

3 Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
AhR	Récepteur d'aryl-hydrocarbone ; <i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AhRR	<i>AhR repressor</i>
AhRR	<i>Aryl-hydrocarbon receptor repressor</i>
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i>
AMP	Adénosine monophosphate
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AP-2 et AP-4	<i>Adaptator protein 2 et 4</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN Pol III	ARN polymérase III
ARNdb	ARN double brin
ARNg	ARN guides
ARNm	ARN messenger
ARNsb	ARN simple brin
ARNT = HIF-1 β	<i>AhR nuclear translocator</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
Bcl-10	<i>B-cell lymphoma 10</i>
BCR	Récepteur des cellules B
BMDC	DC dérivés de moelle osseuse murine ; <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
BMDM	Macrophages dérivés de moelle osseuse murine ; <i>bone marrow-derived macrophages</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCL1	<i>C-C motif chemokine ligand 1</i>
CD	Cluster de différenciation
Cellule B	Lymphocyte dont le développement s'achève dans la moelle osseuse, B est l'abréviation de « bourse de Fabricius »
Cellule T	Lymphocyte dont le développement s'achève dans le thymus
Cellule Th1	<i>Type 1 helper T cells</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CHUK = IKK α	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
CLR	Récepteur de lectine de type C ; <i>C-type lectin receptors</i>
COP	<i>Coat protein</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
CYP1A1	Cytochrome P450 famille 1 sous-famille A membre 1
CYP1B1	Cytochrome P450 famille 1 sous-famille B membre 1
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAMP	Motif moléculaire associés aux dégâts ; <i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	Cellules dendritiques ; <i>dendritic cells</i>

DDX41	<i>DEAD-Box helicase 41</i>
DIM	3,3'-diindolométhane
Dll	<i>Distal-less</i>
DLX1	<i>Distal-less homeobox 1</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
ECD	Ectodomaine
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EndoH	Endoglycosidase H
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FICZ	Formylindolo[3,2-b]carbazole
GFP	Protéine fluorescente verte ; <i>green fluorescent protein</i>
GMP	Guanosine monophosphate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3 β</i>
H3N2	Hémagglutinine 3 et neuraminidase 2
HCV	Virus de l'hépatite C
HEK293	Lignée cellulaire de rein d'embryon humain 293T ; <i>human embryonic kidney 293</i>
HEK293T	HEK293, exprimant l'antigène T large de SV40
HeLa	Lignée de cellules d'Henrietta Lacks
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
I3A	Indole-3-aldéhyde
I3C	Indole-3-carbinol
ICER	<i>Inducible cAMP early repressor</i>
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygénase
IFI-16	<i>Gamma-interferon-inducible protein Ifi-16</i>
IFNAR1	<i>IFN-α receptor 1</i>
IFN β	Interféron β
IKK ϵ = IKKi	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukine
IL-18R	Récepteurs de l'IL-18
IL-1R	Récepteurs de l'IL-1
INAM	<i>IRF3-dependent NK-activating molecule</i>
IP-10	Protéine induite par l'IFN γ 10
IPAF	<i>Ice protease-activating factor</i>
IRAK4	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factors</i>
ISRE	<i>Interferon-sensitive response elements</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinases</i>

KLF6	<i>Kruppel-like factor 6</i>
KO	Knock-out
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LINE-1	<i>Long interspersed nuclear element-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LRRC59	<i>Leucine rich repeat containing 59</i>
MAL = TIRAP	<i>MyD88 adapter-like protein</i>
MALT1	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAMP	Motifs moléculaire associés aux microbes ; <i>microbes-associated molecular pattern</i>
MAP kinases = MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MDDC	Cellules dendritiques dérivées de monocytes ; <i>monocyte derived dendritic cells</i>
MDM	Macrophages dérivés de monocyte
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
miARN	Micro-ARN
MRE11	<i>Meiotic recombination 11 homolog 1</i>
MUC1	<i>Mucin-1</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NACHT	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein, CMH class II transcription activator, incompatibility locus protein from Podospora anserina et telomerase-associated protein</i>
NAP1	<i>NF-κB-activating kinase-associated protein 1</i>
NAS	<i>Nucleic acid sensors</i>
NC-XRE	Nouveau XRE consensus
NEMO = IKK γ	<i>NF-κB essential modifier</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor binding near the κ light-chain gene in B cells</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Récepteurs de type NOD ; <i>NOD-like receptors</i>
NLRP	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NS	Protéine non-structurale
PAMP	Motifs moléculaires présents sur les pathogènes ; <i>pathogen associated molecular patterns</i>
pb	Paires de base
PCB	Polychlorobiphényles
PD-1	<i>Programmed death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death 1 ligand 1</i>
Peli1	<i>Pellino1</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PKR	Récepteur protéine kinase
poly-ICLC	Poly I:poly C avec un stabilisant en poly-1-lysine
poly(I:C)	Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR	Récepteurs détectant des motifs ; <i>pattern recognition receptor</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RelBAhRE	Élément de réponse à RelB:AhR
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RLR	Récepteurs de type RIG-I ; <i>RIG-I-like receptors</i>
RSA	<i>Redundant siRNA activity</i>
S100A9	<i>S100 calcium binding protein A9</i>
siARN	Petits ARN interférents ; <i>small interfering ARN</i>
SIKE	<i>Suppressor of IKKε</i>
SNC	Système nerveux central
SOD1	Superoxide dismutase 1
Souris 3d	Souris triplement déficientes
STING	Protéine stimulant les gènes de l'interféron ; <i>stimulator of interferon genes</i>
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>
syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK1	<i>TGF-β-activated kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated NF-kappa-B activator</i>
TBK1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TDO2	Tryptophane-2,3-dioxygénase
TGF-β	<i>Transforming growth factor</i>
TIPARP	<i>TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR3	Récepteur de type toll numéro 3 ; <i>toll like receptor 3</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factors</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
Treg	Cellules T régulatrices
TRIF = TICAM1	<i>TIR-containing adaptor molecule-1</i>
UNC93B1	<i>Uncoordinated-93 homolog B1</i>
UVB	Ultraviolets B
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WDFY1	Contenant des répétitions WD et un domaine FYVE
XAP2	<i>Hepatitis B virus X-associated protein 2</i>

XRE	Élément de réponse aux xénobiotiques ; <i>xenobiotic response element</i>
YY1	<i>Yinyang1</i>

Rapport-gratuit.com 
 LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

4 Table des matières

1	<i>Remerciements</i>	<i>iii</i>
2	<i>Résumé</i>	<i>v</i>
3	<i>Abréviations</i>	<i>vii</i>
4	<i>Table des matières</i>	<i>xii</i>
5	<i>Introduction</i>	<i>1</i>
5.1	L'activation du système immunitaire	2
5.1.1	Les motifs moléculaires déclenchant une réponse immunitaire	3
5.1.2	Les récepteurs intracellulaires détectant les motifs moléculaires	4
5.2	Le récepteur de type Toll 3	10
5.2.1	La découverte de TLR3	10
5.2.2	La structure de TLR3.....	11
5.2.3	Les modifications post-traductionnelles de TLR3	18
5.2.4	La localisation cellulaire de TLR3 et son trafic.....	19
5.2.5	La cascade de signalisation initiée par TLR3	25
5.2.6	La régulation de l'activité de TLR3.....	35
5.2.7	L'impact de la signalisation par TLR3.....	38
5.3	Le récepteur d'aryl-hydrocarbène	49
5.3.1	Les mécanismes d'activation d'Ahr	49
5.3.2	Les ligands d'Ahr.....	50
5.3.3	L'impact de la signalisation par Ahr	52
6	<i>Hypothèse de travail et objectifs</i>	<i>59</i>
6.1	Hypothèse de travail	59
6.2	Objectifs	59
7	<i>Article et résultats</i>	<i>60</i>
8	<i>Discussion</i>	<i>98</i>
8.1	Le modèle expérimental utilisé	98
8.1.1	Le principe d'un crible génétique.....	98
8.1.2	Les avantages des cribles génétiques par CRISPR/Cas9.....	99
8.1.3	Les défauts inhérents aux cribles génétiques CRISPR/Cas9	99
8.1.4	Le choix de la lignée cellulaire.....	101

8.1.5	Le choix de la bibliothèque d'ARNg	101
8.2	Les protéines requises pour la voie de signalisation de TLR3	102
8.2.1	Les protéines issues du crible jouant un rôle dans la voie TLR3-NF- κ B	102
8.2.2	Le choix des candidats à valider.....	102
8.3	La validation des candidats.....	103
8.3.1	La réalisation d'un test sur 80 lignées.....	103
8.3.2	Les protéines AhR, DLX1 et SOD1 sont des membres de la voie TLR3.....	104
8.4	Résumé et conclusion	109
9	<i>Bibliographie</i>.....	110
10	<i>Table des Figures</i>.....	145
11	<i>Table des Tableaux</i>.....	145
12	<i>Annexe</i>.....	146

5 Introduction

Le système immunitaire défend l'intégrité de l'organisme face aux infections et aux maladies. Son activation repose en partie sur la détection d'éléments étrangers, ou inconnus, provenant de microorganismes ou de la dérégulation de l'organisme. La réponse immunitaire est composée d'une réponse innée et d'une réponse adaptative. La première, préexistante, est activée par des éléments du non-soi. Les senseurs impliqués reconnaissent des éléments partagés par des classes entières de pathogènes, et déclenchent une réponse à large spectre. L'immunité adaptative en revanche est hautement spécifique. Elle est initiée par la réponse innée, et nécessite un temps de maturation pour sa mise en place initiale.

La notion d'immunité évolue constamment afin d'intégrer les nouveaux concepts découverts. Les différents modèles reposent sur le principe central que la détection d'un pathogène initie une réponse conduisant à la destruction du pathogène. Un événement important pour le déclenchement de la réponse immunitaire est donc la détection de motifs moléculaires présents sur les pathogènes (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) (Medzhitov et Janeway 2000). Cette détection est orchestrée par des récepteurs reconnaissant ces motifs (*pattern recognition receptor*, PRR) (Medzhitov et Janeway 2000). Les motifs détectés sont partagés par de nombreux pathogènes et conservés évolutivement, ce qui rend les PRR efficaces et capables de détecter de très larges gammes de dangers potentiels. La quarantaine de PRR connus se trouvent dans diverses localisations, notamment la membrane cytoplasmique, le cytosol ou des compartiments spécialisés (Rabeony *et al.* 2015). Ils reconnaissent des molécules différentes, qui peuvent être des lipides, des protéines, des acides nucléiques ou des glucides. Les PRR sont finement régulés, ce qui évite une activation inappropriée du système immunitaire qui serait néfaste pour l'organisme.

Ma thèse porte sur un PRR particulier appelé récepteur de type toll 3 (*toll like receptor 3*, TLR3), et plus particulièrement sur l'identification de nouveaux facteurs régulant son activation. TLR3 est un récepteur actif uniquement dans des compartiments acides de la cellule, appelés endosomes. Capable de reconnaître l'acide ribonucléique (ARN) double brin (ARNdb), TLR3 joue un rôle important en cas d'infection virale. Il est produit au niveau du réticulum endoplasmique (RE), et son acheminement jusqu'aux endosomes est encore mal connu. La cascade de signalisation déclenchée par TLR3 aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron β (IFN- β), qui ont une action antivirale. Bien que certaines protéines impliquées dans la voie de signalisation du TLR3 soient communes à celles d'autres

TLR, d'autres protéines et modulateurs spécifiques de la voie TLR3 restent encore méconnus. Le but de ma thèse a donc été d'identifier de nouvelles protéines nécessaires à la voie TLR3, que ce soit en amont de l'activation ou bien en aval de la voie de signalisation. Pour cela, j'ai utilisé une méthode de criblage haut débit, permettant de tester le rôle d'environ 20 000 gènes dans la voie de signalisation de TLR3.

Suite à ce préambule, vous trouverez l'introduction de mon travail, dans laquelle je décris plus en détail les concepts de PAMP et de PRR, ainsi que le récepteur TLR3 et sa voie de signalisation. Le facteur de transcription et récepteur d'aryl-hydrocarbène (*aryl hydrocarbon receptor*, AhR), auquel je me suis plus particulièrement intéressé, sera aussi présenté.

5.1 L'activation du système immunitaire

Le modèle initial d'activation du système immunitaire est appelé « soi/non-soi », et met en opposition le soi, qui est toléré, avec le non-soi, qui est attaqué et détruit (Burnet et Fenner 1951; Burnet 1969). Cette théorie est basée sur une reconnaissance hautement spécifique et unique de chaque pathogène par ce qui est aujourd'hui appelé l'immunité adaptative. Suite à la découverte de la possibilité pour des cellules du soi non spécifiques de pathogènes en particulier, de reconnaître les pathogènes, ce qui n'était pas prévu par le modèle soi/non-soi, Charles Janeway propose le modèle du non-soi infectieux (Janeway 1989). Ce nouveau modèle fait intervenir les PRR, encodés dans la lignée germinale. Au lieu d'être spécifiques d'un seul pathogène, les PRR détectent les PAMP qui sont partagés par de nombreuses classes de pathogènes. Dans ce modèle, les PAMP sont des marqueurs de non-soi, permettant l'activation du système immunitaire contre les antigènes associés aux PAMP. Ce modèle présente des lacunes, et ne peut expliquer à lui seul l'absence de réponse à la flore commensale (qui exprime pourtant des PAMP), ni l'auto-immunité dirigée contre des cellules du soi.

Polly Matzinger propose un nouveau modèle dans lequel elle inclut la notion de danger (Matzinger 1994). Le système immunitaire serait alors capable de distinguer le dangereux du bénin, au moyen de la détection de pathogènes ou de signaux de danger spécifiques produits par les cellules et tissus endommagés. Ce modèle donne une place importante au tissu sain qui joue alors un rôle clef dans la tolérance aux protéines du soi. Ce modèle est complété par les motifs moléculaires associés aux dégâts (*damage-associated molecular pattern*, DAMP) (Seong et Matzinger 2004). Cela élargit le modèle dans le sens où non seulement il existe des

signaux spécifiquement produits lors de stress, mais toute molécule anormalement présente, non-fonctionnelle ou dénaturée constitue un DAMP susceptible de stimuler le système immunitaire de la même façon que les PAMP. L'activation du système immunitaire inné par un PAMP ou DAMP permet la production d'un second signal (l'antigène étant le premier signal) nécessaire au déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

Il est maintenant théorisé que le système immunitaire serait avant tout capable de détecter des changements et de s'adapter en cas d'exposition prolongée à certains antigènes (Pradeu, Jaeger et Vivier 2013; Eberl 2016; Pradeu et Vivier 2016). De nombreux mécanismes de contrôle à l'échelle intracellulaire comme intercellulaire ont aussi été décrits, permettant de moduler, voire d'inhiber la réponse immunitaire à l'échelle de la cellule ou du tissu en fonction du contexte. L'équilibre entre la tolérance et la perturbation est maintenant au cœur des modèles utilisés pour décrire la tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou des tumeurs. Le contrôle de cet équilibre permettrait de mieux combattre les cancers ou, à l'opposé, de mieux contrôler les pathologies auto-immunes.

Une des perturbations les plus étudiées dans le cadre de la stimulation du système immunitaire reste la détection des PAMP par les PRR.

5.1.1 Les motifs moléculaires déclenchant une réponse immunitaire

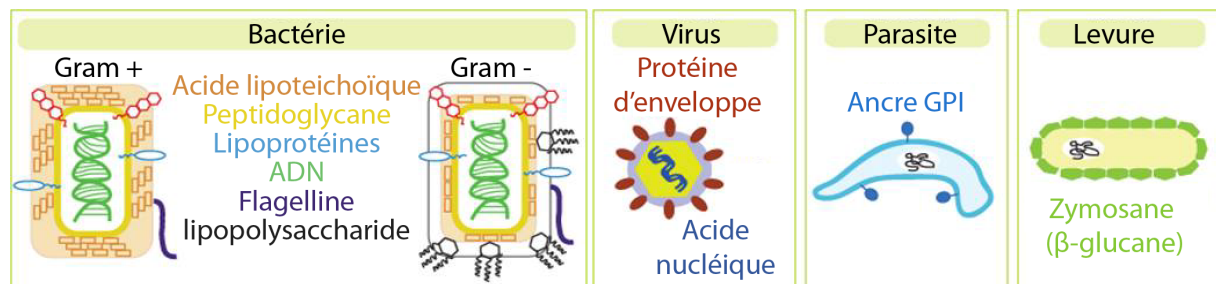


Figure 1 : Les différentes familles de PAMP et leur origine.

Les PAMP sont présents dans les microorganismes comme les bactéries, les virus, les parasites, les levures et les champignons (non représentés ici). Ces motifs sont majoritairement spécifiques des microorganismes et donc absents de l'hôte. Ils sont essentiels à la survie des microorganismes et sont donc peu sujets aux changements (d'après « Pattern recognition receptor (PRRs) ligands » de Rossana Zaru ; EMBL-EBI, UK). GPI : glycosylphosphatidylinositol

5.1.1.1 Les motifs moléculaires présents sur les pathogènes

Les PAMP sont considérés comme des marqueurs d'infection. Ces motifs moléculaires du non-soi sont des composants essentiels des pathogènes, ce qui les rend stables dans le temps

malgré la pression de sélection négative exercée par le système immunitaire de l'hôte. Les PAMP ont aussi la particularité d'être partagés par de nombreux organismes, et donc un unique récepteur peut détecter divers pathogènes. Les PAMP permettent l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, responsables de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les grandes familles de PAMP connues sont décrites dans la Figure 1. On retrouve des molécules absentes des cellules hôtes, comme le peptidoglycane ou le lipopolysaccharide (LPS), mais aussi des molécules naturellement présentes dans les cellules hôtes, comme l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'ARN. Cependant, seules certaines formes d'ARN sont détectées, comme l'ARNdb, normalement absent des cellules. La compartimentalisation, c'est-à-dire le fait que les molécules (dont les PRR) et systèmes fonctionnels soient séparés par des membranes au sein des cellules eucaryotes, permet aussi d'éviter la détection de motifs du soi. Ainsi, l'ADN nucléaire n'est pas détecté par les senseurs cytosoliques d'ADN, et l'ADN détecté sera nécessairement le marqueur d'une infection ou d'un stress cellulaire.

5.1.1.2 Les autres motifs moléculaires détectés

Les PAMP sont supposément spécifiques des pathogènes infectieux, or ces motifs sont partagés avec d'autres organismes non-pathogéniques, tels que les bactéries commensales. Même si le terme « motif moléculaire associé aux microbes » (*microbes-associated molecular pattern*, MAMP) permet de rester neutre quant à la nocivité du microorganisme (Didierlaurent, Simonet et Sirard 2005), c'est le terme PAMP qui reste le plus utilisé, de manière souvent abusive.

Il arrive aussi qu'en l'absence d'infection, des motifs moléculaires déclenchant l'activation des PRR soient présents, comme cela a été décrit précédemment sous le terme de DAMP. Il peut s'agir de résidus de cellules nécrotiques, d'acides nucléiques, voire de molécules immunostimulatrices spécifiques à l'organisme (ex. : Hsp70, hyaluron). Les DAMP sont des marqueurs de stress cellulaire. Ils induisent aussi une réponse immunitaire, qui peut être dommageable pour l'organisme et pourrait être responsable des maladies auto-immunes.

5.1.2 Les récepteurs intracellulaires détectant les motifs moléculaires

Les PRR regroupent les protéines responsables de la détection des PAMP et des DAMP. Les premiers PRR ont été identifiés dans les plantes et les drosophiles (Song *et al.* 1995; Lemaitre *et al.* 1996). Il s'agit, comme précisé plus haut, de récepteurs encodés dans la lignée germinale et donc immuables au cours de la vie de l'organisme. Ces détecteurs ont une séquence

fixe assurant la reconnaissance de certains motifs prédéfinis. En fonction du PRR impliqué, la réponse initiée suite à la reconnaissance de DAMP/PAMP varie. Ainsi les PRR activés par la présence anormale d'acides nucléiques dans la cellule, souvent attribuable à une infection virale, initient une réponse antivirale avec la production d'interféron (IFN) de type 1. De plus, de nombreux types cellulaires, dont les cellules immunitaires, expriment de multiples types de PRR, pouvant entraîner des réponses cellulaires différentes. L'activation d'un PRR induit une maturation des cellules immunitaires et l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative.

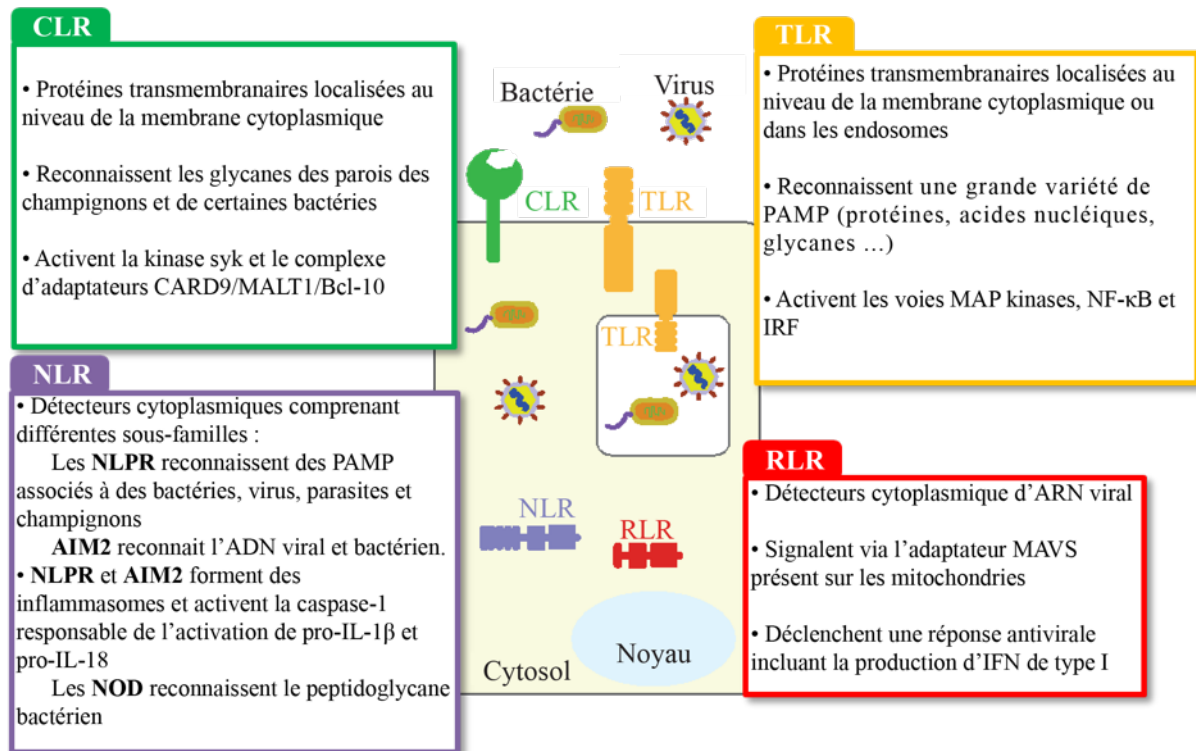


Figure 2 : Les quatre familles classiques de PRR.

Ces quatre familles de PRR diffèrent par les ligands reconnus, leur localisation, et les signaux induits. Les pathogènes sont susceptibles de déclencher plusieurs réponses via différents PRR qui agissent de manière synergique. Les PRR cytoplasmiques détectant l'ADN ne sont pas présents sur ce schéma simplifié. CARD9 : caspase recruitment domain 9 ; MALT1 : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 ; Bcl-10 : B-cell lymphoma 10 ; syk : spleen tyrosine kinase ; NLRP : NOD-like receptor family, pyrin domain containing ; MAP kinases : mitogen-activated protein kinases ; NF-κB : nuclear factor binding near the κ light-chain gene in B cells ; IRF : interferon regulatory factors ; MAVS mitochondrial antiviral-signaling protein (d'après « Pattern recognition receptor (PRRs) ligands » de Rossana Zaru ; EMBL-EBI, UK).

Les PRR sont répartis en différents groupes, selon leurs similitudes (voir Figure 2) et leur localisation. Parmi les PRR cellulaires, on retrouve classiquement le groupe des récepteurs de lectine de type C (*C-type lectin receptors*, CLR) et des TLR qui sont ancrés dans les membranes. Le groupe des PRR cytoplasmiques regroupe les RLR, ou récepteurs de type RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) (*RIG-I-like receptors*, RLR), les NLR ou récepteurs de type NOD

(*nucleotide-binding oligomerization domain*) (*NOD-like receptors*, NLR) ainsi que d'autres senseurs d'ADN cytosolique (voir la Figure 3) comme AIM2 (*absent in melanoma 2*) ou cGAS (*cyclic guanosine monophosphate (GMP)-adenosine monophosphate (AMP) synthase*).

5.1.2.1 Les récepteurs de lectines de type C

Les CLR sont des récepteurs possédant un domaine de détection des glucides (*carbohydrate recognition domains*, CRD). Certains CLR ne reconnaissent pas de glucides mais présentent tout de même des domaines similaires (Zelensky et Gready 2005). Les CLR peuvent être regroupés en trois classes selon qu'ils induisent une signalisation médiée par un domaine activateur ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), par un inhibiteur ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) ou autre. Les motifs ITAM induisent l'activation des voies de signalisation NF- κ B (*nuclear factor binding near the κ light-chain gene in B cells*) et MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'activation du système immunitaire (Hoving, Wilson et Brown 2014).

5.1.2.2 Les récepteurs de types Toll

Le récepteur Toll original a été identifié chez *Drosophila melanogaster*. Il possède un double rôle puisqu'il est important à la fois dans la morphogénèse lors de l'embryogénèse mais aussi dans la réponse immunitaire après la naissance de l'individu (Lemaitre *et al.* 1996; Anderson, Bokla et Nüsslein-Volhard 1985).

Ces cinq premiers TLR humains furent identifiés et nommés ainsi en raison de leur homologie de séquence avec le gène Toll de *Drosophila melanogaster* (Rock *et al.* 1998). Il existe actuellement 27 TLR, de 1 à 16 et de 18 à 28 (le TLR 17 ne faisant référence qu'à un primer utilisé dans le but d'identifier une séquence qui ne fut pas détaillée (H. Zhang *et al.* 2001)). Seuls les TLR 1 à 10 sont présents chez l'homme. Les TLR1 à 9 et 11 à 13 sont présents chez la souris et les autres TLR sont présents chez des espèces de poissons, de reptiles ou d'oiseaux (J. Zhang *et al.* 2013). Il est important de noter que bien que le nombre de TLR aille jusqu'à 28, certains sont redondants et très proches des TLR 1 à 10. Les TLR sont des protéines transmembranaires capables d'initier une réponse inflammatoire et antivirale via des adaptateurs spécifiques TRIF (*Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain-containing adapter-inducing interferon- β*), aussi appelé TICAM1, et MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*). Comme indiqué dans le Tableau 1, les TLR sont répartis en deux catégories selon leur localisation, à la surface de la cellule ou dans les endosomes qui sont des

compartiments intracellulaires. Les TLR de surface 1, 2, 6 et potentiellement 10 ont la capacité de former des hétérodimères avec le TLR2. Les TLR endosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) sont aussi les seuls TLR spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques. Leur compartimentalisation permet d'éviter le déclenchement inopportun d'une réponse inflammatoire (B. L. Lee et Barton 2014). À la différence des TLR et des CLR qui détectent les DAMP/PAMP présents dans le milieu extérieur, il existe des senseurs cytosoliques assurant la détection de DAMP/PAMP dans le milieu intracellulaire.

Tableau 1 : Liste des TLR humains

Adapté de <https://www.cell.com/pb-assets/products/nucleus/nucleus-phagocytes/rnd-systems-tlr-br.pdf?code=cell-site> ; et (Doan et al. 2013).

Récepteurs	Adaptateurs	Localisation	Ligands	Origine des ligands
TLR 1 avec TLR 2	MyD88, MAL	Membrane cytoplasmique	Triacyl-lipopeptides	Bactéries
TLR 2	MyD88, MAL	Membrane cytoplasmique	Lipoprotéines Peptidoglycanes Porines Zymosane (β -glucane) GPI-mucine Glycoprotéine d'enveloppe	Divers pathogènes Bactéries Bactéries Champignons Protozoaires Virus
TLR 3	TRIF	Voie endosomale	ARNdb	Virus
TLR 4	MyD88, MAL, TRIF, TRAM	Membrane cytoplasmique	Lipopolysaccharide Glyco-inositol-phospholipides Protéines de choc thermique Glycoprotéine d'enveloppe	Bactéries Protozoaires Bactéries et origine endogène Virus
TLR 5	MyD88	Membrane cytoplasmique	Flagelline	Bactéries
TLR 6 avec TLR 2	MyD88, MAL	Membrane cytoplasmique	Diacyl-lipopeptides Acide lipotéichoïque	Bactéries Bactéries
TLR 7	MyD88	Voie endosomale	ARNsb	Virus
TLR 8	MyD88	Voie endosomale	ARNsb	Virus
TLR 9	MyD88	Voie endosomale	ADN non-méthylé contenant des CpG ADN mitochondrien	Bactéries et virus Origine endogène
TLR 10 avec TLR 2		Membrane cytoplasmique	Triacyl-lipopeptides	Bactéries

5.1.2.3 Les récepteurs de type NOD

Les NLR sont des PRR cytoplasmiques possédant une structure commune organisée autour du domaine NACHT (*neuronal apoptosis inhibitory protein, major histocompatibility complex class II transcription activator, incompatibility locus protein from *Podospora anserina* et telomerase-associated protein*). La plupart des NLR possèdent aussi un domaine contenant des motifs répétés riches en leucine (*leucine-rich repeat*, LRR) C-terminal. Le domaine NACHT est responsable de l'homo-dimérisation des NLR, tandis que les LRR assurent la détection des ligands (Franchi *et al.* 2009). Les NLR peuvent être subdivisés en trois familles en se basant sur leurs séquences : les NOD, les NLRP (*NOD-like receptor family, pyrin domain-containing*) et les IPAF (*ice protease-activating factor*) (Rose et Mackay 2006). Les NOD, et particulièrement NOD1 et 2, reconnaissent les peptidoglycanes cytosoliques et déclenchent l'activation de la voie NF- κ B et MAPK entraînant la production de cytokines inflammatoires (G. Chen 2009). Les NLRP et IPAF sont des composants de l'inflammasome et leur activation est déclenchée par de nombreux ligands, issus de pathogènes cytoplasmiques, mais aussi des fragments de silice ou d'amiante (G. Chen 2009). Un fois activé, un adaptateur contenant un domaine de recrutement des caspases (*caspase recruitment domain*, CARD) est recruté. Ce qui résulte en la liaison et l'activation de la caspase-1 dans ce complexe appelé inflammasome (Schroder et Tschopp 2010). Une fois la caspase-1 activée, la pro-interleukines (IL)-1 β et la pro-IL-18 sont alors clivées et sécrétées. Les fonctions des NLR sont complémentaires de celles d'autres PRR, comme les TLR, afin d'assurer la sécrétion d'IL-1 β (G. Chen 2009). De par leur capacité à induire la formation d'inflammasome, les senseurs cytoplasmiques d'ADN AIM2 et IFI-16 (*gamma-interferon-inducible protein Ifi-16*) sont parfois associés aux NLR. Les autres PRR présents dans le cytoplasme sont aussi spécialisés dans la détection d'acides nucléiques.

5.1.2.4 Les récepteurs de type RIG-I

La famille RLR regroupe RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*) (Yoneyama et Fujita 2007). Les RLR sont des hélicases possédant un domaine DExD/*H box helicase* capable de lier l'ARN. MDA5 et RIG-I possèdent aussi deux domaines CARD qui sont accessibles suite à la liaison à l'ADN, ce qui leur permet d'initier une cascade de signalisation. Les RLR sont spécialisés dans la détection d'ARN dans le cytoplasme. Bien entendu, il est crucial de différencier l'ARN du soi et celui issu de la réplication virale. RIG-I ne reconnaît que l'ARN simple brin (ARNsb) tri-phosphorylé, mais ne présentant pas de coiffe, excluant ainsi les ARN messagers (ARNm)

cellulaires. MDA5 ne reconnaît que les ARNdb longs (Kato *et al.* 2008). LGP2 n'est pas un PRR, et inhibe les réponses de RIG-I et MDA5 (Yoneyama et Fujita 2007). La cascade de signalisation déclenchée passe par l'adaptateur membranaire présent sur les mitochondries MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*) qui entraîne ensuite une réponse antivirale avec l'activation des voies NF- κ B et des facteurs régulant l'IFN (*interferon regulatory factors*, IRF) 3 et 7 (Taro Kawai et Akira 2008; Loo et Gale 2011). RIG-I a aussi la capacité de détecter l'ADN double brin (ADNdb) cytoplasmique lorsqu'il est transcrit par l'ARN polymérase III dans le cytoplasme (Ma, Ni et Damania 2018). RIG-I n'est cependant pas le seul à assurer la détection cytosolique d'ADN.

5.1.2.5 Les détecteurs cytosoliques d'ADN

Les senseurs d'ADN cytosoliques (Figure 3) sont regroupés dans cette famille non pas par homologie structurelle, mais par homologie de fonction. On retrouve notamment IFI16, AIM2 et RIG-I dont nous avons déjà parlé. La présence d'IFI16 dans le noyau rend nécessaires des mécanismes contrôlant son activation. Il a été suggéré qu'IFI16 serait spécifique de structures tertiaires particulières présentes lors de la réplication de virus à ADN (Brázda *et al.* 2012). Les mécanismes qui inhibent ces facteurs lors de la mitose, lorsque l'intégrité de la membrane nucléaire n'est plus assurée, restent à définir précisément. La protéine cGAS requiert la présence d'un autre senseur pour déclencher une cascade de signalisation (Lahaye *et al.* 2018). À l'exception de RIG-I et AIM2, les senseurs d'ADN cytoplasmiques entraînent l'activation de la protéine stimulant les gènes de l'interféron (*stimulator of interferon genes*, STING) afin de déclencher l'activation des voies de signalisation IRF et NF- κ B (Ma, Ni et Damania 2018).

