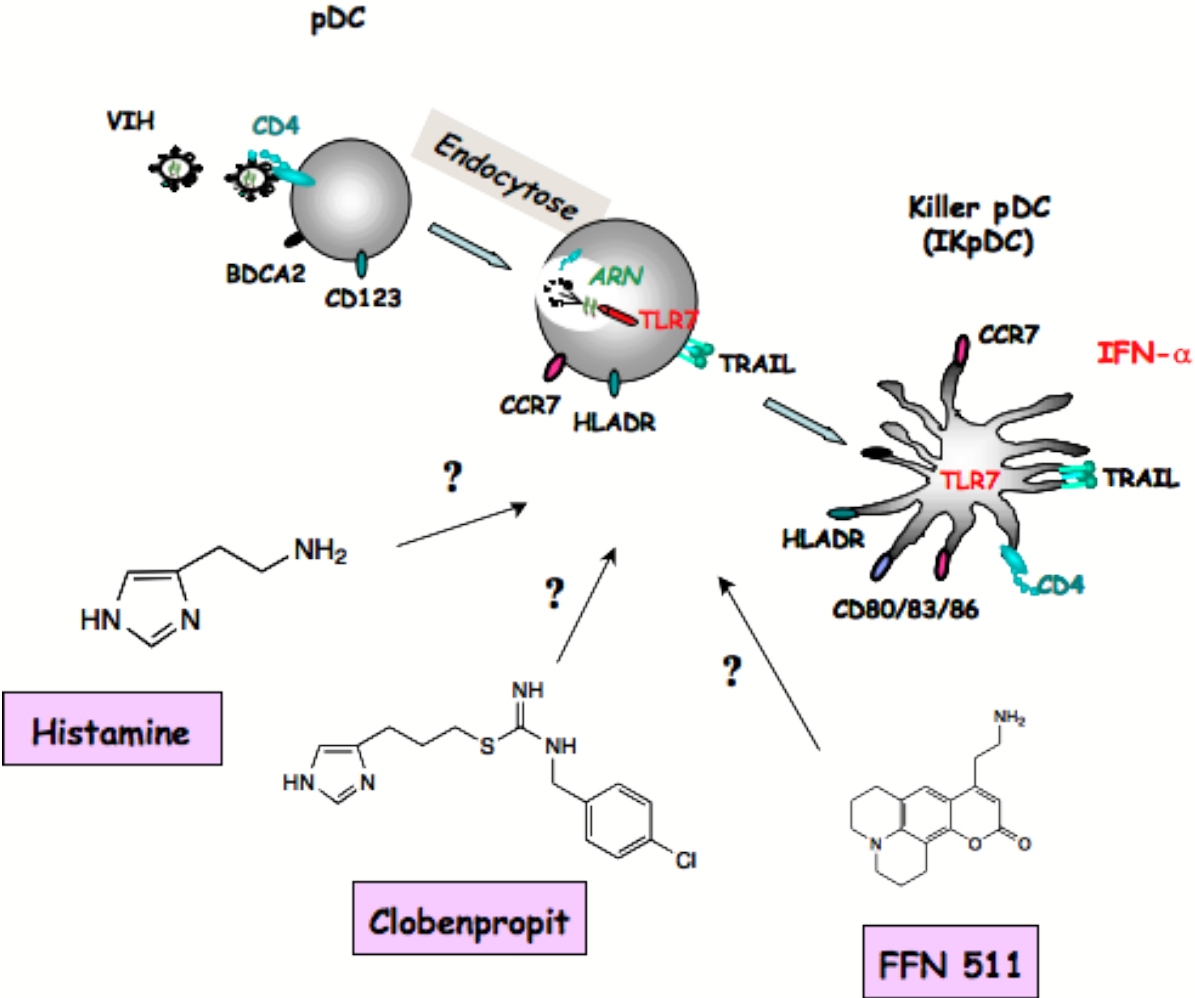
Résultat 4 : Etude d'inhibiteurs de la production d'IFN- α et de l'activation des pDC

But : L'activation immune chronique contribue à la progression du SIDA chez les patients infectés par le VIH. L'IFN- α est également associé à différentes pathologies (maladies auto-immunes et cancers). Ainsi, le but de cette étude est de trouver des inhibiteurs de l'activation des pDC.

Hypothèse : Une étude a montré que l'histamine, un médiateur chimique synthétisé par les granulocytes basophiles et les mastocytes, pouvait diminuer la production d'IFN- α par les pDC stimulées par les CpG-A (activation de la voie du Toll-like Receptor 9, TLR9) (Mazzoni et al., 2003). Nous avons alors testé l'effet de cette amine dans notre modèle d'activation des pDC par le VIH, et plus particulièrement l'effet d'un ligand synthétique de l'histamine, le clobenpropit (CB). Nous avons également élargi notre étude à d'autres stimuli (virus Herpes Simplex (HSV), virus Sendai (SeV), virus de la grippe (Flu) mais aussi les CpG-A). Afin de comprendre le mode d'action des amines au niveau des pDC, nous avons utilisé une amine fluorescente, le FFN 511 (False Fluorescent Neurotransmitters). Le FFN 511 mime les propriétés physiques des amines et peut être détecté par microscopie à fluorescence (émission à 480-520 nm).

Méthodes : Les pDC ont été purifiées par tri magnétique (sélection négative) et stimulées par des virus à ARN (VIH, Flu et HSV) et à ADN (SeV) ainsi que des CpGA. L'expression des marqueurs d'activation (CD40, HLA-DR, TRAIL), de maturation (CD83, CD86) et de migration (CCR7) a été analysée par cytométrie en flux. L'IFN- α produit par les pDC stimulées a été dosé dans les surnageants de culture par la technique d'Elisa. L'interaction des protéines MyD88 et IRF7, protéines indispensables dans l'activation des pDC, a été étudiée par une technique très récente, le DuoLink. Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier par microscopie des interactions entre deux protéines. Le principe de cette technique innovante se résume en 4 étapes : 1) Deux anticorps primaires de différentes espèces (ici, MyD88 (souris) et IRF7 (lapin)) vont reconnaître leur cible. 2) Des PLA probes (Proximity Ligation Assay) vont reconnaître spécifiquement les deux espèces des anticorps primaires. 3) Une solution de ligation comprenant des oligonucléotides et une ligase, va permettre l'hybridation des oligonucléotides avec les PLA probes et la formation d'un cercle si les deux protéines sont très proches. 4) Une étape de polymérisation permet d'amplifier le signal. La réaction d'amplification permet la réplication de l'ADN qui va être détecté par des sondes marquées (solution de détection). L'interaction des deux protéines est alors facilement

délectable par l'émission d'un spot bien défini (rouge) visible au microscope. Les noyaux des pDC sont marqués par DAPI (bleu).



En revanche, peu d'études ont été menées sur l'inhibition de la production d'IFN- α . Cependant, l'activation des pDC par des virus, ou des séquences d'ADN, commence à être bien étudiée. Une étude a montré qu'une monoamine, l'histamine, inhibait la production d'IFN- α par des pDC activées avec le virus de la grippe (Flu) (Mazzoni et al., 2003). Nous avons alors étudié l'effet de cette monoamine naturelle (Histamine) mais également d'une amine de synthèse (Clobenpropit) et d'une amine fluorescente (FFN511) sur l'activation des pDC et la production d'IFN- α .

• Effet de l'histamine et du clobenpropit sur l'activation des pDC

En adéquation avec les résultats de Mazzoni et al., nous avons observé que l'histamine était également capable de diminuer dans notre modèle d'étude la production d'IFN α par les pDC stimulées par le VIH. Nous avons alors testé dans un second temps une autre molécule, un ligand synthétique de l'histamine, le clobenpropit (CB), ainsi qu'une amine fluorescente (FITC), le FFN 511, qui nous permettra par la suite de visualiser cette molécule dans les pDC par microscopie 3D. Ces deux molécules sont capables d'inhiber drastiquement la production d'IFN α et de TNF α par les pDC stimulées par le VIH (Figure 1). De plus, une cinétique réalisée sur 24h nous a permis d'observer que le clobenpropit agissait très rapidement en inhibant dès 3h et sur le long terme la production d'IFN- α par les pDC stimulées par le VIH (Figure 2).

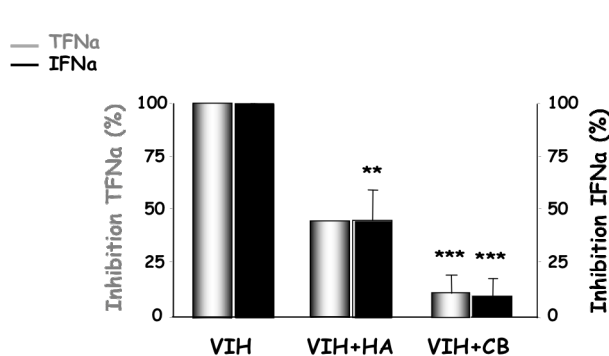


Figure 1: Effet de l'histamine (HA) et du clobenpropit (CB) sur les productions d'IFN α et de TNF α par les pDC stimulées par le VIH

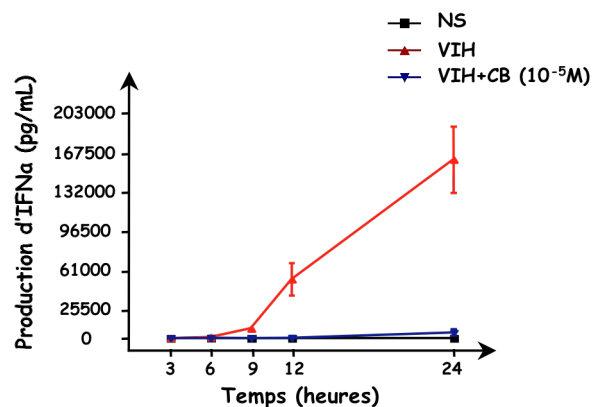


Figure 2: Cinétique de l'effet du clobenpropit (CB) sur la production d'IFN α par les pDC stimulées par le VIH

Les pDC, activées par la voie TLR7, expriment alors le ligand TRAIL ainsi que des marqueurs de maturation (CD83), de migration (CCR7) et d'activation (CD40L). Nous avons testé l'effet du clobenpropit sur l'expression de ces marqueurs d'activation et observé que le clobenpropit réduisait leur expression à la surface des pDC stimulées (Figure 3). Le clobenpropit peut donc empêcher l'expression de TRAIL à la surface des pDC et ainsi bloquer leur transformation en cellules tueuses, les IKpDC (Figure 4).

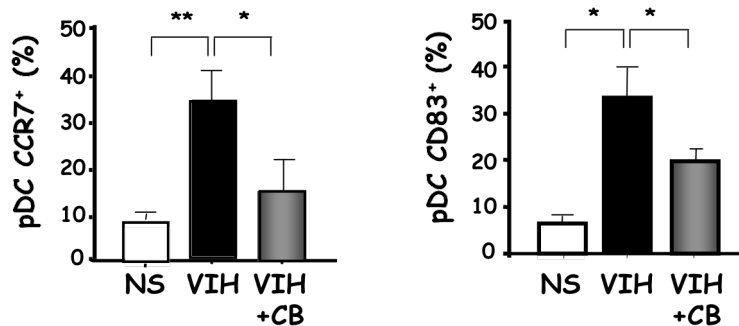


Figure 3: Expression des marqueurs de migration (CCR7) et de maturation (CD83) par les pDC stimulées par le VIH en présence ou non du clobenpropit (CB).

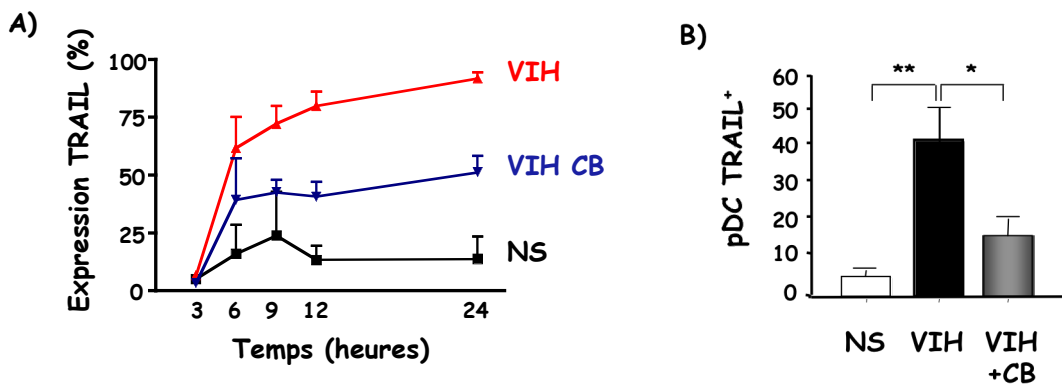


Figure 4: A- Effet du clobenpropit (CB) sur l'expression de TRAIL par les pDC stimulées par le VIH en fonction du temps. B- Marquage membranaire de TRAIL exprimé par les pDC stimulées par le VIH en présence ou non de clobenpropit. des marqueurs de migration (CCR7) et de maturation (CD83) par les pDC stimulées par le VIH en présence ou non du clobenpropit (CB).

- **L'effet du clobenpropit n'est pas spécifique au VIH**

Notre étude a également révélé que l'effet du clobenpropit n'était pas restreint au VIH. En effet, nous avons observé un effet inhibiteur du clobenpropit sur la production d'IFN α par les pDC stimulées par d'autres virus tels les virus Sendai (SeV), Herpes Simplex (HSV) ou

encore la grippe (Flu), mais aussi par un agoniste de TLR9 (CpGA). Le clobenpropit semble donc agir sur la voie d'activation des TLR7 et TLR9, tous deux exprimés dans les endosomes des pDC.