Parmi tous ces PRR, mon travail porte sur TLR3 qui a la particularité, comme tous les autres TLR endosomaux, d'être dépendant de sa bonne localisation pour assurer la détection d'acide nucléique.

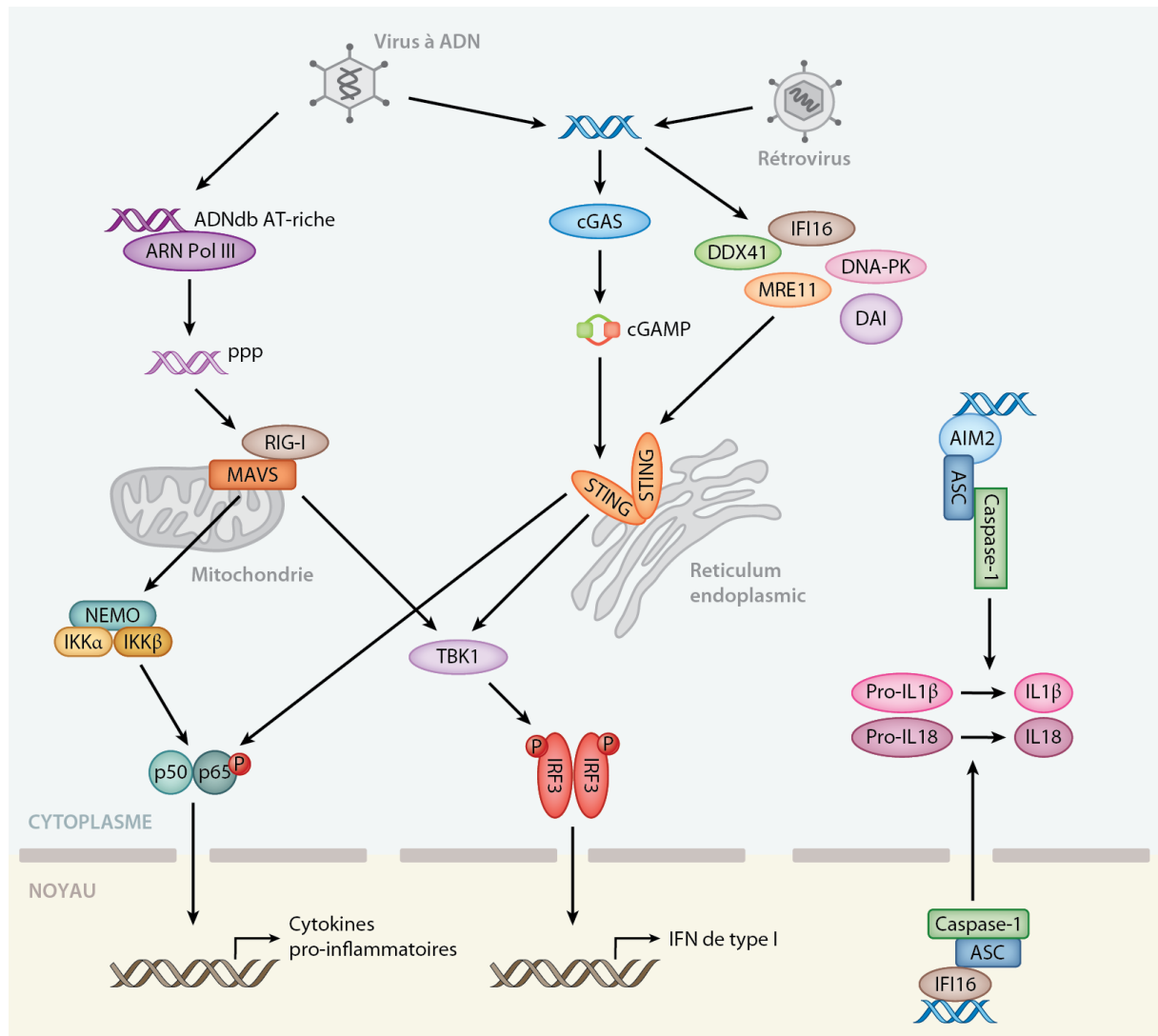


Figure 3 : Les détecteurs cytosoliques d'ADN et leurs voies de signalisation.

L'ADNdb riche en AT est transcrit par l'ARN polymérase (Pol) III en ARNdb 5'-ppp sans coiffe et est détecté par RIG-I. L'ADN viral est détecté par cGAS et potentiellement par d'autres senseurs activant STING (stimulator of interferon genes). STING est relocalisé du RE au Golgi où il active la voie de signalisation IRF3 et NF-κB. La détection de l'ADN par AIM2 et IFI16 dans le cytoplasme et le noyau respectivement induit la formation de l'inflammasome. DDX41 : DEAD-Box helicase 41 ; DNA-PK : DNA-dependent protein kinase ; MRE11 : meiotic recombination 11 homolog 1 ; DAI : DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors ; ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (Ma, Ni et Damania 2018).

5.2 Le récepteur de type Toll 3

5.2.1 La découverte de TLR3

Les gènes humains des TLR1, 2, 3, 4 et 5 furent découverts les premiers. Ces cinq TLR furent identifiés et nommés ainsi en raison de leur homologie de séquence avec le gène Toll de *Drosophila melanogaster*. Il fut supposé que, de manière identique à Toll, ces TLR humains

jouent un double rôle lors de la morphogénèse et lors de la réponse immunitaire (Rock *et al.* 1998), bien qu'à ce jour seul leur rôle en tant que PRR ait été décrit.

Consécutivement à leur découverte, les motifs détectés par ces premiers TLR furent rapidement identifiés. Le récepteur protéine kinase (*protein kinase RNA regulated*, PKR) était jusqu'alors le seul connu capable de détecter l'ARNdb présent notamment en cas d'infection virale (Clemens et Elia 1997). La présence d'une réponse induite par de l'ARNdb indépendante de PKR a poussé Alexopoulou *et al.* à utiliser des cellules non-répondantes à l'ARNdb afin d'observer si la complémentation par les TLR connus pouvait restaurer la sensibilité à l'ARNdb. Elle a ainsi mis en évidence la capacité de TLR3 d'induire la sécrétion de cytokines en réponse au poly(I:C) (acide polyinosinique-polycytidylique), un analogue synthétique d'ARNdb (Alexopoulou *et al.* 2001).

5.2.2 La structure de TLR3

TLR3 est, comme tous les autres TLR, une protéine transmembranaire de type 1. Lors de sa synthèse au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER), la partie N-terminale nouvellement synthétisée est transloquée pour se retrouver dans la partie luminaire du RER. Cette translocation nécessite un peptide signal constitué des acides aminés 1 à 23 présents à l'extrémité N-terminale (<https://www.uniprot.org/uniprot/O15455>), qui seront ensuite clivés dans le RER. La partie C-terminale quant à elle reste à l'extérieur du RER. TLR3 est donc constitué de trois parties : une partie extracellulaire (côté N-terminal), un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire (côté C-terminal). Le domaine extracellulaire (acides aminés 24 à 704) assure la détection d'ARNdb tandis que le domaine intracellulaire (acides aminés 726 à 904) assure la localisation de TLR3 et initie la cascade de signalisation.

5.2.2.1 Le domaine extracellulaire de TLR3

5.2.2.1.1 La structure du domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire, ou ectodomaine (ECD), de TLR3 est constitué, comme pour les autres TLR, de LRR (*leucine-rich repeat*). TLR3 en compte 23. Ces LRR sont systématiquement présents dans l'ECD des TLR et forment un solénoïde en fer à cheval. Ils sont eux-mêmes constitués de 24 résidus respectant plus ou moins le motif **xLxxLxLxxN Φ xx Φ xxxxFxxLx** (x : n'importe quel acide aminé, L : leucine, F : phénylalanine, Φ : acide aminé hydrophobe, N : asparagine), les résidus de 1 à 10 (en gras) forment un feuillet β du côté concave du solénoïde et sont communs à tous les types de LRR.

Les résidus suivants sont spécifiques des LRR de chacun des TLR, et sont situés sur la partie convexe extérieure du solénoïde (Jessica K. Bell *et al.* 2003)

5.2.2.1.2 La première cristallisation de l'ECD

L'ECD de TLR3 fut cristallisé de manière conjointe par deux groupes (Choe 2005; J. K. Bell *et al.* 2005), à partir d'ECD (acides aminés 27 à 700 ou 22 à 702 respectivement) de TLR3 murin produit en cellules d'insectes. Cette partie N-terminale de TLR3 est celle qui se lie au ligand. Ces études ont confirmé la forme de fer à cheval prédite par l'analyse des séquences. Les asparagines en position 10 des LRR contribuent à la stabilisation de la structure par un réseau de liaisons hydrogène (J. K. Bell *et al.* 2005). Il ressort aussi de ces premières cristallographies que TLR3 est majoritairement masqué par les motifs de glycosylation à l'exception de sa face de feuillets β côté C-terminal de l'ECD, proche de la membrane. Cela laisse supposer son rôle probable dans la liaison à l'ARNdb ou une interaction protéique (Choe 2005; J. K. Bell *et al.* 2005).

5.2.2.1.3 La liaison de TLR3 à l'ARNdb

Leonard *et al.* ont montré l'association de l'ECD de TLR3 avec des ARNdb de différentes tailles. Le plus petit ARNdb capable d'induire une signalisation est composé de 39 paires de bases (pb). La liaison de dimère d'ECD à l'ARNdb est stable, spécifique et réversible (Leonard *et al.* 2008). La formation de ces complexes ECD-ARNdb est pH-dépendante. En effet, l'ECD de TLR3 peut lier efficacement des ARNdb de 39 pb et jusqu'à au moins 540 pb à un pH de 5,5 (correspondant au pH des endosomes tardifs (Huotari et Helenius 2011)). Alors qu'à un pH de 6 (correspondant au pH des endosomes précoces), seuls les ARNdb testés faisant 139 pb ou plus sont capables de lier TLR3 (Leonard *et al.* 2008). La taille limite de l'ARNdb détecté a été revue à la baisse dans une étude réalisée par Kleinman *et al.* Cette étude a mis en évidence que, contrairement à ce qui était observé jusqu'alors, des ARNdb de taille inférieure à 40 pb sont aussi capables d'initier une réponse via un groupe de TLR3 présents à la surface cellulaire chez la souris. Les ARNdb utilisés étaient des *small interfering* (si)ARN de 21 pb ou plus ; en deçà, aucune réponse n'était observable (Kleinman *et al.* 2008). Cette observation rend délicate l'utilisation de siARN pour l'étude de TLR3.

L'interaction entre le poly(I:C) et l'ECD de TLR3 conduit à la formation d'un complexe, ce qui présuppose la possible dimérisation de TLR3 en présence de son ligand. Cette

dimérisation pourrait être un mécanisme clef pour la transmission de signal vers la partie cytoplasmique, et initier une cascade de signalisation (J. K. Bell *et al.* 2005).

5.2.2.1.4 La dimérisation de TLR3

Concernant la dimérisation de TLR3, Leonard *et al.* ont montré, à l'aide d'ECD libres interagissant avec des ARNdb de différentes tailles, que les complexes ECD-ARNdb s'établissaient avec un ratio de 2 ECD pour 1 molécule d'ARNdb (Leonard *et al.* 2008). Si l'ARN est suffisamment long (> 90 pb), plusieurs dimères d'ECD peuvent se former. L'importance de la dimérisation dans l'activation de la voie de signalisation de TLR3 a été mise en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques de TLR3. Il en résulte que lorsque TLR3 est présent à la membrane cytoplasmique (suite à une surexpression), la présence d'anticorps anti-TLR3 permet d'initier une réponse NF- κ B. Ces résultats suggèrent que les anticorps induisent une dimérisation, mimant celle obtenue en présence d'ARNdb initiant une réponse cellulaire (Leonard *et al.* 2008).

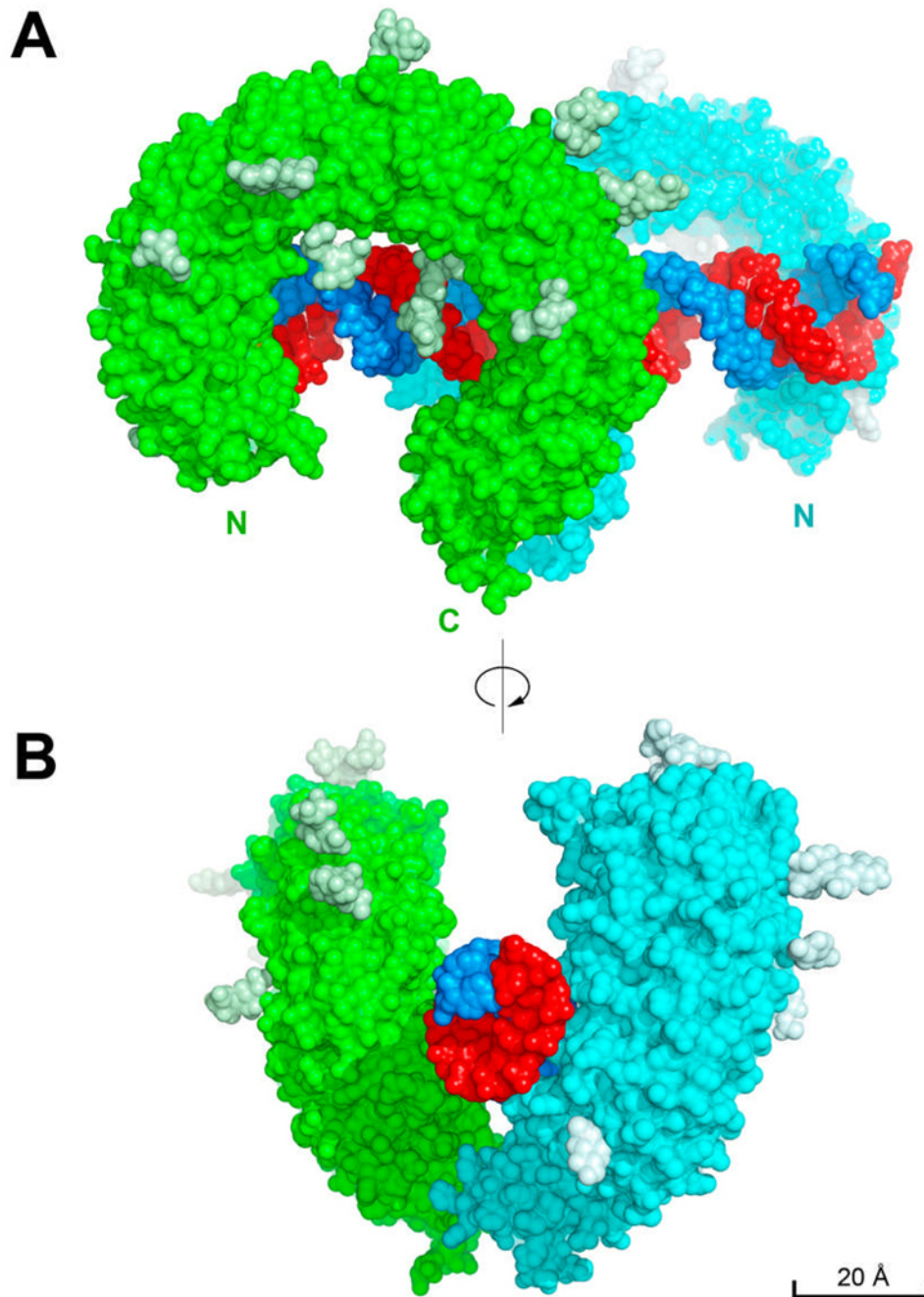


Figure 4 : Structure du complexe TLR3:ARNdb.

Les ectodomaines (ECD) de TLR3 murins (vert et cyan) forment un dimère sur l'ARNdb (rouge et bleu). Les N-glycanes sont représentés (vert clair et bleu clair). A. Représentation des sites de liaison N et C terminaux. B. Représentation du site de liaison entre les deux ECD (L. Liu et al. 2008).

5.2.2.1.5 La seconde cristallisation de l'ECD

Liu *et al.* réussirent à isoler et cristalliser un complexe contenant deux ECD de TLR3 murin liés à un ARNdb de 46 pb. Ces travaux ont permis de montrer que chaque ECD lie l'ARNdb par deux sites situés chacun sur une extrémité du fer à cheval de l'ECD. Les LRR C-terminaux de chaque ECD sont en contact l'un avec l'autre, ce qui permet de stabiliser la dimérisation des

deux TLR3. Ces résultats ont aussi dévoilé que la forme de TLR3 ne change pas lors de la liaison à l'ARNdb. Ainsi, l'homo-dimérisation de TLR3 comme seul changement notable lié à la liaison de l'ARNdb serait susceptible de conduire à la signalisation par juxtaposition des domaines intra-membranaires de TLR3 (L. Liu *et al.* 2008). À l'aide de mutants de TLR3, Wang a mis en lumière que le site de dimérisation présent dans l'ECD de TLR3 est requis pour l'initiation d'une signalisation (Y. Wang *et al.* 2010). Malgré quelques propositions d'un complexe TLR3-ECD-siARN pour expliquer l'accommodation de siARN (Kleinman *et al.* 2008) ce n'est que suite à la co-cristallisation de TLR3 et d'ARNdb (L. Liu *et al.* 2008) qu'une structure est proposée pour la liaison des siARN à TLR3 dans un complexe plus compact préservant la juxtaposition des domaines intracellulaires (Pirher *et al.* 2008).

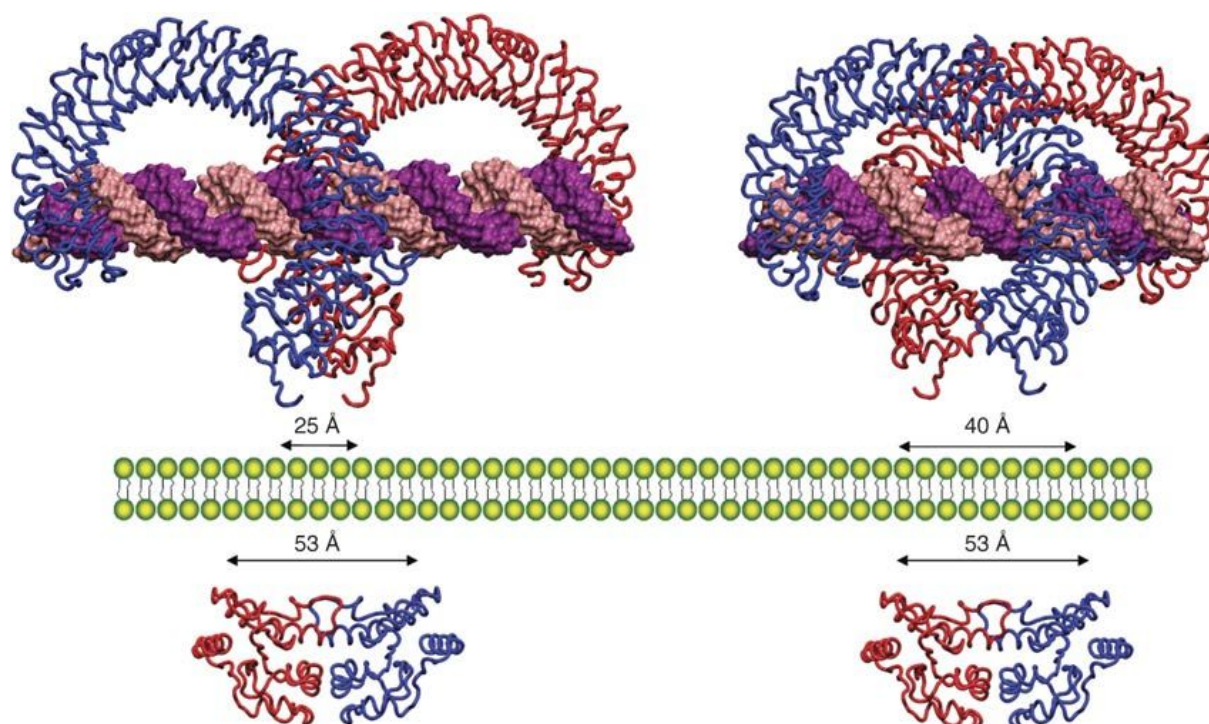


Figure 5 : Arrangements du complexe constitué de deux TLR3 murin et d'un ARNdb. Les sites de liaison sont identiques entre les deux modèles, seulement décalés d'un tour de double hélice. La distance entre les parties C-terminales des ECD est différente mais reste compatible avec la dimérisation et l'activation du domaine cytoplasmique (Pirher *et al.* 2008).

La liaison de l'ECD avec le domaine transmembranaire s'effectue par sept acides aminés, ce qui limite la flexibilité, et joue probablement un rôle dans le positionnement de l'ECD par rapport à la membrane (J. K. Bell *et al.* 2005). Le domaine extracellulaire de TLR3 a donc la capacité de former un homo-dimère spécifiquement en présence d'ARNdb et en pH acide. La dimérisation induit le rapprochement des domaines transmembranaires et intracellulaires des deux TLR3 impliqués.

5.2.2.2 Le domaine transmembranaire de TLR3

Le domaine transmembranaire de TLR3 est très peu étudié. Il est constitué d'une seule hélice α comme pour toutes les protéines transmembranaires de type 1. Une seule étude, réalisée par Mineev *et al.*, a montré par résonance magnétique nucléaire que les domaines transmembranaires de TLR3 sont capables de former des dimères ainsi que des trimères dans des micelles (Mineev, Goncharuk et Arseniev 2014). Les dimères de domaines transmembranaires pourraient jouer un rôle stabilisateur lors de la dimérisation observée en présence d'ARNdb. Au contraire de TLR7, le domaine transmembranaire de TLR3 ne joue pas de rôle dans la localisation intracellulaire de celui-ci (Nishiya *et al.* 2005).

5.2.2.3 Le domaine intracellulaire de TLR3

La partie intracellulaire de TLR3 remplit 2 fonctions essentielles, via deux domaines distincts. Le premier, côté C-terminal, est le domaine TIR responsable de l'activation de la cascade de signalisation. Le second, appelé domaine de liaison (*linker*), fait le lien entre le domaine transmembranaire et le domaine TIR. Le domaine de liaison joue aussi un rôle dans la localisation endosomale de TLR3 (Funami *et al.* 2004).

5.2.2.3.1 Le domaine TIR de TLR3

Le domaine TIR est présent chez tous les TLR ainsi que sur les récepteurs à l'IL-1 (IL-1R) et 18 (IL-18R). Ce domaine joue un rôle clef dans leur signalisation en se liant par homologie à d'autres domaines TIR, permettant le recrutement d'autres protéines. Les TLR peuvent ainsi lier, grâce à ces domaines TIR, des adaptateurs, au nombre de cinq, qui constituent la première étape de la cascade de réactions déclenchée par leur activation (O'Neill et Bowie 2007). Le domaine TIR de TLR3 a la capacité de se lier au domaine TIR d'un unique adaptateur appelé TRIF (Oshiumi *et al.* 2003).

Au sein du domaine TIR, 14 acides aminés forment la boucle BB connectant l'hélice α B au feuillet β B. La particularité du domaine TIR du TLR3 est qu'il contient une alanine en position 795 du TLR3, dans la boucle BB, alors qu'il s'agit d'une proline dans tous les autres TLR (Xu *et al.* 2000). L'importance de cet acide aminé a été mise en évidence par le fait que la substitution de l'alanine 795 par une histidine abolit la liaison de TLR3 à TRIF et la réponse cellulaire au ligand de TLR3 (Oshiumi *et al.* 2003). Le remplacement de cette alanine par une proline conduit à la perte de signalisation du TLR3 via TRIF, mais entraîne le recrutement de la protéine MyD88, l'adaptateur commun à tous les autres TLR (Verstak, Arnot et Gay 2013).

Toujours dans le domaine TIR, il a été démontré par Sarkar *et al.* que la phosphorylation des tyrosines 759 et 858 jouait un rôle essentiel dans la voie de signalisation de TLR3, la première étant requise pour le recrutement de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et les deux résidus semblent requis pour l'activation de la voie NF- κ B (Sarkar *et al.* 2004).

5.2.2.3.2 Le domaine de liaison de TLR3

5.2.2.3.2.1 Rôle du domaine de liaison dans la localisation de TLR3

Le domaine de liaison joue un rôle important dans la localisation de TLR3, composante essentielle de la fonction de ce TLR, qui est décrite plus en détail ci-dessous (p. 19). Dans une étude assez complète, Funami *et al.* se sont servis de la surexpression de différents mutants de TLR3 pour mettre en évidence le fait que le TLR3 humain est localisé, au sein des cellules humaines et murines, dans des compartiments intracellulaires. Alors que la perte du domaine TIR n'impacte en rien cette localisation, la perte de toute la queue cytoplasmique (domaine TIR et linker) conduit à la présence de TLR3 au niveau de la membrane cytoplasmique. Chez l'homme, les acides aminés 740 et 741 (arginine et valine) sont cruciaux pour la localisation dans les endosomes, qui sont des compartiments acides. Leur substitution par des alanines est suffisante pour modifier la localisation du TLR3, qui se retrouve alors au niveau de la membrane cytoplasmique, sans abroger entièrement l'activation de la voie de signalisation (Funami *et al.* 2004). Un an après, Nishiya *et al.* ont montré que des chimères TLR4/TLR3 sont absentes de la membrane cytoplasmique à partir du moment où les acides aminés 727 à 749 du TLR3, correspondant au domaine de liaison, sont présents (Nishiya *et al.* 2005). Ces résultats démontrent que le domaine de liaison est essentiel pour l'adressage du TLR3 vers les endosomes.

5.2.2.3.2.2 Rôle du domaine de liaison dans le déclenchement d'une réponse par TLR3

Comme mentionné précédemment, la phénylalanine 732 et la tyrosine 733 jouent un rôle dans la capacité de TLR3 à activer les voies NF- κ B et IFN- β , bien que ces résidus ne soient pas présents dans le domaine TIR. La phosphorylation de la tyrosine 733 n'est pas nécessaire pour l'activation de ces voies de signalisation, car sa substitution par une phénylalanine de structure proche, mais non-phosphorylable, n'abroge pas la signalisation. Cette tyrosine 733 aurait donc un rôle structurel (Sarkar *et al.* 2003; Funami *et al.* 2004). Un autre acide aminé, la glycine 743, est aussi impliqué dans l'activation des voies NF- κ B et IFN- β suite à la liaison d'ARNdb au

TLR3 (Funami *et al.* 2004). Il est à noter que la substitution de ces trois acides aminés n'a aucun impact sur la localisation de TLR3.

5.2.3 Les modifications post-traductionnelles de TLR3

Pour être fonctionnel, TLR3 doit subir de nombreuses modifications post-traductionnelles, que ce soit lors du clivage du peptide signal, de la glycosylation de l'ECD, de la mise en place de ponts disulfures ou les phosphorylations dans le domaine TIR lié à la signalisation (https://www.uniprot.org/uniprot/O15455#ptm_processing).

5.2.3.1 Le clivage de TLR3

TLR3 subit aussi une étape de maturation en étant clivé une seconde fois. L'existence d'un clivage essentiel pour l'activité des TLR endosomaux a été initialement identifiée pour TLR9 (Ewald *et al.* 2008; Park *et al.* 2009; Sepulveda *et al.* 2009). Ce clivage, essentiel à la signalisation, a aussi été décrit pour TLR3, TLR7 et TLR8 (Ewald *et al.* 2011; Itoh *et al.* 2011).

Le clivage de TLR3 est effectué dans le LRR12 au sein de la boucle 1, entre les acides aminés 252 et 346 (Qi, Singh et Kao 2012; Garcia-Cattaneo *et al.* 2012). Ce clivage est effectué dans les endosomes, en pH acide, par les cathepsines B et H, postérieurement à la sortie du Golgi (Garcia-Cattaneo *et al.* 2012). La totalité des TLR3 clivés présentent des glycosylations typiques post-Golgi, résistantes à l'endoglycosidase H. De plus, l'inhibition des cathepsines entraîne l'observation d'une forme de TLR3 de taille supérieure, 135 kDa au lieu de 130 kDa, compatible avec une forme de la protéine entièrement glycosylée post-Golgi. En situation physiologique, TLR3 est rapidement clivé post-Golgi, et donc la forme de 135kDa n'est pas observable. Les fragments clivés sont stables dans le temps avec une demi-vie observée supérieure à 24 h (Toscano *et al.* 2013). En réponse au poly(I:C), le ratio TLR3 clivé/TLR3 entier augmente, indiquant une mobilisation du réservoir de TLR3 non-clivés (Garcia-Cattaneo *et al.* 2012).

Le clivage de TLR3 nécessite un transport correct de TLR3 au sein des endosomes. Cela a été confirmé par l'utilisation de cellules knock-out pour la protéine requise pour le transport des TLR endosomaux, nommée UNC93B1 (*uncoordinated-93 homolog B1 (C. elegans)*). En son absence, l'apparition de la forme clivée de TLR3 est inhibée (Garcia-Cattaneo *et al.* 2012). Les fragments clivés de TLR3 ont pu être observés non seulement dans les endosomes, mais aussi à la surface cellulaire de cellules d'une lignée cellulaire de rein d'embryon humain 293T

((*human embryonic kidney 293* (HEK293), exprimant l'antigène T large de SV40 (*simian vacuolating virus 40*), HEK293T) sur-exprimant TLR3 et UNC93B1 (Qi, Singh et Kao 2012).

5.2.3.2 Le rôle du clivage pour la fonction de TLR3

La forme clivée de TLR3 est nécessaire et suffisante pour assurer la signalisation suite à la détection d'ARNdb. L'inhibition du clivage par un inhibiteur de protéase (leupeptine) ou un inhibiteur de cathepsine (z-FA-fmk) prévient toute signalisation par TLR3 dans des cellules humaines dérivées d'épithélium de rétine (*retinal pigmented epithelial cells*, RPE1) (Garcia-Cattaneo *et al.* 2012). Cependant, il semblerait que dans certaines situations, la forme entière de TLR3 soit aussi capable d'assurer la signalisation, à un degré cependant inférieur à la forme clivée, mais cela n'a jamais été démontré dans des cellules primaires (Toscano *et al.* 2013; Qi, Singh et Kao 2012). Une fois clivés, les deux fragments de TLR3 restent associés par des liaisons non-covalentes, et c'est ensemble qu'ils signalent. En effet, la synthèse de fragment C-terminal seul, bien que contenant le domaine TIR, déclenche une réponse plus faible qu'un récepteur natif clivé (Toscano *et al.* 2013; Garcia-Cattaneo *et al.* 2012).

À la suite du clivage de TLR3, chaque fragment contient un site de liaison à l'ARNdb (L. Liu *et al.* 2008). Les deux fragments de TLR3 resteraient très proches. Le clivage induit probablement une plus grande flexibilité pour assurer un positionnement optimal du complexe composé de deux TLR3 et d'un ARNdb. La structure de TLR3 ayant été obtenue par cristallisation d'ECD non-clivé (L. Liu *et al.* 2008), le modèle proposé doit encore être confirmé par de nouvelles études cristallographiques.

5.2.4 La localisation cellulaire de TLR3 et son trafic

5.2.4.1 Le profil d'expression de TLR3

TLR3 est présent dans de nombreux tissus chez les humains et les souris. TLR3 est notamment exprimé dans de nombreuses cellules du système immunitaire, comme les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC), notamment les DC positives pour le cluster de différenciation (CD)141 capable de présentation croisée (Jongbloed *et al.* 2010), les macrophages, les cellules T (lymphocytes dont le développement s'achève dans le thymus) CD8⁺ et les cellules NK. TLR3 est aussi exprimé dans les cellules épithéliales de la rétine, de la cornée, de l'intestin et des voies biliaires intrahépatiques. Les kératinocytes, les fibroblastes des poumons et de la peau, les cellules de l'endothélium des vaisseaux ainsi que les hépatocytes expriment aussi TLR3. Dans le système nerveux central (SNC), TLR3 est exprimé par les neurones, les

oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales (Miettinen *et al.* 2001; S. Y. Zhang *et al.* 2013). Ainsi, TLR3 est présent non seulement dans les cellules du système immunitaire, mais aussi au niveau des différents épithéliums ainsi que dans le SNC. Cette vaste distribution suggère un rôle important de TLR3 dans la physiologie de l'individu.

5.2.4.2 Localisation intracellulaire de TLR3

Comme évoqué précédemment, les TLR sont répartis en deux catégories, certains sont ancrés à la membrane cytoplasmique, d'autres, comme les TLR3, 7, 8 et 9, sont dans les endosomes. La localisation des TLR est essentielle à leur fonction. De plus, il apparaît, pour les TLR endosomaux, que cette localisation est finement régulée.

La génération d'un premier anticorps anti-TLR3 humain par Matsumoto *et al.* a permis de mettre en évidence que TLR3 était en partie exprimé *in vitro* à la surface des fibroblastes (Misako Matsumoto *et al.* 2002). En effet, cet anticorps bloque la signalisation par TLR3 en présence d'un ligand, suggérant que TLR3 est localisé au niveau de la membrane cytoplasmique et y est fonctionnel. Cependant, l'année suivante, la même équipe a démontré que dans des DC, TLR3 est exprimé de manière intracellulaire, et ne peut pas être bloqué par l'anti-TLR3 (M. Matsumoto *et al.* 2003).

5.2.4.2.1 La localisation dans la voie endosomale de TLR3

Dans des HEK293 sur-exprimant TLR3, celui-ci co-localise en partie avec le réseau trans-golgien, les endosomes tardifs ou les compartiments acides. Johnsen *et al.* ont montré que TLR3 co-localise dans des compartiments positifs pour la calnexine, correspondant au RE en l'absence de stimulation tant dans des cellules HeLa (lignée de cellule d'Henrietta Lacks) sur-exprimant TLR3 que dans des cellules dendritiques dérivées de monocytes (*monocyte derived dendritic cells*, MDDC) humaines. En présence d'ARNdb, TLR3 co-localise avec un marqueur d'endosomes tardifs dans les MDDC. Dans des HeLa sur-exprimant TLR3, celui-ci est associé aux compartiments contenant l'ARNdb (Johnsen *et al.* 2006). Cependant, cette étude, bien que qualitative, manque de quantification. Il serait important de connaître la distribution de TLR3 dans ces différents compartiments.

Nous avons vu précédemment que le clivage de TLR3 est essentiel à sa fonction. Le clivage protéique de TLR3 est aussi nécessaire pour sa localisation. En effet, en l'absence de clivage (suite à un traitement par l'inhibiteur de cathepsine z-FA-FMK), il y a une diminution de la quantité de TLR3 dans les endosomes précoces, et une accumulation de la protéine dans les

endosomes tardifs (marqués par Rab7), et parfois fusionnés avec des lysosomes (Qi, Singh et Kao 2012).

L'absence de la protéine Lyst, qui régule le trafic des lysosomes, conduit à une perte de réponse spécifique à TLR3 et TLR4. En l'absence de Lyst, la maturation des phagosomes est impactée, ce qui induit une perte des compartiments Rab7⁺ (endosomes tardifs). Ces compartiments jouent un rôle essentiel pour la signalisation du TLR3, car ils sont associés à la protéine TRIF. Ainsi, la bonne localisation de TLR3 dans la voie endosomale est essentielle à sa fonction (Westphal *et al.* 2017). Les compartiments endosomaux Rab7⁺ jouent donc un rôle important pour la signalisation du TLR3 suite à la liaison de son ligand.

5.2.4.2.2 La localisation de TLR3 à la membrane cytoplasmique

Si la localisation intracellulaire est confirmée par de nombreuses études, dans certains cas il a été rapporté que TLR3 pouvait aussi être présent à la membrane cytoplasmique. Dans des cellules humaines HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), l'activation par poly(I:C) entraîne une surexpression de UNC93B1 qui induit l'expression en surface de TLR3 (Pohar *et al.* 2013). La glycosylation des TLR3 présents à la surface cellulaire est différente de celle des TLR3 endosomaux. Cette différence suggère que lorsque UNC93B1 est surexprimé, il adresse le TLR3 à un compartiment où il sera glycosylé différemment, avant de finir à la surface cellulaire. Dans des cellules HEK293T sur-exprimant TLR3, Pohar *et al.* ont montré que TLR3 était en partie exprimé à la membrane cytoplasmique. Des protéines chimériques TLR3/TLR9 ont permis de mettre en évidence qu'en l'absence de l'ECD de TLR3, la localisation à la membrane cytoplasmique était perdue (Pohar *et al.* 2014).

La majeure partie de ces études utilise des protéines de fusion, des chimères contenant TLR3, et majoritairement dans des systèmes de surexpression. Les expérimentations utilisant des modèles primaires sont marginales. Ce qui ressort de ces travaux cependant, c'est que TLR3 est présent dans les endosomes, mais peut aussi être présent à la surface cellulaire, particulièrement suite à une stimulation (Pohar *et al.* 2013) ou en cas de surexpression. La localisation cellulaire de TLR3 est dépendante des cellules étudiées, ainsi, dans les cellules immunitaires, TLR3 semble majoritairement cantonné aux endosomes (Kajita, Nishiya et Miwa 2006), ce qui est probablement la conséquence d'une régulation plus stricte. Cette double localisation soulève une question : TLR3 peut-il initier une cascade de signalisation à partir de la surface cellulaire ? Une réponse a été apportée par Bugge *et al.*, qui ont démontré que sur des cellules de métastase de l'épithélium intestinal, TLR3 est présent à la surface et capable de déclencher une cascade de signalisation de manière indépendante de l'endocytose. Dans ce

modèle, UNC93B1 et l'acidification des endosomes sont toujours requis pour la fonction de TLR3, et des TLR3 clivés et non-clivés étaient détectables à la membrane cytoplasmique de ces cellules (Bugge *et al.* 2017). Ces résultats suggèrent qu'une partie des TLR3 passerait d'abord dans des endosomes acides, où ils subiraient une étape de maturation (le clivage) avant d'être redirigés vers la surface, ceci de façon dépendante de l'expression de UNC93B1. Il reste à déterminer si la localisation de TLR3 influence la réponse produite, ou la capacité de TLR3 à se lier à différents ligands, étant donné notamment l'absence d'environnement acide.

5.2.4.3 Le rôle de la protéine UNC93B1 dans le transport de TLR3

TLR3 est produit au niveau du RE et est transporté jusque dans les endosomes ou la membrane cytoplasmique. Comme cela a déjà été évoqué précédemment, le domaine de liaison de TLR3 est important pour la localisation endosomale (Funami *et al.* 2004), et l'ECD pour la localisation cytoplasmique (Pohar *et al.* 2014). TLR3 passe par le Golgi lors de sa relocalisation, comme en témoigne la présence de glycosylation résistante à l'endoH (*endoglycosidase H*) (Garcia-Cattaneo *et al.* 2012; Toscano *et al.* 2013).

Les TLR détectant les acides nucléiques, TLR7 et 9, sont aussi localisés dans les endosomes (Nishiya *et al.* 2005; Kajita, Nishiya et Miwa 2006) (TLR8 étant très peu fonctionnel chez la souris, il n'est donc pas inclus dans certaines études), mais leur mécanisme de transport est différent et fait intervenir leur domaine transmembranaire.

5.2.4.3.1 Le rôle de UNC93B1 dans le fonctionnement des TLR endosomaux

En dehors de leur spécificité pour les acides nucléiques, le point commun des TLR endosomaux réside dans la nécessité de l'interaction avec la protéine membranaire du RE UNC93B1. À l'aide d'un crible génétique, Tabeta *et al.* ont identifié chez la souris l'histidine 421 de UNC93B1 comme essentielle pour les TLR3, 7 et 9. Cette histidine est conservée chez tous les vertébrés et son remplacement par une arginine abolit la signalisation des TLR endosomaux. Les souris portant cette mutation sont appelées souris 3d (pour « triplement déficientes »). Elles montrent une sensibilité accrue aux infections causées par le cytomégalo virus murin, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Tabeta *et al.* 2006). La mutation 3d récapitule les effets d'une perte d'acidification des endosomes (suite à un traitement par chloroquine ou bafilomycine) sur la signalisation des TLR. Cependant, cette mutation de UNC93B1 n'a pas d'impact sur le pH des endosomes (Tabeta *et al.* 2006), mais abolit, chez la souris, l'interaction directe entre UNC93B1 et les TLR endosomaux (TLR3, 7,

9 et 13) (Brinkmann *et al.* 2007), qui se fait avec la région transmembranaire dans le cas des TLR3 et 9.

La déficience en UNC93B1 a aussi été liée à l'étiologie du virus *Herpes simplex-1* (HSV-1) chez des patients humains. Cette déficience conduit également à la perte de signalisation par TLR7, 8 et 9 (Casrouge *et al.* 2006). La sensibilité au virus HSV-1 étant liée à un TLR3 non fonctionnel (S. Y. Zhang *et al.* 2007), la perte de UNC93B1 impacte aussi TLR3 chez l'homme.

5.2.4.3.2 Le rôle de UNC93B1 dans la localisation des TLR endosomaux

Le rôle de UNC93B1 pour la localisation de TLR fut dans un premier temps identifié chez la souris pour TLR7 et 9, surtout en cas de relocalisation induite par leur ligands spécifiques (Kim *et al.* 2008). Une autre étude, toujours chez la souris, a confirmé le rôle essentiel de UNC93B1 dans la localisation de tous les TLR endosomaux murins (TLR3, 7, 9, 11, 12 et 13) (B. L. Lee *et al.* 2013).

Comme les TLR endosomaux, UNC93B1 passe par le Golgi avant de se retrouver au niveau des endosomes. De premières études n'ont pas observé de glycosylation résistante à endoH témoignant d'un passage à travers le Golgi (Brinkmann *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008). Cependant, la purification de phagolysosomes a permis de démontrer qu'une partie de UNC93B1 est résistante à l'endoH (B. L. Lee *et al.* 2013). Ce n'est qu'en présence de UNC93B1 que cette glycosylation résistante à l'endoH est observée sur les TLR endosomaux, quels qu'ils soient. De plus, le clivage de TLR3 et TLR9 s'opérant dans les endosomes est aussi aboli en l'absence de UNC93B1 (B. L. Lee *et al.* 2013; Qi, Singh et Kao 2012). Il ressort aussi de l'étude de Lee *et al.* que chaque TLR est dépendant de différents domaines de UNC93B1 pour la sortie du RE et le transport post-Golgi. Les protéines *adaptator protein* (AP)-2 et AP-4 sont requises respectivement pour TLR9 et TLR7, et non requises pour les autres TLR. TLR9 a aussi la particularité d'être chargé dans des vésicules contenant des *coat proteins* (COP)II. Et enfin, l'association de UNC93B1 avec TLR7 et TLR9 est mutuellement exclusive (B. L. Lee *et al.* 2013). Ces résultats, démontrés chez la souris, indiquent que UNC93B1 est crucial pour le transport intracellulaire des TLR endosomaux, via des interactions qui sont spécifiques à chaque TLR. À ce jour, UNC93B1 est la seule protéine qui a été démontrée comme indispensable au transport de TLR3.

La présence de UNC93B1 semble aussi avoir un effet stabilisateur sur le TLR3 non-clivé, qui sinon est ubiquitiné de manière plus importante et dégradé par le protéasome (Qi, Singh et Kao 2012). Une récente étude sur cellules humaines et murines remet en cause la nécessité de UNC93B1 dans le transport des TLR endosomaux, ne conservant que son rôle de chaperonne.

Afin de dissocier le rôle de UNC93B1 dans le transport de sa capacité à lier les TLR endosomaux, deux mutants de UNC93B1 ont été utilisés dans cette étude : le mutant 3d et un mutant comportant des motifs de transport rétrograde, assurant ainsi son maintien dans le RE tout en préservant sa capacité à lier les TLR. Pelka *et al.* ont montré que le second mutant est capable de restaurer la signalisation dans des cellules UNC93B1-KO (*knock-out*). Le mutant 3d, en ne se liant pas aux TLR, conduit à une réduction de leur demi-vie, ce qui expliquerait l'absence de TLR fonctionnels (Pelka *et al.* 2018). Ainsi donc UNC93B1 serait nécessaire pour son rôle de chaperonne, aidant à stabiliser les TLR durant leur séjour dans le RE. Cette étude, cependant, de par la nature des motifs choisis pour contraindre UNC93B1 à rester dans le RE, ne permet pas d'exclure que UNC93B1 soit nécessaire pour la sortie du RE. En effet, le mutant généré est capable de quitter le RE pour le compartiment intermédiaire RE-Golgi, où il recrute une machinerie de transport rétrograde dépendant de COPI assurant son retour dans le RE. Ainsi, pour les TLR, si UNC93B1 n'est pas requis jusque dans les endosomes, il pourrait néanmoins jouer un rôle dans la sortie du RE vers le Golgi.

5.2.4.3.3 Le rôle de LRRC59 et S100A9 dans le transport de TLR3

Deux autres protéines ont été identifiées comme jouant un rôle dans le transport des TLR endosomaux. La première, LRRC59 (*leucine rich repeat containing 59*), se lierait à UNC93B1 dans le RE en cas de phagocytose (notamment phagocytose de poly(I:C)), ce qui déclencherait une remobilisation du stock de TLR3 déjà synthétisé vers les endosomes (Tatematsu *et al.* 2015). La seconde, S100A9 (*S100 calcium binding protein A9*), est présentée comme se liant à TLR3 après stimulation dans les macrophages dérivés de moelle osseuse murine (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM). En l'absence de S100A9, la maturation des endosomes contenant TLR3, des endosomes précoces aux endosomes tardifs, est impactée. Cela a pour effet de prévenir la bonne localisation de TLR3. Ainsi, dans des souris S100A9 KO, la production d'IFN- β et de TNF α est significativement réduite en réponse au poly(I:C) (S.-Y. Tsai *et al.* 2015). Néanmoins, aucun autre TLR n'a été étudié dans ces systèmes.

Ainsi, le transport des TLR endosomaux est hétérogène. Si la localisation endosomale des TLR requiert la protéine UNC93B1, le transport de ces TLR endosomaux vers la membrane cytoplasmique reste très mal connu.

La signalisation déclenchée par ces TLR endosomaux est, elle aussi, spécifique. TLR3 est particulièrement unique car sa voie de signalisation est indépendante de MyD88, l'adaptateur utilisé par tous les autres TLR.

5.2.5 La cascade de signalisation initiée par TLR3

La liaison d'ARNdb par TLR3 est facilitée par diverses protéines, et conduit à la phosphorylation de TLR3, suivie du recrutement de l'adaptateur clef : TRIF. TRIF est à l'origine de deux cascades de signalisation différentes. La première cascade conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de la voie MAP kinase. La seconde cascade déclenche la production d'IFN- β par activation du facteur de transcription IRF3.

5.2.5.1 La détection de l'ARNdb et la modification de TLR3

L'élément déclencheur de la signalisation par TLR3 est la liaison de ce récepteur à son ligand, l'ARNdb. Des cofacteurs sont nécessaires pour une activation optimale de TLR3 suivie de l'induction de la voie de signalisation via la protéine TRIF.

Yang *et al.* ont montré que la protéine Mex3B est présente dans les endosomes et joue un rôle dans le clivage et la stabilité de TLR3, mais aussi dans la liaison de TLR3 à l'ARNdb. Lorsque Mex3B, une protéine capable de se lier à l'ARN, est absente des cellules murines, la réponse de TLR3 est plus faible en réponse au poly(I:C), mais pas absente (Yang *et al.* 2016).

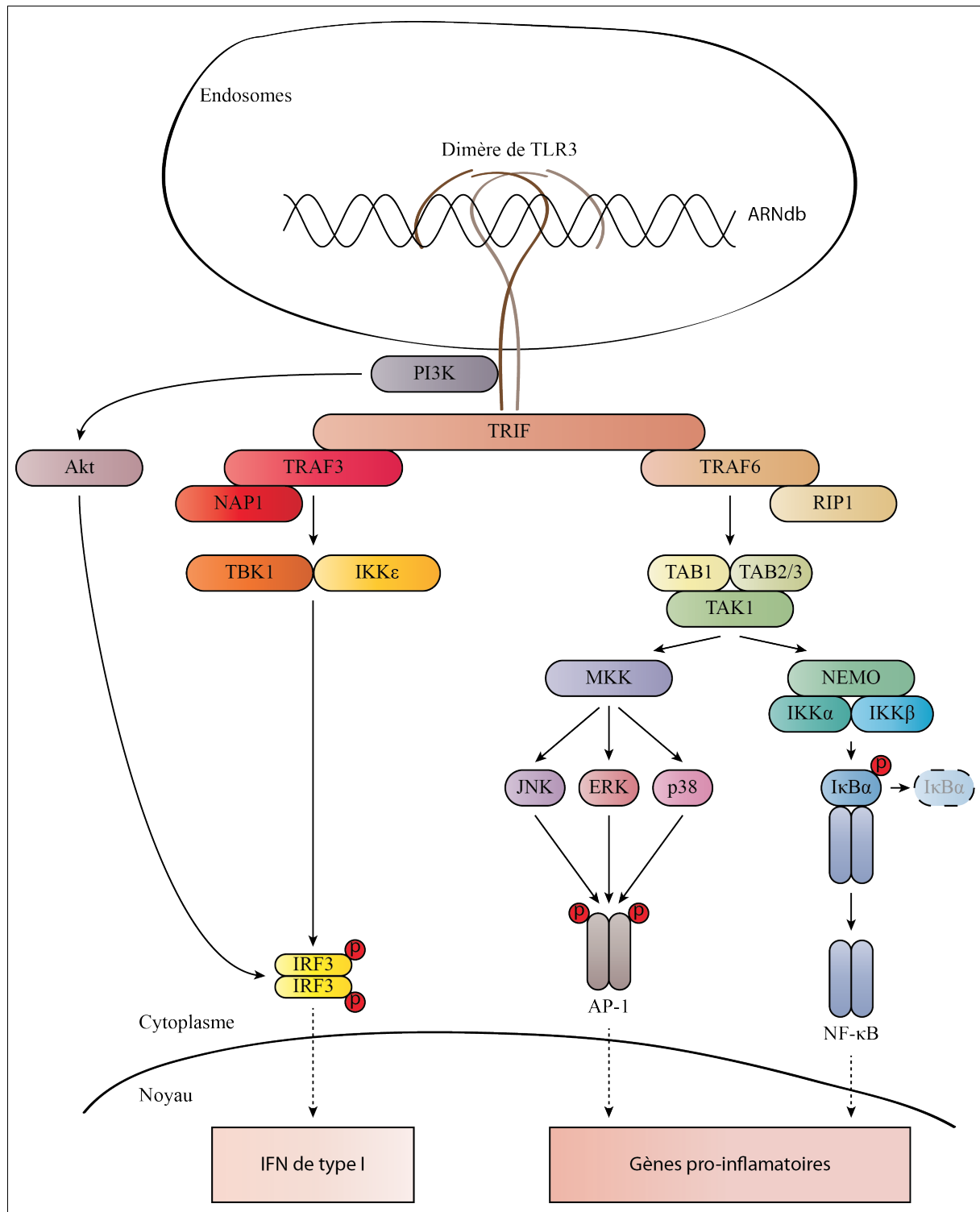


Figure 6 : Voie de signalisation de TLR3.

TLR3 recrute TRIF, interagit avec TRAF (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors) 3, TBK1 (TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) binding kinase 1) et IKKε (inhibitor of κB (IκB) kinase ε). TBK1 et IKKε induisent la phosphorylation (p) de IRF3 qui dimérise et est transloqué dans le noyau où il assure la production d'IFN de type I. IRF3 peut aussi être activé par la voie PI3K et Akt (protein kinase B) qui est recrutée directement par TLR3. TRIF interagit aussi avec TRAF6, ce qui active TAK1 (transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase) et entraîne la phosphorylation et dégradation de IκBα via le complexe constitué de NEMO (NF-κB essential modifier), IKKα et IKKβ. Une fois IκBα

dégradé, le dimère NF- κ B est transloqué dans le noyau où il induit l'expression de gènes pro-inflammatoires. La voie MAPK est aussi activée par TAK1 et induit l'activation et la translocation de AP-1 (activator protein 1), contribuant à la réponse inflammatoire. JNK : c-Jun N-terminal kinases ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; RIP (receptor-interacting protein) ; TAB (TAK1-binding protein) ; NAPI (NF- κ B-activating kinase-associated protein 1)

Une autre protéine facilite la liaison d'ARNdb à TLR3 chez la souris. Il s'agit du CD14, déjà connu pour son interaction avec TLR4 qui facilite la liaison au LPS (Ulevitch 2004). CD14 semble d'abord se lier au poly(I:C) avant d'être relocalisé et de s'associer avec TLR3 dans les lysosomes (H. K. Lee *et al.* 2006) et son absence diminue la réponse au poly(I:C). CD14 est aussi associé à la protéine kinase Src, ce qui pourrait expliquer son rôle facilitant la transmission du signal (Finberg et Kurt-Jones 2006).

Comme discuté précédemment, la cascade de signalisation de TLR3 repose sur la phosphorylation de deux tyrosines du domaine TIR (Sarkar *et al.* 2003). La phosphorylation de la tyrosine 858 serait médiée par le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) plus particulièrement par l'isoforme ErbB1. La phosphorylation de la tyrosine 759 est assurée par la protéine kinase Src dont l'interaction avec TLR3 avait déjà été identifiée (Johnsen *et al.* 2006). La protéine Src est dépendante de la présence de l'EGFR. Ces deux protéines ne sont associées à TLR3 qu'en présence d'ARNdb et sont essentielles pour le recrutement de TRIF, ainsi que la phosphorylation de IRF3 et de p65/RelA (Michifumi Yamashita *et al.* 2012).

La protéine WDFY1, contenant des répétitions WD et un domaine FYVE, joue un rôle important dans les voies de signalisation des TLR3 et TLR4. WDFY1 interagit notamment avec TLR3 en présence de son ligand de TLR3. La signalisation via ces deux TLR est plus forte lors de la surexpression de WDFY1, et diminuée dans les cellules KO (Hu *et al.* 2015; Nandakumar et Paludan 2015). WDFY1 est probablement requise pour le recrutement de TRIF, adaptateur commun à TLR3 et 4.

5.2.5.2 L'initiation de la cascade de signalisation

Suite à la phosphorylation des TLR, le recrutement d'adaptateur est crucial. Comme pour TLR4 (Taro Kawai *et al.* 1999), la réponse initiée par TLR3 a d'abord été montrée comme étant à la fois partiellement dépendante de MyD88 et de TRIF (Alexopoulou *et al.* 2001). Il est maintenant admis que la voie de signalisation de TLR3 est indépendante de MyD88, et uniquement dépendante de TRIF (Akira et Takeda 2004). Ainsi, le poly(I:C) n'induit aucune réponse dans des souris TRIF^{-/-} (Yamamoto *et al.* 2003). Au contraire de tous les autres TLR qui sont dépendants de MyD88, TLR3 est uniquement dépendant de TRIF. TLR4 fait aussi figure

d'exception, puisque deux adaptateurs, TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) et MAL (*MyD88 adapter-like protein*), aussi appelé TIRAP, lui permettent de déclencher une réponse via TRIF et MyD88.

Une fois TRIF recruté, deux différentes cascades de signalisation sont initiées séparément (Jiang *et al.* 2004). Ceci se fait au moyen du recrutement de deux facteurs associés, TRAF3 et TRAF6 (*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors*), entraînant *in fine* l'activation de deux facteurs de transcription, NF- κ B et IRF3 respectivement.

5.2.5.3 L'activation de la voie NF- κ B

La voie initiée par TRIF suite au recrutement de TRAF6 engendre deux types de réponses. Une de ces réponses conduit à l'activation de manière canonique du facteur de transcription NF- κ B. L'autre conduit à la phosphorylation des protéines JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), p38 et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) de la famille des MAPK. Les MAPK induisent alors l'activation du facteur de transcription AP-1 (*activator protein 1*).

5.2.5.3.1 TRAF6

TRAF6 est une protéine essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B. Dans des cellules MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) TRAF6 KO, la réponse NF- κ B déclenchée par TLR3 est absente (Cusson-Hermance *et al.* 2005). De même dans les HEK293, la présence de TRAF6 conditionne l'activation de NF- κ B déclenchée par TLR3 (S. Sato *et al.* 2003). Cependant, d'autres travaux réalisés sur des macrophages murins ont montré que l'activation de NF- κ B médiée par poly(I:C) est présente même dans des macrophages TRAF6 KO (Gohda, Matsumura *et al.* 2004). Il est néanmoins possible que cette activation ne soit pas due à la liaison de poly(I:C) au TLR3, mais à d'autres récepteurs intracellulaires tels que RIG-I ou MDA5.

TRAF6 s'associe directement à TRIF via un domaine de liaison spécifique présent dans TRIF (S. Sato *et al.* 2003). TRAF6 possède un domaine RING (*really interesting new gene*) possédant une activité E3 ligase. TRAF6 a la capacité de s'auto-ubiquitiner. Cette capacité serait nécessaire à l'activation de NF- κ B par TRAF6 (Lamothe *et al.* 2007). Une autre étude présente cette auto-ubiquitination comme non-nécessaire, mais note tout de même l'importance du domaine RING pour l'activation de NF- κ B (Walsh *et al.* 2008).

5.2.5.3.2 RIP1 et RIP3

Dans les HEK293T, les kinases RIP1 et RIP3 (*receptor-interacting protein*), aussi appelées RIPK1 et 3, interagissent également avec TRIF. Cette interaction touche un domaine présent dans TRIF et RIP : le domaine RHIM (*RIP homotypic interaction motif*). RIP1 est essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B, mais superflue pour l'activation de JNK ou la production d'IFN- β . La présence de RIP3 va, au contraire de RIP1, agir en diminuant le niveau d'activation de NF- κ B (Meylan *et al.* 2004; Cusson-Hermance *et al.* 2005). Ainsi RIP1 pourrait jouer le rôle que jouent IRAK1 et IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) dans la signalisation médiée par MyD88, et RIP3 celui de IRAK3. Leur homologie de séquence suggère en effet des fonctions similaires (Meylan *et al.* 2002).

RIP1 est rapidement phosphorylée et poly-ubiquitinée suite à l'activation de la voie TNF α . TRAF6, qui possède une activité E3 ligase, pourrait être responsable de cette ubiquitination. Cependant, le fait que TRAF6 semble être superflue dans certaines conditions (Gohda, Matsumura et Inoue 2004; Kobayashi *et al.* 2001) suggère l'existence d'une autre ubiquitine ligase, qui pourrait être Pellino1 (Peli1). En effet, Peli1 est aussi une E3 ubiquitine ligase, qui est importante pour l'activation de la voie NF- κ B en réponse au poly(I:C) dans les MEF et les splénocytes murins. De plus, Peli1 interagit directement avec RIP1 et entraîne son ubiquitination (Chang, Jin et Sun 2009). L'activation de Peli1 serait médiée en partie par TBK1 (*TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) binding kinase 1*) et IKK ϵ (*inhibitor of κ B (I κ B) kinase*), aussi appelée IKKi, en réponse au TNF α . TBK1 et IKK ϵ étant aussi activées en réponse au poly(I:C), leur implication dans la voie de signalisation de TLR3 est possible (Goh *et al.* 2012). Cependant, il a été montré que TBK1 n'est pas essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B. Peli1 pourrait aussi être activée par une autre kinase de la voie TLR3 (McWhirter *et al.* 2004).

5.2.5.3.3 TRADD et caspase 8

La protéine TRADD (*TNF receptor-associated death domain protein*) est aussi impliquée dans la voie de signalisation du TLR3 par son association à RIP1. Cependant, alors que TRADD est nécessaire pour l'activation des voies NF- κ B et MAPK dans les MEF et BMDC, les BMDM TRADD KO ne présentent pas de défaut d'activation de la voie NF- κ B en réponse au poly(I:C) (Ermolaeva *et al.* 2008). Les caspases 8 et 10 ont aussi été identifiées comme jouant un rôle dans la réponse médiée par TLR3 (Takahashi *et al.* 2006). Dans certains cancers du poumon, l'activation de la caspase 8 en réponse à l'activation de TLR3 entraîne l'apoptose. L'activation

de la caspase 8 est dépendante de RIP1 et inhibée par TRADD, témoignant d'un équilibre entre signalisation et apoptose (Estornes *et al.* 2012). En l'absence de RIP1 et d'activation de la caspase 8, la signalisation initiée par TLR3 peut induire une nécrose RIP3 dépendante (Buchrieser *et al.* 2018).

5.2.5.3.4 TAK1

Plusieurs études démontrent l'importance de TAK1 (*transforming growth factor* (TGF)- β -*activated kinase 1*, TAK1) dans la cascade de signalisation de TLR3 comme activateur requis pour la voie NF- κ B (Shintaro Sato *et al.* 2005; Shim *et al.* 2005). En présence de poly(I:C) les protéines RIP1, TRAF6 et TAK1 immunoprécipitent avec TLR3, confirmant leur interaction (Cusson-Hermance *et al.* 2005). TAK1 est recrutée dans le complexe suite à l'ubiquitination de RIP1. Ce recrutement est probablement médié de manière redondante par les protéines TAB (*TAK1-binding protein*) 1, 2 ou 3 (Chen Wang *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2003). En effet, ces deux dernières protéines sont capables de se lier à des chaînes de poly-ubiquitine liées en K63, comme celles présentes sur RIP1, et de faire le lien avec TAK1 et la protéine TAB1 (Z. J. Chen 2012; Ajibade, Wang *et al.* 2013).

Contrairement à TAK1, TAB1 et TAB2 sont superflues pour l'activation de la voie NF- κ B dans des MEF stimulées par du poly(I:C). Les MEF KO pour TAB1 ou TAB2 montrent une réponse présente, bien que tardive, de la voie JNK (Shim *et al.* 2005). Ainsi, comme démontré précédemment pour RIP1 (Meylan *et al.* 2004), l'activation de la voie JNK semble être en partie indépendante de TAB1 et TAB2. Les protéines TAB1, 2 et 3 pourraient avoir des rôles redondants, et ainsi pallier la déficience de l'une ou l'autre.

TAK1 est, au contraire, essentielle à l'activation des voies NF- κ B et MAPK. Une fois TAK1 associée au complexe contenant TRIF, TRAF6 et RIP1, elle phosphoryle et active les voies de signalisation MAPK kinase 6 et IKK, ce qui conduit à l'activation respective des voies JNK-p38 et NF- κ B (Chen Wang *et al.* 2001).

5.2.5.3.5 La voie NF- κ B

5.2.5.3.5.1 Description de la voie NF- κ B

NF- κ B est un dimère de facteurs de transcription de la famille Rel : RelA/p65, RelB, c-Rel, p52 et p50, les trois premières protéines contenant un domaine transactivateur (Hayden *et al.* 2008). Chaque dimère reconnaît différentes séquences d'ADN en fonction des sous-unités qui le composent. Les deux dimères classiques de NF- κ B sont RelA:p50 et RelB:p52,

responsables de la voie canonique et alternative respectivement (Q. Zhang, Lenardo et Baltimore 2017). En l'absence de stimulation, NF- κ B est principalement cytoplasmique du fait de la liaison de protéines inhibitrices de la famille des I κ B (Hayden et Ghosh 2008). Par exemple, le dimère RelA:p50 est principalement inhibé par la présence d'I κ B α .

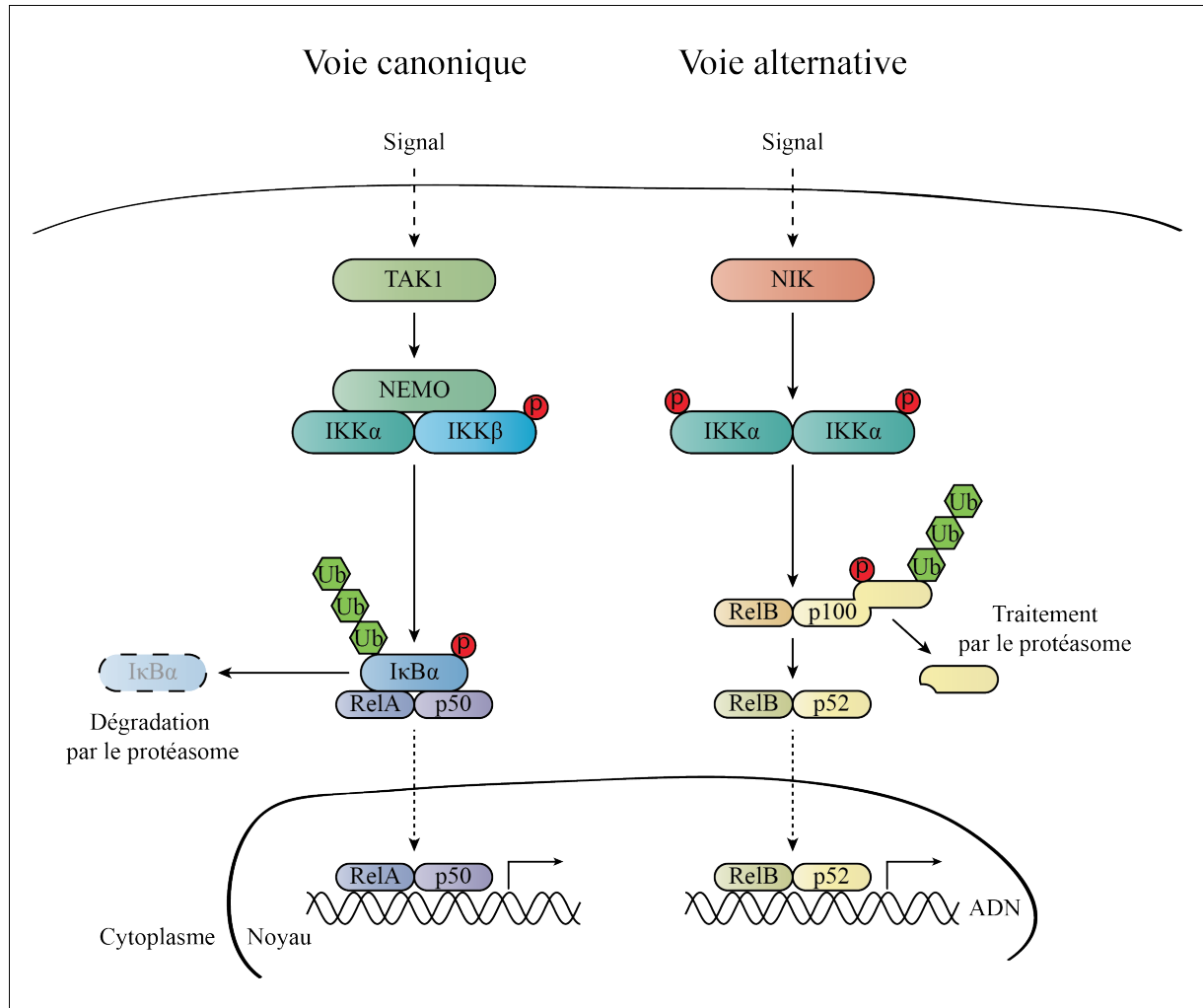


Figure 7 : Voies de signalisation canonique et alternative de NF- κ B.

La voie canonique repose sur l'activation du complexe (IKK α , IKK β , NEMO). Ce complexe phosphoryle I κ B α entraînant sa dégradation, et libérant le dimère RelA:p50. La voie de signalisation alternative ne dépend pas de NEMO. Elle repose sur l'activation d'IKK α déclenchée par NIK (NF- κ B-inducing kinase). Cela induit la phosphorylation de p100 qui est traité par le protéasome et produit le dimère RelB:p52. P : phosphorylation ; Ub : ubiquitine.

L'activation de la voie NF- κ B peut se faire de deux façons, canonique ou alternative. La voie canonique est initiée par la phosphorylation de membres du complexe de kinases appelé IKK (I κ B kinase). Le complexe IKK est constitué de IKK α aussi appelé CHUK (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*), IKK β et IKK γ aussi appelé NEMO (*NF- κ B essential modifier*). NEMO ne possède pas d'activité catalytique, mais est capable de reconnaître des chaînes d'ubiquitine liées en K63 et est essentiel pour la voie canonique. Une fois IKK β

phosphorylé, il phosphoryle à son tour les protéines IκB, notamment IκBα, déclenchant ainsi sa dégradation (Hayden et Ghosh 2012). L'absence d'IκBα permet au dimère RelA:p50 d'être relocalisé dans le noyau et de moduler l'expression de gènes en se liant à l'ADN. La voie alternative repose sur la présence de NIK (*NF-κB-inducing kinase*) qui phosphoryle IKKα, phosphorylant à son tour un IκB appelé p100 et dont le traitement par le protéasome génère p52. Ensuite p52 transloque dans le noyau sous forme du dimère RelB:p52 et module l'expression de gènes (Q. Zhang, Lenardo et Baltimore 2017). Au contraire de la voie canonique, la voie alternative ne dépend ni de la présence de NEMO, ni de la dégradation d'IκBα (Hayden et Ghosh 2012).