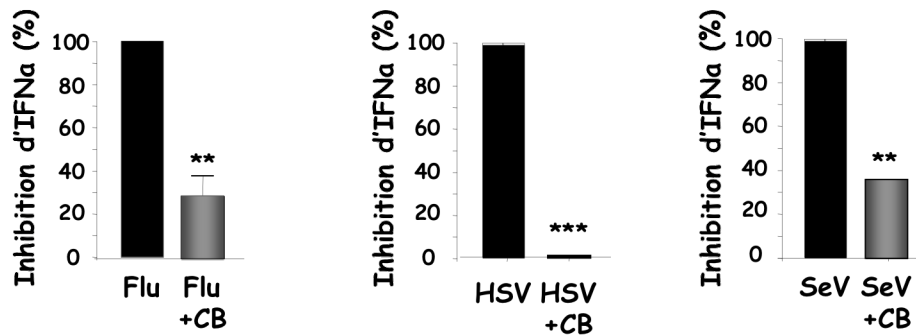


Figure 5: Effet du clobenpropit sur la production d'IFN- α par les pDC stimulées par le virus de la grippe (Flu), HSV et SeV.

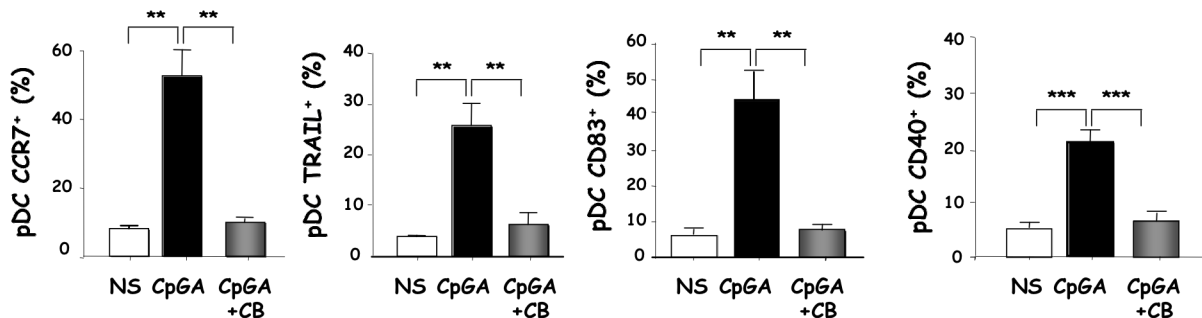


Figure 6: Expression des marqueurs de migration (CCR7) et de maturation (CD83) et d'activation (CD40, TRAIL) par les pDC stimulées par CpGA (agoniste TLR9) en présence ou non du clobenpropit (CB).

- Mécanisme d'action du clobenpropit

Il reste à déterminer le mécanisme d'action du clobenpropit sur les pDC. En collaboration avec Isabelle McCort (UMR 8601 Faculté des Saints Pères), nous avons synthétisé et testé une amine fluorescente, FFN 511. Nous avons observé par microscopie que le FFN 511 rentrait spontanément dans les pDC privilégiant alors l'hypothèse d'une action directe sur les TLR plutôt que la fixation à un récepteur extracellulaire. Nous avons en effet observé que les pDC expriment les récepteurs à l'histamine H2R et H4R. Le clobenpropit peut se fixer au récepteur H4R et peut aussi être transporté par des transporteurs de la famille des OCT

(Organic Cation Transportor), OCT3. Cependant, l'utilisation d'antagonistes des 4 récepteurs de l'histamine (H₁R, H₂R H₃R et H₄R), ainsi que l'utilisation de souris déficientes pour le transporteur OCT3 (OCT3 KO), n'ont pas permis d'empêcher l'effet inhibiteur du clobenpropit sur la production d'IFN α par les pDC stimulées par le VIH ou Flu. Ainsi, les récepteurs de l'histamine ne semblent pas jouer un rôle dans l'entrée et l'action du clobenpropit dans les pDC.

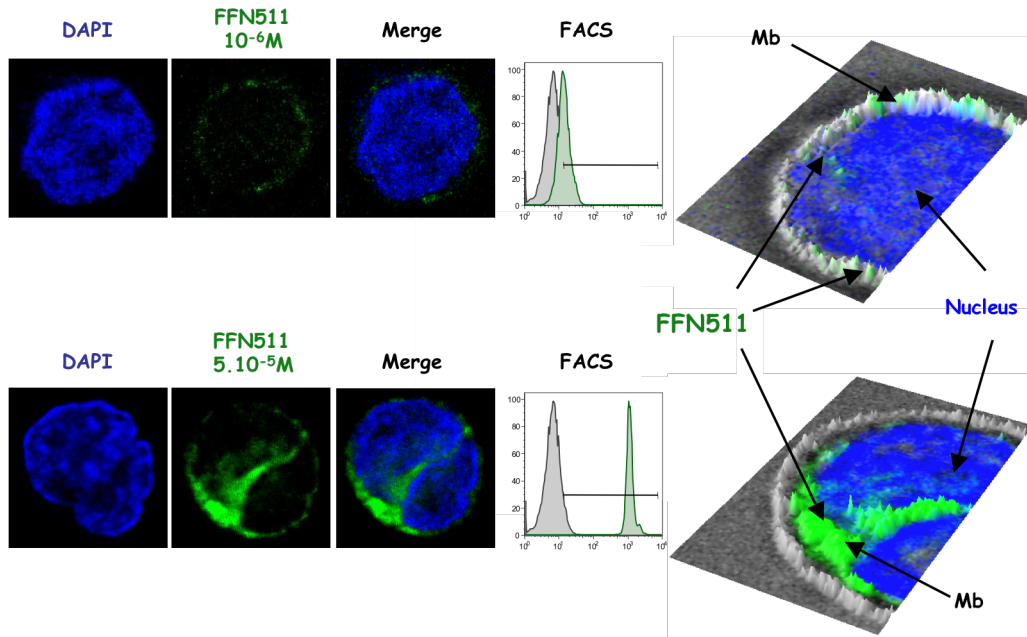


Figure 7: Visualisation par microscopie de la molécule fluorescente FFN511 (en vert) dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). La reconstruction en 3D surface plot permet de localiser le FFN511 dans le cytoplasme des pDC. Les analyses de cytométrie en flux et de microscopie montrent que la concentration nécessaire pour que le FFN511 pénètre dans les cellules est de $5 \cdot 10^{-5}M$.

Tout d'abord, nous avons testé l'effet du FFN511 sur l'activation des pDC. FFN511 inhibe la production d'IFN- α et nous avons déterminé sa concentration optimale qui est comprise entre 3 et $5 \cdot 10^{-5}M$.

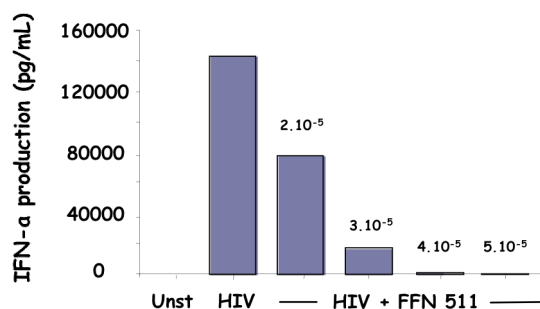


Figure 8: Inhibition de la production d'IFN- α par les pDC stimulées par le VIH en présence de FFN511 à différentes concentrations. La concentration nécessaire pour que le FFN511 inhibe complètement la production d'IFN- α est de $5 \cdot 10^{-5}M$.

FFN 511 est également capable de bloquer la formation d'IKpDC en inhibant la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC stimulées par le VIH. En plus de sa capacité à être visualisé à l'intérieur des pDC, nos résultats montrent que le FFN 511 a également un effet biologique sur l'activation des pDC.

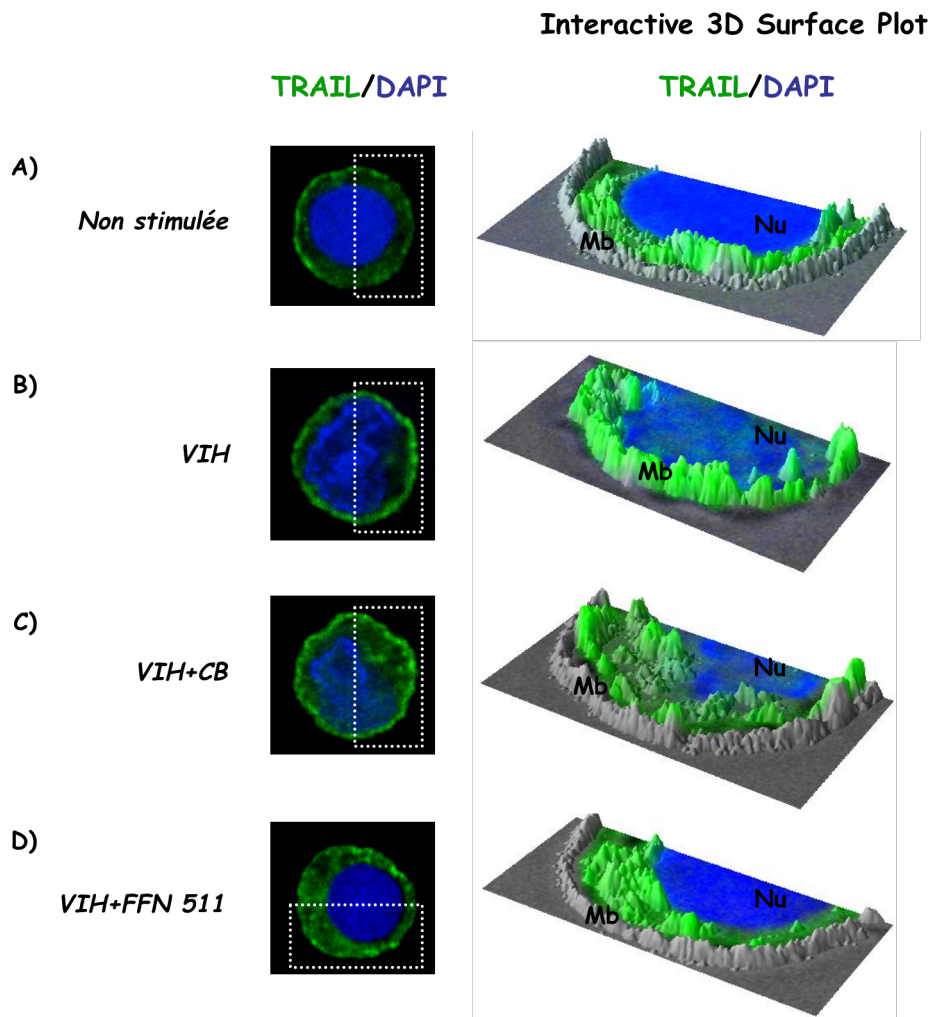


Figure 9: Régulation de l'expression de TRAIL (vert) à la surface des pDC stimulées par le VIH en présence du clobenpropit (CB) ou du FFN511. La reconstruction en 3D surface plot permet de localiser TRAIL à la membrane des pDC stimulées par le VIH. En présence de CB ou de FFN511, l'expression de TRAIL reste intracellulaire similairement aux pDC non stimulées. CB et FFN511 bloquent ainsi la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC stimulées par le VIH.

En tenant compte de l'effet drastique du clobenpropit et du FFN 511 observé sur l'état d'activation des pDC stimulées par le VIH, et sachant que dans les expériences réalisées ces molécules sont cultivées simultanément avec le virus, nous émettons l'hypothèse d'un effet immédiat du CB dans la voie d'activation du TLR7, probablement au niveau de molécules

ayant un rôle primordial, telles MyD88 et IRF7.

Nous avons réalisé une expérience DuoLinK permettant de visualiser avec précision si le CB agit (ou non) sur l'interaction entre les deux molécules MyD88 et IRF7. En effet, grâce à cette technique, nous pouvons visualiser par fluorescence et avec précision l'interaction de MyD88 et IRF7. Ainsi, nous observons une interaction MyD88/IRF7 sous stimulation virale. En présence de CB ou de FFN511, cette interaction est fortement diminuée.

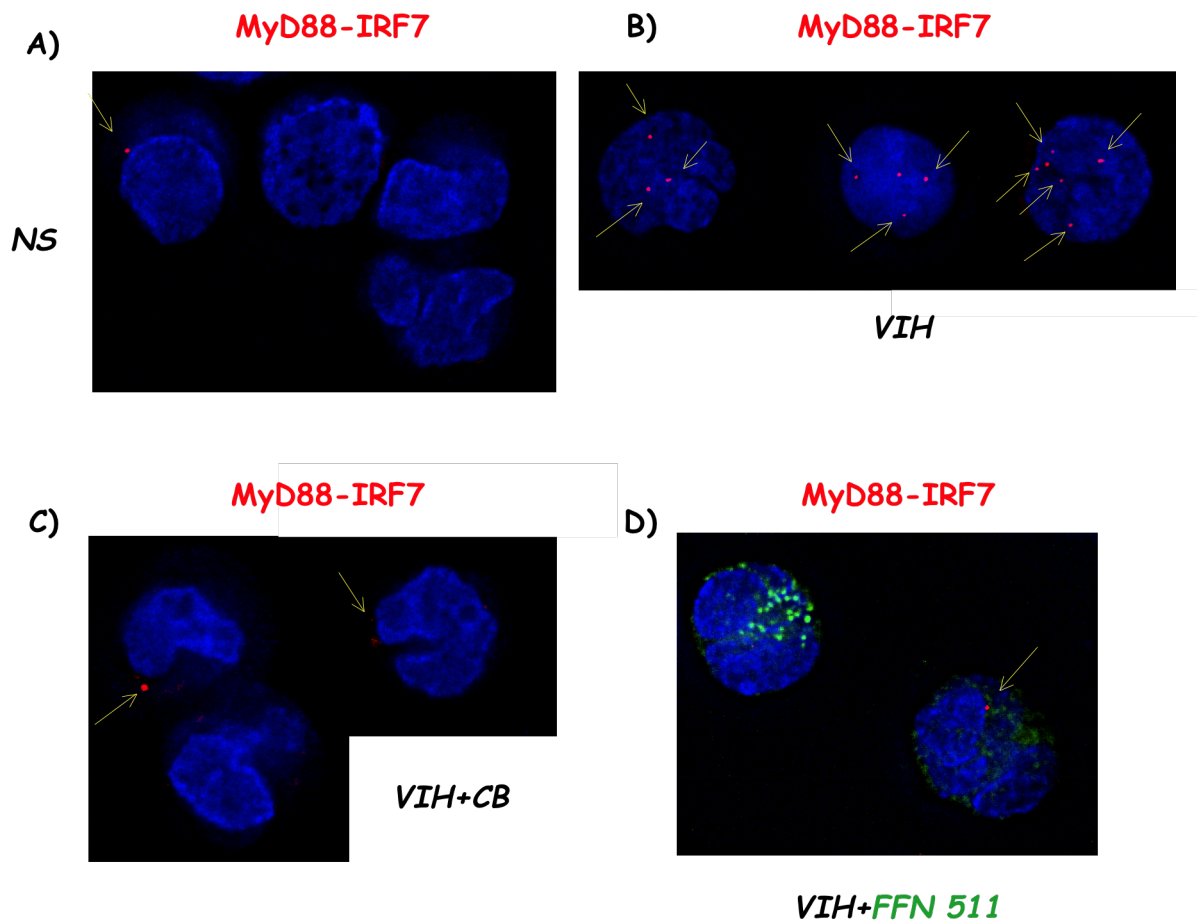


Figure 10: Visualisation de l'interaction MyD88/IRF7 par microscopie. Le clobenpropit et le FFN511 diminuent l'interaction MyD88/IRF7 dans les pDC stimulées par le VIH.