5.2.5.3.5.2 L'activation de la voie NF-κB dans la réponse induite par TLR3

Lors de la signalisation induite par TLR3, le complexe formé par TRAF6, RIP1, TAB1, TAB2 ou 3, et TAK1 s'associe aux complexes formés par les trois IKK : IKKα, β et NEMO. La phosphorylation d'IKKβ se fait par TAK1 (Chen Wang *et al.* 2001), grâce à la présence d'une chaîne de poly-ubiquitine dans le complexe. IKKβ induit ensuite la phosphorylation d'IκBα puis sa dégradation, libérant ainsi le dimère RelA:p50. Cette voie de signalisation classique, médiée par IKKβ, conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα, IL-1, IL-6 ou IL-8. La voie de signalisation non-canonique ne semble pas être activée par les TLR, bien que les études sur ce point soient trop limitées pour se prononcer définitivement. Seule la réponse médiée par TLR4 a été montrée comme étant susceptible d'activer la voie alternative via NIK qui entraîne la dégradation de p100 (Bhattacharyya *et al.* 2010; Mordmüller *et al.* 2003). IKKα et RelB pourraient aussi être des facteurs régulant négativement la voie NF-κB suite à son activation par la réponse TLR (Siednienko *et al.* 2011; T. Lawrence *et al.* 2005), cependant aucune de ces études ne montre une activation de la voie NF-κB non-canonique.

5.2.5.3.5.3 Interactions entre facteurs de transcription

NF-κB est susceptible d'agir conjointement avec d'autres facteurs de transcription, modulant ainsi l'activation de gènes en fonction du contexte cellulaire. Comme cela sera discuté au cours de ma thèse, l'activation du facteur de transcription ligand-dépendant AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*), en s'associant avec RelB, entraîne une augmentation de la production d'IL-8 et d'IP-10 (Kado *et al.* 2017; Vogel *et al.* 2007). De même, il a été montré qu'AhR pouvait s'associer à RelA et ainsi contribuer à la régulation de la production d'IL-6 (P. H. Chen

et al. 2012). Certains gènes sont régulés par de nombreux facteurs de transcription, c'est le cas par exemple pour IP-10. La production d'IP-10 est contrôlée, entre autres, par NF- κ B, AP-1 et IRF3 (Brownell *et al.* 2014; T. Kawai *et al.* 2001). Cependant, dans les cellules MEF TBK1 KO, la production d'IP-10 est abolie (McWhirter *et al.* 2004), suggérant que la régulation d'IP-10 est probablement dépendante du type cellulaire étudié. Le promoteur de l'IFN- β possède aussi des éléments de réponse à NF- κ B, AP-1 et IRF3 (Honda, Takaoka et Taniguchi 2006). Il est important de considérer aussi que les facteurs de transcription ne fonctionnent pas nécessairement de manière synergique, et peuvent conduire à l'arrêt de l'expression de certains gènes.

5.2.5.3.6 Les voies MAPK

Les MAPK sont aussi activées par TAK1. Ainsi TAK1 induit la phosphorylation de JNK, p38 (Pisegna S 2004) et ERK (Lundberg *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2003), bien que l'activation de certaines de ces voies dépendent en partie du type cellulaire (Lundberg *et al.* 2007).

La protéine GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) est essentielle à la phosphorylation des MAPK, conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules murines. GSK3 β est ubiquitinée par TRAF6, et joue un rôle dans le complexe de signalisation formé par TLR3, TRAF6 et TAK1 (Ko *et al.* 2015). D'autre signaux, comme le TGF- β , activent aussi les voies JNK et p38 via l'activation de TRAF6 et de TAK1 (Motozo Yamashita *et al.* 2008; Sorrentino *et al.* 2008).

L'activation des voies MAPK conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Karin 1996; Whitmarsh et Davis 1996). AP-1 est un hétéro-dimère conduisant notamment à la production de cytokines pro-inflammatoires (Y. L. Zhang et Dong 2005). Dans les cellules NK (*natural killer*) notamment, l'activation d'AP-1, via la phosphorylation de p38, est nécessaire à la production d'IP-10 en réponse au poly(I:C) (Pisegna S 2004).

Si les voies MAPK sont bien activées suite à la liaison des TLR avec leurs ligands, et notamment suite à l'activation de TLR3, leur contribution à la réponse cellulaire initiée spécifiquement par les TLR reste encore très mal caractérisée.

5.2.5.3.7 Les voies IRF

La voie de signalisation de TLR3, qui lie des ARNdb, entraîne la production d'IFN par la cellule. C'est l'activation de la voie passant par TRAF3, initiée par TRIF, qui a pour conséquence la production d'IFN, déclenchée par l'activation de facteur régulateur de

l'interféron (IRF, *interferon regulatory factor*) 3. Cette capacité de produire de l'IFN est clef dans la réponse antivirale déclenchée par l'activation de TLR3.

5.2.5.3.7.1 La voie IRF3

En plus de TRAF6 conduisant à l'activation d'NF- κ B, TRIF interagit avec la protéine TRAF3. TRAF3 recrute alors les kinases TBK1 et IKK ϵ responsables de l'activation IRF3 et 7 (Oganesyan *et al.* 2006; Fitzgerald *et al.* 2003; Miwa Sasai *et al.* 2005; Doyle *et al.* 2002). L'interaction entre TRIF et le complexe TBK1-IKK ϵ nécessite la protéine NAP1 (*NF- κ B-activating kinase-associated protein 1*) (Miwa Sasai *et al.* 2005; M. Sasai *et al.* 2006). L'activation d'IRF3 par phosphorylation induit sa dimérisation et sa relocalisation dans le noyau où il agit comme facteur de transcription et entraîne la production d'IFN- β .

Une étude réalisée sur les HEK293-TLR3 a mis en évidence la dépendance de la voie IRF3 vis-à-vis de la protéine PI3K. Elle serait recrutée par TLR3 suite à la phosphorylation de la tyrosine 759 dans son domaine TIR. La kinase Akt (*protein kinase B*), activée à son tour par PI3K, jouerait un rôle dans l'activation d'IRF3 et la production d'IL-10. Cependant, le mécanisme d'action d'Akt dans l'activation d'IRF3 reste encore mal connu (Sarkar *et al.* 2004; W. Bai *et al.* 2014). Il est intéressant de noter qu'Akt a aussi la capacité d'induire l'activation d'IKK α et donc d'NF- κ B (D. Bai, Ueno et Vogt 2009).

La réponse IFN- β déclenchée par l'activation d'IRF3 joue un rôle crucial dans la mise en place d'une réponse antivirale. Cette réponse IFN- β est nécessaire dans la résistance aux encéphalites herpétiques. En effet, les personnes déficientes pour TLR3, UNC93B1, TRIF, TRAF3, TBK1 et IRF3 sont plus susceptibles de développer des encéphalites liées à HSV-1 (S. Y. Zhang *et al.* 2007; Casrouge *et al.* 2006; Herman *et al.* 2012; Pérez de Diego *et al.* 2010; Sancho-Shimizu *et al.* 2011; Andersen *et al.* 2015). L'activation d'IRF3 par TLR3 ne conduit pas seulement à la production d'IFN- β , mais a aussi la capacité d'induire la production d'IFN de type III/ λ dans les astrocytes (J. Li *et al.* 2012).

Suite à la liaison de TLR3 et de son ligand, les deux voies de signalisation conduisant à l'activation de NF- κ B et de IRF3 sont induites de façon indépendante. En effet, la déficience de l'une de ces voies de signalisation n'impacte pas l'autre. Ainsi l'absence de TBK1 dans des MEF n'impacte pas la voie NF- κ B (McWhirter *et al.* 2004). De même, la présence de TRAF6 conditionne l'activation de NF- κ B, mais pas l'activation du promoteur de l'IFN- β (S. Sato *et al.* 2003).

5.2.5.3.7.2 Les voies IRF5 et IRF7

En plus de IRF3, il existe d'autres facteurs de régulation, tels que l'IRF5 et l'IRF7, qui interviennent dans la réponse TLR3. Néanmoins, le rôle d'IRF5 sur la réponse TLR3 semble dépendant du type cellulaire étudié. Dans les DC CD11c⁺, IRF5 est requis pour la production de TNF α en réponse au poly(I:C). En revanche, dans ces mêmes cellules, TLR3 et TLR4 ne dépendent pas d'IRF5 pour activer la voie IFN (Paun *et al.* 2008). Dans cette étude, les auteurs ne trouvent pas de différence entre les BMDM WT ou IRF5 KO dans leur réponse au poly(I:C). D'autres travaux montrent que l'activation de la voie de signalisation de TLR3 n'active pas IRF5, ni dans des HEK293 (cellules humaines), ni dans des RAW264.7 (lignée cellulaire murine de monocytes/macrophages), au contraire des voies TLR7 et 8 (Schoenemeyer *et al.* 2005). Cependant, Takaoka *et al.* ont montré que les macrophages de rate issus de souris IRF5 KO sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-12) en réponse au poly(I:C) (Takaoka *et al.* 2005). Les auteurs montrent que IRF5 a la capacité d'interagir avec TRAF6 et MyD88, et que son absence impacte la production de cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 sans perturber la phosphorylation d'NF- κ B, de p38 et de JNK (Takaoka *et al.* 2005).

L'activation d'IRF7 a été initialement rapportée dans les voies de signalisation de TLR7, 8 et 9 (Uematsu *et al.* 2005; Taro Kawai *et al.* 2004). Des travaux de la même équipe ont montré l'activation d'IRF7 suite à la stimulation par poly(I:C) de cellules HEK-293 et U373 d'astrocytome humain (Siednienko *et al.* 2011; Siednienko *et al.* 2010). De plus, dans les astrocytes, la délétion d'IRF7 induit une perte d'expression d'IFN- λ 2 et 3 en réponse à l'activation de TLR3 (J. Li *et al.* 2012).

5.2.6 La régulation de l'activité de TLR3

La voie TLR3 est sujette à de nombreuses étapes de régulation. La nécessité de l'acheminement de TLR3 dans les endosomes où prend place sa maturation par clivage rend ce récepteur inapte à induire une signalisation dans le RE ou le Golgi. La nécessité d'un pH acide pour assurer une bonne dimérisation avec l'ARNdb, ainsi que la localisation du recrutement du complexe de signalisation dans la voie endosomale, assure le confinement de l'activation de TLR3 à la voie endosomale. La spécificité de TLR3 pour l'ARNdb est aussi importante pour restreindre son activation à des ligands normalement absents de la cellule.

Un contrôle fin de la cascade de signalisation est aussi effectué, notamment par la présence de boucles de rétrocontrôle négatif, inhibant le signal une fois celui-ci déclenché.

5.2.6.1 La régulation de la cascade de signalisation de TLR3

Parmi les protéines inhibant la signalisation induite par TLR3, certaines inhibent la totalité du signal déclenché par TLR3, d'autres sont spécifiques de certaines voies de signalisation (NF- κ B, IRF3...). TRAF1 fait partie de la première catégorie. TRAF1 a la capacité d'inhiber les diverses voies initiées par TLR3 et TRIF, que ce soit la voie NF- κ B ou IRF3 (Su *et al.* 2006).

La protéine SIKE (*suppressor of IKK ϵ*) impacte uniquement la voie IRF3. Dans des conditions physiologiques, SIKE est associée avec TBK1, et se dissocie suite à l'interaction avec TLR3. La surexpression de SIKE empêche l'interaction de TBK1 ou IKK ϵ avec TRIF et IRF3, inhibant ainsi l'activation d'IRF3 (J. Huang *et al.* 2005).

Les phosphatases, qui entraînent la déphosphorylation de protéines, jouent aussi un rôle régulateur dans la voie de signalisation de TLR3. Ainsi, les BMDM KO pour SHIP-1 (*SH2 domain-containing inositol phosphatase 1*) montrent une capacité accrue à sécréter des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à induire la production d'IFN- β en réponse au poly(I:C). Cela s'explique par une phosphorylation constitutive de TBK1 (Gabhann *et al.* 2010). La présence de SHIP-1 est donc requise pour inhiber la réponse médiée par TLR3.

MAL est une protéine inhibant le bon fonctionnement d'IRF7 au niveau du promoteur de l'IFN- β . Elle est importante pour la voie de signalisation de TLR 2 et 4. MAL, mais bloque l'activation d'IRF7 en réponse à la stimulation de TLR3 (Siednienko *et al.* 2010).

Ces protéines font partie du contexte cellulaire préexistant, et modulent la réponse induite par TLR3 en régulant l'intensité de la réponse de manière globale ou spécifiquement pour certaines voies de signalisation. D'autres protéines ayant le même effet régulateur voient leur expression renforcée par l'activation de TLR3. Ces protéines contrôlent ainsi l'intensité de l'activation de la voie de signalisation de TLR3 dans le temps.

5.2.6.2 La boucle de rétrocontrôle déclenchée par l'activation de TLR3

Une fois activée, la voie TLR3 induit l'expression d'un programme cellulaire inflammatoire. Le coût de cette inflammation temporaire est justifié par le gain obtenu par l'éradication d'un pathogène. Une inflammation latente est beaucoup plus dommageable pour l'organisme, il est donc crucial d'assurer un contrôle temporel de la voie TLR3.

L'activation de la voie TLR4 par du LPS induit l'activation de p38, permettant ainsi la production d'ICER (*inducible cAMP early repressor*). La protéine ICER produite se lie à RelA, inhibant ainsi la voie NF- κ B. Cela impacte notamment la réponse NF- κ B déclenchée par l'activation de TLR3. (Lv *et al.* 2017).

L'enzyme A20 est une dé-ubiquitinase induite par l'ARNdb. Elle co-immunoprécipite avec TRIF, inhibe l'activation de la voie NF- κ B et agit aussi sur les promoteurs contenant des ISRE (*interferon-sensitive response elements*) ainsi que sur le promoteur de l'IFN- β (Wartz *et al.* 2004). A20 agit en partie sur l'activation de la voie TBK1-IKK ϵ -IRF3 déclenchée par TLR3 en interagissant avec TBK1-IKK ϵ . En présence d'A20, la transcription des gènes dépendants d'IRF3 est diminuée alors que cette transcription augmente en l'absence d'A20 (Saitoh *et al.* 2005).

La protéine TRAF4 est régulée notamment par TLR4 et 9. D'une manière qui rappelle le fonctionnement de TRAF1, TRAF4 interagit avec TRAF6 et TRIF et son expression inhibe les voies NF- κ B et IRF3 dans la réponse TLR3 et 4 (Takeshita *et al.* 2005).

Siednienko *et al.* ont montré que la réponse NF- κ B déclenchée par TLR3 diminue la réponse IFN- β . Cette diminution est orchestrée par le facteur de transcription YY1 (*yinyang1*) dont l'expression est régie par la voie NF- κ B. YY1 diminue l'expression d'IFN- β en impactant la liaison d'IRF7 au promoteur d'IFN- β (Siednienko *et al.* 2011).

D'autres mécanismes de régulation propres aux voies de signalisation activées par TLR3 sont aussi mis en place. Par exemple, l'activation de NF- κ B induit directement la production d'I κ B α . RelA et I κ B α nouvellement produit forment un complexe et sont exportés du noyau, inhibant ainsi l'expression des gènes dépendants de NF- κ B (Chiao, Miyamoto et Verma 1994).

5.2.6.3 La régulation par des protéines virales de la signalisation par TLR3

Les virus ont évolué et développé des moyens d'échappement à la réponse immunitaire, en empêchant son activation. La voie de signalisation de TLR3 est ainsi la cible de protéines virales qui empêchent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN- β . C'est le cas notamment des protéines du virus de l'hépatite C (HCV) NS (protéine non-structurale) 4B et NS3/4A qui induisent la dégradation de TRIF. NS4B induit l'activation de la caspase 8 (Liang *et al.* 2018) conduisant à la dégradation de TRIF et donc à la perte de signalisation via TLR3. NS4/3A est une protéase non-structurale qui clive directement TRIF, empêchant la détection d'HCV (K. Li *et al.* 2005). De manière surprenante, HCV active aussi la voie TLR3 via la protéine virale NS5B. NS5B possède une activité ARN polymérase ARN dépendante, et produit ainsi de l'ARNdb de manière indépendante de la réplication virale. Cet ARNdb est alors détecté par TLR3, mais pas par RIG-I. Ces mécanismes complexes pourraient permettre à HCV d'assurer une production basale d'IFN- β , contrôlant ainsi sa réplication à un niveau faible, non létal et indétectable par l'hôte (Naka *et al.* 2006).

D'autres virus ciblent aussi les voies TLR. Par exemple, la protéine A46R du virus de la vaccine possède un domaine TIR lui permettant de se lier aux protéines adaptatrices des TLR, dont TRIF et MyD88. A46R interfère avec les voies classiques de signalisation, en perturbant notamment l'induction de la réponse IRF3 initiée par TRIF. Ce mécanisme permet au virus d'éviter le contrôle de sa réplication dans les macrophages (Stack *et al.* 2005). Une autre protéine du virus de la vaccine, A52R, se lie à TRAF6 et induit une perte de la signalisation NF- κ B déclenchée par TLR3, en empêchant la liaison de TRAF6 au complexe contenant TAB1 (Harte *et al.* 2003). Le fait que les voies TLR soient la cible de protéines virales est une preuve de leur impact sur la valeur sélective (*fitness*) des virus et de leur rôle important dans la réponse immunitaire contre certaines infections.

5.2.7 L'impact de la signalisation par TLR3

5.2.7.1 Les ligands endogènes de TLR3

TLR3 a rapidement été identifié comme détecteur d'ARNdb (Alexopoulou *et al.* 2001), notamment d'ARNdb purifié de réovirus Lang de type I. L'absence de signalisation par des ligands endogènes a longtemps semblé être un prérequis pour un récepteur détectant des pathogènes. Pourtant, un premier ligand endogène de TLR3 a été identifié par Karikó *et al.* en 2004. Les auteurs ont montré que l'ARN issu de cellules nécrotiques pouvait stimuler les DC humaines. L'activation étant abrogée en présence de ribonucléase, ces résultats suggèrent l'implication de TLR3. Les auteurs proposent que l'ARNm extracellulaire, de par la présence de structures secondaires, est susceptible d'induire l'activation de TLR3 (Karikó *et al.* 2004). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de péritonite, pour lequel TLR3 est responsable d'une activation importante et soutenue de la réponse inflammatoire aux cellules nécrotiques. De plus, TLR3 est requis pour la production de cytokines par les macrophages péritonéaux murins en présence de cellules nécrotiques, alors que la présence de cellules apoptotiques n'induit pas l'activation de la voie de signalisation de TLR3 (Cavassani *et al.* 2008). De même, l'incubation de fibroblastes avec des cellules nécrotiques issues de liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde résulte en la production de chimiokines via l'activation de TLR3 (Brentano *et al.* 2005).

Un autre ligand endogène apparaît lors de l'exposition de cellules aux ultraviolets B (UVB). De longs ARN non codants voient leur structure modifiée au niveau des domaines double brin. Ces ARN sont rejetés par les cellules irradiées et induisent une réponse via TLR3 dans les cellules voisines (Bernard *et al.* 2012).

Les rétrovirus endogènes sont des éléments dégradés du génome issus d'infections virales anciennes. Leur expression génère des acides nucléiques détectables par les TLR endosomaux (Yu *et al.* 2012). L'idée sous-jacente à l'existence des PRR reste la lutte contre les infections. TLR3 est un acteur clef, capable de détecter l'ARNdb produit notamment lors d'infections virales, déclenchant une réponse antivirale.

5.2.7.2 Les ligands exogènes de TLR3

De nombreux virus induisent une réponse dépendante, au moins en partie, de TLR3. C'est le cas entre autres du rhinovirus sérotype 16, du virus West Nile, du coxsackievirus groupe B sérotype 3, du virus de la stomatite vésiculaire, du virus de l'herpès simplex (HSV)-1, du poliovirus souche Mahoney, du virus Influenza A/Scotland/20/74(H3N2), du virus Punta Toro de souche Adames, du virus Zika et du virus de l'hépatite C (Hewson *et al.* 2005; T. Wang *et al.* 2004; Daffis *et al.* 2008; Negishi *et al.* 2008; Oshiumi *et al.* 2011; Guillot *et al.* 2005; Gowen *et al.* 2006; Dang *et al.* 2016; Wörnle *et al.* 2006). Cependant, les ligands issus de virus sont mal définis ; et même si ces virus produisent bien des fragments d'ARNdb au cours de leur cycle viral, la localisation de ces ARNdb dans les endosomes n'a jamais été étudiée.

Pour la plupart de ces virus, la réponse déclenchée par TLR3 a seulement été analysée à l'échelle de l'organisme murin. Néanmoins, il a été montré que le poliovirus est capable d'induire une réponse impliquant TRIF dans des DC dérivées de moelle osseuse murine (*bone marrow-derived dendritic cells*, BMDC) et BMDM (Oshiumi *et al.* 2011). L'implication de la voie TLR3 en réponse au virus Influenza A a été observée dans les cellules humaines BEAS-2B (Guillot *et al.* 2005), et le virus Zika impacte via TLR3 la croissance de neurosphères murines (Dang *et al.* 2016).

Il est important de noter qu'aucune de ces études n'a exclu le fait que l'activation de la voie TLR3 puisse se faire par d'autres ligands que des molécules virales, tels que, par exemple, l'ARN issu de cellules nécrotiques. De plus, les ligands de TLR3 lors d'infections virales ne sont jamais caractérisés de façon précise, et leur mode d'accès aux endosomes reste mal caractérisé.

Tableau 2 : Rôle de TLR3 dans les infections virales
adapté de (M. Patel *et al.* 2014; Jensen et Thomsen 2012; Perales-Linares et Navas-Martin 2013)

Virus	Impact de TLR3	Référence
Cytomégalo-virus murin	Protection	(Tabeta <i>et al.</i> 2004)
HSV-1	Protection	(S. Y. Zhang <i>et al.</i> 2007; Casrouge <i>et al.</i> 2006; Herman <i>et al.</i> 2012; Pérez de Diego <i>et al.</i> 2010; Sancho-Shimizu <i>et al.</i> 2011; Andersen <i>et al.</i> 2015; Lafaille <i>et al.</i> 2012; Y. Guo <i>et al.</i> 2011)
HSV-2	Protection	(Reinert <i>et al.</i> 2012)
Virus encephalo-myocarditis	Protection	(Hardarson <i>et al.</i> 2007)
Virus Coxsackie B	Protection	(Negishi <i>et al.</i> 2008; Richer <i>et al.</i> 2009)
Poliovirus	Protection	(Abe <i>et al.</i> 2012; Oshiumi <i>et al.</i> 2011)
Rotavirus	Protection	(Pott <i>et al.</i> 2012)
HCV	Protection et réponse inflammatoire nocive	(N. Wang <i>et al.</i> 2009; Kui Li <i>et al.</i> 2012; Wörnle <i>et al.</i> 2006)
Virus de la dengue	Protection	(Y. T. Tsai <i>et al.</i> 2009)
Virus Hantaan	Protection	(Handke <i>et al.</i> 2009)
Phlebovirus	Réponse inflammatoire nocive	(Gowen <i>et al.</i> 2006)
Virus de la grippe	Protection et réponse inflammatoire nocive	(Le Goffic <i>et al.</i> 2006; Guillot <i>et al.</i> 2005; Esposito <i>et al.</i> 2012; Hidaka <i>et al.</i> 2006)
Virus de la vaccine	Réponse inflammatoire nocive	(Hutchens <i>et al.</i> 2008)
Virus du Nil occidental	Protection et réponse inflammatoire nocive	(Tian Wang <i>et al.</i> 2004; Daffis <i>et al.</i> 2008)

5.2.7.3 Les fonctions de TLR3 lors d'infections

Le fait que TLR3 puisse être activé suite à la reconnaissance de l'ARNdb produit notamment lors d'infections virales suggère un rôle de la voie de signalisation TLR3 dans la lutte contre ces infections. Comme mentionné plus haut, TLR3 joue un rôle crucial dans la protection contre les encéphalites lié à HSV-1 (S. Y. Zhang *et al.* 2007; Casrouge *et al.* 2006; Herman *et al.* 2012; Pérez de Diego *et al.* 2010; Sancho-Shimizu *et al.* 2011; Andersen *et al.*

2015). Le rôle protecteur de TLR3 au cours de l'infection à HSV-1 est associé à la production d'IFN- λ suivant la stimulation du TLR3, permettant ainsi l'inhibition de la réplication d'HSV-1 dans les astrocytes (J. Li *et al.* 2012). L'association de TLR3 et de la réponse au virus de la grippe a aussi été révélée par l'apparition d'une encéphalite chez un patient porteur d'une mutation non-sens de TLR3 (Hidaka *et al.* 2006). Il semblerait donc que les patients déficients pour la voie TLR3 soient susceptibles aux encéphalites herpétiques et grippales, sans pour autant avoir des prédispositions envers d'autres virus. Ces résultats indiquent que si la réponse à TLR3 est commune à de nombreux virus, c'est seulement pour les encéphalites qu'elle est non-redondante et essentielle.

Le rôle de TLR3 dans d'autres infections est souvent plus ambivalent (voir Tableau 2). Il joue un rôle important pour limiter la charge virale, mais parfois au détriment de l'intégrité de certains organes, notamment à cause d'une production de cytokines élevée. À l'inverse des cas précédents, démontrant un effet protecteur de TLR3 au sein du SNC, TLR3 aurait un effet négatif dans le cas d'une infection par le virus de la méningo-encéphalite à tiques (Kindberg *et al.* 2011). Chez la souris, en réponse à une infection par le virus du Nil occidental, l'activation de la voie TLR3 induit des dommages de la barrière hémato-encéphalique, causant dans certains cas des encéphalite létales (Tian Wang *et al.* 2004). Une autre étude, cependant, a démontré au contraire un rôle protecteur de TLR3 suite à l'infection par le virus du Nil occidental, bien qu'ils observent aussi une dégradation de la barrière hémato-encéphalique (Daffis *et al.* 2008).

Le rôle de TLR3 dans le SNC a été très étudié, et semble vraiment particulier par rapport à ce qui se passe dans le reste de l'organisme. L'expression de TLR3 dans de nombreux types cellulaires du SNC (neurones, oligodendrocytes, astrocytes et cellules microgliales (Miettinen *et al.* 2001; S. Y. Zhang *et al.* 2013)) renforce l'idée que son rôle y est important.

Dans le cas d'une infection par HCV, l'action de TLR3 semble nocive dans certains organes, notamment au niveau du rein (Wörnle *et al.* 2006). Au niveau du foie, HCV induit, via TLR3, l'expression de cytokines jouant un rôle dans la réponse immunitaire, ainsi que dans l'apparition de maladies du foie associées à HCV (Kui Li *et al.* 2012). Ces deux exemples démontrent bien la dualité du système immunitaire. La réponse déclenchée est efficace pour éliminer les infections mais elle est nocive pour les tissus de l'organisme. L'organisme tolère une inflammation aiguë et courte, et le bénéfice de l'éradication du pathogène est supérieur au coût pour l'organisme. En revanche, en cas d'inflammation chronique, les tissus sont attaqués, et TLR3 devient néfaste.

TLR3 joue aussi un rôle protecteur dans l'infection par certaines bactéries. Dans le cas d'infection par *Chlamydia muridarum* chez la souris, l'absence de TLR3 entraîne des

symptômes plus sévères (Carrasco *et al.* 2018). Les infections par *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guérin (BCG) chez la souris sont exacerbées en présence de TLR3. TLR3 est en effet activé suite à l'infection par le BCG et induit la sécrétion d'IL-10, ce qui entraîne la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au profit du développement de l'infection (W. Bai *et al.* 2014). Ces exemples démontrent la complexité du rôle des PRR. Ils apportent un avantage global de survie, mais certains pathogènes ont évolué pour tourner ce système à leur avantage.

5.2.7.4 Les fonctions de TLR3 dans les cancers

Le rôle de TLR3 dans la réponse au cancer est délicat à étudier de par la complexité de l'environnement tumoral, qui fait intervenir de nombreux types cellulaires. Les modèles utilisés reposent souvent sur des KO à l'échelle de l'organisme et sont donc restreints aux études chez la souris. La déficience en TLR3, 7 et 9 chez certaines lignées de souris, aux rétrovirus endogènes actifs, conduit à l'apparition de leucémies. Les TLR endosomaux joueraient donc un rôle dans la surveillance immunitaire (Yu *et al.* 2012). Dans un autre modèle murin, l'implantation d'adénocarcinome transgénique de prostate de souris dans des souris TLR3 KO provoque une croissance tumorale plus importante que dans des souris WT (Chin *et al.* 2010). Il ressort aussi de cette étude que l'absence de IFNAR1 (*IFN-α receptor 1*) induit le même effet que l'absence de TLR3. Ainsi, la surveillance immunitaire médiée par TLR3 passe notamment par la production d'IFN de type 1. D'autres travaux montrent cependant qu'en l'absence de TLR3, 7 et 9, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ assurent la suppression totale d'un cancer chez la souris (Klein *et al.* 2017). Ces différences reflètent bien la diversité des tumeurs qui rend leur étude complexe.

Chez l'homme, le rôle de TLR3 dans le développement tumoral n'est pas établi. En revanche, son activation par des ligands exogènes induit une réponse, à prédominance anti-tumorale, détaillée ci-dessous (5.2.7.7 Les fonctions thérapeutiques potentielle p.45)

5.2.7.5 Les fonctions de TLR3 dans les maladies auto-inflammatoires et auto-immunes

Malgré de nombreux mécanismes de régulation de la voie TLR3, certaines pathologies auto-immunes semblent liées à une activation chronique de TLR3.

Dans la polyarthrite rhumatoïde, les cellules nécrotiques déclenchent une réponse dans les fibroblastes synoviaux (Brentano *et al.* 2005). Cette réponse est médiée par TLR3, et pourrait être responsable de la réponse inflammatoire, contribuant ainsi au développement de la

pathologie. De plus, chez les patients atteints de cette pathologie, l'expression de TLR3 est augmentée par l'IL-17 présent dans le liquide synovial (S.-Y. Lee *et al.* 2014). TLR3 serait donc impliqué au moins dans le maintien du processus d'arthrite, comme observé dans un modèle adapté au rat (Meng *et al.* 2010).

TLR3 joue aussi un rôle dans le développement de certains diabètes. Les cellules β des îlots de Langerhans sont responsables de la production d'insuline, qui permet de réguler la glycémie. La perte de ces cellules est une cause de diabète. Il a été rapporté que des infections virales pourraient être dans certains cas à l'origine de la maladie (Jun et Yoon 2003). Le traitement par poly(I:C), mimant certains aspects d'une infection virale, induit l'apoptose des cellules β de manière TLR3 dépendante (Dogusan *et al.* 2008). Les souris TLR3 KO présentent un niveau d'insuline plus élevé qui est bien toléré par l'organisme (Strodtz *et al.* 2015). TLR3 jouerait donc un rôle dans le métabolisme et la régulation de la glycémie de l'organisme, bien que le mode de fonctionnement ne soit pas décrit.

L'activation exogène de TLR3 peut aussi jouer un rôle protecteur, notamment dans le système nerveux central, dans un modèle murin de sclérose en plaques. L'injection de poly(I:C) dans ces souris prévient la démyélinisation en cas de rechute. La production d'IFN- β est essentielle pour cette protection (Touil *et al.* 2006).

Un article récent met en évidence que TLR3 peut être acteur d'une inflammation systémique. Dans le sang de patients schizophrènes, la protéine syncytine-1, exprimée par un rétrovirus endogène, est surexprimée et associée à l'activation de la protéine C réactive, marqueur d'inflammation. Il semblerait que syncytine-1 ait la capacité de déclencher l'activation de la voie TLR3, ce qui induit la production d'IL-6 et l'activation de la protéine C réactive. Bien que le lien avec le développement de la schizophrénie ne soit pas étudié, il est intéressant de noter ce mode d'activation de TLR3, et la possibilité que la schizophrénie soit liée à un dérèglement de l'inflammation (X. Wang *et al.* 2018).

Il semblerait que TLR3 ait une fonction protectrice essentielle dans le système nerveux central, de par sa capacité à induire la production d'IFN- β aux propriétés anti-inflammatoires. Dans d'autres organes, au contraire, l'activation de TLR3 est plus nocive et pro-inflammatoire. On retrouve ici la dualité de la réponse TLR3, protectrice ou délétère, avec une différence entre le SNC et le reste de l'organisme.

5.2.7.6 Les fonctions de TLR3 dans la guérison de blessures

Le rôle de TLR3 a aussi été étudié dans le processus de guérison, que ce soit suite à une blessure physique, une irradiation par des UVB ou bien lors d'une ischémie-reperfusion (I/R)

(soit une hypoxie suivie d'une ré-oxygénation). Les ligands de TLR3 dans ces contextes-là sont mal connus. Cependant, il existe bien des ligands endogènes de TLR3 présents notamment en cas d'irradiation par des UVB (Bernard *et al.* 2012) ou bien associés aux cellules nécrotiques (Cavassani *et al.* 2008). Dans les modèles d'études, ces ligands théoriques sont mimés par l'injection de poly(I:C) afin d'observer l'impact de l'activation potentielle de TLR3 lors de blessures.

Chez les souris TLR3 KO, les blessures réalisées par excision mettent plus de temps à se résorber. En l'absence de TLR3, les macrophages et les neutrophiles ne sont pas recrutés sur le site de la blessure à cause d'un faible niveau de cytokines (Lin *et al.* 2011). Le fait que dans les kératinocytes, le poly(I:C) induise l'expression de gènes associés avec la maintenance de l'épiderme rajoute de l'importance au rôle joué par TLR3 dans la reconstruction de l'épiderme (Borkowski *et al.* 2013).

Chez la souris, l'induction de colites par prise de dextran sulfate de sodium est inhibée par l'injection en sous-cutané de poly(I:C). Cette effet est absent chez les souris TLR3 KO, indiquant que l'impact du poly(I:C) est bien dépendant de TLR3 (Vijay-Kumar *et al.* 2007). TLR3 pourrait donc jouer un rôle protecteur dans les inflammations intestinales.

La consommation d'alcool crée des lésions au niveau du foie. L'activation de TLR3 par l'injection de poly(I:C) atténue ces blessures chez la souris. Les cellules Kupffer et les cellules stellaires hépatiques ont la capacité de produire la cytokine anti-inflammatoire IL-10 en réponse au poly(I:C). Cet effet protecteur du poly(I:C) est diminué chez les souris TLR3 ou IL-10 KO (Byun *et al.* 2013).

Suite à une I/R, la réponse de l'organisme lui permet de mieux résister à un second épisode d'I/R (X. Q. Liu, Sheng et Qin 2009). Le processus de ce mécanisme restant mal connu, certaines équipes ont cherché si TLR3 y jouait un rôle. Chez les rats, l'injection de poly(I:C) induit un effet protecteur diminuant les blessures occasionnées par I/R (Y. Li *et al.* 2015). Cela est sans doute dû à la sécrétion TLR3 dépendante d'IFN- β par les astrocytes. Chez la souris, l'injection de poly(I:C) permet d'empêcher la production de TNF α et d'IL-6 suite à une I/R cérébrale (Pan *et al.* 2012). Ces études démontrent les propriétés anti-inflammatoires de l'activation de TLR3 dans le cerveau. Cette activation est cependant dépendante d'un ligand exogène, le tissu cérébral des souris TLR3 KO se comportant comme celui des souris WT en cas d'I/R cérébrale (Hyakkoku *et al.* 2010). Personne n'a pour l'instant démontré la présence d'une réponse TLR3 suite à une I/R. Si cette réponse existait, elle pourrait sans doute avoir un rôle protecteur, au moins lors d'un second épisode d'I/R.

Dans le cœur, au contraire du cerveau, TLR3 joue un rôle nocif en cas d'I/R ou d'infarctus du myocarde. TLR3 induit l'activation délétère de la voie NF- κ B, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α . Les souris TLR3 KO montrent une atténuation des effets adverses déclenchés par un modèle d'I/R cardiaque (Lu *et al.* 2014; C. Chen *et al.* 2014). L'activation de TLR3 dans ce système est liée à la nécrose de cardiomyocytes, ce qui génère des ligands de TLR3, et promeut une réponse inflammatoire délétère (C. Chen *et al.* 2014).

Enfin, TLR3 joue un rôle dans la protection des parois des artères. Un modèle de souris utilisé pour étudier le développement d'athérosclérose montre une mise en place plus rapide de la maladie en l'absence de TLR3 (Cole *et al.* 2011).

Ainsi, TLR3 est un composant important de l'homéostasie. La présence de ligand endogène lors de blessures, ainsi que l'expression de TLR3 dans de nombreux tissus, renforce l'importance de son rôle. Cependant, l'activation de TLR3 n'est pas toujours positive pour l'organisme. La modulation de son activité par agoniste ou antagoniste permettrait de contrôler son activation pour un bénéfice thérapeutique. En cas de blessure, TLR3 représente une cible potentielle, qui pourrait cependant n'être utile que pour l'activation de voies spécifiques (NF- κ B ou IFN- β). Le traitement directement par TNF α ou IFN- β pourrait être équivalent avec moins d'effets secondaires.

Malgré les effets secondaires potentiels et mal connus, des traitements ciblant TLR3 sont envisagés. Ils ont la capacité d'induire une stimulation complexe de la réponse immunitaire, une propriété qui pourrait se montrer utile pour une utilisation en tant qu'adjuvants lors de vaccins ou de traitements nécessitant une mobilisation du système immunitaire.

5.2.7.7 Les fonctions thérapeutiques potentielles de la modulation de TLR3

5.2.7.7.1 Les effets bénéfiques directs de l'activation de TLR3

5.2.7.7.1.1 Dans les cancers

La majorité des études montrent que l'activation de TLR3 est délétère à la croissance tumorale. TLR3 est connu pour induire l'apoptose dans des lignées tumorales, notamment dans certaines lignées de cancer du sein, ou de carcinomes hépatocellulaires (Salaun *et al.* 2006; Z. Guo *et al.* 2012). L'activation de la caspase 8 de manière dépendante de TRIF et de RIP1 est nécessaire pour la mise en place d'un complexe de mort cellulaire par apoptose en réponse à une stimulation par le poly(I:C) (Feoktistova *et al.* 2011; Estornes *et al.* 2012). La mort cellulaire induite peut aussi être nécrotique, notamment en présence de RIP3.

L'injection de poly(I:C) dans des souris présentant une tumeur pulmonaire induite par une lignée métastatique induit une diminution de la croissance tumorale (Forte *et al.* 2012). Cette diminution est due à l'activation des DC et est dépendante de la production d'IFN de type 1. Cette activation est suivie d'une réponse efficace des cellules T cytotoxiques contre la tumeur. Lors de la transplantation d'adénocarcinome transgénique de prostate de souris, la stimulation par poly(I:C) induit là aussi une réduction du volume de la tumeur. Cette réduction est de même dépendante de TLR3 et de la réponse IFN. La déplétion des cellules NK empêche cette réduction de taille et entraîne l'expansion de cellules T régulatrices (Chin *et al.* 2010), ce qui démontre le rôle des NK dans la réponse anti-tumorale déclenchée par le poly(I:C).

L'injection de liposomes contenant du poly(I:C), capables de traverser les membranes, permet de provoquer une réponse efficace contre une tumeur (Ce Wang *et al.* 2012). Cette réponse repose sur l'activation des DC, une production d'IFN de type 1 ainsi que sur la participation des cellules T CD8⁺ et la présence d'antigènes. Le poly(I:C) peut cependant aussi déclencher un signal via les détecteurs cytoplasmiques (RIG-I et MDA5), surtout lorsqu'il est intracellulaire. Les auteurs de cette étude n'excluent pas cette possibilité, bien que le poly(I:C) co-localise avec les compartiments contenant TLR3 (Ce Wang *et al.* 2012).

L'interaction entre les DC et les NK est favorisée par la présence de poly(I:C). En effet, poly(I:C) induit non seulement la sécrétion de cytokines, mais aussi l'expression à la membrane cytoplasmique des DC et des NK de la protéine *IRF3-dependent NK-activating molecule* (INAM). Cette expression est dépendante de TRIF et de la voie IRF3. INAM est essentielle, mais non suffisante pour l'activation des NK. La transplantation de DC INAM⁺ suffit pour induire la régression de tumeurs sensibles au NK chez la souris. Ainsi, le mécanisme déclenchant l'action d'une réponse anti-tumorale suite à l'activation de TLR3 repose en partie sur la production d'IFN de type 1, l'activation de DC et des NK.

La réponse déclenchée par TLR3 peut aussi induire un changement profond dans le microenvironnement tumoral en convertissant les cellules myéloïdes, dont les macrophages, les faisant passer d'un comportement anti-inflammatoire, tolérogénique et pro-tumoral à un comportement anti-tumoral. Une étude réalisée sur un modèle murin de cancer pulmonaire de Lewis montre que l'injection de poly(I:C) induit une régression de la tumeur en convertissant les macrophages d'une fonction pro-tumorale à une fonction anti-tumorale. Cela se traduit par une différenciation des macrophages vers un phénotype inflammatoire (M1), et une production de TNFα nécessaire pour la régression de la tumeur. Dans des souris TRIF KO cet effet est absent, indiquant le rôle majeur de TLR3 (Shime *et al.* 2012). Une autre étude montre des

résultats concordants en utilisant un autre ligand de TLR3 appelé poly-ICLC (poly I:poly C avec un stabilisant en poly-1-lysine) (B. Liu *et al.* 2016).

Malgré les effets bénéfiques potentiels d'un traitement par poly(I:C), à l'échelle d'une tumeur l'activation de TLR3 ne déclenche pas uniquement la mort cellulaire, et la mise en place d'un microenvironnement anti-tumoral. Il a été montré que la stimulation par poly(I:C) pouvait induire la survie des cellules tumorales via TRIF. Cette survie est annulée par la production d'IFN de type 1, également médiée par TRIF (Hasan *et al.* 2007). TLR3 a été montré comme ayant la capacité de promouvoir les capacités invasives des cellules métastatiques issues de l'épithélium intestinal (Bugge *et al.* 2017). Dans un autre article sur le cancer du sein, l'activation de TLR3 induit une diminution de la taille d'une tumeur, mais aussi l'activation des voies β -caténine et NF- κ B qui facilitent l'apparition d'un phénotype de type cellule-souche, nuisant à la guérison. Ainsi, malgré un retard de croissance de la tumeur suite à l'activation de TLR3, l'induction de cellules pluripotentes dans la tumeur non détruite pourrait engendrer une seconde phase de prolifération plus importante et plus robuste (Jia *et al.* 2015).

5.2.7.7.1.2 Dans les infections virales

Le poly(I:C) inhibe la réplication virale via la production d'IFN de type 1. C'est le cas par exemple contre le virus du chikungunya (Y. G. Li *et al.* 2012), ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Trapp *et al.* 2009). Cependant, à part en tant qu'adjuvant, le poly(I:C) ne semble pas considéré comme traitement antiviral potentiel du fait qu'une réponse systémique à TLR3 serait dommageable à l'organisme. De plus, les traitements par IFN seraient plus directs, mais sont très peu utilisés à cause des effets secondaires.

Il est intéressant de noter que la famille des antibiotiques aminoglycosides confère une résistance à certaines infections virales, incluant le HSV, le virus influenza A et le virus Zika. Ces antibiotiques déclenchent une réponse TLR3 de manière indépendante du microbiote. Le ligand détecté par TLR3 n'est pas connu, mais cela repose probablement sur la capacité de ces antibiotiques à lier l'ARN ribosomal (Gopinath *et al.* 2018).

5.2.7.7.2 L'utilisation de ligands de TLR3 en tant qu'adjuvants

La transformation de l'environnement tumoral, souvent tolérogène, est aussi un point critique dans les traitements anticancéreux. L'activation du système immunitaire est centrale dans les thérapies basées sur des vaccins anti-tumoraux, ou des inhibiteurs de points de contrôle. L'émergence de ces deux modes de thérapies prometteuses nécessite la mise en place

d'adjuvants efficaces dans un contexte tumoral. Les TLR sont dans leur ensemble la cible de nombreux adjuvants potentiels (Shi *et al.* 2016; Pradere, Dapito et Schwabe 2014). TLR3 a la capacité d'induire une présentation croisée de la part des DC CD141⁺ (Schulz *et al.* 2005; Jongbloed *et al.* 2010), et ainsi de conduire à une activation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques impliquées dans les réponses anti-cellulaires (Salem *et al.* 2005). L'adjonction de poly(I:C) comme adjuvant dans un vaccin contenant le glycopeptide MUC1 (issu de Mucin-1) permet la mise en place d'une réponse anti-tumorale dirigée spécifiquement contre les cellules exprimant MUC1 (Glaffig *et al.* 2017). Une récente étude montre que le poly(I:C) peut jouer un rôle comme adjuvant d'un vaccin ciblant le VIH-1. Dans ce contexte, des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du VIH-1 sont produites. De plus, le poly(I:C) démontre une capacité à induire l'expression du VIH dans des cellules réservoirs, permettant leur élimination (Cheng *et al.* 2018).

Le traitement de cancers par inhibiteur de point de contrôle permet d'annuler des signaux de non-réponse présents dans le micro-environnement tumoral. Par exemple, l'interaction entre le récepteur PD-1 (*programmed death 1*) présent à la surface d'une cellule immunitaire et son ligand PD-L1 (*PD-1 ligand 1*) (une autre molécule membranaire) inhibe l'activation de la cellule immunitaire (Karwacz *et al.* 2011). Le traitement par inhibiteur de point de contrôle, ici des anti-PD1 ou anti PD-L1, prévient la mise en place de ce point de contrôle, permettant une réponse immunitaire. L'efficacité de cette technique requiert la préexistence de lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T lymphocytes* CTL) inhibés par l'interaction avec PD-L1 (Tumeh *et al.* 2014). L'utilisation d'adjuvants ciblant TLR3 permettrait de stimuler la production de ces CTL spécifiques d'antigènes tumoraux dont le contrôle serait levé par anti-PD1 ou anti-PD-L1. Cette production de CTL serait permise par l'activation des DC présentes dans les ganglions lymphatiques par poly(I:C).

Un récent adjuvant ciblant spécifiquement TLR3 (Misako Matsumoto *et al.* 2015), sODN-140/ARNAX (un oligodésoxynucléotide), couplé à des antigènes associés aux tumeurs, présente la capacité d'induire un rejet de la tumeur associée aux antigènes. En plus de sODN-140s, l'adjonction d'anti-PD-L1 induit le priming des CTL anti-tumoraux, et augmente l'infiltration des cellules T CD8⁺ dans la tumeur chez la souris (Takeda *et al.* 2017).

La mise en place de ces nouveaux adjuvants permettrait de déclencher une réponse immunitaire différente de celle déclenchée par les adjuvants classiques (sels d'aluminium, émulsion huile/eau), ouvrant d'autres possibilités de vaccins ciblant des maladies infectieuses importantes (paludisme, VIH...), des cancers, ou des maladies neurodégénératives comme Alzheimer.

L'activation de TLR3 par divers ligands ne génère pas qu'une réponse bénéfique pour l'organisme. Il est important de réaliser que la réponse déclenchée par le poly(I:C) n'est pas uniquement médiée par TLR3, mais aussi par certains détecteurs cytoplasmiques (RIG-I et MDA5) initiant la production de cytokines inflammatoires via l'activation de la protéine MAVS (Wu et Hur 2015). De plus, la réponse déclenchée par le poly(I:C) peut être très puissante et induire des effets secondaires indésirables (Lampkin *et al.* 1985; Levine et Levy 1978). Ces effets adverses limitent la dose maximale utilisable et donc l'impact de poly(I:C) sur le système immunitaire. D'autres ligands de TLR3 ont été développés, présentant pour certains une spécificité plus importante pour TLR3, parmi lesquels sODN-140, poly-ICLC et polyA:U (Galluzzi *et al.* 2012; Misako Matsumoto *et al.* 2015). Parmi ces différents ligands, l'utilisation en tant qu'adjuvants de poly(I:C) ou de poly-ICLC fait l'objet d'essais cliniques (<https://www.clinicaltrials.gov/>). La synthèse du sODN-140 est probablement encore trop récente pour avoir pu conduire à des essais cliniques, mais sa capacité à ne pas déclencher de réponse délétère via RIG-I ou MDA5 (Misako Matsumoto *et al.* 2015) en fait un candidat intéressant.

Ainsi, TLR3 est la cible d'adjuvants prometteurs pour la mise en place de traitements anti-tumoraux. Il reste crucial de mieux appréhender toutes les étapes de mise en place et de régulation de la voie TLR3 afin d'assurer une efficacité optimale et exempte d'effets indésirables de ces nouveaux traitements. Cet approfondissement des connaissances est rendu nécessaire en partie par la diversité des voies de régulation de TLR3, la diversité de niveaux d'expression entre types cellulaires et entre tumeurs, ainsi que par les différentes réponses induites par TLR3 en fonction du contexte.

Au cours de ma thèse j'ai pu mettre en évidence le rôle du récepteur d'aryl-hydrocarbène dans la voie de signalisation de TLR3.

5.3 Le récepteur d'aryl-hydrocarbène

5.3.1 Les mécanismes d'activation d'Ahr

AhR est un facteur de transcription dont l'activité est induite par la liaison à un ligand (Figure 8). En l'absence de ligand, AhR est présent dans le cytoplasme et complexé aux protéines HSP90 (*heat shock protein 90*), XAP2 (*hepatitis B virus X-associated protein 2*) et p23, qui empêchent sa translocation dans le noyau (Petrulis et Perdew 2002). En présence de

ligand, AhR transloque dans le noyau où il se sépare de HSP90, XAP2 et p23, et se lie à ARNT (*AhR nuclear translocator*), aussi appelé HIF-1 β . AhR et ARNT lient ensemble des promoteurs contenant des éléments de réponse à la dioxine appelés éléments de réponse aux xénobiotiques (*xenobiotic response element*, XRE) (Larigot *et al.* 2018). AhR est ensuite rapidement dégradé par le protéasome (Davarinos et Pollenz 1999).

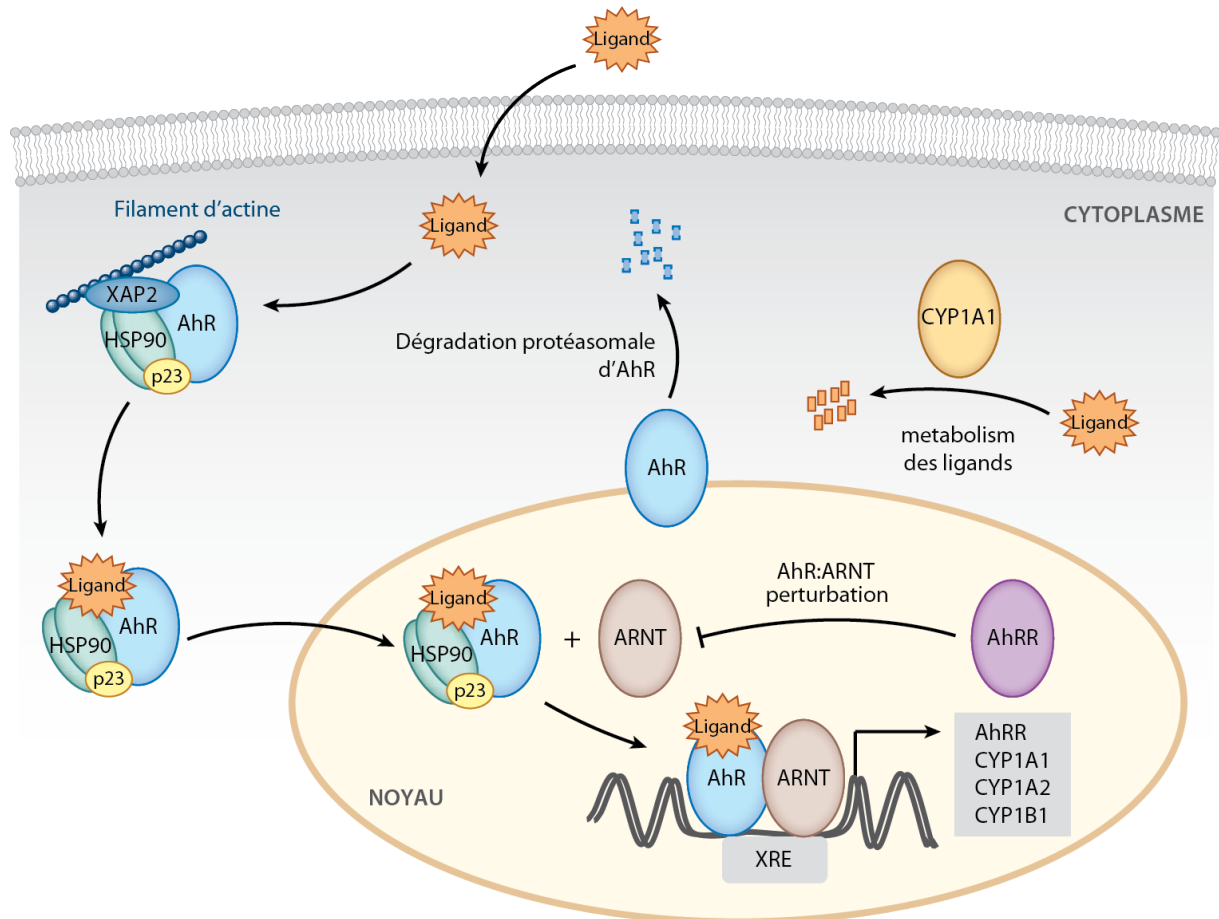


Figure 8 : Voie de signalisation canonique d'Ahr.

En l'absence de ligand, Ahr est présent dans le cytoplasme sous forme d'un complexe avec HSP90, XAP2 et p23. Suite à sa liaison à un ligand, il transloque dans le noyau où il quitte le complexe pour interagir avec ARNT. Le dimère Ahr:ARNT régule l'expression de gènes contenant un motif XRE dans leur promoteur. Il en résulte, entre autres, l'expression des enzymes du cytochrome p450 1 (CYP1)A1, A2 et B1 ainsi que l'expression d'AhrR (*AhR repressor*). Ce dernier va perturber la formation du complexe Ahr:ARNT. Ahr va aussi être dégradé suite à son activation. Adapté de (Stockinger *et al.* 2014)

5.3.2 Les ligands d'Ahr

5.3.2.1 Les ligands exogènes d'Ahr

Ahr lie, comme son nom l'indique, des hydrocarbures aromatiques (voir Figure 9). Les ligands exogènes artificiels d'Ahr sont considérés comme des polluants toxiques (xénobiotiques), de par leur capacité à induire une signalisation via Ahr. Les premiers ligands

découverts furent les dioxines et les polychlorobiphényles (PCB) (Larigot *et al.* 2018). Un ligand classique dans les études sur AhR est le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), qui est référencé par le Centre international de recherche sur le cancer comme cancérogène de groupe 1 (Guyton *et al.* 2018), et est tristement célèbre pour avoir été libéré lors de la catastrophe de Seveso (https://fr.wikipedia.org/wiki/Catastrophe_de_Seveso). L'incapacité de l'organisme à évacuer ou dégrader les dioxines est probablement responsable de leur toxicité (Aylward *et al.* 2005).

D'autres molécules, issues de l'alimentation, ont la capacité à lier AhR. Ces molécules sont les flavonoïdes présents dans les fruits et légumes (S. Zhang, Qin et Safe 2003), ainsi que les indoles tel l'indole-3-carbinol (I3C) présents dans les crucifères (brocoli, chou de Bruxelles...) (Hammerschmidt-Kamper *et al.* 2017). L'I3C n'est pas un ligand en tant que tel, mais un précurseur dont la métabolisation produit le 3,3'-diindolométhane (DIM), un agoniste d'AhR. Au contraire du TCDD, ces ligands ne sont pas délétères pour l'organisme mais permettent notamment une bonne tolérance immunologique périphérique vis-à-vis d'antigènes administrés par voie orale (Hammerschmidt-Kamper *et al.* 2017). Le tryptophane est le seul acide aminé à posséder deux cycles aromatiques, et son métabolisme peut produire des ligands d'AhR. Ainsi, le microbiote intestinal a la capacité de produire entre autres de l'indole-3-aldéhyde (I3A) qui est un ligand d'AhR (Zelante *et al.* 2013).

Et enfin, il est important de noter qu'en 2014, Moura-Alves *et al.* ont identifié deux pigments bactériens comme nouveaux ligands, capables d'être détectés par AhR (Moura-Alves *et al.* 2014).

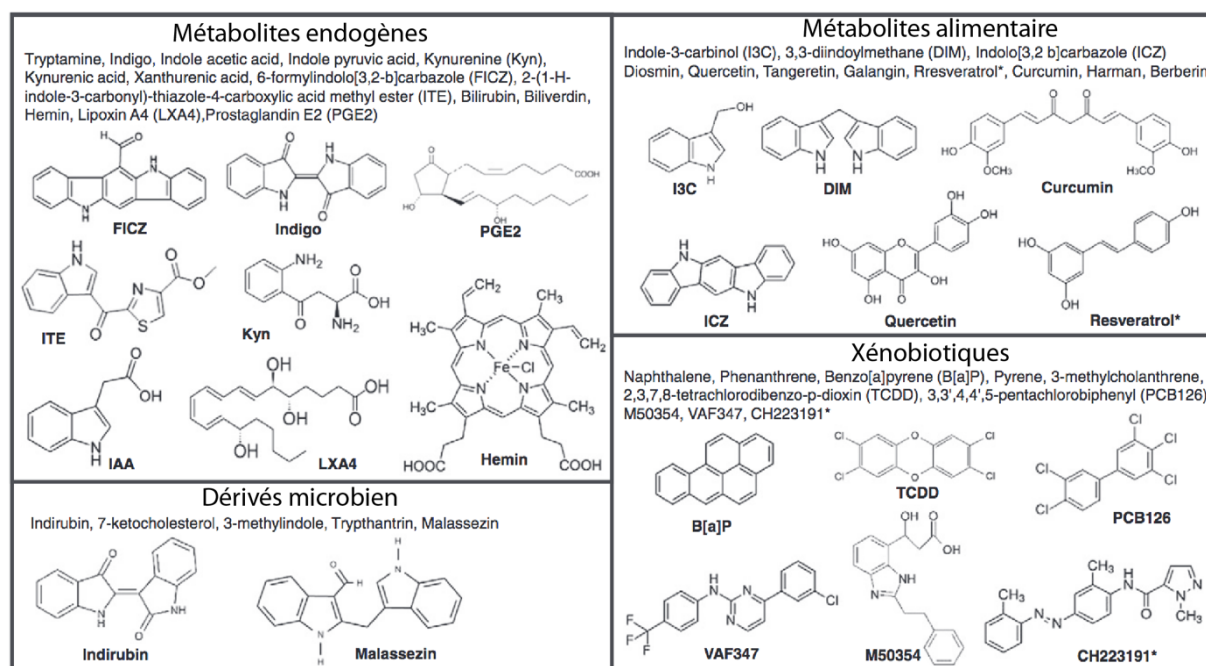


Figure 9 : Ligands d'Ahr et leur source.

Cette liste non-exhaustive présente les ligands considérés comme des agonistes d'Ahr, à l'exception des ligands signalés par des * qui sont des antagonistes. Adapté de (H. Wang, Wei et Yu 2015).

5.3.2.2 Les ligands endogènes d'Ahr

Le tryptophane est métabolisé par trois enzymes chez l'homme (la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO2) et la indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) 1 et 2). Ces enzymes ainsi que le métabolisme de la cellule génèrent la production d'indirubine, d'indigo, ou de kynurénine qui sont aussi des ligands d'Ahr (Hubbard, Murray et Perdew 2015). Un autre ligand d'Ahr, le formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) est aussi issu du tryptophane, en présence d'UVB (Fritsche *et al.* 2007).

Si les différents ligands d'Ahr induisent différentes réponses, il semblerait que cela soit principalement dû à leur demi-vie dans la cellule. Le TCDD, très stable, induit une réponse légèrement différente du FICZ qui sera catabolisé rapidement par des enzymes induites par l'activation d'Ahr (cytochrome P450 famille 1 sous-famille A membre 1 (CYP1A1)) (Boule *et al.* 2018).

5.3.3 L'impact de la signalisation par Ahr

Le rôle d'Ahr est souvent étudié en présence de ligands exogènes ajoutés dans le modèle expérimental utilisé. Bien que cela ne permette pas nécessairement de conclure sur l'importance

de certains mécanismes *in vivo*, la présence avérée de ligands d’AhR dans l’alimentation, certains polluants, ou produits de manière endogène, rend ces études pertinentes.

5.3.3.1 Le rôle d’AhR dans l’expression des gènes

Le rôle direct d’AhR en tant que facteur de transcription est la modulation de l’expression de gènes lors de son activation. Les gènes les plus souvent utilisés comme marqueurs de l’état d’activation sont CYP1A1 et CYP1B1 (cytochrome P450 famille 1 sous-famille B membre 1). Ces deux gènes sont clefs pour le contrôle de l’activation d’AhR, car ils permettent le métabolisme des ligands, endogènes ou exogènes (Nebert *et al.* 2000). Le gène AhRR (*aryl-hydrocarbon receptor repressor*) est induit par AhR et inhibe sa capacité à se lier à l’ADN, c’est un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Mimura *et al.* 1999). La régulation de l’expression de gènes est possible grâce à la présence d’ARNT associé à AhR pour former le dimère canonique. Les éléments transposables *long interspersed nuclear element-1* (LINE-1) et Alu possédant des sites XRE, AhR régule aussi les gènes proches de ces éléments potentiellement mobiles.

AhR a également un rôle en dehors de son interaction avec ARNT ; de nombreuses études rapportent en effet sa capacité à interagir avec des éléments de la voie NF- κ B. La surexpression d’AhR induit une activation de la production d’IL-6. Cela est possible grâce à l’interaction observée entre RelA et AhR et la localisation nucléaire de cet hétéro-dimère. Les protéines p50 et ARNT ne sont pas impliquées dans ce mécanisme (P. H. Chen *et al.* 2012). Ainsi, la surexpression d’AhR conduit à sa localisation nucléaire malgré l’absence de ligands exogènes. Une étude faisait déjà part de la capacité d’AhR à s’associer à RelA. Cependant, dans ce cas, AhR inhibait la réponse NF- κ B, et RelA inhibait la réponse AhR. Là encore, en cas de surexpression, AhR peut jouer un rôle en l’absence de ligand et ARNT ne joue aucun rôle dans le dimère AhR:RelA (Tian *et al.* 1999). Un article récent implique AhR dans la dégradation par le protéasome de RelA (Domínguez-Acosta *et al.* 2018). Cette dégradation prendrait place lors de l’activation d’AhR et pourrait expliquer l’inhibition de la voie NF- κ B par AhR. Il est intéressant de noter que les protéines chaperons Hsp90, associées à AhR lorsque celui-ci est dans le cytoplasme, jouent aussi un rôle dans la stabilité et l’activation des protéines IKK α , β et γ (Broemer, Krappmann et Scheidereit 2004).

Il semblerait qu’AhR puisse également interagir avec RelB. Cette interaction induit l’expression des gènes contenant un élément de réponse à RelB:AhR (RelBAhRE) (Vogel *et al.* 2007; Vogel, Sciullo et Matsumura 2007). Ce dimère AhR:RelB a aussi la capacité

d'interagir avec les sites de liaison des dimères RelB:p52 et AhR:ARNT et est important pour la production TCDD dépendante d'IL-8 et d'IRF3 notamment.

La protéine *kruppel-like factor 6* (KLF6) est aussi un partenaire identifié d'AhR. Le dimère AhR:KLF6 a la capacité de lier un motif d'ADN défini comme un nouveau XRE consensus (NC-XRE). Ce dimère est dépendant de la présence de ligand d'AhR, et est indépendant de ARNT (G. Huang et Elferink 2012; Wilson, Joshi et Elferink 2013).

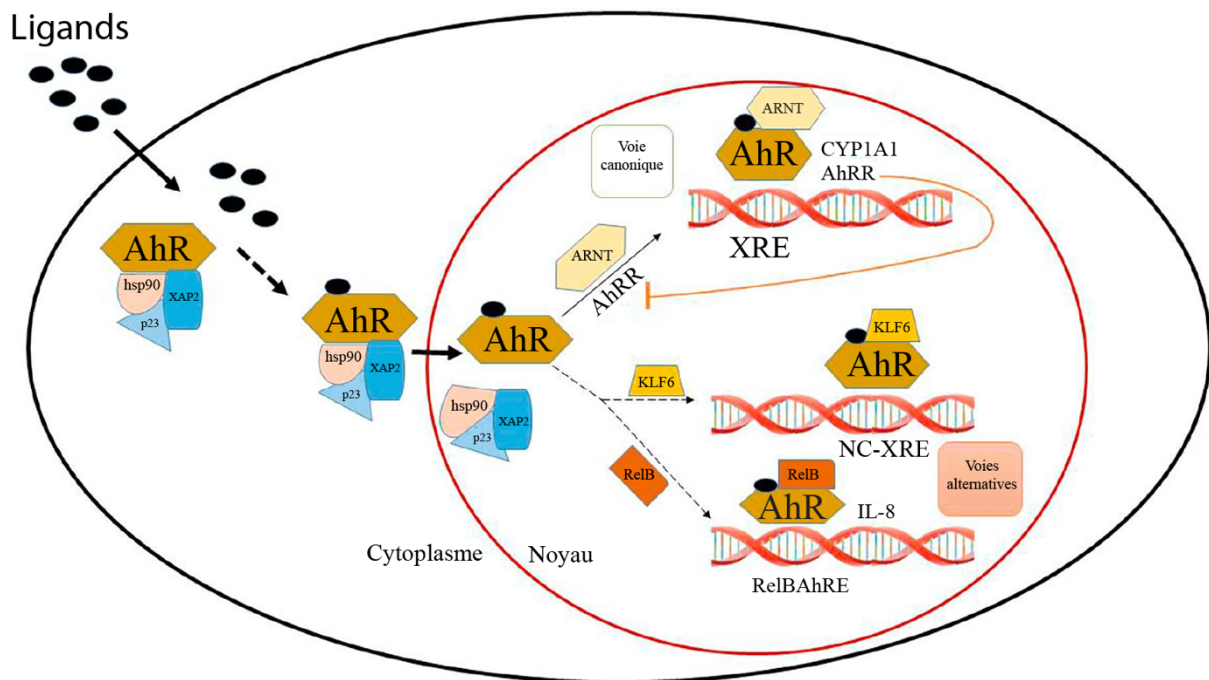


Figure 10 : Voies de signalisation canonique et alternatives d'AhR.
Adaptée de (Napolitano et Patruno 2018).

AhR a donc la capacité d'interagir sous forme de dimère avec ARNT pour se lier aux motifs XRE présents dans l'ADN. AhR module aussi d'autres gènes ainsi que la réponse NF- κ B en interagissant avec RelA et RelB. Une troisième voie de fonctionnement d'AhR est la régulation de gènes de manière indirecte. L'activation d'AhR induit une modification de certains marqueurs épigénétiques, ainsi que l'expression de micro-ARN, ce qui permet un niveau supplémentaire de régulation de l'expression génique (Mulero-Navarro et Fernandez-Salguero 2016). Ces différents modes d'action d'AhR ont un rôle important, notamment dans le système immunitaire.