Nous avons quantifié les effets du clobenpropit et du FFN511 sur l'interaction MyD88/IRF7. Nous avons observé que CB et FFN511 inhibent de façon significative l'interaction MyD88/IRF7. Il semble que le CB inhibe la relocalisation nucléaire d'IRF7/MyD88 et ainsi la production d'IFN- α . En bloquant MyD88/IRF7, le CB bloque l'activation des pDC (Figure 10 et 11).

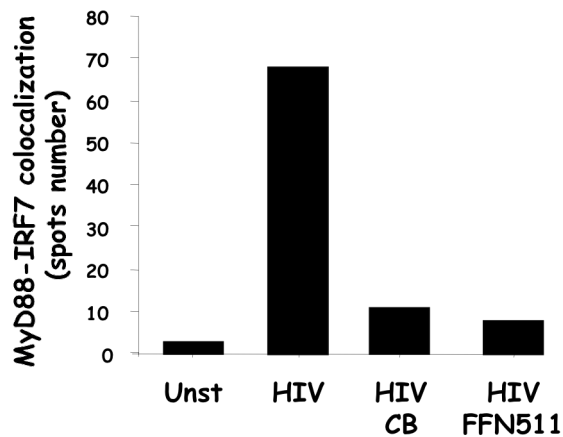


Figure 11: Quantification de l'interaction MyD88/IRF7. En présence de CB ou de FFN511, l'interaction MyD88/IRF7 est fortement diminuée dans les pDC stimulées par le VIH.

Conclusion : Les amines inhibent l'activation des pDC. Sur un plan clinique, il est connu que les patients allergiques (forte production d'histamine) sont plus sensibles aux infections virales. Notre étude tente de démontrer l'implication des amines dans la régulation de la production d'IFN- α et de manière plus générale leur implication dans la régulation de l'activation des pDC. Sachant qu'il n'est pas envisageable d'utiliser l'histamine en thérapie, nous avons testé les effets d'une molécule de synthèse analogue compétitrice de l'histamine, le clobenpropit.

Nous montrons que le clobenpropit diminue de façon significative la production d'IFN- α par les pDC stimulées par le VIH mais également par les virus Flu, SeV et HSV, ainsi que par les CpG-A. L'effet du clobenpropit n'est donc pas spécifique à un virus donné et agit aussi bien au niveau de la voie TLR7 (VIH, Flu, SeV) que TLR9 (HSV et CpG-A). Le clobenpropit diminue également l'activation des pDC en régulant de manière négative l'expression des marqueurs d'activation, de maturation et de migration des pDC stimulées par le VIH ou CpG-A. De plus, après avoir vérifié l'effet biologique de la molécule fluorescente FFN 511 notamment au niveau de la production d'IFN- α et de la relocalisation de TRAIL à la membrane des pDC, nous avons pu visualiser la molécule FFN 511 dans le cytoplasme des pDC.

Nous avons également étudié l'effet du CB et du FFN 511 sur l'interaction des protéines MyD88 et IRF7. La présence du CB et du FFN 511 empêche le recrutement d'IRF7 par MyD88 et explique indirectement la régulation négative sur la production d'IFN- α .

Il reste à déterminer par quel mécanisme agit le CB et le FFN 511. Nous émettons deux hypothèses : 1) CB et FFN 511 pénètrent dans les endosomes et modifient le pH, bloquant ainsi l'activation de la voie des TLR ; 2) CB et FFN 511 s'intercalent dans l'ADN et l'ARN empêchant ainsi leur fixation sur les TLR (ces expériences sont en cours à la Faculté des Saint-Pères avec Isabelle McCort et Sophie Bombard).

Discussion

Les travaux de recherche effectués durant ma thèse ont porté sur l'étude de mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes lors des infections rétrovirales (VIH-1, HTLV-1) ainsi que sur les mécanismes d'apoptose des LTCD4⁺ dans l'infection par le VIH impliquant la voie TRAIL et DR5.

ACTIVATION DES pDC PAR LES VIRUS LIBRES D'HTLV-1

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les pDC étaient capables d'induire une réponse innée après stimulation par des virus libres d'HTLV-1.

❖ Notre intérêt d'étudier la réponse innée des pDC stimulées par le virus HTLV-1.

Le virus HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus 1) est le premier rétrovirus à avoir été identifié (Poiesz et al., 1981). Ce virus est responsable du développement de leucémies dont l'ATL (Adult T-cell leukemia/lymphoma) qui se traduit par une prolifération de LTCD4⁺ infectés qui deviennent, par des mécanismes encore indéterminés, résistants aux mécanismes de défense de l'hôte et à la mort (Takatsuki, 1977). L'étude de ce virus est d'autant plus important que nous étudions en parallèle les mécanismes de résistance à la mort des LTCD4⁺ des patients HIV controllers. Nous sommes tenter de nous demander si un lien pourrait exister entre les patients infectés par le VIH et les patients infectés par HTLV-1.

Il a longtemps été pensé que la transmission virale ne se réalisait que lors des contacts cellule-cellule. Les virions libres n'étant pas capables d'infecter directement les LTCD4⁺. Cette théorie a récemment été remise en question, notamment sur le pouvoir infectieux des virus libres d'HTLV-1. En effet, une étude a démontré que des virus libres d'HTLV-1 pouvaient infecter les pDC et les mDC (Jones et al., 2008). Trois molécules sont nécessaires à l'entrée du virus dans les cellules. Ce complexe multimoléculaire est constitué de GLUT-1 (Manel et al., 2003), un transporteur permettant la fusion du virus avec la cellule, ainsi que des héparanes sulfates protéoglycanes (HSP) et de la neuropilin-1 (NP-1) (Ghez et al., 2006), qui participent à la fixation du virus sur les cellules cibles. Plus intéressant, NP-1 est plus connue sous le nom de BDCA-4 qui est le marqueur spécifique des pDC. La réponse innée lors de l'infection par HTLV-1 est peu documentée. Nous avons alors orienté nos recherches sur l'étude de la réponse innée induite par les pDC dans le cas d'une stimulation par des virus libres d'HTLV-1.

❖ **Les résultats obtenus.**

Nos résultats ont mis en évidence l'activation des pDC suite à la stimulation par des virus d'HTLV-1. En effet, nous avons montré qu'en réponse aux virus HTLV-1 les pDC produisent de grandes quantités d'IFN- α et de TFN- α . Les pDC activées expriment aussi les marqueurs de maturation (CD80, CD86, HLADR), d'activation (CD40) ainsi que le ligand pro-apoptotique TRAIL les transformant ainsi en IKpDC. De plus, nous avons montré que l'activation des pDC implique la voie d'endocytose et l'activation du TLR7. En effet, l'utilisation de la chloroquine et de l'A151, des inhibiteurs de l'activation des endosomes et de TLR7 respectivement, inhibent l'activation des pDC. Les analyses par microscopie 3D nous ont permis de découvrir un stockage intracellulaire de TRAIL dans les pDC immédiatement relocalisé à la surface des pDC après stimulation par HTLV-1 (Colisson et al., 2010).

❖ **L'étude de la primo-infection.**

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent un rôle potentiel des pDC dans la phase de primo-infection par HTLV-1, notamment par l'expression de TRAIL. Les pDC jouent-elles un rôle dans l'infection par HTLV-1 ? Les IKpDC sont-elles capables d'induire l'apoptose des LTCD4⁺ infectés par HTLV-1 ? L'IFN- α contrôle-t-il la réplication virale ?

Cependant, l'étude de l'infection par HTLV-1 chez des patients en primo-infection est rendue difficile due à la latence du virus. En effet, plusieurs années d'infection sont nécessaires avant que les symptômes n'apparaissent. Cependant, l'étude de la primo-infection paraît indispensable étant donné que la protéine Tax semble jouer un rôle crucial dans les mécanismes d'échappement au virus, et que Tax est exprimée à des temps précoces de l'infection (Hasegawa et al., 2006).

Une des alternatives serait l'étude du modèle simien STLV-1 (simian T-lymphotropic virus-1). Le mandrill apparaît comme un bon modèle d'étude de la physiopathologie associée à HTLV-1. Il a récemment été montré que le virus STLV-1 infectait à la fois les LTCD4⁺ et les LTCD8⁺ des Mandrills, avec une charge provirale cependant plus élevée dans les LTCD4⁺ (Souquière, 2009b). Une corrélation positive a été établie entre les taux élevés de la charge

virale et ceux d'interleukines (IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ et TNF- α). De plus les LTCD4⁺ sont activés et expriment le marqueur HLA-DR (Souquière, 2009b). Cette étude des Mandrills a montré que la charge virale augmentait avec le temps et l'âge des animaux infectés par HTLV-1, et qu'elle était associée à la diminution du nombre de LTCD4⁺ et de LTCD8⁺ (Souquière, 2009a). Ce modèle d'étude semble donc pouvoir apporter des réponses sur l'infection chronique par HTLV-1 et la réponse des cellules T. Il serait intéressant d'étudier les pDC *in vivo* chez les Mandrills et de mesurer la production d'IFN- α afin d'identifier le caractère délétère ou bénéfique de l'IFN- α .

❖ Les mécanismes de résistance à l'apoptose des LTCD4⁺ infectés par HTLV-1.

Par analogie avec notre modèle VIH, il serait important de déterminer l'implication de la voie TRAIL dans l'infection par HTLV-1. À l'heure actuelle, l'induction de DR4 et/ou DR5 par HTLV-1 à la surface des LTCD4⁺ n'est pas connue (cette étude est actuellement en cours au laboratoire). Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que les pDC stimulées par HTLV-1 expriment TRAIL à leur surface et que ces cellules tueuses TRAIL⁺ pourraient induire l'apoptose des cellules T non infectées DR5⁺, contribuant indirectement à l'expansion clonale des LTCD4⁺ résistants aux voies d'apoptose médiées par TRAIL.

Il est connu que la transformation maligne implique le développement d'une résistance à l'apoptose. La protéine Tax du virus HTLV-1 confère une résistance à l'apoptose induite par FAS. Il a été démontré que des lignées dérivées de cellules T de patients infectés exprimant Tax expriment des taux élevés de c-FLIP (caspase-8 FLICE-inhibitory protein). Les taux de c-FLIP corrélaient avec la résistance de la mort induite par FAS. Or les voies TRAIL et FAS sont toutes les deux bloquées par c-FLIP. L'augmentation de c-FLIP par Tax pourrait alors constituer un mécanisme d'évasion à la mort induite par TRAIL et FASL des cellules infectées par HTLV-1 (Krueger et al., 2006). La question que nous nous posons est qu'en est-il de l'expression de DR5 sur les cellules infectées par HTLV-1? Comme dans le cas de FAS, Tax joue-t-elle un rôle dans la régulation de ce récepteur de mort du TRAIL ?

Un élément de réponse avait été avancé dans une étude réalisée en 2005 par Matsuda et al, mais cette étude a depuis été rétractée. L'équipe suggérait que des lignées de cellules T infectées par le virus HTLV-1 et des cellules primaires de patients atteints d'ATL

développaient une résistance à la mort induite par TRAIL en comparaison à des cellules non infectées (Matsuda et al., 2005).

Une autre étude plus récente a montré que des lignées de cellules dérivées de patients et des cellules de patients atteints d'ATL montraient une résistance à TRAIL et CD95L (FASL) (Bleumink, 2011). En effet, les cellules infectées par HTLV-1 expriment des taux élevés de c-FLIP conférant alors une résistance à l'apoptose médiée par les récepteurs de TRAIL et FASL. La Rocaglamide (un composé végétal) restaure la mort induite par FASL et TRAIL dans les cellules infectées par HTLV-1 en diminuant l'expression de c-FLIP. Les auteurs suggèrent alors que la Rocaglamide pourrait être utilisée comme adjuvant pour les thérapies anti-cancéreuses basées sur TRAIL.

❖ L'étude des pDC dans la transmission du virus HTLV-1.

Il serait également intéressant d'étudier le lait maternel des femmes infectées par HTLV-1 afin de chercher la présence éventuelle de pDC et de virus libres dans le colostrum. En effet, il a été montré qu'une des voies de transmission majeure du virus se faisait par l'allaitement (Hino, 2011). Dans le Sud du Japon, la campagne de « non allaitement » a permis de réduire drastiquement le nombre d'enfants infectés. De récentes publications ont également montré un transfert des lymphocytes maternels dans le système immunitaire des nouveaux-nés (Bandrick et al., 2008; Reber et al., 2008a, 2008b). Il serait également intéressant d'étudier le "homing" des pDC, à savoir l'expression des récepteurs aux chemokines de la glande mammaire, les couples CCL28/CCR10 et intégrine MAdCAM/VCAM. Il serait aussi judicieux de tester l'expression de FAS ligand à la surface des pDC. Les pDC étant susceptibles d'être infectées par les virus HTLV-1, les pDC pourraient participer à la transmission du virus par contact cellulaire ou production de virus libres. Nous avons tenté par 3 reprises d'isoler des PBMC du lait maternel de patientes infectées par HTLV-1. Les résultats n'ont pas été concluants. Des mises au point techniques sont nécessaires. De plus, la qualité des prélèvements a rendu difficile l'isolation des cellules étant donné que les échantillons de lait nous parvenaient plus de 36h après avoir été prélevés.

Ainsi, parallèlement à la sensibilité des pDC à être infectées par des virus libres d'HTLV-1, l'activation des pDC et plus précisément leur transformation en cellules tueuses, pourrait

contribuer au développement de l'ATL chez les patients infectés par le VIH-1 en participant à la mort des LTCD4⁺ non infectés. Il ne s'agit à l'heure actuelle que d'une hypothèse. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'expression des récepteurs de mort DR4 et DR5 afin de déterminer si les pDC TRAIL⁺ pourraient contribuer à l'apoptose des LTCD4⁺ non infectés.

ACTIVATION DES pDC CHEZ LES PATIENTS HIV-CONTROLLERS

En dépit de l'activité anti-virale des IFN- α , la réponse immune innée lors de l'infection par le VIH-1 serait un élément central dans l'activation immune chronique et la progression vers la maladie. De plus, il a été montré que des taux sériques d'IFN- α apparaissaient dans les phases tardives du SIDA. Des études récentes montrent que l'IFN- α est responsable de la déplétion des LTCD4⁺ *in vitro* dans le thymus (Sivaraman et al., 2011) et *in vivo* dans les amygdales infectés par le VIH (Stary et al., 2009). Ces études suggèrent une participation de l'IFN- α à la pathologie associée au VIH. (Buimovici-Klein et al., 1986).

Nous avons eu l'opportunité de travailler sur une cohorte de patients très rares infectés par le VIH et qui contrôlent naturellement la maladie. Ces patients résistants au SIDA sont nommés les patients HIV-controllers (HIC). Les patients controllers représentent moins de 1% des patients infectés par le VIH et sont capables de contrôler spontanément et durablement la charge virale (inférieure à 400 copies/mL) (Dinso, 2008) en l'absence de traitement anti-rétroviral. Une des piste pouvant expliquer le statut de patients HIV-controllers pourrait être une réponse innée optimale sur le contrôle de la charge virale. D'un autre côté, nous pouvons émettre l'hypothèse inverse qui tend à expliquer le maintien des LTCD4⁺ par une production d'IFN- α moins importante. Ces deux hypothèses sont contradictoires mais reflètent le rôle ambigu de l'IFN- α dans la pathologie du VIH.

❖ Hypothèse sur le rôle de l'IFN- α dans la pathologie du VIH.

Il existe également un modèle de singes résistants au SIDA, il s'agit des sooty mangabeys (SM) et des african green monkeys (AGM) (hôtes naturels du VIS). Contrairement aux patients HIC, les SM et AGM ne contrôlent pas la charge virale. Cependant, le contrôle du nombre de LTCD4⁺ est associé au contrôle de l'activation immune chronique, ce qui n'est pas observé en revanche chez les macaques rhesus qui progressent vers le SIDA. En effet, la réponse interféron tout au long de l'infection persiste chez les macaques, contrairement à celle des AGM qui retrouve un niveau basal après 4 semaines. Ainsi, la persistance de la réponse interféron potentialiserait l'activation immune et la progression vers la maladie (Jacquelin et al., 2009; Mandl et al., 2008). De plus, la résistance des SM s'expliquerait par un polymorphisme au niveau d'IRF7 (facteur clé dans la voie de la production d'IFN- α). Il est désormais établi que la progression vers la phase SIDA ne résulte pas d'une faible réponse immune au virus mais plutôt d'une hyperactivation du système immunitaire.

❖ Le modèle de l'induction de la mort par les IKpDC.

Plusieurs études ont démontré l'implication des pDC dans le cas du VIH. Ces cellules expriment le récepteur CD4 et les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 du VIH et sont donc susceptibles d'être infectées par le VIH (Donaghy, 2003; Smed-Sørensen, 2005). Cependant, il n'est pas nécessaire que les pDC soient infectées pour qu'elles s'activent. Il a été démontré que le VIH activait les pDC par la voie de l'endocytose et du TLR7 (Beignon et al., 2005a). Les cellules activées sécrètent alors de grandes quantités d'IFN- α (Fonteneau et al., 2004), dont le rôle bénéfique va permettre de contrôler la charge virale.

Cependant, notre étude *in vitro* soulève le rôle délétère de l'IFN- α dans la pathologie du VIH (Herbeuval and Shearer, 2006). En effet, l'IFN- α sécrété par les pDC induit l'expression du ligand apoptotique TRAIL à la surface des LTCD4⁺, infectés ou non, induisant la mort des cellules qui expriment le récepteur de mort DR5, un des récepteurs de mort associé à TRAIL (Herbeuval et al., 2005c). Plus intéressant, la fixation du VIH sur les LTCD4⁺ est suffisante pour induire l'expression de DR5. Ainsi, les cellules n'ont pas besoin d'être infectées pour exprimer DR5. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la voie TRAIL/DR5 contribuerait à la déplétion massive du nombre de LTCD4⁺, signant la progression vers la phase SIDA.

Ainsi, nous avons testé si les pDC des patients HIC pouvaient se transformer en IKpDC et si elles étaient capables de produire de l'IFN- α sous stimulation par le VIH.

❖ Les résultats obtenus.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'état d'activation des pDC des patients HIV-Controllers. Pour cela, nous avons comparé au niveau quantitatif et qualitatif les pDC des patients HIC avec celles de patients virémiques et de donneurs sains en testant leur réponse IFN et l'expression du ligand de mort TRAIL.

Contrairement à l'étude de Sabado et al, nos résultats n'ont montré aucun défaut quantitatif des pDC circulantes des HIC par rapport aux donneurs sains (Sabado et al., 2010). De plus, la réponse IFN des pDC des patients HIC activées par le VIH ou le virus de la grippe (Flu) est fonctionnelle. Leurs pDC produisent en effet de grandes quantités d'IFN- α sous les deux stimulations virales. De manière surprenante, nous avons observé une production élevée d'IFN- α par les pDC stimulées par Flu chez les patients virémiques, malgré une diminution importante de leurs pDC circulantes par rapport aux donneurs sains et HIC. Ce résultat suggère que le faible nombre de pDC sanguines des patients virémiques n'en reste pas moins fonctionnel (Sabado et al., 2010) et appuie une fois de plus le rôle crucial des pDC dans l'activation immune chronique.

De plus, nous avons testé l'expression de TRAIL sur les pDC des HIC. Contrairement aux patients virémiques, mais similairement aux donneurs sains, les pDC des HIC n'expriment pas de TRAIL *in vivo*. Cependant, une stimulation *in vitro* par le VIH induit l'expression membranaire de TRAIL, comparable à celle observée chez les patients virémiques. De plus, les analyses par microscopie à 3 dimensions ont révélé que les patients HIC exprimaient des taux de TRAIL intracellulaire très élevés, rapidement relocalisés à la surface des pDC après stimulation par le VIH. Une autre analyse fonctionnelle, qui consistait à mettre en co-culture des pDC avec des cellules de la lignée H9 (LT CD4⁺ infectés) exprimant DR5, nous a permis de tester la capacité des pDC TRAIL⁺ des patients HIC à tuer les cellules H9. De la même façon que les pDC des donneurs sains et des patients virémiques, nous avons observé que les pDC des HIC exprimant TRAIL sous activation *in vitro* étaient capables d'induire la mort des

cellules H9. Ainsi, sous activation *in vitro*, les pDC des HIC acquièrent le phénotype des IkpDC.

Nous avons également observé que le VIH induisait l'expression des marqueurs de maturation CD80/CD83/CD86, des marqueurs d'activation CD40 et HLA-DR, ainsi que le marqueur de migration CCR7 (résultats non montrés). Les pDC des HIC sont donc activables *in vitro* en présence de VIH. Ainsi, d'après notre modèle d'étude TRAIL/DR5, aucun défaut qualitatif des pDC ne peut expliquer la résistance des LT CD4⁺ à la mort. Nos résultats diffèrent de ceux observés dans le modèle de résistance des Sooty Mangabey où une mutation dans le gène IRF7, facteur clé dans la production d'IFN- α , a été décrite. Les auteurs émettent alors l'hypothèse que le polymorphisme IRF7 ne permettrait pas aux pDC de produire d'IFN- α , empêchant ainsi l'effet pathogène de l'IFN- α sur les LTCD4⁺. Cependant, ce travail fait débat puisque les pDC des SM produisent de l'IFN- α suite à l'activation par Flu. Il paraît donc surprenant qu'un polymorphisme IRF7 soit sélectif pour une stimulation avec le VIH. Pour conclure cette étude, les pDC des patients HIV-controllés sont fonctionnelles et n'expliquent pas le phénotype de résistance à la déplétion des LTCD4⁺.

Notons qu'à la différence des patients HIC, les SM et AGM ne contrôlent pas la charge virale. Les SM et AGM parviennent cependant, par des mécanismes qui restent inconnus à ce jour, à contrôler l'activation immune. Nous pouvons donc nous demander si chez les patients HIC, l'absence de virus dans le sang résulte d'une action efficace des pDC et des IFN ou si les pDC ne sont pas activées chez ces patients du fait des quantités indétectables du virus. Nous avons observé chez les patients HIC des taux sériques de TRAIL inférieurs à ceux des patients virémiques mais supérieurs à ceux de donneurs sains, suggérant alors des traces d'une activation immune. Ce résultat serait en accord avec le modèle des sooty mangabeys pour lesquels l'IFN- α et plus globalement l'activation immune chronique serait régulée par des facteurs restant à identifier.

❖ Le rôle potentiel des pDC dans l'infection par le VIH-2.

Il serait également intéressant d'analyser les pDC des patients infectés par le VIH-2. En effet, le VIH-2 est moins virulent que le VIH-1. Une étude a montré que le pourcentage des pDC circulantes des patients infectés par le VIH-2 était semblable à celui des donneurs sains

(Cavaleiro, 2009). On peut donc supposer que les pDC ne migrent pas vers les organes lymphoïdes où ces dernières participent à la mort des LTCD4⁺ chez les patients virémiques. Il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité de ces pDC en analysant notamment la réponse interféron *in vitro* et le phénotype d'activation. Cela nous permettrait de valider si TRAIL et l'IFN- α sont importants dans la pathologie, et de corrélérer peut-être les patients infectés par le VIH-2 au modèle de résistance simien étant donné leur similitude phylogénétique.

ETUDE DE LA VOIE D'APOPTOSE TRAIL/DR5 CHEZ LES PATIENTS HIV-CONTROLLERS

Les pDC étant capable d'acquérir le phénotype tueur des IKpDC, nous avons orienté notre étude sur les LTCD4⁺ des différents groupes de patients infectés par le VIH.

❖ Les résultats obtenus.

Nous avons observé que le VIH-1 induisait une apoptose réduite des LTCD4⁺ *in vitro* chez les patients HIV-Controllers. Nous avons alors tenté de déterminer si un défaut d'expression de TRAIL ou DR5 dans les LTCD4⁺ des HIC pourrait expliquer la résistance des LTCD4⁺ à la mort induite par le VIH.

Nous avons montré que les LTCD4⁺ des HIC exprimaient TRAIL à leur surface après stimulation *in vitro* par le VIH, écartant ainsi l'implication de TRAIL dans le maintien des LTCD4⁺ des HIC. Ensuite, nous avons testé l'expression des récepteurs de mort du TRAIL. Aucune différence significative de l'expression des récepteurs DR4, DcR1 et DcR2, ainsi que FAS n'a été observée entre les donneurs sains, les patients virémiques et les HIC. DR4, DcR1, DcR2 ou FAS ne peuvent donc pas expliquer la résistance des LTCD4⁺ des HIC. Cependant, nous avons observé que DR5 était beaucoup plus faiblement induit chez les HIC que chez les donneurs sains après stimulation *in vitro* des LTCD4⁺ et chez les patients virémiques, qui expriment *in vivo* des quantités importantes de DR5.

Nous avons alors séquencé le gène de DR5 et mis en évidence une substitution homozygote. Cette mutation est particulièrement intéressante étant donné qu'elle change une proline en une

leucine à la position 32 dans la région du peptide leader, qui joue un rôle primordial dans l'export des protéines à la surface des cellules. Nous avons nommé cette mutation P32L. Il s'agit d'une mutation récessive, qui est présente majoritairement chez les HIC (10/12) et chez quelques patients virémiques (3/14). Il est intéressant de souligner que les 3 patients virémiques exprimant la mutation P32L présentent un nombre de LTCD4⁺ plus élevés que les autres patients virémiques non mutés. Nous avons en effet établi une corrélation négative entre le nombre de LTCD4⁺ et l'expression de DR5.

Ce résultat nous a conduit à étudier l'ARN messager de DR5. Les expériences de RT-PCR n'ont révélé aucun défaut de synthèse de l'ARNm de DR5 chez les HIC. Nous avons alors réalisé des expériences de microscopie en 3D afin de déterminer s'il y avait un défaut de synthèse protéique. Nous avons constaté avec surprise que la protéine DR5 était synthétisée et exprimée dans des compartiments intracellulaires des LTCD4⁺ des patients HIC, similairement aux donneurs sains et virémiques. La stimulation *in vitro* des LTCD4⁺ par le VIH nous a permis de visualiser une séquestration intracellulaire de DR5 chez les HIC alors que DR5 était majoritairement exporté à la membrane des donneurs sains et des patients virémiques.

❖ Les perspectives.