5.3.3.2 Le rôle d'AhR dans la différenciation et la maturation de cellules immunitaires

Il est démontré que l'activation d'AhR induit une maturation des BMDM avec notamment l'expression de CD86, témoin d'activation. L'activation d'AhR est dans ce cas corrélée à la présence de RelB dans le noyau (Vogel *et al.* 2013). Suite à l'engagement du récepteur des cellules B (lymphocyte dont le développement s'achève dans la moelle osseuse, B est l'abréviation de « bourse de Fabricius ») (BCR), AhR contribue à la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Villa *et al.* 2017). Une autre étude met en évidence l'importance d'AhR dans l'équilibre macrophages/cellules dendritiques lors de la différenciation de monocytes, l'activation d'AhR favorisant l'apparition de DC, et son inhibition celle de macrophages (Goudot *et al.* 2017).

AhR a aussi un rôle majeur dans la différenciation de certaines populations de cellules T. La promotion de la différenciation de plusieurs sous-populations de cellules T, notamment des cellules T régulatrices (Treg), par AhR, est particulièrement documentée (Gutiérrez-Vázquez et Quintana 2018). Les cellules T Th17 ont aussi été démontrées comme dépendantes du FICZ (agoniste d'AhR) présent dans le milieu de culture (dû à la photo-oxydation du tryptophane) pour leur différenciation *in vitro* (Veldhoen *et al.* 2009). L'importance d'AhR dans la production de cellules immunitaires anti-inflammatoires rejoint son rôle déjà observé dans la tolérance immunitaire.

5.3.3.3 Le rôle d'AhR dans la tolérance immunitaire

Comme évoqué précédemment, AhR joue un rôle dans la tolérance immunitaire périphérique vis-à-vis d'un antigène administré par voie orale (Hammerschmidt-Kamper *et al.* 2017). Chez la souris, AhR est responsable de la tolérance induite par une première exposition aux LPS. Ce mécanisme repose sur les enzymes IOD1 et TDO1 qui ont la capacité de produire des ligands d'AhR (Bessede *et al.* 2014). Le ligand I3A, produit par le microbiote, atténue au niveau du foie la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin de régime enrichi en gras. Au niveau des hépatocytes, I3A réduit le métabolisme des lipides, diminuant la production d'acides gras libres pro-inflammatoires. Ces actions d'I3A sont bloquées en présence d'antagonistes d'AhR (Krishnan *et al.* 2018).

5.3.3.4 Le rôle d'AhR dans la réponse aux pathogènes

Le rôle d'AhR est important dans le contrôle des microorganismes. Dans le cas d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*, l'activation d'AhR augmente le taux de survie des

souris. Il est intéressant de noter que la réponse inflammatoire n'est pas plus importante, ce qui suggère un rôle plus direct de l'action d'AhR, via des gènes induits (Vorderstrasse et Lawrence 2006). Comme décrit plus haut, AhR est capable de reconnaître des motifs associés aux pathogènes, étant donné qu'il est capable de détecter la présence de deux pigments produits par *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium tuberculosis* (Moura-Alves *et al.* 2014). Ce rôle d'AhR en cas d'infection par des microorganismes est important, comme le prouve la sensibilité accrue de souris déficientes pour AhR à l'infection par *P. aeruginosa* et *M. tuberculosis* (Moura-Alves *et al.* 2014).

Bien qu'AhR ne soit pas activé lors d'infections virales, de nombreuses études ont regardé l'impact du polluant TCDD sur la réponse au virus de la grippe chez la souris. L'activation d'AhR affaiblit la réponse immunitaire, entraînant la mort de souris suite à l'infection par le virus de la grippe H3N2 (hémagglutinine 3 et neuraminidase 2) (Vorderstrasse, Bohn et Lawrence 2003). Lors d'une infection par le virus de la grippe, l'activation d'AhR dans les DC induit une diminution du priming de cellules T CD8⁺ (B. P. Lawrence *et al.* 2006; Jin *et al.* 2014). Une autre étude montre qu'AhR diminue la quantité d'IFN- β produite en réponse à différents virus. Dans des cellules AhR KO, des niveaux plus élevés d'IFN sont en effet observés. Cet effet est médié par le gène TIPARP (*TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase*), dont l'expression basale est due à AhR et dont le niveau d'expression est corrélé positivement au niveau d'activation d'AhR. TIPARP bloque TBK1 et donc l'activation d'IRF3. Cette voie est sensible aux agonistes et antagonistes d'AhR, qui exacerbent ou réduisent le niveau de blocage. Lors de l'infection de souris par le virus de la grippe H1N1, l'injection d'antagoniste d'AhR augmente le niveau d'IFN- β et le temps de survie des souris (Yelamanchi *et al.* 2016).

AhR a déjà été impliqué dans les cascades de signalisation induites par les récepteurs de l'immunité innée (dont les TLR). Ainsi, AhR module positivement l'activation de MyD88 par TLR2 et la phosphorylation subséquente de p38 et p65. L'inhibition d'AhR diminue la production d'IL-8 et de TNF α en réponse à un ligand de TLR2 (Hou *et al.* 2018). À l'opposé, l'activation de TLR9 par efferocytose de cellules apoptotiques induit l'activation d'AhR. Cette activation entraîne un contrôle de l'inflammation via la sécrétion d'IL-10 de manière AhR dépendante (Shinde *et al.* 2018). AhR réprime la phase aigüe de l'inflammation, déclenchée par IL-1 β et IL-6. Il est intéressant de noter que pour ce rôle-là, si la localisation nucléaire d'AhR est nécessaire, ce n'est pas le cas de sa capacité à lier l'ADN (R. D. Patel *et al.* 2009).

Une étude réalisée sur des DC humaines dérivées de monocytes met en évidence l'impact de quatre ligands d'AhR sur la réponse médiée par TLR3, 4 et 8. L'état d'activation d'AhR a

un rôle différent en fonction des gènes observés. L'expression d' IL-1 β et CCL-1 (*C-C motif chemokine ligand*) est amplifiée (Kado *et al.* 2017). Le mécanisme d'action décrit repose sur la présence d'un motif sur l'ADN qui est reconnu par un dimère AhR:RelB. Ce motif avait été précédemment décrit par la même équipe, dans le promoteur du gène IL-8 (Vogel *et al.* 2007). Au contraire de ces gènes, IL-12 et CCL4 voient leur expression diminuée lors d'une réponse TLR si AhR est activé (Kado *et al.* 2017). Ici, le mécanisme proposé est indirect, il ferait intervenir la production dépendante d'AhR du facteur de transcription CDX2 (*caudal type homeobox 2*) qui inhiberait la production d'IL-12 et CCL4. À l'opposé de ces données, une étude montre que dans les cellules humaines d'épithélium des bronches, AhR et ARNT répriment l'expression d'IL-8 en réponse au poly(I:C). Ces résultats sont limités par le modèle, basé sur une lignée cellulaire immortalisée (P. H. Chen *et al.* 2012).

Si dans certaines études l'activation d'AhR se fait par ligand exogène, il a été rapporté qu'AhR pouvait aussi être activé par les voies de signalisation issues de l'activation de TLR4 et TLR9 (Vogel *et al.* 2014; Shinde *et al.* 2018). Pour TLR4, cette activation repose sur l'activation de la voie NF- κ B et son interaction avec le promoteur d'AhR, résultant en une surexpression d'AhR peu actif (Vogel *et al.* 2014). Dans le cas de TLR9, AhR joue un rôle clef dans le modèle étudié de phagocytose de cellules apoptotiques par des macrophages. Comme vu précédemment, AhR est responsable, dans ce modèle, de la production d'IL-10 nécessaire à la répression de la réponse inflammatoire (Shinde *et al.* 2018). Ce rôle d'AhR est important, et permet de limiter l'impact du lupus érythémateux disséminé (Shinde *et al.* 2018). De nombreuses autres études démontrent qu'à l'échelle de la cellule ou de l'organisme AhR module la réponse cellulaire et contrôle la réponse inflammatoire en favorisant la production d'IL-10 et de Treg, et en restreignant la présence de cellules T CD8⁺ (Jin *et al.* 2014; Gutiérrez-Vázquez et Quintana 2018; Quintana *et al.* 2008).

Il en ressort qu'AhR joue un rôle lors d'infections bactériennes en initiant une réponse antibactérienne. Simultanément, AhR joue un rôle important de régulation de la réponse inflammatoire, limitant ainsi les immunopathologies. Cette réponse anti-inflammatoire peut être détrimentaire en cas d'activation lors d'infections virales.

5.3.3.5 Le rôle d'AhR dans les cancers

Dans les tumeurs, AhR a une action majoritairement pro-tumorale. De nombreuses études rapportent en effet son rôle dans l'apparition et le maintien de cancers (Peng *et al.* 2009; Gramatzki *et al.* 2009; Stanford *et al.* 2016). Par exemple, les souris possédant une version d'AhR constitutivement active développent des cancers gastriques (Andersson *et al.* 2002).

Comme évoqué précédemment, l'activation d'AhR induit la production de cellules T régulatrices, ainsi que la production d'IL-10 (Gutiérrez-Vázquez et Quintana 2018). De plus, des enzymes clefs pour le métabolisme du tryptophane sont exprimées dans certaines cellules tumorales via une boucle impliquant AhR (Litzenburger *et al.* 2014). Ces enzymes permettent la production de kynurénine, un ligand d'AhR induisant la prolifération des cellules cancéreuses (Opitz *et al.* 2011). En plus d'activer AhR, la disparition du tryptophane induit un arrêt de la prolifération des cellules T, ce qui permet une progression du cancer (Uyttenhove *et al.* 2003).

D'autres études rapportent qu'AhR pourrait aussi avoir un rôle anti-tumoral. L'utilisation de ligands d'AhR inhiberait la prolifération cellulaire dans certains cancers (K. Wang *et al.* 2013; Fan *et al.* 2010; Hall *et al.* 2010). Ces résultats sont cohérents avec une déficience dans la réplication de l'ADN, liée à l'activation d'AhR, entraînant un arrêt de la prolifération cellulaire (Bauman *et al.* 1995; Hushka Dr et Greenlee Wf 1995). Cependant, ces résultats sont principalement basés sur des modèles *in vitro*, ou restreints aux étapes d'initiation de tumeurs. Ils ne prennent donc pas en compte l'environnement complexe créé par la présence du système immunitaire dans lequel AhR est anti-inflammatoire.

Ainsi, AhR joue un rôle majoritairement pro-tumoral en induisant un contexte tolérogène et anti-inflammatoire dans l'environnement tumoral.

6 Hypothèse de travail et objectifs

6.1 Hypothèse de travail

TLR3 est capable de déclencher une réponse immunitaire en cas de détection d'ARNdb. Cette réponse est efficace pour défendre l'organisme en cas d'infection, mais son activation prolongée peut s'avérer nocive. De plus, si l'ARNdb est un marqueur d'infection virale, il n'en reste pas moins une molécule qui peut avoir une origine endogène.

TLR3 est régulé à de multiples niveaux, et de nouvelles protéines jouant un rôle dans sa voie de signalisation sont identifiées régulièrement. Notre hypothèse de travail est que d'autres acteurs de la voie TLR3, régulant sa mise en place dans les endosomes, sa liaison à l'ARNdb ou sa voie de signalisation, restent à découvrir.

6.2 Objectifs

L'objectif principal de cette étude est d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires participant à la régulation de TLR3 et d'établir leur mode d'action.

Le projet pour mener à bien cet objectif peut être divisé en plusieurs parties :

- Création d'une lignée cellulaire exprimant un gène rapporteur en présence d'un ligand de TLR3
- Réalisation d'un crible génétique CRISPR/Cas9 sur la lignée créée
- Validation des candidats issus du crible
- Caractérisation plus avancée d'un des candidats

A genome-wide CRISPR screen identifies regulation factors of the TLR3 signaling pathway

Laurent Zablocki-Thomas^a, Sam A. Menzies^b, Paul J. Lehner^b, Nicolas Manel^a, Philippe Benaroch^{a*}

^aInstitut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris, France

^bDepartment of Medicine, Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge Biomedical Campus, Hills Road, Cambridge CB2 0XY, UK

*Correspondance : Philippe Benaroch – philippe.benaroch@curie.fr

Keywords: TLR, TLR3, AhR, innate immunity, genetic-screen

Abstract

A subset of the Toll-like receptors (TLRs) is specialized in the detection of incoming pathogens by sampling endosomes for nucleic acid contents. Among them, TLR3 senses the abnormal presence of double-stranded RNA in the endosomes and initiates a potent innate immune response. Nevertheless, mechanisms governing TLR3 regulation still remain poorly understood. To identify new molecular players involved in the TLR3 pathway, we performed a genome-wide screen using the CRISPR/Cas9 technology. We generated reporter cells expressing GFP when stimulated via TLR3. Mutagenesis was achieved by transducing these cells with the lentiviral GeCKO v2 sgRNA library. Cells were then subjected to sequential rounds of stimulation with poly(I:C) and sorting of the GFP- cells. Enrichments in sgRNA estimated by deep-sequencing identified genes required for TLR3-induced activation of NF- κ B.

Five genes, including TLR3 itself and the chaperone UNC93B1, known to be critically involved in the TLR3 pathway, were identified by the screen, thus validating our strategy. We further studied the best 40 hits. Among the hits confirmed, we focused on AhR (aryl hydrocarbon receptor). Depletion of AhR had a dual effect on the TLR3 response, abrogating the IL-8 production and enhancing the IP-10 release. Interestingly, in primary human macrophages exposed to poly(I:C), AhR activation enhanced IL-8 and inhibited the IP-10 one. Overall, AhR appears able to modulate the TLR3 response.

Introduction

Deciphering the mechanisms underlying innate sensing is critical due to its central role in fighting pathogens and in the initiation of the adaptive immune responses. Important attention to the field has also been fueled by the need to manipulate the immune response and design appropriate immunotherapies to fight diseases including cancers. Among the numerous receptors specialized in innate sensing, Toll-like receptors (TLRs) represent in humans a family of 10 members that are type I transmembrane proteins sharing a similar organisation in domains and in shape (Kawasaki and Kawai 2014). A subset of the TLRs, called nucleic acid-sensing TLRs (NAS TLRs) has been selected by evolution to react to pathogens, such as viruses, by sensing the abnormal location of nucleic acids within the endocytic pathway. Thus, they are also often referred to as endosomal TLRs. Microbial nucleic acids are generally not directly accessible to cell surface receptors. They are present in apoptotic bodies of infected cells or can be exposed upon degradation of the microbes within the endocytic pathway (Blasius and Beutler 2010). Since NAS TLRs do not biochemically discriminate between host- and pathogen-derived ligands, it implies that self-detection by endosomal TLRs is limited by a tight regulation of their activity.

The various NAS TLRs exhibit different specificities and expression patterns. TLR3 detects double-stranded RNA (dsRNA) (Alexopoulou et al. 2001) and stands out among the NAS TLRs for several of its features. 1) It is the only TLR whose function is non-redundant in humans with any other TLRs (Zhang et al. 2007). Homozygous deleterious mutations on *TLR3* are strongly associated with recurrent herpes simplex virus infections leading to dramatic encephalitis. 2) Unlike other NAS TLRs which expression is restricted to a few immune cell types, TLR3 is expressed in various cell types including myeloid cells (macrophages, microglia and dendritic cells) but also epithelial cells, vessel endothelial cells, fibroblasts and hepatocytes (Zhang et al. 2013). 3) Activation of the other TLRs leads to the formation of a supramolecular complex containing the adaptor MyD88, called the myddosome. This complex constitutes a signaling platform leading to the production of type I IFN and inflammatory cytokines. In contrast, TLR3 activation is MyD88-independent and leads to the recruitment of TRIF, an adaptor specific of this pathway with the exception of TLR4 which can use both (M. Yamamoto et al. 2002; Masahiro Yamamoto et al. 2003). Whether TRIF also forms a supramolecular complex remains elusive. Ultimately, TLR3 activation cascade leads to the production of inflammatory cytokines and type I IFNs (Jiang et al. 2004). Given the potent response that

TLR3 engagement can elicit, ligands of TLR3 are currently tested in clinical trials to boost the immune response in immunotherapy protocols. As a reflect of this potency, TLR3 appears to be tightly regulated at different levels to prevent its activation against self. TLR3 can contribute to the pathogenesis of autoimmune rheumatoid arthritis (Brentano et al. 2005; S.-Y. Lee et al. 2014; Meng et al. 2010).

Our current knowledge of the regulation of NAS TLRs and of their precise involvement in the immune response remains however rather superficial. While the intracellular trafficking route of the NAS TLR7 and 9 have been studied in details (B. L. Lee et al. 2013; Kim et al. 2008; Pelka et al. 2018; Nishiya et al. 2005) , the trafficking of TLR3 remains to be better established. All the NAS TLRs associate upon neo-synthesis with the chaperone UNC93B1 in the endoplasmic reticulum (ER), which is central in their post-ER trafficking towards endosomes (Kim et al. 2008; B. L. Lee et al. 2013). In absence of functional UNC93B1, none of the NAS TLR can function (Tabeta et al. 2006; Brinkmann et al. 2007; Casrouge et al. 2006; Itoh et al. 2011). TLR3, like the other NAS TLRs, has to reach the endosome where it becomes functional by cleavage of its ectodomain and can then encounter its dsRNA ligand (Ewald et al. 2011; Qi, Singh, and Kao 2012; Garcia-Cattaneo et al. 2012; Johnsen et al. 2006). Regulation of TLR3 can thus occur by controlling its access to the endosomal compartment where its maturation can take place. Moreover, spatial dissociation of sensing, i.e. TLR3 binding to dsRNA, and signaling through TRIF in a different set of endosomes represents an attractive level of regulation that remains to be demonstrated (Chow, Franz, and Kagan 2015; Barton and Kagan 2009). Overall, knowledge about the post-translational regulation of TLR3, to prevent activation by self-nucleic acids, remains rather superficial.

Schematically, TLR3 signaling leads to the recruitment of TRIF and TRAFs adaptors and activation of two signaling cascades (Akira and Takeda 2004; Jiang et al. 2004). First, TRIF and TRAF6 recruit the kinase TAK1 (Cusson-Hermance et al. 2005; S. Sato et al. 2003) that phosphorylates the IKK complex. This leads to the activation of NF- κ B and the production of inflammatory cytokines (Shintaro Sato et al. 2005; Shim et al. 2005; Hayden and Ghosh 2012; C. Wang et al. 2001). TAK1 activation would also trigger AP-1 activation through the MAPK pathway activating ERK, JNK and p38 and thus promoting the production of inflammatory cytokines (Pisegna S 2004; Jiang et al. 2003; C. Wang et al. 2001). In parallel, TRIF and TRAF3 recruitment activates IKK ϵ and TBK1, which can then phosphorylate IRF3 inducing its dimerization and nuclear translocation where it drives the expression of type I IFN (Oganesyan

et al. 2006; Fitzgerald et al. 2003; Sasai et al. 2005; Doyle et al. 2002). Despite these studies, we still have a partial knowledge of the molecular players involved in the TLR3 signaling and of their regulation.

For years, genome-wide screens have been limited to bacteria and yeast genetics. The development of the CRISPR/Cas9 technology combined with lentiviral delivery of sgRNAs has opened the possibility to perform such genetic screens in mammalian cells (Zhou et al. 2014; Shalem et al. 2014). Given the lack of knowledge regarding the regulation of the TLR3 pathway and the great potential for new molecules that could precisely control its signaling, we launched a genome-wide screen to identify new players controlling the TLR3 pathway. We generated reporter cells allowing the measurement of the NF- κ B transcriptional activity by following the expression of a GFP reporter. Using these cells and a genome-wide library of sgRNAs we performed a genetic screen to identify genes required for the TLR3-mediated activation of the NF- κ B pathway. Importantly, the screen identified expected hits such as *TLR3* itself but also *UNC93B1* and *TRIF/TICAM1* thus validating our strategy. Among the newly identified proteins, we focused on AhR, whose absence abolished the TLR3-induced IL-8 production but increased the IP-10 release.

Materials and methods

Cell Culture

KBM7 cells (kindly provided by Prof. T. Brummelkamp) were cultured in IMDM plus 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin in 5% CO₂ at 37°C. 293FT cells were cultured in DMEM plus 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin in 5% CO₂ at 37°C. Macrophages were obtained as published in (Decalf et al. 2017). Plasmapheresis residues were obtained from healthy adult donors (EFS Blood Bank, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated using Ficoll-Paque (GE Healthcare), and monocytes were isolated by positive selection using CD14 magnetic microbeads (Miltenyi) and differentiated into macrophages for 7 days in RPMI (Gibco, Life Technologies) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS; BioWest), 5% human serum AB (Sigma), penicillin-streptomycin (Gibco), and 50 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; ImmunoTools).

Antibodies and reagents

Antibodies: rabbit polyclonal antibody anti-AhR (Enzo Life Sciences; BML-SA210; WB 1/1000), mouse monoclonal antibody (clone C4) anti-actin (MERK; MAB1501; WB 1/5000), goat antibody anti-rabbit IgG linked to horseradish peroxidase(HRP) (Cell Signaling; 7074; WB 1/3000), horse antibody anti- mouse IgG linked to HRP (Cell Signaling; 7076; WB 1/3000), mouse antibody anti-TLR3 (kindly provided by Innate Pharma; 40F9.6; WB 1/1000), rat monoclonal antibody (Clone YL1/2) anti-tubulin alpha (Bio-Rad; MCA77G; WB 1/2500), goat polyclonal antibody anti-rat IgG linked to HRP (Jackson ImmunoResearch; 112-036-062).

Reagents: Poly(I:C) low molecular weight (InvivoGen; tlr1-picw), recombinant human TNF α (Sigma-Aldrich; T6674), FICZ (Enzo Life Sciences; BML-GR206-0100), SR1 (Bertin Bioreagent; T1831), Concanamycin B (Yilla et al. 1993).

Plasmids

pTRH1 NFkB dscGFP was a gift from Prof. Hidde Ploegh; pTRH1 NFkB RFP was produced from pTRH1 NFkB dscGFP, by introducing TagRFP in place of dscGFP by overlapping PCR (forward 5'-gtcaaagcttaccatggtgtctaagggcgaaga-3'; reverse 5'-tgacgtcgactattaattaagttgtgccccca -3') and the restriction sites HindIII and SalI. pTRIP-SFFV TLR3-HA 2A mTagBFP2 salI was produced from hTLR3-4HA (Garcia-Cattaneo et al. 2012) and pTRIP-SFFV-GFP by successive overlapping PCRs. pHRSIN pSFFV FLAG NLS Cas9 NLS pGK Hygro was a gift from Prof. Paul Lehner. To generate targeted sgRNA targeting lentivectors we used the lentiCRISPR v2 (gifted from Prof. Feng Zhang; Addgene plasmid # 52961 (Sanjana, Shalem, and Zhang 2014)). As recommended we digested the BsMB1 sites, before annealing with the appropriate oligos. Table S1 display the list of sgRNA used to control the candidates from the screen, * indicates sgRNA further used in the article.

CRISPR screen

The screen was performed as described in (Stewart et al. 2017). The Cas9 enzyme was stably transduced in KBM7 cells. At day 1, 100 million cells were transduced with the GeCKO v2 sgRNA library A and B (generously deposited by Prof. Feng Zhang (Shalem et al. 2014); Addgene; #1000000047) at a multiplicity of infection of 0.09 and 0.25 for each screen. At day 2, puromycin was added (2 μ g/ml) to remove untransduced cells from the suspension. At day 7 cells were stimulated twice by 35 μ g/ml of poly(I:C) 4 hours apart. At day 8, 16 hours after the last stimulation, cells were enriched by FACS on the 5 % GFP low cells. This enrichment was

performed three times successively, each time following a stimulation of the cells, at day 8, 16 and 22. From each sort genomic DNA was extracted (Gentra Puregene Cell Kit; Qiagen; 158767) from both the sorted cells and a control-unselected pool of mutagenized cells. sgRNA amplification, sequencing and identification was performed as described in (Stewart et al. 2017).

Library amplification

The GeCKO library was amplified according to the protocol from Feng Zhang's lab (Sanjana, Shalem, and Zhang 2014)

Production of lentivector

The lentivector used to transduce the GeCKO library, or the other constructs, were produced as described in (Silvin et al. 2017). Viral particles were produced by transfection of 293FT cells in 6-well plates with 3 μ g DNA and 8 μ l TransIT-293 (Mirus Bio) per well. Cells were transduced with 0.4 μ g CMV-VSVG, 1 μ g psPAX2 and 1.6 μ g of the plasmids of interest. One day after transfection, media was removed, and fresh DMEM medium was added. Viral supernatants were harvested 1 day later, filtered at 0.45 μ m, used freshly or aliquoted and frozen at -80°C. For TLR3 transduction, $\approx$ 40 ml of viruses were ultra-centrifuged 1h 30 at 31000 rpm using Beckman LE80K, the pellet was then resuspended in 500 μ l. The KBM7 cells were systematically spinoculated for 2h at 1200 g following mixing with the virus.

Flow cytometry

The GFP expression and the cytokine bead assays were analysed on a FACSVERSE (BD), laser 488 nm, filter 527/32 for the GFP. The RFP expression was analysed on a LSRFORTESSA (BD) laser 561 nm, filter 610/20. The sorts for the screen were performed on a FACSARIA III (BD) or the S3 Cell Sorters (Bio-Rad).

RNA isolation and RT-qPCR and oligonucleotides

The total RNA from the samples was extracted from cultured cells using Nucleospin RNA II from (Macherey-Nagel; 740955.5) accordingly to the manufacturer's instructions. The RNA samples were then reverse transcribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific; 4368814). qPCR was performed using the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche ; 04887352001) according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for CYP1A1 are : forward (5'-AGGCCCTGATTACCCAGAAT-3') reverse (5'-TCCCAGCTCAGCTCAGTACC-3').

Immunoblotting

Cells were lysed in RIPA 2X (100 mM Tris pH 7.4; 300 mM NaCl; Triton 2%; SDS 0.2%; Deoxycholate 1%; 1X protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich; 11873580001). After 30 minutes of incubation on ice, sample were centrifuged 10 minutes at 16100 g at 4°C. Protein quantification was performed on the supernatant by micro BCA (Thermo Fisher Scientific; 23235) and the LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific; NP0008) containing 5% β -mercaptoethanol was added to the samples, normalized for their protein content. After 10 minutes at 95°C, samples were loaded and resolved on Mini-PROTEAN TGX Precast Protein gradient polyacrylamide gels (Bio-Rad, 4-15% or 4-20%). Samples were subsequently transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad; #1704156) and blocked with 5% (w/v) skim milk powder in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) for 1 hour at room temperature. Membranes were then probed with an appropriate dilution of primary antibody overnight at 4°C. Membranes were washed three times in PBS-Tween before incubation in diluted secondary antibody for 1 h at room temperature. Membranes were washed as before and developed with ECL (Bio-Rad; #1705061 or ThermoFisher Scientific; 34096) using a Bio-Rad Chemi Doc system setting for signal accumulation. Pictures were analysed and prepared using the Image Lab (Bio-Rad) software.

Cytokines secretion assay

IP-10 and IL-8 concentration was measured after 16 h of stimulation using IP-10 of IL-8 cytometric bead assay (BD; 558280 and 558277) according to the manufacturer's protocol.

Statistics and analysis

All statistics were performed as described using Prim 6 software. The analysis of IP-10 and IL-8 cytometric assay was performed on FCAP Array (BD). Graphs were generated with either Prism 6 or R using Rstudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>)

Results

A genome-wide screen identifies genes required for TLR3-induced response

Owing to the limited knowledge about TLR3 intracellular trafficking and its regulation, we performed a genome-wide CRISPR/Cas9 forward genetic screen in human near-haploid KBM7 cells. One of the early steps following TLR3 signaling is the activation of the NF- κ B transcription factor that is translocated to the nucleus. To easily monitor TLR3 activation, we created a KBM7 cell line transduced with an NF- κ B reporter construct made of a minimal CMV promoter with four NF- κ B binding sites driving the expression of the dscGFP (which has a shorter half-life than the widely used E-GFP) or the RFP. The KBM7 reporter cells did not respond to poly(I:C) but did to TNF α (Fig S1A), showing that: i) KBM7 cells do not express TLR3 and, ii) that poly(I:C) exposure did not trigger MDA5 or RIGI sensors in our conditions. We next transduced the KBM7 reporter cells with TLR3 cDNA and checked by western blot that it was correctly expressed and processed (Fig S1B). These cells will be referred to as KBM7Rep. Finally, to ensure optimal and homogenous screening parameters, the cells were also transduced with a third lentivirus encoding the Cas9 enzyme (see Fig 1A). Cells were maintained in bulk and in parallel, subcloned.

Next, we checked that the KBM7Rep cells properly responded to poly(I:C). TLR3 signaling is strictly dependent on the acidic pH present in the endosomal pathway (Garcia-Cattaneo et al. 2012; De Bouteiller et al. 2005). Inhibition of the proton pump responsible for the acidification of the endosomes can be achieved very rapidly and efficiently with the macrolide Concanamycin B (ConB) (Yilla et al. 1993). ConB exposure of KBM7Rep cells totally abrogated poly(I:C)-induced GFP expression, but did not when cells were stimulated by TNF α (Fig. S1D). Moreover, IP-10 and IL-8 production by KBM7Rep cells in response to poly(I:C) required the TLR3 cDNA and was totally abrogated by ConB exposure (Fig S1C).

Next, we checked that the Cas9 introduced in the reporter cells was active using an sgRNA targeting the β 2 microglobulin by following cell surface expression of MHC I (Burr et al. 2016), which dramatically decreased in a large proportion of the population revealing high rates of gene editing (not shown). We concluded that our reporter cells were fitted for the screen and decided to run two screens in parallel, one with the cells maintained as a bulk population, and the other with a clonal one.

We performed a genome-wide CRISPR/Cas9 forward genetic screen using the lentiviral GeCKO v2 sgRNA library to transduce our reporter cells (roughly 10^8 cells). The library contained 122,411 sgRNAs targeting 19,050 genes. We aimed for a low multiplicity of infection (below 0.3) to limit the possibility of two viruses infecting the same cell (Shalem et al. 2014; Timms et al. 2016). Cells that were successfully transduced were selected with puromycin and enriched for cells GFP⁺ after poly(I:C) stimulation (Fig. 1A). For both polyclonal and clonal cell populations, a progressive enrichment in GFP⁺ took place along the rounds of stimulation/sorting (Fig. 1B and C).

The genome-wide screen identified expected and new genes required for TLR3 signaling

The sgRNA abundance of the enriched populations obtained after 1, 2 or 3 rounds of stimulation/sorting, was estimated twice by deep sequencing and compared to a control unsorted population for each of the two screens (Fig. 2). We then selected a cut off, considering only genes identified with a $-\log(\text{p-value}) > 4$ found in more than 2 of the 12 total estimations of enrichment generated with the two screens. Strikingly, the most significantly enriched genes identified were *TLR3* itself and *UNC93B1*. The latter encodes an ER resident chaperone critically required for the nucleic acid sensing TLRs to exit the ER and traffic to the endosome where they become functional (Tabeta et al. 2006; Brinkmann et al. 2007). In the absence of a functional UNC93B1, TLR3, 7 and 9 signaling are totally impaired, both in human and mouse (Kim et al. 2008; B. L. Lee et al. 2013; Qi, Singh, and Kao 2012; Casrouge et al. 2006). The fact that both hits, *TLR3* and *UNC93B1*, possessed the lowest p-value indicated that our whole screening process was correct to probe for genes involved in TLR3 signaling. Moreover, we also identified 2 genes involved in the NF- κ B pathway; *CHUK* and *RELA*, which are not specific of the TLR3 pathway. Finally, using a different cut off to analyze the data, i.e. a $-\log(\text{p-value}) > 3$ found in at least 5 enrichment analyses out of the 12 performed, we found in addition to the already mentioned 4 hits, the *TICAM1* gene also called *TRIF* which encodes a key molecular adaptor highly specific of the TLR3 pathway (the other TLRs use MyD88 instead, except TLR4 which can use both adaptors) (Akira and Takeda 2004; Masahiro Yamamoto et al. 2003).

We concluded that the genome-wide screen performed was likely to identify new genes involved in the TLR3 pathway. Thus, we selected the 40 best hits identified for further studies.

DLX1, SOD1 and AhR are required for IL-8 production by poly(I:C) stimulated cells

Focusing on the first 40 hits, we cloned 2 sgRNAs per gene in a lentiviral vector also encoding Cas9 (sgRNAs were the one enriched in the screen). Thus, 80 sgRNAs were produced in lentiviral vectors, introduced into KBM7Rep cells that were submitted to puromycin selection and maintained as bulk populations. Cells were exposed for 16 h to increasing doses of poly(I:C) or to a single dose of TNF α and then analyzed by FACS to monitor NF- κ B activity by following GFP expression (Fig. 3A). Confirming the results of the screen, the sgRNA targeting *UNC93B1* and *TLR3* were the most active at inhibiting TLR3 signaling as judged by the levels of GFP expression (Fig. 3A). Interestingly, *DLX1*, *SOD1* and *AhR* grouped together with the best hits (Fig. 3A). They were further studied for GFP expression, IL-8 and IP-10 production taking a cell line that was transduced with an *UNC93B1* sgRNA as a positive control and cells that were transduced with a lentivector devoid of sgRNA (but still encoding Cas9 and called Cas9 ctrl), as a negative control. In response to poly(I:C) stimulation and compared to the Cas9 ctrl the *DLX1*, *SOD1* and *AhR* edited cell lines exhibited a diminished GFP expression (Fig. 3B) and only a residual IL-8 production (Fig 3C). The *DLX1* sgRNA did not modify the IP-10 response, whereas the *AhR* and *SOD1* sgRNA increased its production (although to a lower extent for *SOD1* sgRNA) (Fig. 3D). As expected cells edited for *UNC93B1* did not respond to poly(I:C) in the three assays (Fig. 3B-D). We also tested these cell lines for their response to TNF α with the same 3 read out. While cells edited for *UNC93B1* retained their responsiveness in all cases, the 3 other cell lines were moderately impaired in their NF- κ B response as judged by GFP expression (Fig. 3E), and more frankly in their IL-8 response (Fig 3F). Again, *AhR* editing led to higher IP-10 response (Fig. 3G).