Mon travail de thèse sur les patients HIV-controllés apporte une explication supplémentaire sur la résistance à l'apoptose des LTCD4⁺. Cependant, le profil des HIC est multifactoriel. L'expression des allèles protecteurs HLA-B57, HLA-B27 (Emu, 2008; Flores-Villanueva, 2001; Migueles, 2000), ou encore de la mutation delta CCR5 (Ioannidis, 2001) contribuent au contrôle de la progression vers le SIDA. Cependant, la difficulté de la compréhension du profil des patients HIC résulte de l'hétérogénéité observée parmi ces mêmes patients. Ici, nous pensons avoir découvert une mutation dans le gène DR5 majoritairement exprimée dans notre groupe de patients HIC mais qui peut également être exprimée chez d'autres patients.

Notons aussi que Chehimi et al. ont confirmé l'expression de TRAIL sur les pDC mais n'ont pas trouvé d'expression de DR5 sur les LTCD4⁺ autologues infectés par le VIH, concluant que les pDC sont incapables de tuer les LTCD4⁺ (Chehimi et al., 2010). Au vu de nos résultats actuels, il est tout à fait envisageable que les donneurs utilisés dans leur étude exprimaient la

mutation P32L sachant qu'il nous est déjà arrivé de ne pas réussir à induire DR5 sur des LTCD4⁺ purifiés de donneurs sains après stimulation par le VIH-1. Aussi, il est désormais important d'établir la fréquence de cette mutation P32L dans la population de donneurs sains.

Le séquençage de DR5 doit également être élargi à d'autres cohortes afin de confirmer nos résultats et de définir un nouveau sous-groupe de patients basé uniquement sur le nombre de LTCD4⁺ et qui ne serait pas restreint aux HIC mais également aux LTNP (Long-Term Non Progressor). Définir génétiquement l'expression de DR5, comme doser le TRAIL sérique, chez les patients infectés par le VIH pourrait ainsi devenir un marqueur de diagnostic de la progression vers la maladie. La compréhension du trafic intracellulaire de DR5 est peu documentée. Une étude a suggéré l'implication de Rab7 dans la régulation de la voie d'apoptose régulée par TRAIL/DR5 (Akasawa et al., 2009). Des siRNA dirigés contre Rab7 inhibe la signalisation de DR5 dans les lysosomes et réduit ainsi l'apoptose. L'étude de la voie du trafic de DR5 des compartiments intracellulaires à la membrane des LTCD4⁺ des patients infectés par le VIH nous permettrait d'améliorer notre compréhension sur la signalisation de DR5 de manière générale et nous permettrait de déterminer dans quel compartiment cellulaire la forme mutée de DR5 (P32L) est séquestrée.

Enfin, les nouvelles perspectives de notre équipe seront de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'inhiber l'interaction TRAIL/DR5 et par conséquent l'apoptose des lymphocytes TCD4⁺ lors de l'infection par le VIH. DR5 semble être une molécule clé dans l'apoptose. La régulation et l'activation de DR5 représentent des cibles thérapeutiques sérieuses pour prévenir la progression des patients vers la phase SIDA et la compréhension du trafic de DR5 pourrait aussi avoir des applications en cancérologie.

IDENTIFIER DES INHIBITEURS D'INTERFERON

L'activation immune chronique contribue à la progression du SIDA chez les patients infectés par le VIH. L'IFN- α est également associé à différentes pathologies (maladies auto-immunes et cancers). Ainsi, le but de cette étude est de trouver des inhibiteurs de l'activation des pDC.

Une étude a montré que l'histamine pouvait diminuer la production d'IFN- α par les pDC stimulées par les CpG-A (Mazzoni et al., 2003). Nous avons alors testé l'effet de cette amine

sur des pDC stimulées par le VIH, et plus particulièrement l'effet d'un ligand synthétique de l'histamine, le clobenpropit (CB). Nous avons également testé le CB sur les pDC stimulées par d'autres virus, le virus Herpes Simplex (HSV), virus Sendai (SeV), virus de la grippe (Flu) mais aussi les CpG-A.

❖ Effets biologiques du clobenpropit (CB).

Nous montrons que le clobenpropit diminue de façon significative la production d'IFN- α par les pDC stimulées par le VIH mais également par les virus Flu, SeV et HSV, ainsi que par les CpG-A. L'effet du clobenpropit n'est donc pas spécifique à un virus donné et agit aussi bien au niveau de la voie TLR7 (VIH, Flu, SeV) que TLR9 (HSV et CpG-A). En inhibant la production d'IFN- α et en diminuant fortement le profil tueur des IKpDC, le CB est un très bon candidat pour inhiber l'activation des pDC. Le CB diminue en effet fortement l'expression des marqueurs d'activation, de maturation et de migration sur les pDC stimulées par le VIH-1 et empêche la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC. De plus, nous avons également étudié l'effet du CB sur l'interaction des protéines MyD88 et IRF7 qui sont des facteurs jouant un rôle clé dans la production d'IFN- α par les pDC. Les résultats obtenus montrent que le CB empêche le recrutement d'IRF7 par MyD88 expliquant indirectement la régulation négative sur la production d'IFN- α .

❖ Mécanisme d'entrée et mode d'action.

Afin de comprendre le mode d'action des amines au niveau des pDC, nous avons utilisé une amine fluorescente, le FFN 511 (False Fluorescent Neurotransmitters). Le FFN 511 mime les propriétés physiques des amines et peut être détecté par microscopie à fluorescence (émission à 480-520 nm) (Gubernator et al., 2009). Nous avons estimé à 5.10^{-5} M la concentration de FFN 511 nécessaire pour obtenir des effets biologiques sur la régulation de l'activation des pDC. En effet, FFN 511 est capable de bloquer la formation d'IKpDC en inhibant la relocalisation de TRAIL à la surface des pDC stimulées par le VIH et diminue également leur production d'IFN- α .

De manière plus intéressante, cette concentration nous permet de visualiser par microscopie en 3D le FFN 511 dans le cytoplasme des pDC. Concernant le mécanisme d'entrée de

FFN511 dans les pDC, nous pensons que les mécanismes d'endocytose ne sont pas indispensables à l'entrée du FFN511 dans les pDC. En effet, le FFN 511 pénètre aussi bien dans les pDC non stimulées que dans les pDC stimulées par le VIH. Nous pouvons suggérer un transport passif de cette molécule ou l'implication de récepteurs ou transporteurs d'amines présents à la membrane des pDC. Cependant, nous avons exclu l'implication des récepteurs à l'histamine et du transporteur OCT3 étant donné que le CB possède toujours la capacité d'inhiber la production d'IFN- α en présence d'antagonistes des récepteurs à l'histamine ou chez des souris déficientes pour le transporteur OCT3.

Il reste à déterminer par quel mécanisme agissent le CB et le FFN 511. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le CB et le FFN 511 empêchent directement l'entrée des virus dans les pDC, que le CB et le FFN511 pénètrent dans les endosomes, modifient le pH et bloquent ainsi l'acidification des endosomes et la dégradation des ARN/ADN, ou encore nous pouvons imaginer que le CB et le FFN511 s'intercalent dans l'ADN et l'ARN empêchant ainsi leur fixation sur les TLR. Nous réalisons actuellement les expériences d'intercalation du FFN511 dans l'ADN ou l'ARN en utilisant le Phosphorimager (Faculté des Saints-Pères) qui nous permet de détecter et quantifier la fluorescence de molécules à partir de gels. Nous comparons ainsi la fluorescence du FFN511 avec celle du SybrGreen qui est connu pour se fixer sur les acides nucléiques et pour servir de fluorophore (une alternative au bromure d'éthidium, BET).

De plus, nos résultats montrent que la plupart des amines (naturelles ou de synthèse) testées (histamine, dopamine, spermine, clobenpropit, FFN 511) ont un effet sur la régulation de l'activation des pDC. Afin de déterminer si la fonction amine est bien responsable de cet effet inhibiteur sur les pDC, nous souhaitons tester une molécule FFN 511 dans laquelle la fonction amine aura été remplacée par une fonction carboxyle. Cette molécule a été synthétisée par Isabelle McCort mais sa solubilité doit être optimisée. Nous pensons que la synthèse de cette molécule nous apportera une réponse précise quant au rôle précis de la fonction amine dans la régulation de l'activation des pDC.

Nous pensons qu'il est crucial de mettre au point des modulateurs de la production d'IFN- α durant certaines phases de la maladie du SIDA. Il est important que ces inhibiteurs aient des effets réversibles, qui cessent lors de l'arrêt du traitement. En effet, bien qu'ayant des effets

délétères, les IFN de type I ont également des effets antiviraux puissants et contribuent à la diminution de la réplication virale. Sur un plan physiologique, nos résultats pourraient expliquer des corrélations entre certaines maladies et la sensibilité aux infections. Par exemple, les sujets déprimés (surproduction de dopamine, une autre amine naturelle, lors des psychoses) sont plus sensibles aux infections virales. En effet, en diminuant la production d'IFN- α , la dopamine pourrait diminuer les défenses de l'organisme vis-à-vis des virus. De la même manière, il est connu que les allergies sensibilisent les patients aux infections virales, ce qui pourrait être dû à l'action de l'histamine (surproduction lors des allergies) sur la production d'IFN- α . Ainsi, la régulation négative obtenue par le clobenpropit sur l'activation des cellules de la réponse innée pourrait représenter de nouveaux axes de recherches dans les domaines de la physiopathologie.

Bibliographie

- Adjorlolo-Johnson, G., Unger, E.R., Boni-Ouattara, E., Toure-Coulibaly, K., Maurice, C., Vernon, S.D., Sissoko, M., Greenberg, A.E., Wiktor, S.Z., Chorba, T.L., 1994, Assessing the relationship between HIV infection and cervical cancer in Cote d'Ivoire: a case-control study. *BMC Infect Dis* 10, 242.
- Aggarwal, B.B., 2003, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.
- Akasawa, A., Suda, T., Akashi, M., Narita, M., Ohya, Y., Manki, A., Watanabe, H., Kumaki, M., Matsumoto, K., Saito, H., 2009, [Prospective observational study of clinical course after stopping inhaled corticosteroids in child asthma]. *Arerugi* 58, 1407-1417.
- Al-Masri, A.N., Heidenreich, F., Walter, G.F., 2009, Interferon-induced Mx proteins in brain tissue of multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 16, 721-726.
- Almasan, A., Ashkenazi, A., 2003, Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 337-348.
- Alter, G., Suscovich, T.J., Teigen, N., Meier, A., Streeck, H., Brander, C., Altfeld, M., 2007, Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol* 178, 7658-7666.
- Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., Havlir, D.V., Richman, D.D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2000, HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192, 63-75.
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C.C., Censoplano, N., Chung, E., Reitano, K.N., Kottlilil, S., Goode, D.J., Fauci, A.S., 2008, HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9, 301-309.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1999, Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., Trinchieri, G., 2001, Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2, 1144-1150.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., Trinchieri, G., 2005, Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 201, 1157-1167.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F., Trinchieri, G., 2003, Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171, 6466-6477.

- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., Theofilopoulos, A.N., 2007, TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13, 543-551.
- Badley, A.D., Dockrell, D.H., Algeciras, A., Ziesmer, S., Landay, A., Lederman, M.M., Connick, E., Kessler, H., Kuritzkes, D., Lynch, D.H., Roche, P., Yagita, H., Paya, C.V., 1998, In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients. *J Clin Invest* 102, 79-87.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baron, M., Davignon, J.L., 2008, Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol* 181, 5530-5536.
- Baron, S., Tying, S.K., Fleischmann, W.R., Jr., Coppenhaver, D.H., Niesel, D.W., Klimpel, G.R., Stanton, G.J., Hughes, T.K., 1991, The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *Jama* 266, 1375-1383.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., Dasilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., Bhardwaj, N., 2005a, Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest*.
- Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., Bhardwaj, N., 2005b, Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115, 3265-3275.
- Bjorck, P., 2001, Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98, 3520-3526.
- Bleumink, M., 2011, Rocaglamide breaks TRAIL resistance in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma by translational suppression of c-FLIP expression. *Cell Death Differ* 18(2):362-70.
- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 2000, Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1785-1796.
- Boasso, A., Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., Shearer, G.M., 2007, HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109, 3351-3359.

- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., Stark, G.R., 2007, Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6, 975-990.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Oldstone, M.B., 1994, Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68, 6103-6110.
- Boxus, M., Willems, L., 2009, Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *Br J Cancer* 101, 1497-1501.
- Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., De Smedt, T., 2002, Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* 169, 6711-6719.
- Brenchley, J.M., Paiardini, M., Knox, K.S., Asher, A.I., Cervasi, B., Asher, T.E., Scheinberg, P., Price, D.A., Hage, C.A., Kholi, L.M., Khoruts, A., Frank, I., Else, J., Schacker, T., Silvestri, G., Douek, D.C., 2008, Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112, 2826-2835.
- Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B.R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J.N., Hecht, F.M., Picker, L.J., Lederman, M.M., Deeks, S.G., Douek, D.C., 2006, Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12, 1365-1371.
- Buimovici-Klein, E., Lange, M., Klein, R.J., Grieco, M.H., Cooper, L.Z., 1986, Long-term follow-up of serum-interferon and its acid-stability in a group of homosexual men. *AIDS Res* 2, 99-108.
- Camidge, D.R., Herbst, R.S., Gordon, M.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Durbin, B., Ing, J., Tohny, T.M., Sager, J., Ashkenazi, A., Bray, G., Mendelson, D., 2010, A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 16, 1256-1263.
- Canque, B., Rosenzweig, M., Camus, S., Yagello, M., Guigon, M., Gluckman, J.C., 1997, In vitro HIV infection of dendritic cell precursors. Effect on dendritic cell differentiation and function. *Adv Exp Med Biol* 417, 407-410.
- Cavaleiro, R., 2009, Major depletion of plasmacytoid dendritic cells in HIV-2 infection, an attenuated form of HIV disease. *PLoS Pathog.*
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 1999, Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D.W., Jacobs, B.S., Borden, E.C., 2002, IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J Immunol* 169, 847-855.