Our data suggested that *AhR* was required in KBM7 to fully respond to TLR3 activation as seen by impaired NF- κ B and IL-8 responses and enhanced IP-10 production. These effects were also observed but to a lower extent upon TNF α stimulation, indicating that absence of *AhR* may impact other pathways than the TLR3 specific one as expected (Kado et al. 2017).

Given the phenotype of the cells edited for *AhR*, we focused the rest of our study on the role of *AhR* in the TLR3 pathway. *AhR* is a ligand-induced transcription factor endowed with a large immunomodulatory capacity on different immune cell types including, dendritic cells, regulatory T cells and TH17 (Gutiérrez-Vázquez and Quintana 2018).

AhR-deficient cells produce less IL-8 and more IP-10 than wild type cells in response to TLR3 stimulation

We first checked that AhR expression was abolished in the KBM7Rep cells transduced with the AhR sgRNA. In these cells AhR remained undetectable by immuno-blot while it was clearly present in the ctrl Cas9 population (Fig 4A). We confirmed that editing the *AhR* gene in the KBM7 reporter cells led to a reduced capacity to respond to poly(I:C) in terms of GFP and IL-8 expression (Fig 4B and C) but to an increased IP-10 production, a situation even more pronounced in response to TNF α (Fig 4D).

Agonists and antagonists of AhR modulate IL-8 and IP-10 production by TLR3-stimulated cells

To confirm that AhR was involved in the TLR3 pathway by an independent approach, we used well described AhR agonists and antagonists (Rannug et al. 1995; Boitano et al. 2010). The KBM7Rep cells edited for AhR and the ctrl Cas9 cell population were exposed to poly(I:C) (25 μ g/ml) or to TNF α (10 ng/ml) and to increasing doses of agonist (FICZ) or antagonist (SR-1). We observed that FICZ increased the NF- κ B and IL-8 responses to poly(I:C), while SR-1 inhibited them (Fig. 5A and B). Importantly, these effects were abolished in the absence of AhR. Regarding the IP-10 responses, SR-1 and FICZ had almost no effect on the response to poly(I:C) (Fig. 5C). The effects of the AhR ligands on the response to TNF α were very limited with the exception of an inhibition of the NF- κ B reporter expression by SR-1 exposure (Fig. 5A). We concluded that activation of the TLR3 pathway involved the activity of the AhR transcription factor. Conversely, the involvement of AhR activity in the response to TNF α appeared less important.

The AhR pathway is involved in the TLR3-mediated response in primary human macrophages

To extend our findings to primary cells naturally expressing TLR3, we repeated similar experiments with in primary human monocyte-derived macrophages (MDMs). Here we used a fixed concentration of AhR ligands (5 μ M) and increasing doses of poly(I:C) and TNF α . Interestingly, the agonist FICZ significantly increased the IL-8 response to TLR3 stimulation while the antagonist SR-1 had the opposite effect (Fig. 6A). Similar but lower effects of the AhR ligands were observed in response to TNF α (Fig. 6A). The IP-10 response to poly(I:C) was inhibited by FICZ but also to a lower extent by SR-1 (Fig. 6B). In contrast, both AhR ligands exhibited no clear effect on the IP-10 response to TNF α (Fig. 6B).

As a control of the activity of the AhR ligands on MDMs, we measured their effects on the expression of the *CYP1A1* mRNA by RT-qPCR (Nebert et al. 2000). As expected, FICZ dramatically increased the CYP1A1 expression (by 36 folds) while SR-1 reduced these levels (by 2 folds) (Fig. 6C).

Discussion

Several nucleic acid analogues are currently used in clinical trials as adjuvants since NAS TLRs induce potent inflammatory responses including type I interferon, thereby efficiently stimulating the immune response (Chalovich and Eisenberg 2012; Matsumoto et al. 2015; Shi et al. 2016). However, we still lack basic knowledge regarding the regulation of NAS TLR function allowing their activation by pathogen-derived nucleic acids but preventing detrimental response to self-nucleic acids. Two main levels of post-translational regulation can be considered for TLR3 in particular: during its intracellular trafficking and within its signal transduction cascade. Here, we developed reporter cells that express GFP in response to NF- κ B nuclear translocation in order to follow TLR3-induced activation. Using these reporter cells and the GeCKO v2 library, we applied a genome-wide CRISPR screen to identify regulators of the TLR3 pathway.

Following mutagenesis and enriching for cells with reduced GFP expression after poly(I:C) exposure, several genes were identified. *TLR3* itself and *UNC93B1* grouped together as the genes with the highest enrichment of corresponding sgRNAs, confirming the validity of our screening process. The ER resident chaperone UNC93B1 is essential for the functioning of all the NAS TLRs (Tabeta et al. 2006; Casrouge et al. 2006). This multipass transmembrane protein controls their trafficking from the ER to the endosomes and remains associated with the TLRs through post-Golgi steps (B. L. Lee et al. 2013; Kim et al. 2008). Although the details of the mechanism by which TLR3 trafficking is controlled by UNC93B1 remains elusive, it was reassuring to identify this key protein as a strong hit in our genetic screen.

We also identified the TICAM1/TRIF adaptor (Figure S2), which is recruited by TLR3 at the level of its cytosolic tail upon ligand binding to its ectodomain in endosomes (Yamashita et al. 2012). TICAM1/TRIF is highly specific of the TLR3 pathway as the other NAS TLRs use MyD88 instead (O'Neill and Bowie 2007). Two additional genes related to the NF- κ B pathway were also identified by the screen. First, *CHUK*, also named *IKK α* , encodes a serine kinase part of the IKK complex (Häcker and Karin 2006). CHUK phosphorylates I κ B and thus triggers its degradation via the ubiquitination pathway, thereby activating the NF- κ B transcription factor

(Häcker and Karin 2006; Hayden and Ghosh 2012). Second, the *RELA* gene product is complexed with the p50 subunit of NF- κ B and is required for its activities on transcription (Hayden and Ghosh 2012). Taken together, these results indicated that our screen strategy was suitable to identify molecular players involved at different levels in the regulation of the TLR3 pathway.

Among the newly identified hits by the screen, we initially focused on three of them DLX1, SOD1 and AhR to validate our finding using different read out. We observed that editing of each of these three genes led to a strong inhibition of the IL-8 response to poly(I:C) in addition to a diminished NF- κ B activity as measured by GFP expression in the reporter cells. However, as compared to the DLX1 and SOD1 sgRNAs, the AhR sgRNA was the only one to impact positively the IP-10 response to poly(I:C). Moreover, DLX1 is mostly expressed during development (Merlo et al. 2000) and thus might have been identified in our screen as the result of the particular cell line used, i.e. the near haploid KBM7 cell which was derived from a chronic myeloid leukemia (Kotecki, Reddy, and Cochran 1999). SOD1 (Superoxide Dismutase 1) is a cytosolic enzyme able to convert free superoxide radicals into hydrogen peroxide H₂O₂ and oxygen (Dimayuga et al. 2007). The absence of SOD1 may thus affect the finely tuned concentrations of cytosolic ROS. Therefore, our result raises the possibility that the TLR3 pathway relies in part on the activation of SOD1 and its capacity to produce H₂O₂.

AhR depletion had a dual effect on the TLR3 response: abrogation of the IL-8 production and enhancement of the IP-10 response. We further focused on AhR, an environmental sensor that is complexed in the cytosol with several chaperone at the steady state (Stockinger et al. 2014; Larigot et al. 2018). AhR can accommodate different ligands including the carcinogenic pollutant 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Guyton et al. 2018), or tryptophan metabolites as well as ligands derived from food (Veldhoen et al. 2009; H. Wang, Wei, and Yu 2015). Ligand binding induces AhR nuclear translocation and dissociation from the chaperones. In the nucleus, AhR regulates gene expression with its partner ARNT. They are recruited together on promoters containing xenobiotic response elements (Larigot et al. 2018). The IL-8 promoter appears to be free of such elements but contains AP-1, NF- κ B and C/EBP transcription responsive elements (Brat, Bellail, and Van Meir 2005). RelA and RelB, two subunits of the NF- κ B complex have been shown to bind AhR independently of ARNT (Chen et al. 2012; Vogel et al. 2007; Vogel, Sciullo, and Matsumura 2007). Interestingly, RelB-AhR response elements are present in the IL-8 promoter (Vogel et al. 2007). This may explain the AhR dependency of IL-8 production in response to TLR3 which induces the activation of NF- κ B. An attractive hypothesis is therefore that IL-8 expression would be controlled by AhR-

RelB dimer, while IP-10 would be repressed by CDX2 AhR-dependent expression (Kado et al. 2017). More work is required to test this hypothesis.

Future work will establish how AhR is involved in the different TLR pathways in different cell types. Our study supports the idea that AhR is a powerful modulator and environmental sensor involved in the regulation of the TLR3 pathway.

Acknowledgments

The authors would like to thank Francesca Graziano, François-Xavier Gobert, and Elodie Segura from the Institut Curie as well as Xavier Coumoul from Université Paris Descartes for the helpful discussions.

Funding

This work was supported by grants from the ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, and ANR-11-LABX-0043, INCA 40832 and ANR 44118 to PB. LZ-T was supported by a doctoral fellowship from “École normale supérieure de Lyon”, followed by another one from the “Association de la Recherche contre le Cancer (ARC)”.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Author Contribution

P.B. and N.M. conceived and supervised the project. L.Z-T carried out the experiments. S.M. performed the deep sequencing and analysis. P.L. provided materials and meaningful suggestions. L.Z-T and P.B. wrote the manuscript.

References

- Akira, Shizuo, and Kiyoshi Takeda. 2004. "Toll-like Receptor Signalling." *Nature Reviews Immunology* 4 (7): 499–511. doi:10.1038/nri1391.
- Alexopoulou, Lena, Agnieszka Czopik Holt, Ruslan Medzhitov, and Richard A. Flavell. 2001. "Recognition of Double-Stranded RNA and Activation of NF-KB by Toll-like Receptor 3." *Nature* 413 (6857): 732–38. doi:10.1038/35099560.
- Barton, Gregory M., and Jonathan C. Kagan. 2009. "A Cell Biological View of Toll-like Receptor Function: Regulation through Compartmentalization." *Nature Reviews Immunology* 9 (8): 535–41. doi:10.1038/nri2587.
- Blasius, Amanda L., and Bruce Beutler. 2010. "Intracellular Toll-like Receptors." *Immunity* 32 (3): 305–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012.
- Boitano, Anthony E., Jian Wang, Russell Romeo, Laure C. Bouchez, Albert E. Parker, Sue E. Sutton, John R. Walker, et al. 2010. "Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells." *Science* 329 (5997): 1345–48. doi:10.1126/science.1191536.
- Bouteiller, Odette De, Estelle Merck, Uzma A. Hasan, Sylvain Hubac, Barbara Benguigui, Giorgio Trinchieri, Elizabeth E.M. Bates, and Christophe Caux. 2005. "Recognition of Double-Stranded RNA by Human Toll-like Receptor 3 and Downstream Receptor Signaling Requires Multimerization and an Acidic PH." *Journal of Biological Chemistry* 280 (46): 38133–45. doi:10.1074/jbc.M507163200.
- Brat, Daniel J, Anita C Bellail, and Erwin G Van Meir. 2005. "The Role of Interleukin-8 and Its Receptors in Gliomagenesis and Tumoral Angiogenesis." *Neuro-Oncology* 7 (2): 122–33. doi:10.1215/S1152851704001061.
- Brentano, Fabia, Olivier Schorr, Renate E. Gay, Steffen Gay, and Diego Kyburz. 2005. "RNA Released from Necrotic Synovial Fluid Cells Activates Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts via Toll-like Receptor 3." *Arthritis and Rheumatism* 52 (9): 2656–65. doi:10.1002/art.21273.
- Brinkmann, Melanie M., Eric Spooner, Kasper Hoebe, Bruce Beutler, Hidde L. Ploegh, and You Me Kim. 2007. "The Interaction between the ER Membrane Protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 Is Crucial for TLR Signaling." *Journal of Cell Biology* 177 (2): 265–75. doi:10.1083/jcb.200612056.
- Burr, Stephen P., Ana S.H. Costa, Guinevere L. Grice, Richard T. Timms, Ian T. Lobb, Peter Freisinger, Roger B. Dodd, et al. 2016. "Mitochondrial Protein Lipoylation and the 2-

- Oxoglutarate Dehydrogenase Complex Controls HIF1 α Stability in Aerobic Conditions.” *Cell Metabolism* 24 (5): 740–52. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.015.
- Casrouge, Armanda, Shen Ying Zhang, Céline Eidenschenk, Emmanuelle Jouanguy, Anne Puel, Kun Yang, Alexandre Alcais, et al. 2006. “Herpes Simplex Virus Encephalitis in Human UNC-93B Deficiency.” *Science* 314 (5797): 308–12. doi:10.1126/science.1128346.
- Chalovich, Joseph M, and Evan Eisenberg. 2012. “Toll-Like Receptor 3-Specific DsRNA Oligonucleotide Adjuvants Induce Dendritic Cell Cross-Presentation, CTL Responses and Antiviral Protection.” *Biophysical Chemistry* 257 (5): 2432–37. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.
- Chen, P. H., H. Chang, J. T. Chang, and P. Lin. 2012. “Aryl Hydrocarbon Receptor in Association with RelA Modulates IL-6 Expression in Non-Smoking Lung Cancer.” *Oncogene* 31 (20): 2555–65. doi:10.1038/onc.2011.438.
- Chow, Jonathan, Kate M. Franz, and Jonathan C. Kagan. 2015. “PRRs Are Watching You: Localization of Innate Sensing and Signaling Regulators.” *Virology* 479–480: 104–9. doi:10.1016/j.virol.2015.02.051.
- Cusson-Hermance, Nicole, Smriti Khurana, Thomas H. Lee, Katherine A. Fitzgerald, and Michelle A. Kelliher. 2005. “Rip1 Mediates the Trif-Dependent Toll-like Receptor 3- and 4-Induced NF-KB Activation but Does Not Contribute to Interferon Regulatory Factor 3 Activation.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 36560–66. doi:10.1074/jbc.M506831200.
- Decalf, J., M. Desdouits, V. Rodrigues, F.-X. Gobert, M. Gentili, S. Marques-Ladeira, C. Chamontin, M. Mougél, B.C. de Alencar, and P. Benaroch. 2017. “Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages.” *Journal of Virology* 91 (15). doi:10.1128/JVI.00147-17.
- Dimayuga, Filomena O., Chunmei Wang, Jordan M. Clark, Edgardo R. Dimayuga, Vanessa M. Dimayuga, and Annadora J. Bruce-Keller. 2007. “SOD1 Overexpression Alters ROS Production and Reduces Neurotoxic Inflammatory Signaling in Microglial Cells.” *Journal of Neuroimmunology* 182 (1–2): 89–99. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.10.003.
- Doyle, Sean E., Sagar A. Vaidya, Ryan O’Connell, Hajir Dadgostar, Paul W. Dempsey, Ting Ting Wu, Govinda Rao, et al. 2002. “IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program.” *Immunity* 17 (3). Cell Press: 251–63. doi:10.1016/S1074-7613(02)00390-4.
- Ewald, Sarah E., Alex Engel, Jiyoun Lee, Miqi Wang, Matthew Bogoyo, and Gregory M. Barton.

2011. "Nucleic Acid Recognition by Toll-like Receptors Is Coupled to Stepwise Processing by Cathepsins and Asparagine Endopeptidase." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (4): 643–51. doi:10.1084/jem.20100682.
- Fitzgerald, Katherine A., Sarah M. McWhirter, Kerrie L. Faia, Daniel C. Rowe, Eicke Latz, Douglas T. Golenbock, Anthony J. Coyle, Sha Mei Liao, and Tom Maniatis. 2003. "IKKE and TBKI Are Essential Components of the IRF3 Signalling Pathway." *Nature Immunology* 4 (5): 491–96. doi:10.1038/ni921.
- Garcia-Cattaneo, A., F.-X. Gobert, M. Muller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery, and P. Benaroch. 2012. "Cleavage of Toll-like Receptor 3 by Cathepsins B and H Is Essential for Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (23): 9053–58. doi:10.1073/pnas.1115091109.
- Gutiérrez-Vázquez, Cristina, and Francisco J. Quintana. 2018. "Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor." *Immunity* 48 (1): 19–33. doi:10.1016/j.immuni.2017.12.012.
- Guyton, Kathryn Z., Ivan Rusyn, Weihsueh A. Chiu, Denis E. Corpet, Martin van den Berg, Matthew K. Ross, David C. Christiani, Frederick A. Beland, and Martyn T. Smith. 2018. "Application of the Key Characteristics of Carcinogens in Cancer Hazard Identification." *Carcinogenesis* 39 (4): 614–22. doi:10.1093/carcin/bgy031.
- Häcker, Hans, and Michael Karin. 2006. "Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2006 (357). doi:10.1126/stke.3572006re13.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2012. "NF-KB, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions." *Genes and Development* 26 (3): 203–34. doi:10.1101/gad.183434.111.
- Itoh, Hiroki, Megumi Tatematsu, Ayako Watanabe, Katsunori Iwano, Kenji Funami, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto. 2011. "UNC93B1 Physically Associates with Human TLR8 and Regulates TLR8-Mediated Signaling." *PLoS ONE* 6 (12). doi:10.1371/journal.pone.0028500.
- Jiang, Zhengfan, Tak W Mak, Ganes Sen, and Xiaoxia Li. 2004. "Toll-like Receptor 3-Mediated Activation of NF-KappaB and IRF3 Diverges at Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN-Beta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (10): 3533–38. doi:10.1073/pnas.0308496101.
- Jiang, Zhengfan, Maryam Zamanian-Daryoush, Huiqing Nie, Aristobolo M. Silva, Bryan R.G.

- Williams, and Xiaoxia Li. 2003. "Poly(DI-dC)-Induced Toll-like Receptor 3 (TLR3)-Mediated Activation of NF κ B and MAP Kinase Is through an Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK)-Independent Pathway Employing the Signaling Components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR." *Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 16713–19. doi:10.1074/jbc.M300562200.
- Johnsen, Ingvid Bjellmo, Thuy Thanh Nguyen, Monika Ringdal, Anne Merete Tryggstad, Oddmund Bakke, Egil Lien, Terje Espevik, and Marit W. Anthonsen. 2006. "Toll-like Receptor 3 Associates with c-Src Tyrosine Kinase on Endosomes to Initiate Antiviral Signaling." *EMBO Journal* 25 (14): 3335–46. doi:10.1038/sj.emboj.7601222.
- Kado, Sarah, W. L. William Chang, Aimy Nguyen Chi, Monika Wolny, David M. Shepherd, and Christoph F. A. Vogel. 2017. "Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Modifies Toll-like Receptor-Regulated Responses in Human Dendritic Cells." *Archives of Toxicology* 91 (5). Springer Berlin Heidelberg: 2209–21. doi:10.1007/s00204-016-1880-y.
- Kawasaki, Takumi, and Taro Kawai. 2014. "Toll-like Receptor Signaling Pathways." *Frontiers in Immunology* 5: 461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- Kim, You Me, Melanie M. Brinkmann, Marie Eve Paquet, and Hidde L. Ploegh. 2008. "UNC93B1 Delivers Nucleotide-Sensing Toll-like Receptors to Endolysosomes." *Nature* 452 (7184): 234–38. doi:10.1038/nature06726.
- Kotecki, Maciej, P. Sanjeeva Reddy, and Brent H. Cochran. 1999. "Isolation and Characterization of a Near-Haploid Human Cell Line." *Experimental Cell Research* 252 (2): 273–80. doi:10.1006/excr.1999.4656.
- Larigot, Lucie, Ludmila Juricek, Julien Dairou, and Xavier Coumoul. 2018. "AhR Signaling Pathways and Regulatory Functions." *Biochimie Open* 7: 1–9. doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001.
- Lee, Bettina L., Joanne E. Moon, Jeffrey H. Shu, Lin Yuan, Zachary R. Newman, Randy Schekman, and Gregory M. Barton. 2013. "UNC93B1 Mediates Differential Trafficking of Endosomal TLRs." *ELife* 2013 (2). doi:10.7554/eLife.00291.
- Lee, Seon-Yeong, Bo-Young Yoon, Ju-In Kim, Yang-Mi Heo, Yun-Ju Woo, Sung-Hwan Park, Ho Youn Kim, Sung-Il Kim, and Mi-La Cho. 2014. "Interleukin-17 Increases the Expression of Toll-like Receptor 3 via the STAT3 Pathway in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes." *Immunology* 141 (3): 353–61. doi:10.1111/imm.12196.
- Matsumoto, Misako, Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Masahiro Azuma, Noriko Ishii, Akiko Morii-Sakai, Hiroaki Shime, and Tsukasa Seya. 2015. "Defined TLR3-Specific Adjuvant That Induces NK and CTL Activation without Significant Cytokine Production

- in Vivo.” *Nature Communications* 6 (February). doi:10.1038/ncomms7280.
- Meng, Liesu, Wenhua Zhu, Congshan Jiang, Xiaojing He, Weikun Hou, Fang Zheng, Rikard Holmdahl, and Shemin Lu. 2010. “Toll-like Receptor 3 Upregulation in Macrophages Participates in the Initiation and Maintenance of Pristane-Induced Arthritis in Rats.” *Arthritis Research and Therapy* 12 (3). doi:10.1186/ar3034.
- Merlo, G. R., B. Zerega, L. Paleari, S. Trombino, S. Mantero, and G. Levi. 2000. “Multiple Functions of Dlx Genes.” *International Journal of Developmental Biology* 44 (6): 619–26. doi:10.1387/IJDB.11061425.
- Nebert, Daniel W., Amy L. Roe, Matthew Z. Dieter, Willy A. Solis, Yi Yang, and Timothy P. Dalton. 2000. “Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and (Ah) Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis.” *Biochemical Pharmacology* 59 (1): 65–85. doi:10.1016/S0006-2952(99)00310-X.
- Nishiya, Tadashi, Emi Kajita, Soichi Miwa, and Anthony L. DeFranco. 2005. “TLR3 and TLR7 Are Targeted to the Same Intracellular Compartments by Distinct Regulatory Elements.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 37107–17. doi:10.1074/jbc.M504951200.
- O’Neill, Luke A.J., and Andrew G. Bowie. 2007. “The Family of Five: TIR-Domain-Containing Adaptors in Toll-like Receptor Signalling.” *Nature Reviews Immunology* 7 (5): 353–64. doi:10.1038/nri2079.
- Oganesyan, Gagik, Supriya K. Saha, Beichu Guo, Jeannie Q. He, Arash Shahangian, Brian Zarnegar, Andrea Perry, and Genhong Cheng. 2006. “Critical Role of TRAF3 in the Toll-like Receptor-Dependent and -Independent Antiviral Response.” *Nature* 439 (7073): 208–11. doi:10.1038/nature04374.
- Pelka, Karin, Damien Bertheloot, Elisa Reimer, Kshiti Phulphagar, Susanne V. Schmidt, Anette Christ, Rainer Stahl, et al. 2018. “The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport.” *Immunity* 48 (5). Elsevier: 911–922.e7. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.011.
- Pisegna S, Pirozzi G Piccoli M Frati L Santoni A Palmieri G. 2004. “P38 MAPK Activation Controls the TLR3-Mediated up-Regulation of Cytotoxicity and Cytokine Production in Human NK Cells.” *Blood* 104 (13): 4157–64.
- Qi, Rongsu, Divyendu Singh, and C. Cheng Kao. 2012. “Proteolytic Processing Regulates Toll-like Receptor 3 Stability and Endosomal Localization.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (39): 32617–29. doi:10.1074/jbc.M112.387803.
- Rannug, U., A. Rannug, U. Sjöberg, H. Li, R. Westerholm, and J. Bergman. 1995. “Structure Elucidation of Two Tryptophan-Derived, High Affinity Ah Receptor Ligands.” *Chemistry*

- and Biology* 2 (12): 841–45. doi:10.1016/1074-5521(95)90090-X.
- Sanjana, Neville E., Ophir Shalem, and Feng Zhang. 2014. “Improved Vectors and Genome-Wide Libraries for CRISPR Screening.” *Nature Methods* 11 (8): 783–84. doi:10.1038/nmeth.3047.
- Sasai, Miwa, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, Norimitsu Inoue, Fumitaka Fujita, Makoto Nakanishi, and Tsukasa Seya. 2005. “Cutting Edge: NF-KappaB-Activating Kinase-Associated Protein 1 Participates in TLR3/Toll-IL-1 Homology Domain-Containing Adapter Molecule-1-Mediated IFN Regulatory Factor 3 Activation.” *Journal of Immunology* 174 (1): 27–30. doi:10.4049/jimmunol.174.1.27.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. “Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor.” *The Journal of Immunology* 171 (8): 4304–10. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4304.
- Sato, Shintaro, Hideki Sanjo, Kiyoshi Takeda, Jun Ninomiya-Tsuji, Masahiro Yamamoto, Taro Kawai, Kunihiro Matsumoto, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. 2005. “Essential Function for the Kinase TAK1 in Innate and Adaptive Immune Responses.” *Nature Immunology* 6 (11): 1087–95. doi:10.1038/ni1255.
- Shalem, Ophir, Neville E. Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A. Scott, Tarjei S. Mikkelsen, Dirk Heckl, et al. 2014. “Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells.” *Science* 343 (6166): 84–87. doi:10.1126/science.1247005.
- Shi, Ming, Xi Chen, Kangruo Ye, Yuanfei Yao, and Yu Li. 2016. “Application Potential of Toll-like Receptors in Cancer Immunotherapy: Systematic Review.” *Medicine* 95 (25): e3951. doi:10.1097/MD.0000000000003951.
- Shim, Jae-Hyuck, Changchun Xiao, Amber E Paschal, Shannon T Bailey, Ping Rao, Matthew S Hayden, Ki-Young Lee, et al. 2005. “TAK1, but Not TAB1 or TAB2, Plays an Essential Role in Multiple Signaling Pathways in Vivo.” *Genes & Development* 19 (22): 2668–81. doi:10.1101/gad.1360605.
- Silvin, Aymeric, Chun I Yu, Xavier Lahaye, Francesco Imperatore, Jean-Baptiste Brault, Sylvain Cardinaud, Christian Becker, et al. 2017. “Constitutive Resistance to Viral Infection in Human CD141+ Dendritic Cells.” *Science Immunology* 2 (13): eaai8071. doi:10.1126/sciimmunol.aai8071.
- Stewart, Sarah E., Sam A. Menzies, Stephanie J. Popa, Natalia Savinykh, Anna Petrunkina

- Harrison, Paul J. Lehner, and Kevin Moreau. 2017. "A Genome-Wide CRISPR Screen Reconciles the Role of N-Linked Glycosylation in Galectin-3 Transport to the Cell Surface." *Journal of Cell Science* 130 (19): 3234–47. doi:10.1242/jcs.206425.
- Stockinger, Brigitta, Paola Di Meglio, Manolis Gialitakis, and João H. Duarte. 2014. "The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System." *Annual Review of Immunology* 32 (1): 403–32. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
- Tabeta, Koichi, Kasper Hoebe, Edith M. Janssen, Xin Du, Philippe Georgel, Karine Crozat, Suzanne Mudd, et al. 2006. "The Unc93b1 Mutation 3d Disrupts Exogenous Antigen Presentation and Signaling via Toll-like Receptors 3, 7 and 9." *Nature Immunology* 7 (2): 156–64. doi:10.1038/ni1297.
- Timms, Richard T., Sam A. Menzies, Iva A. Tchassovnikarova, Lea C. Christensen, James C. Williamson, Robin Antrobus, Gordon Dougan, Lars Ellgaard, and Paul J. Lehner. 2016. "Genetic Dissection of Mammalian ERAD through Comparative Haploid and CRISPR Forward Genetic Screens." *Nature Communications* 7 (June): 11786. doi:10.1038/ncomms11786.
- Veldhoen, Marc, Keiji Hirota, Jillian Christensen, Anne O'Garra, and Brigitta Stockinger. 2009. "Natural Agonists for Aryl Hydrocarbon Receptor in Culture Medium Are Essential for Optimal Differentiation of Th17 T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 43–49. doi:10.1084/jem.20081438.
- Vogel, Christoph F. A., Eric Sciallo, Wen Li, Pat Wong, Gwendal Lazennec, and Fumio Matsumura. 2007. "RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription." *Molecular Endocrinology* 21 (12). Oxford University Press: 2941–55. doi:10.1210/me.2007-0211.
- Vogel, Christoph F A, Eric Sciallo, and Fumio Matsumura. 2007. "Involvement of RelB in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of Chemokines." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363 (3): 722–26. doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.032.
- Wang, Chen, Li Deng, Mei Hong, Giridhar R. Akkaraju, Jun Ichiro Inoue, and Zhijian J. Chen. 2001. "TAK1 Is a Ubiquitin-Dependent Kinase of MKK and IKK." *Nature* 412 (6844): 346–51. doi:10.1038/35085597.
- Wang, Hao, Yunbo Wei, and Di Yu. 2015. "Control of Lymphocyte Homeostasis and Effector Function by the Aryl Hydrocarbon Receptor." *International Immunopharmacology* 28 (2): 818–24. doi:10.1016/j.intimp.2015.03.046.
- Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. "Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That

- Preferentially Activates the IFN- Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling.” *The Journal of Immunology* 169 (12): 6668–72. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6668.
- Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Hideki Sanjo, Osamu Takeuchi, et al. 2003. “Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway.” *Science* 301 (5633). American Association for the Advancement of Science: 640–43. doi:10.1126/science.1087262.
- Yamashita, Michifumi, Saurabh Chattopadhyay, Volker Fensterl, Paramananda Saikia, Jaime L. Wetzel, and Ganes C. Sen. 2012. “Epidermal Growth Factor Receptor Is Essential for Toll-like Receptor 3 Signaling.” *Science Signaling* 5 (233): ra50-ra50. doi:10.1126/scisignal.2002581.
- Yilla, Mamadi, Agnes Tan, Kouichi Itoll, Kiyoshi Miwall, and Hidde L. Ploegh. 1993. “Involvement of the Vacuolar H(+)-ATPases in the Secretory Pathway of HepG2 Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 268 (26): 19092–100.
- Zhang, Shen Ying, Melina Herman, Michael J. Ciancanelli, Rebeca Pérez de Diego, Vanessa Sancho-Shimizu, Laurent Abel, and Jean Laurent Casanova. 2013. “TLR3 Immunity to Infection in Mice and Humans.” *Current Opinion in Immunology* 25 (1): 19–33. doi:10.1016/j.coi.2012.11.001.
- Zhang, Shen Ying, Emmanuelle Jouanguy, Sophie Ugolini, Asma Smahi, Gaëlle Elain, Pedro Romero, David Segal, et al. 2007. “TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis.” *Science* 317 (5844): 1522–27. doi:10.1126/science.1139522.
- Zhou, Yuexin, Shiyu Zhu, Changzu Cai, Pengfei Yuan, Chunmei Li, Yanyi Huang, and Wensheng Wei. 2014. “High-Throughput Screening of a CRISPR/Cas9 Library for Functional Genomics in Human Cells.” *Nature* 509 (7501): 487–91. doi:10.1038/nature13166.

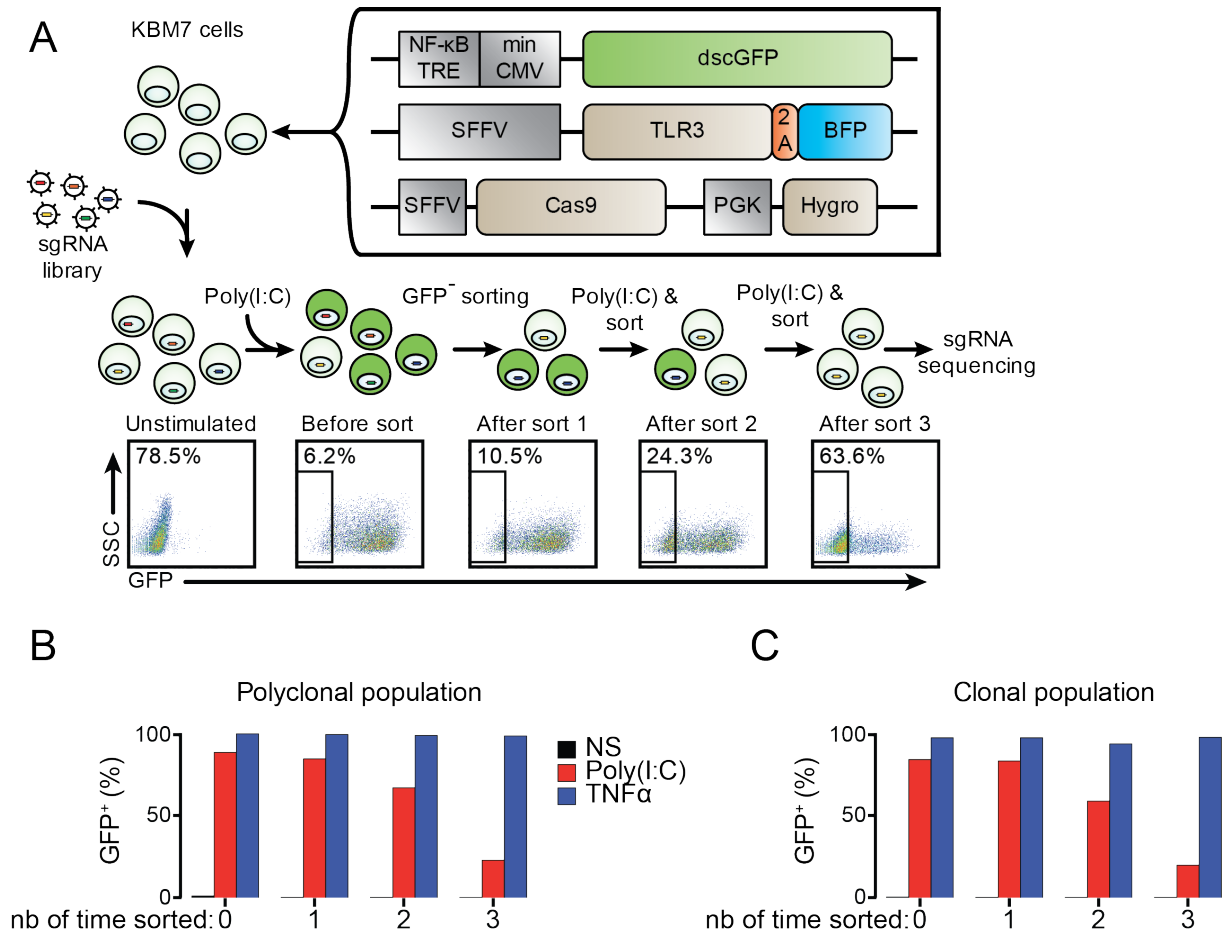


Fig. 11. Outline of the genome-wide CRISPR/Cas9 forward genetic screen to identify genes required for TLR3 signaling

A. Design of the forward genetic screen in human near-haploid KBM7 cells. Creation of the NF- κ B reporter KBM7 cell line by transduction of three independent expression cassettes encoding for dcsGFP, TLR3 and Cas9. dscGFP expression was under a NF- κ B dependent promoter. Cells were transduced with the lentiviral GeCKO v2 sgRNA library (122,411 sgRNAs). Cells that were successfully transduced were selected with puromycin. After selection, the population was split into two; half was not sorted to represent the entire library while the remaining population was sorted by flow cytometry after poly(I:C) stimulation to enrich for dscGFP negative cells. After three rounds of poly(I:C) stimulation/enrichment, the DNA from the enriched populations (rounds 1, 2 and 3) was harvested and enriched sgRNAs were identified by sequencing and compared to an unsorted library. FACS plots obtained after each sort on dscGFP negative cells show progressive enrichment rates of dscGFP negative cells. NF- κ B TRE = NF- κ B transcription responsive element, min CMV = minimal cytomegalovirus promoter, dscGFP = destabilized copepod GFP, SFFV = spleen focus-forming virus promoter, 2A = peptide bond skipping sequence, PGK = phosphoglycerate kinase promoter, Hygro = hygromycin resistance gene. **B** and **C.** Proportion of cells responding to poly(I:C) as judged by

dscGFP expression before and after sorting during the sequential enrichment process. Polyclonal or clonal cell populations were stimulated with poly(I:C) (twice at 35 μ g/ml, 4 h apart) or TNF α (10 ng/ml) for 16 h before sorting at each round. In both cases, the proportion of dscGFP negative cells increased at each round of enrichment.