- Chehimi, J., Papasavvas, E., Tomescu, C., Gekonge, B., Abdulhaqq, S., Raymond, A., Hancock, A., Vinekar, K., Carty, C., Reynolds, G., Pistilli, M., Mounzer, K., Kostman, J., Montaner, L.J., 2010, Inability of plasmacytoid dendritic cells to directly lyse HIV-infected autologous CD4⁺ T cells despite induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* 84, 2762-2773.
- Chehimi, J., Starr, S.E., Kawashima, H., Miller, D.S., Trinchieri, G., Perussia, B., Bandyopadhyay, S., 1989, Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR⁺ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 68, 486-490.
- Chen, H., Wood, C., Petit, C.K., 2000, Comparisons of HIV-1 viral sequences in brain, choroid plexus and spleen: potential role of choroid plexus in the pathogenesis of HIV encephalitis. *J Neurovirol* 6, 498-506.
- Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D., Campbell-Hill, S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J., Kappes, J.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 1991, High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 324, 954-960.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al., 1986, Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Clemens, M.J., Williams, B.R., 1978, Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* 13, 565-572.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., Herbeval, J.P., 2010, Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood*.
- Cretney, E., Shanker, A., Yagita, H., Smyth, M.J., Sayers, T.J., 2006, TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 84, 87-98.
- de Heer, H.J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., 2004, Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine* 200, 89-98.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R., 2001, Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69, 912-920.
- Deeks, S.G., Kitchen, C.M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narvaez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., McGrath, M.S., Hecht, F.M., 2004, Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104, 942-947.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G., 1997a, The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against

- TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., Smith, C.A., 1997b, Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- Dinoso, J., 2008, A comparison of viral loads between HIV-1-infected elite suppressors and individuals who receive suppressive highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 47(1):102-4.
- Donaghy, H., 2003, Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101(11):4505-11.
- Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., Patterson, S., 2001, Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574-2576.
- Donaghy, H., Wilkinson, J., Cunningham, A.L., 2006, HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? *J Leukoc Biol* 80, 1001-1012.
- Donegan, E., Lee, H., Operskalski, E.A., Shaw, G.M., Kleinman, S.H., Busch, M.P., Stevens, C.E., Schiff, E.R., Nowicki, M.J., Hollingsworth, C.G., et al., 1994, Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion* 34, 478-483.
- Douek, D.C., 2002, The contribution of the thymus to immune reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 4, 425-426.
- Dyrhol-Riise, A.M., Stent, G., Rosok, B.I., Voltersvik, P., Olofsson, J., Asjo, B., 2001, The Fas/FasL system and T cell apoptosis in HIV-1-infected lymphoid tissue during highly active antiretroviral therapy. *Clin Immunol* 101, 169-179.
- Dyrhol-Riise, A.M., Voltersvik, P., Olofsson, J., Asjo, B., 1999, Activation of CD8 T cells normalizes and correlates with the level of infectious provirus in tonsils during highly active antiretroviral therapy in early HIV-1 infection. *Aids* 13, 2365-2376.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J., 2000, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- Emu, B., 2008, HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol* 82(11):5398-407.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y., Pulford, K., van den Oord, J.J., Desmet, V.J., 1988, Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 133, 15-21.
- Fallarino, F., Gizzi, S., Mosci, P., Grohmann, U., Puccetti, P., 2007, Tryptophan catabolism in IDO+ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab* 8, 209-216.

- Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., 2008, M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150-159.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., Griffith, T.S., 1999, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190, 1155-1164.
- Fauci, A.S., 1988, The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239, 617-622.
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., Zitvogel, L., 1999, Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-411.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., 2002, Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques Suppl*, 16-20, 22, 24-19.
- Flores-Villanueva, 2001, Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *PNAS* 98(9):5140-5.
- Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N.W., Herndier, B.G., Engleman, E.G., 2002, Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 76, 11033-11041.
- Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., Larsson, M., 2003, Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102, 4448-4455.
- Fonteneau, J.F., Larsson, M., Beignon, A.S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.J., Lifson, J.D., Littman, D.R., Bhardwaj, N., 2004, Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78, 5223-5232.
- Ford, E.S., Puroden, C.E., Sereti, I., 2009, Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 206-214.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., Lipp, M., 1999, CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H., 1992, Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495-499.
- Garcia, M.A., Meurs, E.F., Esteban, M., 2007, The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89, 799-811.
- Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V., Younes, A., 2005, Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured

- lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol* 130, 501-510.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., Trinchieri, G., 2005, The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174, 727-734.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., de The, G., 1985, Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407-410.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Jones, K.S., Pique, C., Hermine, O., 2010, Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7, 99.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., Hermine, O., 2006, Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80, 6844-6854.
- Gibson, S.J., Lindh, J.M., Riter, T.R., Gleason, R.M., Rogers, L.M., Fuller, A.E., Oesterich, J.L., Gorden, K.B., Qiu, X., McKane, S.W., Noelle, R.J., Miller, R.L., Kedl, R.M., Fitzgerald-Bocarsly, P., Tomai, M.A., Vasilakos, J.P., 2002, Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 218, 74-86.
- Gilliet, M., Liu, Y.J., 2002, Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 63, 1149-1155.
- Gloster, S.E., Newton, P., Cornforth, D., Lifson, J.D., Williams, I., Shaw, G.M., Borrow, P., 2004, Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *Aids* 18, 749-755.
- Gougeon, M.L., 2003, Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 3, 392-404.
- Gray, E.S., Moore, P.L., Choge, I.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G.M., Karim, S.S., Williamson, C., Morris, L., 2007, Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 81, 6187-6196.
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., Fanger, N.A., 1999, Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189, 1343-1354.
- Groot, F., van Capel, T.M., Kapsenberg, M.L., Berkhout, B., de Jong, E.C., 2006, Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* 108, 1957-1964.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., Picker, L.J., 2006, Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12, 289-295.

- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1997, The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.
- Gubernator, N.G., Zhang, H., Staal, R.G., Mosharov, E.V., Pereira, D.B., Yue, M., Balsanek, V., Vadola, P.A., Mukherjee, B., Edwards, R.H., Sulzer, D., Sames, D., 2009, Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* 324, 1441-1444.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.D., Coffman, R.L., Barrat, F.J., 2006, Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *The Journal of experimental medicine* 203, 1999-2008.
- Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E.A., Chodakewitz, J.A., 1997, Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 337, 734-739.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., Butcher, E.C., 2008, CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9, 1253-1260.
- Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., 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-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17453-17458.
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., Hartmann, G., 2003, Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63, 6478-6487.
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., Hall, W.W., 2006, Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 12, 466-472.
- Hayakawa, K., Nakagawa, K., 2004, Treatment of infected total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 14, 376-382.
- Hazenberg, M.D., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Lange, J.M., Hamann, D., Prins, M., Miedema, F., 2003, Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids* 17, 1881-1888.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

- 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-alpha. *Blood* 104, 17453-17458.
- Herbeuval, J.P., Boasso, A., Grivel, J.C., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Chougnet, C., Lifson, J.D., Shearer, G.M., 2005a, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105, 2458-2464.
- Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., Shearer, G.M., 2005b, CD4+ T cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type I interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*.
- Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., Shearer, G.M., 2005c, CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524-3531.
- Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Shearer, G.M., 2005d, Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13974-13979.
- Herbeuval, J.P., Lambert, C., Sabido, O., Cottier, M., Fournel, P., Dy, M., Genin, C., 2003, Macrophages From Cancer Patients: Analysis of TRAIL, TRAIL Receptors, and Colon Tumor Cell Apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 95, 611-621.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., Shearer, G.M., 2006, Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7000-7005.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Vaccari, M., Cecchinato, V., Valeri, V., Franchini, G., Andersson, J., Shearer, G.M., 2009, HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Aids* 23, 35-40.
- Herbeuval, J.P., Shearer, G.M., 2006, HIV-1 immunopathogenesis: How good interferon turns bad. *Clin Immunol*.
- Herbst, A.a., 2008, To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of Clinical Investigation* 118.
- Hino, S., 2011, Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87, 152-166.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989, An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-392.

- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M., 1995, Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.
- Hoenen, A., Liu, W., Kochs, G., Khromykh, A.A., Mackenzie, J.M., 2007, West Nile virus-induced cytoplasmic membrane structures provide partial protection against the interferon-induced antiviral MxA protein. *J Gen Virol* 88, 3013-3017.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., Taniguchi, T., 2004, Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15416-15421.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005, IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.
- Hotte, S.J., Winkquist, E.W., Lamont, E., MacKenzie, M., Vokes, E., Chen, E.X., Brown, S., Pond, G.R., Murgo, A., Siu, L.L., 2005, Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study. *J Clin Oncol* 23, 585-590.
- Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., 1999, Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 4, 563-571.
- Ihle, J.N., 1994, The Janus kinase family and signaling through members of the cytokine receptor superfamily. *Proc Soc Exp Biol Med* 206, 268-272.
- Ioannidis, J., 2001, Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med.* 135, 782-795.
- Isaacs, A.L., J. I., 1957, Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 147, 258-267.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., Fukuhara, S., 2001, Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166, 2961-2969.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., Gilliet, M., 2007, Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204, 105-115.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., Fitzgerald-Bocarsly, P., 2003, Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 74, 1125-1138.

- Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., Giavedoni, L.D., Lebon, P., Barre-Sinoussi, F., Benecke, A., Muller-Trutwin, M.C., 2009, Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* 119, 3544-3555.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., Banchereau, J., 2003, Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.
- Jeremias, I., Herr, I., Boehler, T., Debatin, K.M., 1998, TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 28, 143-152.
- Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L.G., Zhang, L., Perelson, A.S., Ho, D.D., 1999, Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189, 991-998.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., Ruscetti, F.W., 2008, Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14, 429-436.
- Journo, C., Douceron, E., Mahieux, R., 2009, HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* 4, 425-440.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y., Liu, Y.J., 2000, Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192, 219-226.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., Liu, Y.J., 2001, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-869.
- Katsikis, P.D., Garcia-Ojeda, M.E., Torres-Roca, J.F., Tijoe, I.M., Smith, C.A., Herzenberg, L.A., 1997, Interleukin-1 beta converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J Exp Med* 186, 1365-1372.
- Katze, M.G., He, Y., Gale, M., Jr., 2002, Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2, 675-687.
- Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., Fox, J.A., 2001, Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 31-38.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., 2003, IFN-lambdas mediate

- antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.
- Krueger, A., Fas, S.C., Giaisi, M., Bleumink, M., Merling, A., Stumpf, C., Baumann, S., Holtkotte, D., Bosch, V., Krammer, P.H., Li-Weber, M., 2006, HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* 107, 3933-3939.
- Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E.R., Colonna, M., Cella, M., 2003, Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 197, 899-906.
- Kuhlmann, A.S., Villaudy, J., Gazzolo, L., Castellazzi, M., Mesnard, J.M., Duc Dodon, M., 2007, HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4, 92.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., Delfraissy, J.F., 2005, HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 41, 1053-1056.
- Lande, R., Gafa, V., Serafini, B., Giacomini, E., Visconti, A., Remoli, M.E., Severa, M., Parmentier, M., Ristori, G., Salvetti, M., Aloisi, F., Coccia, E.M., 2008, Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 388-401.
- Lande, R., Gilliet, M., 2009, Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 89-103.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., Tough, D.F., 2001, Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.
- Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fatkenheuer, G., Wolf, J.S., van Lunzen, J., Romerio, F., 2010, Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *PLoS One* 5, e11110.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Reis e Sousa, C., Acha-Orbea, H., Reith, W., 2004, MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 899-908.
- Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J., Segal, D.M., 2004, TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 173, 1179-1183.
- Leong, S., Cohen, R.B., Gustafson, D.L., Langer, C.J., Camidge, D.R., Padavic, K., Gore, L., Smith, M., Chow, L.Q., von Mehren, M., O'Bryant, C., Hariharan, S., Diab, S., Fox, N.L., Miceli, R., Eckhardt, S.G., 2009, Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies: results of a phase I and pharmacokinetic study. *J Clin Oncol* 27, 4413-4421.

- Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., Haase, A.T., 2005, Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 434, 1148-1152.
- Li, X., 1996, Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon- α . *J Biol Chem* 271, 5790-5794.
- Liu, S., 2011, New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Curr Opin Immunol* 23, 57-64.
- Liu, Y.J., 2005, IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.
- Lopez, C., Fitzgerald, P.A., Siegal, F.P., 1983, Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon- α in vitro associated with severe opportunistic infections. *J Infect Dis* 148, 962-966.
- Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., Goh, L.E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H.J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L.A., van Kooyk, Y., Andersson, J., 2002, Accumulation of DC-SIGN⁺CD40⁺ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *Aids* 16, 683-692.
- Lum, J.J., Pilon, A.A., Sanchez-Dardon, J., Phenix, B.N., Kim, J.E., Mihowich, J., Jamison, K., Hawley-Foss, N., Lynch, D.H., Badley, A.D., 2001, Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T cells by TRAIL/Apo2l. *J Virol* 75, 11128-11136.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., Iwasaki, A., 2003, Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198, 513-520.
- Mahieux, R., 2011, [Virological aspects of HTLV-1 infection and new therapeutical concepts]. *Bull Soc Pathol Exot* 104, 181-187.
- Makino, M., Shimokubo, S., Wakamatsu, S.I., Izumo, S., Baba, M., 1999, The role of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected dendritic cells in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Virol* 73, 4575-4581.
- Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., Lebon, P., Nascimbeni, M., Perie, L., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Andrieu, T., Spreux-Varoquaux, O., Hosmalin, A., Le Grand, R., Vaslin, B., 2008, Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 112, 4598-4608.
- Mandl, J.N., Barry, A.P., Vanderford, T.H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F.J., Coffman, R.L., Staprans, S.I., Feinberg, M.B., 2008, Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* 14, 1077-1087.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., Battini, J.L., 2003, The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115, 449-459.

- Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J.M., Ramiro, A.R., Carrasco, Y.R., Lopez-Botet, M., Toribio, M.L., 1998, Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91, 2760-2771.
- Marriott, S.J., Semmes, O.J., 2005, Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 24, 5986-5995.
- Martinez, I., Melero, J.A., 2002, A model for the generation of multiple A to G transitions in the human respiratory syncytial virus genome: predicted RNA secondary structures as substrates for adenosine deaminases that act on RNA. *J Gen Virol* 83, 1445-1455.
- Matsuda, T., Almasan, A., Tomita, M., Uchihara, J.N., Masuda, M., Ohshiro, K., Takasu, N., Yagita, H., Ohta, T., Mori, N., 2005, Resistance to Apo2 ligand (Apo2L)/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis and constitutive expression of Apo2L/TRAIL in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines. *J Virol* 79, 1367-1378.
- Mazzoni, A., Leifer, C.A., Mullen, G.E., Kennedy, M.N., Klinman, D.M., Segal, D.M., 2003, Cutting edge: histamine inhibits IFN-alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 2269-2273.
- Melki, M.T., Saidi, H., Dufour, A., Olivo-Marin, J.C., Gougeon, M.L., 2010, Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog* 6, e1000862.
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., Micheau, O., 2006, Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26, 7046-7055.
- Meurette, O., Huc, L., Rebillard, A., Le Moigne, G., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M.T., 2005, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces necrosis-like cell death in tumor cells at acidic extracellular pH. *Ann N Y Acad Sci* 1056, 379-387.
- Migueles, S.A., 2000, HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *PNAS* 97(6):2709-14.
- Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C.S., Koutras, D.A., Chrousos, G.P., 2001, Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab* 12, 384-390.
- Miura, Y., Misawa, N., Maeda, N., Inagaki, Y., Tanaka, Y., Ito, M., Kayagaki, N., Yamamoto, N., Yagita, H., Mizusawa, H., Koyanagi, Y., 2001, Critical Contribution of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) to Apoptosis of Human CD4(+) T Cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID Mice. *J Exp Med* 193, 651-660.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., Koszinowski, U., Rocken, M., 2003, Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.

- Mom, C.H., Verweij, J., Oldenhuis, C.N., Gietema, J.A., Fox, N.L., Miceli, R., Eskens, F.A., Loos, W.J., de Vries, E.G., Sleijfer, S., 2009, Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. *Clin Cancer Res* 15, 5584-5590.
- Morrison, B.H., Bauer, J.A., Hu, J., Grane, R.W., Ozdemir, A.M., Chawla-Sarkar, M., Gong, B., Almasan, A., Kalvakolanu, D.V., Lindner, D.J., 2002, Inositol hexakisphosphate kinase 2 sensitizes ovarian carcinoma cells to multiple cancer therapeutics. *Oncogene* 21, 1882-1889.
- Mueller, N., Okayama, A., Stuver, S., Tachibana, N., 1996, Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1, S2-7.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M., 1994, Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Nagai, M., Kubota, R., Greten, T.F., Schneck, J.P., Leist, T.P., Jacobson, S., 2001, Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8⁺ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *J Infect Dis* 183, 197-205.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., Verma, I.M., 1996, Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-11388.
- Nascimbeni, M., Perie, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmman, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J., Marie, J.P., Molina, T.J., Pacanowski, J., Viard, J.P., Oksenhendler, E., Beq, S., Abehsira-Amar, O., Cheynier, R., Hosmalin, A., 2009, Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* 113, 6112-6119.
- Neagu, M.R., Ziegler, P., Pertel, T., Strambio-De-Castillia, C., Grutter, C., Martinetti, G., Mazzucchelli, L., Grutter, M., Manz, M.G., Luban, J., 2009, Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components. *J Clin Invest* 119, 3035-3047.
- Nestle, F.O., Gilliet, M., 2005, Defining upstream elements of psoriasis pathogenesis: an emerging role for interferon alpha. *J Invest Dermatol* 125, xiv-xv.
- Niessner, A., Sato, K., Chaikof, E.L., Colmegna, I., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2006, Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation* 114, 2482-2489.
- Ochando, J.C., Krieger, N.R., Bromberg, J.S., 2006, Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions during rejection and tolerization. *Am J Transplant* 6, 2488-2496.
- Okulicz, J.F., Marconi, V.C., Landrum, M.L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B.K., Dolan, M.J., 2009, Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term

- nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* 200, 1714-1723.
- Otero, M., Nunnari, G., Leto, D., Sullivan, J., Wang, F.X., Frank, I., Xu, Y., Patel, C., Dornadula, G., Kulkosky, J., Pomerantz, R.J., 2003, Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19, 1097-1103.
- Palmer, P., Charley, B., Rombaut, B., Daeron, M., Lebon, P., 2000, Antibody-dependent induction of type I interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II fcgamma receptor (CD32). *Virology* 278, 86-94.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M., 1997, The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
- Pandrea, I.V., Gautam, R., Ribeiro, R.M., Brenchley, J.M., Butler, I.F., Pattison, M., Rasmussen, T., Marx, P.A., Silvestri, G., Lackner, A.A., Perelson, A.S., Douek, D.C., Veazey, R.S., Apetrei, C., 2007, Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol* 179, 3035-3046.
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., Gotch, F., 2001, Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 75, 6710-6713.
- Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S., Adorini, L., 2002, Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1164-1171.
- Pereyra, F., Jia, X., McLaren, P.J., Telenti, A., de Bakker, P.I., Walker, B.D., Ripke, S., Brumme, C.J., Pulit, S.L., Carrington, M., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Heckerman, D., Graham, R.R., Plenge, R.M., Deeks, S.G., Gianniny, L., Crawford, G., Sullivan, J., Gonzalez, E., Davies, L., Camargo, A., Moore, J.M., Beattie, N., Gupta, S., Crenshaw, A., Burt, N.P., Guiducci, C., Gupta, N., Gao, X., Qi, Y., Yuki, Y., Piechocka-Trocha, A., Cutrell, E., Rosenberg, R., Moss, K.L., Lemay, P., O'Leary, J., Schaefer, T., Verma, P., Toth, I., Block, B., Baker, B., Rothchild, A., Lian, J., Proudfoot, J., Alvino, D.M., Vine, S., Addo, M.M., Allen, T.M., Altfeld, M., Henn, M.R., Le Gall, S., Streeck, H., Haas, D.W., Kuritzkes, D.R., Robbins, G.K., Shafer, R.W., Gulick, R.M., Shikuma, C.M., Haubrich, R., Riddler, S., Sax, P.E., Daar, E.S., Ribaud, H.J., Agan, B., Agarwal, S., Ahern, R.L., Allen, B.L., Altidor, S., Altschuler, E.L., Ambardar, S., Anastos, K., Anderson, B., Anderson, V., Andrady, U., Antoniskis, D., Bangsberg, D., Barbaro, D., Barrie, W., Bartczak, J., Barton, S., Basden, P., Basgoz, N., Bazner, S., Bellos, N.C., Benson, A.M., Berger, J., Bernard, N.F., Bernard, A.M., Birch, C., Bodner, S.J., Bolan, R.K., Boudreaux, E.T., Bradley, M., Braun, J.F., Brndjar, J.E., Brown, S.J., Brown, K., Brown, S.T., Burack, J., Bush, L.M., Cafaro, V., Campbell, O., Campbell, J., Carlson, R.H., Carmichael, J.K., Casey, K.K., Cavacuti, C., Celestin, G., Chambers, S.T., Chez, N., Chirch, L.M., Cimo, P.J., Cohen, D., Cohn, L.E., Conway, B., Cooper, D.A., Cornelson, B., Cox, D.T., Cristofano, M.V., Cuchural, G., Jr., Czartoski, J.L., Dahman, J.M., Daly, J.S., Davis, B.T., Davis, K., Davod, S.M., DeJesus, E., Dietz, C.A., Dunham, E., Dunn, M.E., Ellerin, T.B., Eron, J.J., Fangman, J.J., Farel, C.E., Ferlazzo, H., Fidler, S., Fleenor-Ford, A., Frankel, R., Freedberg, K.A., French, N.K., Fuchs, J.D., Fuller, J.D., Gaberman, J., Gallant, J.E.,

Gandhi, R.T., Garcia, E., Garmon, D., Gathe, J.C., Jr., Gaultier, C.R., Gebre, W., Gilman, F.D., Gilson, I., Goepfert, P.A., Gottlieb, M.S., Goulston, C., Groger, R.K., Gurley, T.D., Haber, S., Hardwicke, R., Hardy, W.D., Harrigan, P.R., Hawkins, T.N., Heath, S., Hecht, F.M., Henry, W.K., Hladek, M., Hoffman, R.P., Horton, J.M., Hsu, R.K., Huhn, G.D., Hunt, P., Hupert, M.J., Illeman, M.L., Jaeger, H., Jellinger, R.M., John, M., Johnson, J.A., Johnson, K.L., Johnson, H., Johnson, K., Joly, J., Jordan, W.C., Kauffman, C.A., Khanlou, H., Killian, R.K., Kim, A.Y., Kim, D.D., Kinder, C.A., Kirchner, J.T., Kogelman, L., Kojic, E.M., Korthuis, P.T., Kurisu, W., Kwon, D.S., LaMar, M., Lampiris, H., Lanzafame, M., Lederman, M.M., Lee, D.M., Lee, J.M., Lee, M.J., Lee, E.T., Lemoine, J., Levy, J.A., Llibre, J.M., Liguori, M.A., Little, S.J., Liu, A.Y., Lopez, A.J., Loutfy, M.R., Loy, D., Mohammed, D.Y., Man, A., Mansour, M.K., Marconi, V.C., Markowitz, M., Marques, R., Martin, J.N., Martin, H.L., Jr., Mayer, K.H., McElrath, M.J., McGhee, T.A., McGovern, B.H., McGowan, K., McIntyre, D., McLeod, G.X., Menezes, P., Mesa, G., Metroka, C.E., Meyer-Olson, D., Miller, A.O., Montgomery, K., Mounzer, K.C., Nagami, E.H., Nagin, I., Nahass, R.G., Nelson, M.O., Nielsen, C., Norene, D.L., O'Connor, D.H., Ojikutu, B.O., Okulicz, J., Oladehin, O.O., Oldfield, E.C., 3rd, Olender, S.A., Ostrowski, M., Owen, W.F., Jr., Pae, E., Parsonnet, J., Pavlatos, A.M., Perlmutter, A.M., Pierce, M.N., Pincus, J.M., Pisani, L., Price, L.J., Proia, L., Prokesch, R.C., Pujet, H.C., Ramgopal, M., Rathod, A., Rausch, M., Ravishankar, J., Rhame, F.S., Richards, C.S., Richman, D.D., Rodes, B., Rodriguez, M., Rose, R.C., 3rd, Rosenberg, E.S., Rosenthal, D., Ross, P.E., Rubin, D.S., Rumbaugh, E., Saenz, L., Salvaggio, M.R., Sanchez, W.C., Sanjana, V.M., Santiago, S., Schmidt, W., Schuitemaker, H., Sestak, P.M., Shalit, P., Shay, W., Shirvani, V.N., Silebi, V.I., Sizemore, J.M., Jr., Skolnik, P.R., Sokol-Anderson, M., Sosman, J.M., Stabile, P., Stapleton, J.T., Starrett, S., Stein, F., Stellbrink, H.J., Serman, F.L., Stone, V.E., Stone, D.R., Tambussi, G., Taplitz, R.A., Tedaldi, E.M., Telenti, A., Theisen, W., Torres, R., Tosiello, L., Tremblay, C., Tribble, M.A., Trinh, P.D., Tsao, A., Ueda, P., Vaccaro, A., Valadas, E., Vanig, T.J., Vecino, I., Vega, V.M., Veikley, W., Wade, B.H., Walworth, C., Wanidworanun, C., Ward, D.J., Warner, D.A., Weber, R.D., Webster, D., Weis, S., Wheeler, D.A., White, D.J., Wilkins, E., Winston, A., Wlodaver, C.G., van't Wout, A., Wright, D.P., Yang, O.O., Yurdin, D.L., Zabukovic, B.W., Zachary, K.C., Zeeman, B., Zhao, M., 2010, The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330, 1551-1557.

Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B.L., Wiegand, A., Rothchild, A.C., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M.S., Coffin, J.M., Walker, B.D., 2009, Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* 200, 984-990.

Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pacheco, Y., Lebecque, S., 2007, Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 178, 2763-2769.

Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A., 1996, Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Mier, J.W., Woods, A.M., Gallo, R.C., 1980, T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6815-6819.

- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., Gallo, R.C., 1981, Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268-271.
- Polek, T.C., Talpaz, M., Spivak-Kroizman, T., 2006, The TNF receptor, RELT, binds SPAK and uses it to mediate p38 and JNK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 125-134.
- Polson, A.G., Bass, B.L., Casey, J.L., 1996, RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 380, 454-456.
- Poulsen, A.G., Kvinesdal, B., Aaby, P., Molbak, K., Frederiksen, K., Dias, F., Lauritzen, E., 1989, Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa. *Lancet* 1, 827-831.
- Prechal, M., Pilz, A., Simma, O., Lingnau, K., von Gabain, A., Strobl, B., Muller, M., Decker, T., 2009, Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. *Vaccine* 27 Suppl 6, G17-20.
- Preble, O.T., Rothko, K., Klippel, J.H., Friedman, R.M., Johnston, M.I., 1983, Interferon-induced 2'-5' adenylylase in vivo and interferon production in vitro by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with and without circulating interferon. *J Exp Med* 157, 2140-2146.
- Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B., Catalan-Soares, B.C., Murphy, E.L., 2005, Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058-6068.
- Qi, Y., Martin, M.P., Gao, X., Jacobson, L., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., O'Brien, S.J., Trowsdale, J., Carrington, M., 2006, KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2, e79.
- Reeves, J.D., Doms, R.W., 2002, Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 83, 1253-1265.
- Regoes, R.R., Antia, R., Garber, D.A., Silvestri, G., Feinberg, M.B., Staprans, S.I., 2004, Roles of target cells and virus-specific cellular immunity in primary simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 78, 4866-4875.
- Riccioni, R., Pasquini, L., Mariani, G., Saulle, E., Rossini, A., Diverio, D., Pelosi, E., Vitale, A., Chierichini, A., Cedrone, M., Foa, R., Lo Coco, F., Peschle, C., Testa, U., 2005, TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 90, 612-624.
- Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., Dalgleish, A.G., 1990, In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 64, 5682-5687.
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., Petropoulos, C.J., 2003, Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4144-4149.

- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J., 1999, Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Robertson, J., 2002, Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71, 173-183.
- Robertson, N.M., Zangrilli, J.G., Steplewski, A., Hastie, A., Lindemeyer, R.G., Planeta, M.A., Smith, M.K., Innocent, N., Musani, A., Pascual, R., Peters, S., Litwack, G., 2002, Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival. *J Immunol* 169, 5986-5996.
- Romagnani, C., Della Chiesa, M., Kohler, S., Moewes, B., Radbruch, A., Moretta, L., Moretta, A., Thiel, A., 2005, Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4⁺ T helper cells and CD4⁺ CD25^{hi} T regulatory cells. *Eur J Immunol* 35, 2452-2458.
- Ronnblom, L., Ramstedt, U., Alm, G.V., 1983, Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur J Immunol* 13, 471-476.
- Roucoux, D.F., Wang, B., Smith, D., Nass, C.C., Smith, J., Hutching, S.T., Newman, B., Lee, T.H., Chafets, D.M., Murphy, E.L., 2005, A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis* 191, 1490-1497.
- Sabado, R., M, O.B., A, S., L, Q., N, H., E, T., O, D., A, S., J, F., KV, S., F, S., M, S., K, S., M, L., J, L., A, N., F, V., P, B., N., B., 2010, Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. **Blood** 16, 3839-3852.
- Saez-Cirion, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barre-Sinoussi, F., Delfraissy, J.F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A., 2007, HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6776-6781.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., Ogasawara, K., 2001, Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 31, 3138-3146.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T., 2000, Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13, 539-548.
- Schmidt, B., Ashlock, B.M., Foster, H., Fujimura, S.H., Levy, J.A., 2005, HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 343, 256-266.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L., Reimann, K.A., 1999, Control of viremia

- in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-860.
- Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., Munn, D.H., 2007, Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 2570-2582.
- Sharp, P.M., Robertson, D.L., Hahn, B.H., 1995, Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349, 41-47.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A., 1997, Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
- Shin, J.N., Park, S.Y., Cha, J.H., Park, J.Y., Lee, B.R., Jung, S.A., Lee, S.T., Yun, C.W., Seol, D.W., Kim, T.H., 2006, Generation of a novel proform of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein that can be reactivated by matrix metalloproteinases. *Exp Cell Res* 312, 3892-3898.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 1999, The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Siegal, F.P., Lopez, C., Fitzgerald, P.A., Shah, K., Baron, P., Leiderman, I.Z., Imperato, D., Landesman, S., 1986, Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *J Clin Invest* 78, 115-123.
- Silvestri, G., Fedanov, A., Germon, S., Kozyr, N., Kaiser, W.J., Garber, D.A., McClure, H., Feinberg, M.B., Staprans, S.I., 2005, Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts. *J Virol* 79, 4043-4054.
- Silvestri, G., Sodora, D.L., Koup, R.A., Paiardini, M., O'Neil, S.P., McClure, H.M., Staprans, S.I., Feinberg, M.B., 2003, Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18, 441-452.
- Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Loussert-Ajaka, I., Bartczak, S., Pepin, J.M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., Gastaut, J.A., et al., 1993, Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *Aids* 7, 1411-1417.
- Sivaraman, V., Zhang, L., Su, L., 2011, Type I interferon contributes to CD4+ T cell depletion induced by infection with HIV-1 in the human thymus. *J Virol* 85, 9243-9246.
- Smed-Sørensen, A., 2005, Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 79(14):8861-9.

- Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J.A., Liu, Y.J., 2001, Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906-912.
- Souquière, S., 2009a, Dynamic interaction between STLV-1 proviral load and T cell response during chronic infection and after immunosuppression in non-human primates. *Plos One*.
- Souquière, S., 2009b, T-cell tropism of simian T-cell leukemia virus type 1 and cytokine profiles in relation to proviral load and immunological changes during chronic infection of naturally infected mandrills. *J Med Primatol*.
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., van den Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H., de Jong, S., 2004, Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52, 821-831.
- Stary, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., Stingl, G., 2009, Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114, 3854-3863.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., Nagata, S., 1995, Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 154, 3806-3813.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S., 1993, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Takatsuki, T., 1977, Adult T-cell leukemia in Japan. *Topics in hematology*, 73-77.
- Theze, J., Chakrabarti, L.A., Vingert, B., Porichis, F., Kaufmann, D.E., 2011, HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clin Immunol* 141, 15-30.
- Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., Cohen, M., Eron, J., Hicks, C.B., Liao, H.X., Self, S.G., Landucci, G., Forthal, D.N., Weinhold, K.J., Keele, B.F., Hahn, B.H., Greenberg, M.L., Morris, L., Karim, S.S., Blattner, W.A., Montefiori, D.C., Shaw, G.M., Perelson, A.S., Haynes, B.F., 2008, Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82, 12449-12463.
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., Romeo, P.H., 2002, A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3, 477-482.
- Traugott, U., Lebon, P., 1988, Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 24, 243-251.
- Treilleux, I., Blay, J.Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.J., Barthelemy-Dubois, C., Lebecque, S., 2004,

- Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7466-7474.
- Ureta-Vidal, A., Angelin-Duclos, C., Tortevoeye, P., Murphy, E., Lepere, J.F., Buigues, R.P., Jolly, N., Joubert, M., Carles, G., Pouliquen, J.F., de The, G., Moreau, J.P., Gessain, A., 1999, Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer* 82, 832-836.
- van der Sloot, A.M., Tur, V., Szegezdi, E., Mullally, M.M., Cool, R.H., Samali, A., Serrano, L., Quax, W.J., 2006, Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8634-8639.
- Veazey, R.S., Lackner, A.A., 1998, The gastrointestinal tract and the pathogenesis of AIDS. *Aids* 12 Suppl A, S35-42.
- von Wussow, P., Jakschies, D., Hochkeppel, H., Horisberger, M., Hartung, K., Deicher, H., 1989, MX homologous protein in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32, 914-918.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., 1997, TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16, 5386-5397.
- Wallach, D., 1982, Regulation of susceptibility to natural killer cells' cytotoxicity and regulation of HLA synthesis: differing efficacies of alpha, beta, and gamma interferons. *J Interferon Res* 2, 329-338.
- Wandinger, K.P., Lunemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundstrom, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.D., Volk, H.D., Zipp, F., 2003, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361, 2036-2043.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., et al., 1995, Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Woelk, C.H., Frost, S.D., Richman, D.D., Higley, P.E., Kosakovsky Pond, S.L., 2007, Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals. *Gene* 397, 38-50.
- Yamaguchi, K., 1994, Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet* 343, 213-216.
- Yang, Y., Tikhonov, I., Ruckwardt, T.J., Djavani, M., Zapata, J.C., Pauza, C.D., Salvato, M.S., 2003, Monocytes Treated with Human Immunodeficiency Virus Tat Kill Uninfected CD4(+) Cells by a Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Induced Ligand-Mediated Mechanism. *J Virol* 77, 6700-6708.

- Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C.J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., Wagner, H., 2005, Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174, 6129-6136.
- Younes, A., 2010, Beyond chemotherapy: new agents for targeted treatment of lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 85-96.
- Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T., Gray, C.P., Hersey, P., 2000, Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* 164, 3961-3970.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., Veazey, R.S., Notermans, D., Little, S., Danner, S.A., Richman, D.D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H.L., Schacker, T.W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N.L., Wolinsky, S., Haase, A.T., 1999, Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 286, 1353-1357.

Annexes

Annexe 1 - Liste des communications scientifiques

ARTICLES

1) Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells.

Colisson R, **Barblu L**, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, Hermine O, Lepelletier Y, Herbeuval JP. **Blood**, 18 March 2010.

· co-first authorship

Figure 5 chosen for the cover page of Blood, 18 March 2010.

2) Novel homozygous substitution in Death Receptor 5 confers resistance to HIV-induced TRAIL apoptosis.

Barblu L, Durand S, Gras C, Lepelletier Y, Venet A, Boufassa F, Delfraissy JF, Cimorelli A, Lambotte O, Herbeuval JP. **Blood (under review)**.

3) Quantitative and qualitative characterization of plasmacytoid dendritic cells from HIV-infected controllers.

Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy JF, Boufassa F, Leal M, Ruiz-Mateos E, Lambotte O, Herbeuval JP for the EP36 study group. **Journal of Infectious Disease (under review)**.

4) Over-production of BAFF by myeloid cells during primary HIV/SIV infection correlates with early inflammation and polyclonal Ig production.

Burelout C, Chaoul N, **Barblu L**, Gilbert C, Goujard C, Paul S, Saoudin H, Proust A, Raphael M, Le Grand R, Herbeuval JP, and Richard Y. **PLoS Pathogens (under review)**.

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

1) **Barblu L.**, Gras C., Colisson R., Lepelletier Y. et Herbeuval JP. Tri-dimensional microscopy localization of TRAIL in plasmacytoid dendritic cells (pDC) following TLR7 stimulation by HIV-1. *12th cytokines meeting, Le Croisic (FRA), 18-20 may 2009. Poster session.*

2) **Barblu L**, Lepelletier Y, Gras C, Colisson R, Hadj-Slimane R, Venet A, Sinet M, Boufassa F, Delfraissy JF, Lambotte O, Herbeuval JP for the EP36 study group. Intracytoplasmic DR5 sequestration prevents HIV-1-induced CD4⁺ T cell depletion. *3rd ANRS forum, Institut Pasteur, Paris (FRA), 6-7 may 2010. Oral session.*

3) **Barblu L**, Lepelletier Y, Gras C, Colisson R, Hadj-Slimane R, Venet A, Sinet M, Boufassa F, Delfraissy JF, Lambotte O, Herbeuval JP for the EP36 study group. Activation of plasmacytoid dendritic cells under viral stimulations (HTLV-1 and HIV-1) – Relevance in

HIV-Controllers patients. *Meeting of young researchers in biology- René Descartes, Institut Pasteur, Paris (FRA), 29 september 2010. Oral session.*

4) Barblu L, Lepelletier Y, Gras C, Colisson R, Hadj-Slimane R, Venet A, Sinet M, Boufassa F, Delfraissy JF, Lambotte O, Herbeuval JP for the EP36 study group. Immune characterization of plasmacytoid dendritic cells in HIV-Controllers patients. *Keystone Symposium, Whistler (CAD), 20-25 march 2011. Poster session.*

RECOMPENSE

Lauréate 2010 de la Bourse l'OREAL FRANCE-UNESCO en association avec l'Académie des Sciences.

Résumé

Le développement d'une réponse innée est essentiel pour lutter contre les infections virales. Elle se traduit par la production de cytokines antivirales, parmi lesquelles les interférons-alpha (IFN- α). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont les principales cellules productrices d'IFN- α .

Nous avons démontré que les virus libres d'HTLV-1 induisaient une réponse innée se traduisant par une forte production d'IFN- α . Les pDC non stimulées sont dans un état de quiescence avec des taux du ligand pro-apoptotique TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) intracellulaire très élevés, rapidement mobilisés à la surface des pDC sous activation de la voie du Toll-like receptor 7. Les pDC acquièrent alors un phénotype de cellules tueuses, les IKpDC (Interferon producing killer pDC). C'est la première fois qu'une réponse innée induite par les particules libres d'HTLV-1 a été mise en évidence.

Il a été montré que des taux sériques d'IFN- α apparaissaient dans les phases tardives du SIDA, suggérant un rôle de l'IFN- α dans la pathologie du VIH. La voie d'apoptose régulée par TRAIL/DR5 est impliquée dans la déplétion massive des LTCD4⁺ des patients infectés par le VIH. Les patients « *HIV Controllers* » (HIC) sont des patients infectés par le VIH mais qui contrôlent la charge virale et la mort de leurs LTCD4⁺. Nous avons alors étudié la voie IFN/TRAIL/DR5 chez ces patients. Notre analyse protéomique et génomique de DR5 a révélé un défaut d'expression de DR5 à la surface des LTCD4⁺ des patients HIC par rapport aux patients virémiques. Le séquençage du gène DR5 a révélé l'existence d'une substitution homozygote dans l'exon 1 du gène des HIC. Cette substitution génomique a pour conséquence le changement d'un acide aminé dans la région leader de la protéine DR5 entraînant la séquestration intracellulaire de DR5. Cette mutation associée au profil des patients HIC pourrait expliquer le maintien du nombre de leurs LTCD4⁺, ainsi que la non-progression vers la phase SIDA.

Mots clés : cellules dendritiques plasmacytoïdes, interféron- α , apoptose, patients HIV-controllers.

Abstract

Innate immune response which is characterized by antiviral cytokines such as interferon-alpha (IFN- α), is essential during viral infections. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are the main IFN- α producer cells.

We demonstrated that HTLV-1 free viruses induced a strong IFN- α production by pDC. Unstimulated pDC were in fact dormant cells stocking intracellular proapoptotic ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), which was quickly mobilized at the cell surface of pDC after Toll-like receptor 7 activation. Then, pDC acquire a new killer phenotype, the IKpDC (Interferon producing killer pDC). This is the first demonstration that HTLV-1 free viruses can induce an innate immune response by pDC.

Plasma levels of IFN- α have been found in HIV-1-infected patients, suggesting a role of IFN- α in HIV-associated disease. We hypothesized in our HIV *in vitro* model the implication of TRAIL/DR5 pathway in CD4 T cells massive depletion observed in HIV-1-infected patients.

A population of HIV-infected patients, called « *HIV Controllers* » (HIC), do not progress to AIDS despite HIV infection, control their viral load and their CD4 T cells depletion. We have then study IFN/TRAIL/DR5 pathway of these patients. Our proteomic and genomic analysis revealed a default of DR5 expression at the cell surface of CD4 T cells from HIV controllers in contrast to progressor patients. DNA sequencing revealed a homozygous substitution in the exon 1 of DR5 gene from HIC. The consequence of this substitution is the change of one amino-acid in the leader region of DR5 protein. Thus, DR5 is uncleaved and is sequestered in the intracellular compartments in CD4 T cells. The lack of DR5 cell surface expression in HIV Controllers may explain the maintain of CD4⁺ T cells count and thus the non progression to AIDS.

Key words: plasmacytoid dendritic cells, interferon- α , apoptosis, HIV-controllers patients.