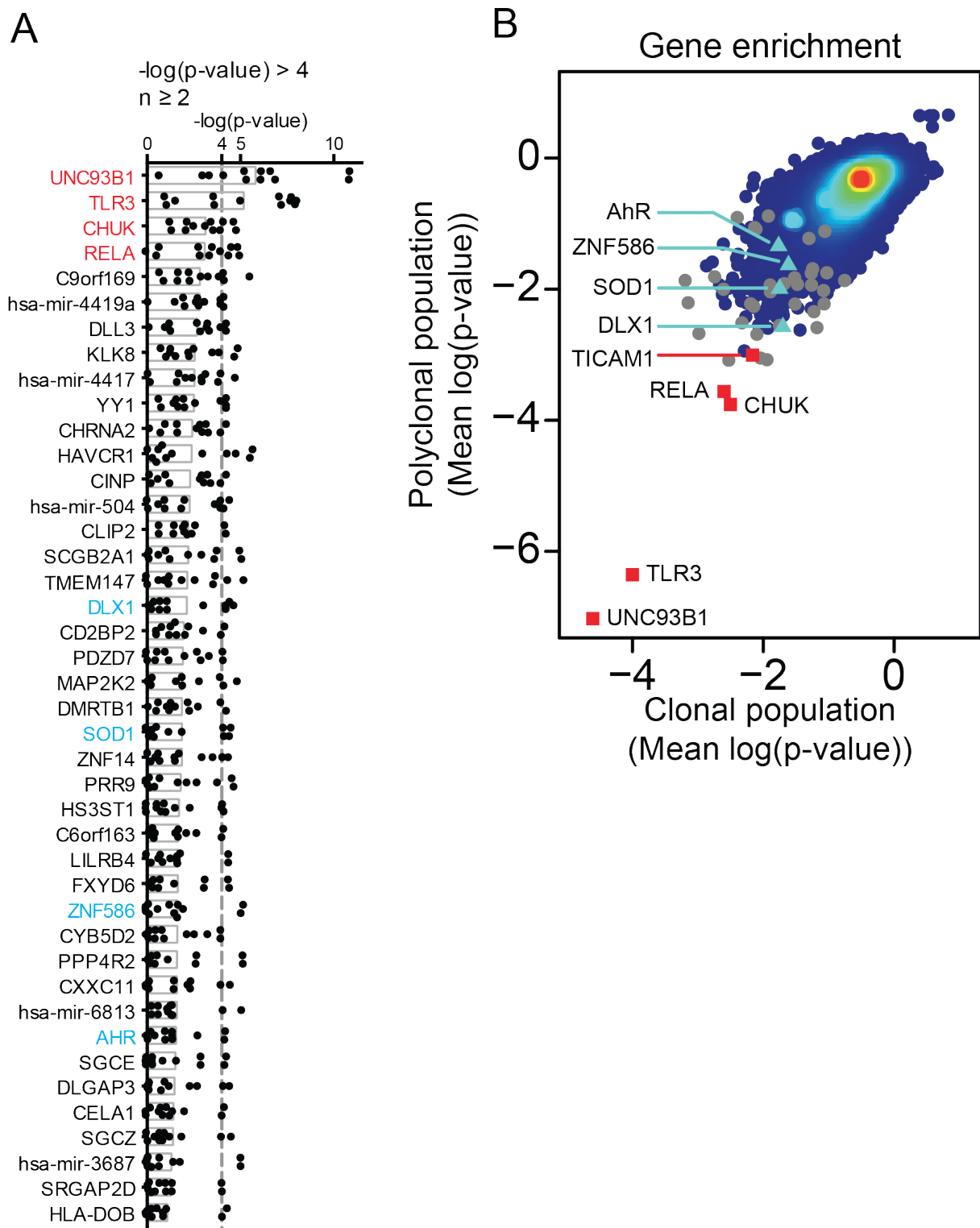


Fig. 12. Results of the genetic screen

A. $-\log(p\text{-value})$ of the results of sgRNA enrichments identified by sequencing, corresponding to 42 genes. After one, two or three rounds of enrichment, the DNA from the enriched cell population was harvested, and enriched sgRNAs were identified by sequencing and comparison to an unsorted library. This determination was carried out for the two independent screens performed in parallel, and sequencing was performed twice generating in

total 12 cell populations enriched. Genes are presented when $-\log(\text{p-value}) > 4$ for at least 2 of the 12 comparisons. Each dot represents the gene enrichments calculated from one condition. The RSA algorithm was used to identify the significantly enriched genes targeted in the selected cells. Red: known key members of TLR3 pathway, blue: further validated genes. **B.** Plot illustrating the hits from the genetic screen. Mean $\log(\text{p-values})$ determined with the clonal population as a function of those found with polyclonal population. Each dot is a gene. Red squares: known key members of the TLR3 pathway, light blue triangles: genes further validated, gray dots : genes further tested, density colors: remaining genes out of the 42 found in panel A.

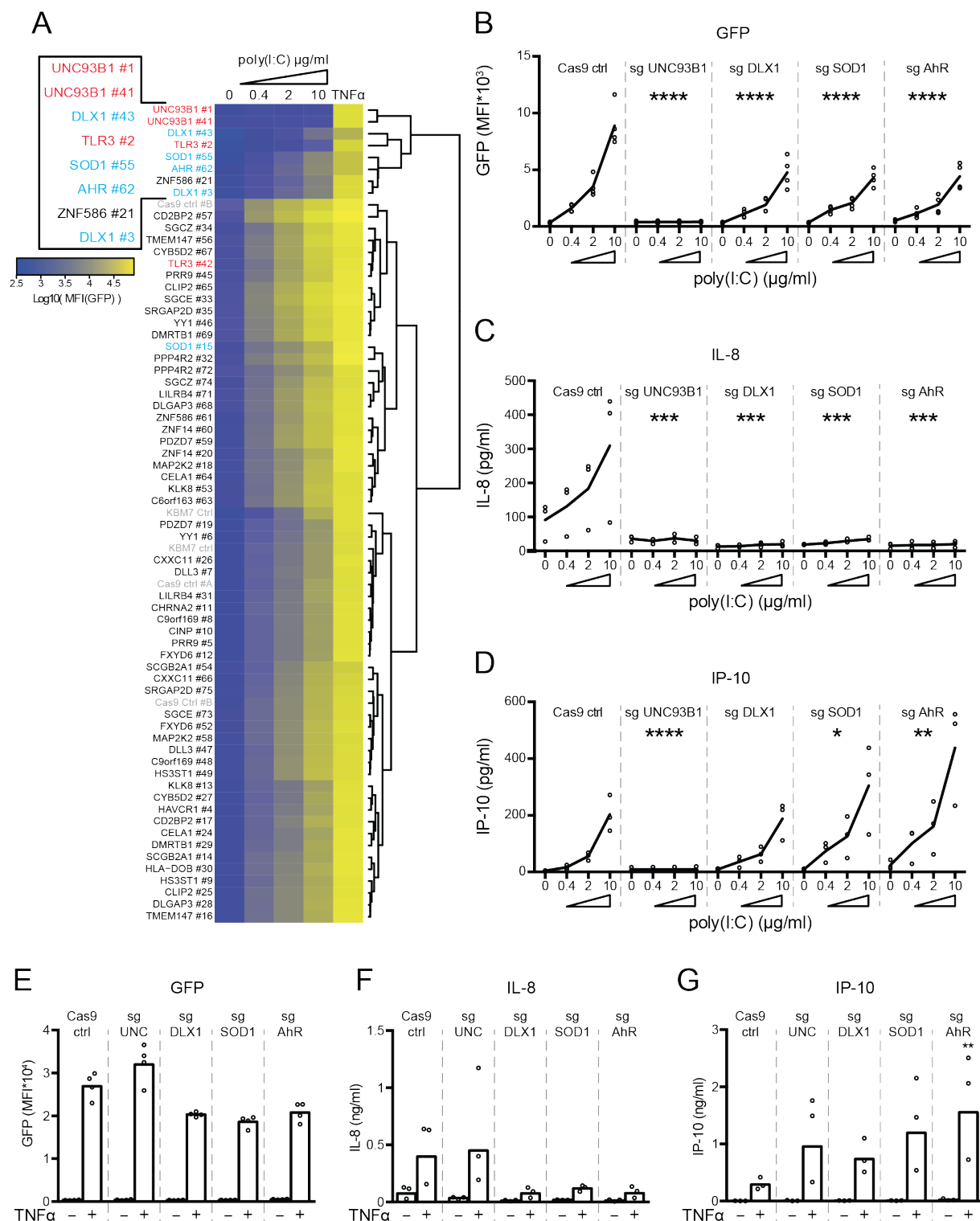


Fig. 13. *DLX1*, *SOD1*, and *AhR* are required for a proper TLR3 response

A. Heatmap of the GFP expression results obtained with KBM7Rep cells transduced with the various sgRNAs (n = 3 independent experiments). KBM7Rep cells transduced with the indicated sgRNAs were exposed to increasing doses of poly(I:C) or TNFα (10 ng/ml) for 16 h before measurement of the GFP expression by FACS. The cluster of genes containing two sgRNAs targeting *UNC93B1* and one targeting *TLR3* is magnified. In red: positive controls, in

blue: genes further studied, in grey: negative controls. **B.** NF- κ B activity, **C** IL-8 and, **D** IP-10 were measured by FACS or CBA, respectively, in response to poly(I:C) exposure of the indicated cells (two-way ANOVA between one sgRNA condition and ctrl Cas9 ctrl). **E**, **F** and **G**: the indicated parameters were measured in the absence or presence of TNF α . n = 3 independent experiments. *, **, *** or ****: significantly different from ctrl Cas9 (Friedman test, with Dunn's multiple comparison test between sgRNA conditions and Cas9 ctrl). UNC = UNC93B1, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

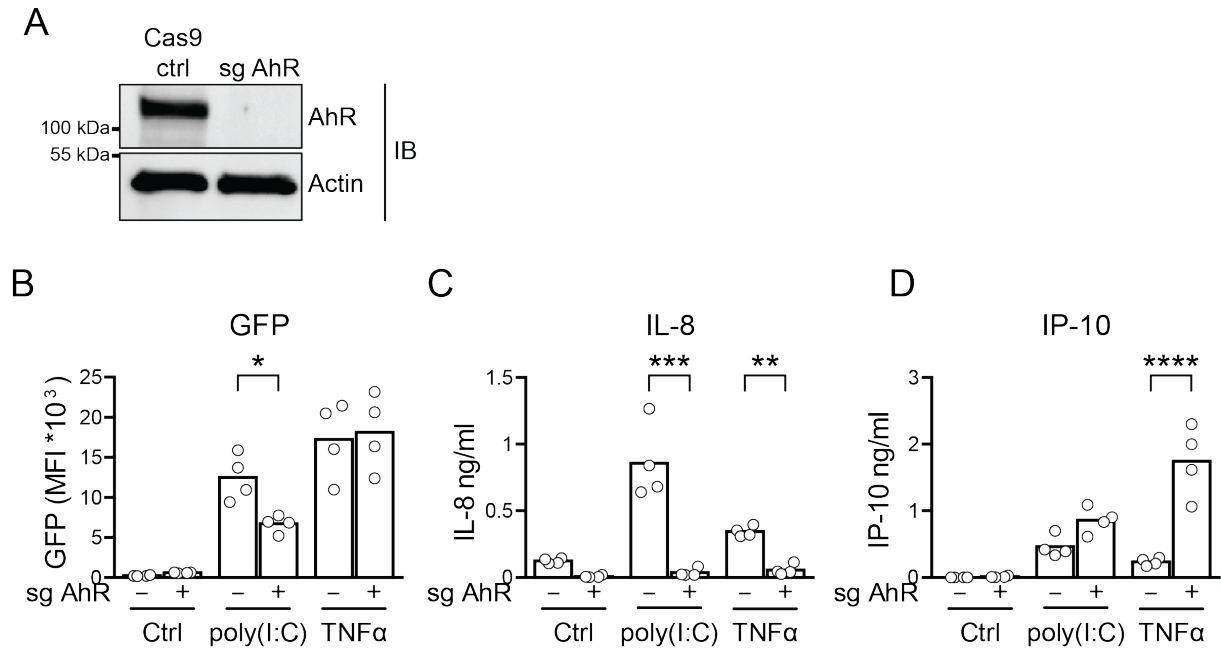


Fig. 14. Cells edited for AhR exhibit a decreased IL-8 and an increased IP-10 response to poly(I:C)

A. Immunoblots of cell lysates of KBM7Rep cells KO for *AhR* or ctrl Cas9 cells revealed with an anti-AhR mAb or with an anti-actin mAb. **B.** NF-κB activity or **C** IL-8 and **D** IP-10 were measured by FACS or CBA, respectively, under the various conditions and cells as indicated

(n = 4 independent experiments). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test, for each panel).

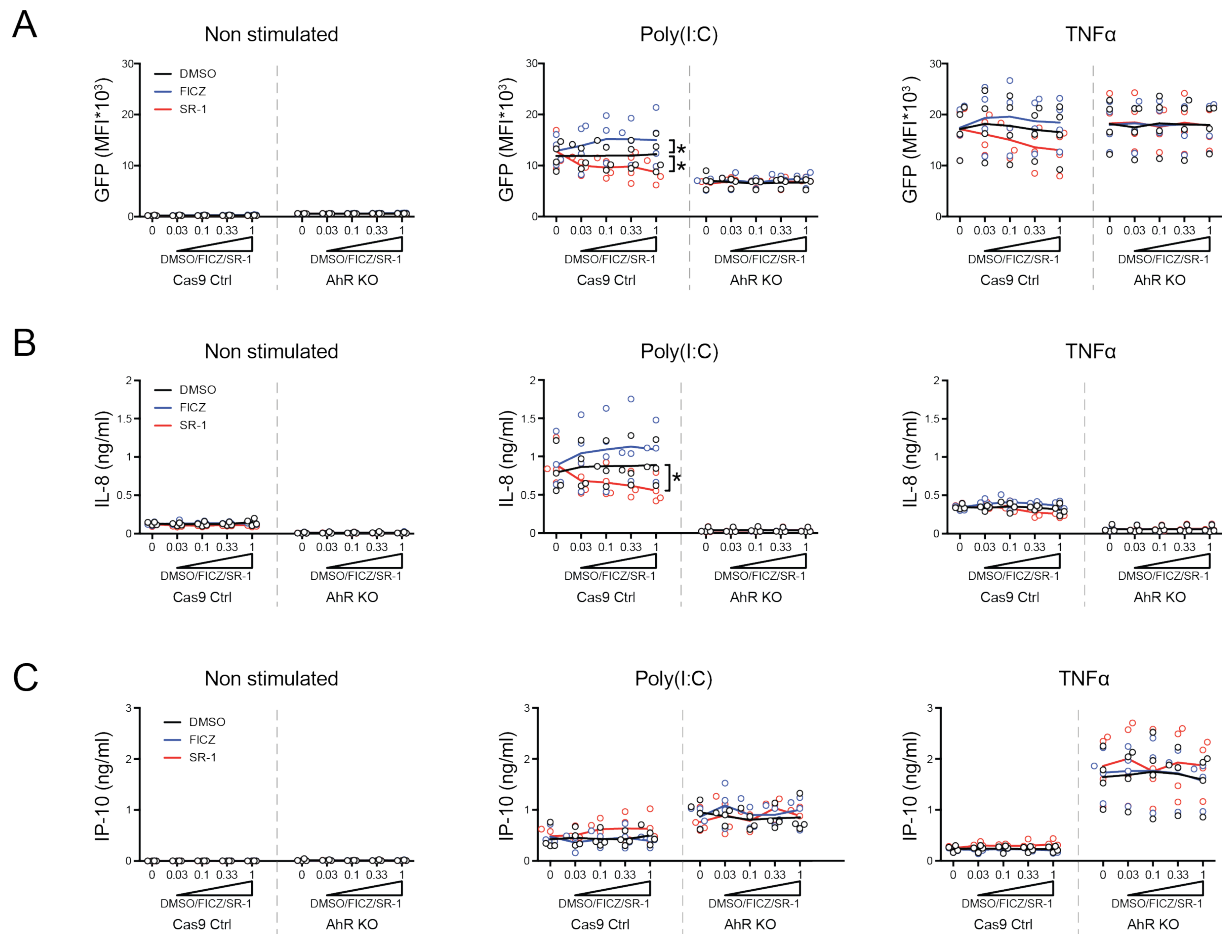


Fig. 15. *AhR* agonist and antagonist affect IP-10 and IL-8 response to poly(I:C)

A, GFP expression **B**, IL-8 and **C**, IP-10 production were determined in control or AHR KO cells in response to poly(I:C) or TNF α in the presence of increasing doses of AhR agonist (FICZ) and antagonist (SR-1) (n = 4 independent experiments). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (for each curve vs the appropriate DMSO control, two-ways ANOVA).

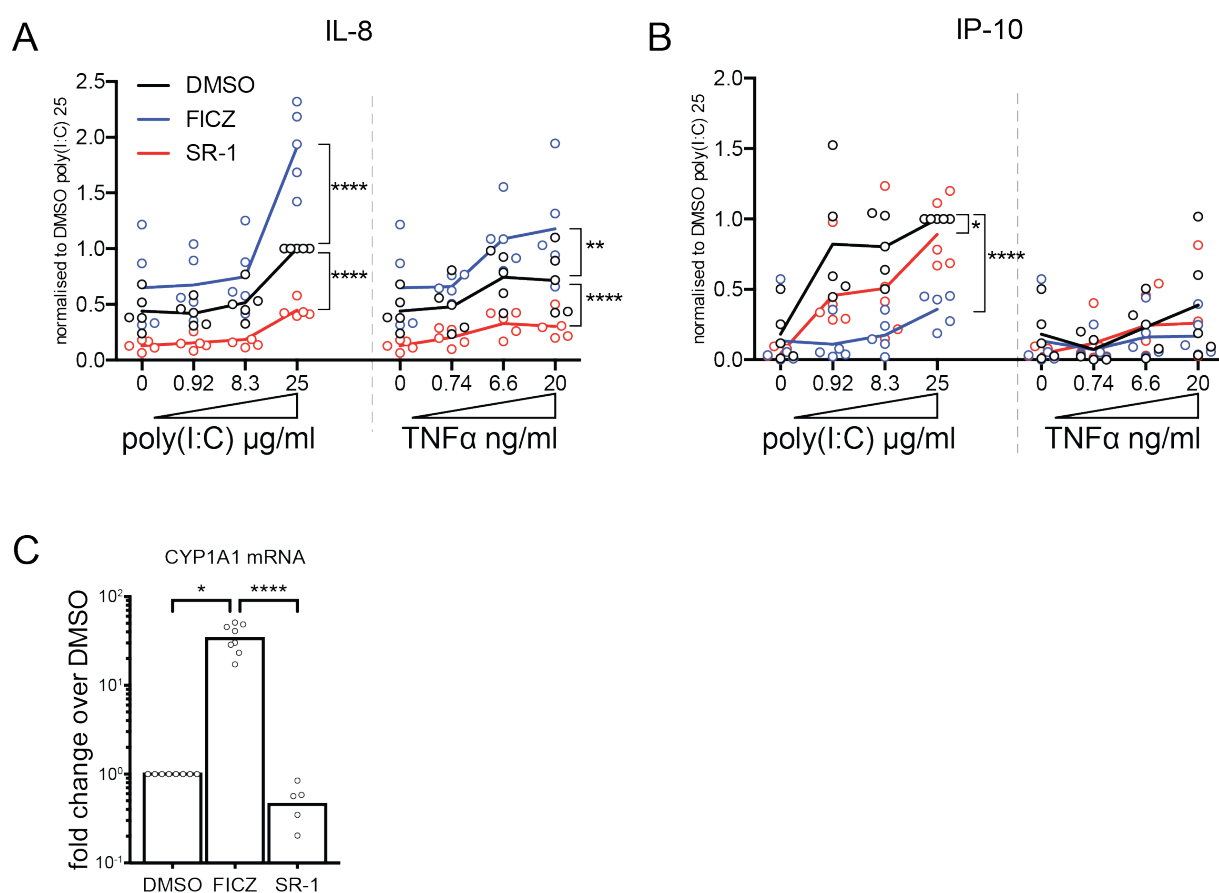


Fig. 16. Primary myeloid cells response to poly(I:C) is affected by AhR agonist and antagonist

A-B. AhR modulators impact human monocyte derived macrophages (MDM) response to poly(I:C) and TNFα. MDM were treated with FICZ (5 µM), SR-1 (5 µM), or vehicle (DMSO) for 1h before stimulation with increasing doses of poly(I:C) or TNFα. **A**, IL-8 and **B**, IP-10 were measured by CBA (n = 5 independent donors). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$, (for each curve vs the appropriate DMSO control, two-way ANOVA). **C.** AhR activity was enhanced by the agonist and inhibited by the antagonist. CYP1A1 mRNA expression of MDM treated with FICZ (5 µM) or SR-1 (5 µM) for 17h, was quantified by RT-qPCR (n = 5 independent donors). * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.0001$ (Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparisons test).

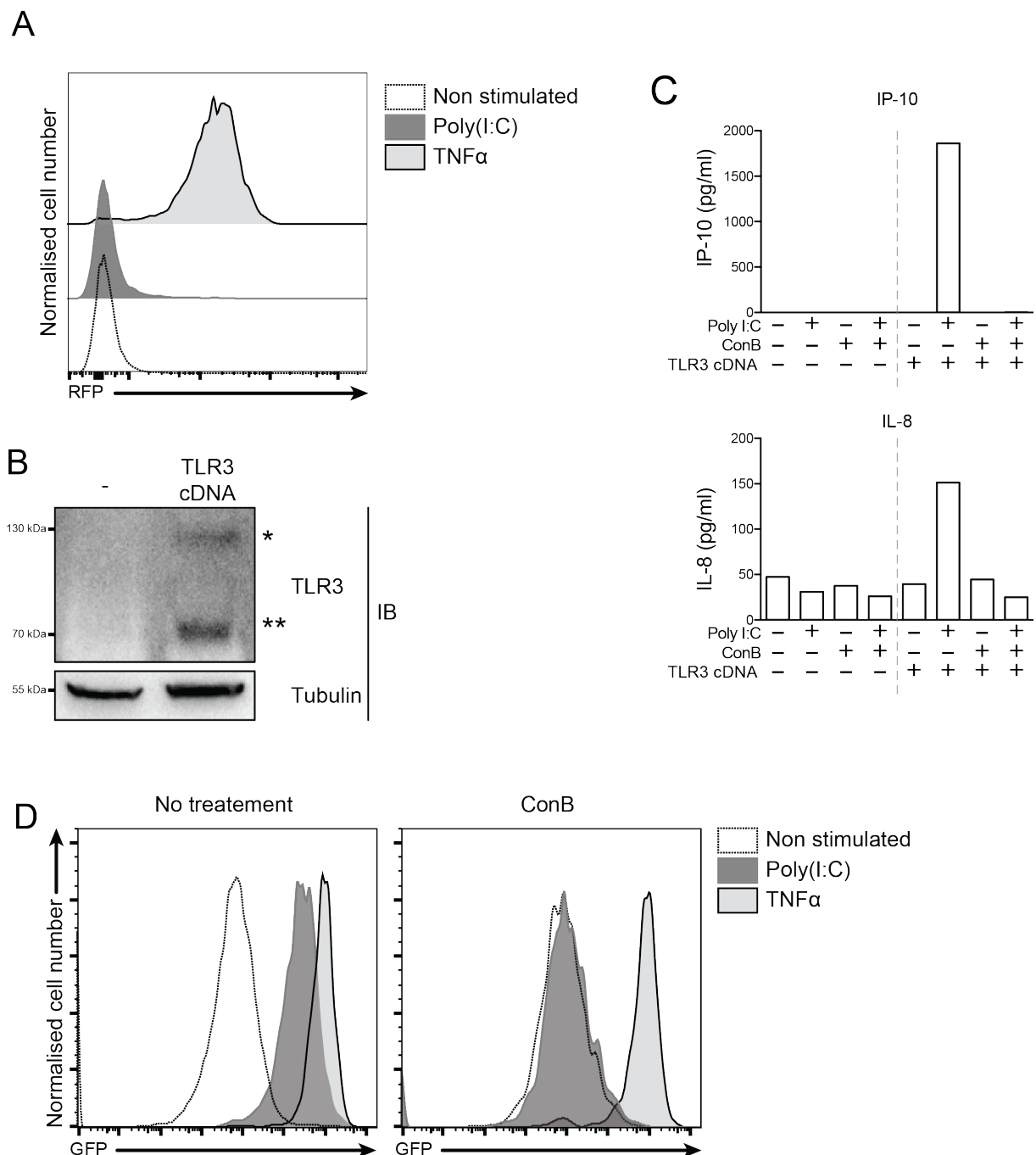


Fig. S1. Functional validation of the KBM7 reporter cells for probing the TLR3 pathway

A. KBM7 cells are not responsive to poly(I:C). Cells were transduced with a cassette encoding RFP under a NF- κ B dependent promotor and stimulated with poly(I:C) (25 μ g/ml) or TNF α (10 ng/ml) for 16 h. NF- κ B activity of KBM7 cells was monitored by FACS. **B.** Transduction of KBM7 cells with TLR3 cDNA leads to the expression of both full-length (*) and cleaved/mature (**) TLR3. Immunoblot of cell lysates of KBM7 cells complemented by the indicated cDNA was revealed by an anti-TLR3 mAb. As a loading control Tubulin was revealed with a specific mAb. **C.** KBM7 cells response to poly(I:C) exposure is dependent on TLR3 expression and endosomal acidification for poly(I:C) detection. IL-8 and IP-10

production were measured in the supernatant from KBM7 complemented or not with TLR3 cDNA, stimulated or not with poly(I:C) (25 µg/ml) for 16 h, with or without 45 min of pre-treatment with 20 nM ConB. **D.** NF-κB activity of KBM7 cells complemented with TLR3 was monitored by FACS. Cells were transduced with a cassette encoding dscGFP under a NF-KB dependent promotor and stimulated with poly(I:C) (25 µg/ml) or TNFα (10 ng/ml) for 16 h, with or without 45 min of pre-treatment by 20 nM conB.

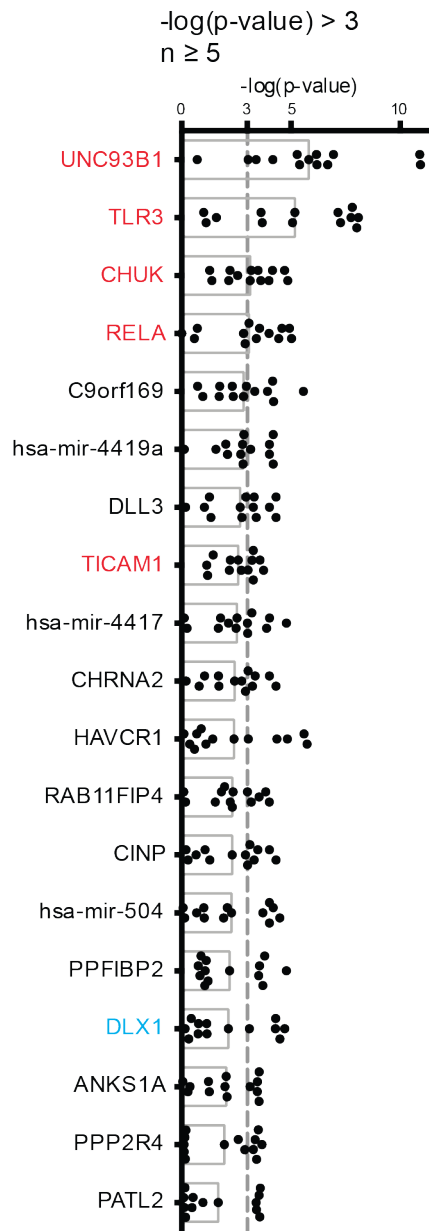


Fig. S2. Results of the genetic screen

$-\log(p\text{-value})$ of the results of sgRNA enrichments identified by sequencing, corresponding to 19 genes. After 1, 2 or 3 rounds of enrichment, the DNA from the enriched population was harvested, and enriched sgRNAs were identified by sequencing and comparison to an unsorted library. This determination was carried out for the two independent screens performed in parallel, generating in total 12 cell populations enriched. $-\log(p\text{-value})$ are presented when > 3 for at least 5 of the 12 comparisons. Each dot represents the gene enrichments calculated from one condition. The RSA algorithm was used to identify the significantly enriched genes targeted in the selected cells. Red: known key members of TLR3 pathway, blue: genes further studied.

Tableau 3 : sgRNA used in the study

name	forward	reverse	ref GeCKO
UNC93B1 #1	CACCTGTTGCCATACTTCACCTCG	AAACCGAGGTGAAGTATGGCAACA	LibB_52973
TLR3 #2	CACCTACCTTGTGAAGTTGGCGGC	AAACGCCGCCAACTTCACAAGGTA	LibB_49588
DLX1 #3	CACCGAAAAAAGATCCGTAAACCC	AAACGGGTTTACGGATCTTTTTC	LibB_13352
HAVCR1 #4	CACCGCTCGTTCGAACAGTCGTGA	AAACTCACGACTGTTCGAACGAGC	LibA_20898
PRR9 #5	CACCCCTGCACTAGACACTTATCT	AAACAGATAAGTGTCTAGTGCAGG	LibA_38854
YY1 #6	CACCGATGTAGAGGGTGTGCCCCG	AAACCGGGCGACACCCTCTACATC	LibA_54756
DLL3 #7	CACCGAGATCAGGCGCGGGCGCTC	AAACGAGCGCCCCGCGCCTGATCTC	LibA_13362
C9orf169 #8	CACCGGTTCTTGACGACCATCTCT	AAACAGAGATGGTCGTCAAGAACC	LibB_6700
HS3ST1 #9	CACCGATCGACTTGGGGGTGCGCC	AAACGGCGCACCCCCAAGTCGATC	LibA_22120
CINP #10	CACCGGCACAATTTAATCCTGAAG	AAACCTTCAGGATTAATTTGTGCC	LibA_9715
CHRNA2 #11	CACCGACGTGGTGATTGTGCGCTT	AAACAAGCGCACAAATCACCACGTC	LibA_9568
FXVD6 #12	CACCCATCGCTCACCATAATGAAA	AAACTTTCATTATGGTGAGCGATG	LibB_18213
KLK8 #13	CACCGGGACGCCCCCGACCTCGTG	AAACCACGAGGTCGGGGGCGTCCC	LibB_25235
SCGB2A1 #14	CACCAGACAGTGATGCCGCTGCAG	AAACCTGCAGCGGCATCACTGTCT	LibA_42924
SOD1 #15	CACCTTGCATCATTGGCCGCACAC	AAACGTGTGCGGCCAATGATGCAA	LibA_46143
TMEM147 #16	CACCGGTCCGAGTACAACGCCTTC	AAACGAAGGCGTTGTACTCGGACC	LibA_49975
CD2BP2 #17	CACCGGTCTCTGGGAGCCGCTTTAA	AAACTTAAAGCGGCTCCCAGGACC	LibA_8331
MAP2K2 #18	CACCTCTCTGCAGGGCAAACCTGG	AAACCCAGGTTTGCCCTGCAGAGA	LibA_28143
PDZD7 #19	CACCTGATCTTGTCCTCCACGCAC	AAACGTGCGTGGGGGACAAGATCA	LibB_35935
ZNF14 #20	CACCTTCATGCAATCGAATTTGAC	AAACGTCAAATTCGATTGCATGAA	LibA_55479
ZNF586 #21	CACCCCAGAAGAGATCACAACAC	AAACGTGTTTGTGATCTCTTCTGG	LibA_56326
CELA1 #24	CACCACGTTATCGCTGTTCCAGTA	AAACTACTGGAACAGCGATAACGT	LibB_8982
CLIP2 #25	CACCGAGGCCAATCGTCACTCCCC	AAACGGGGAGTGACGATTGGCCTC	LibB_10035
CXXC11 #26	CACCTATGACATCGAAGACTGCGA	AAACTCGCAGTCTTCGATGTCATA	LibB_11957
CYB5D2 #27	CACCGAGCTGTCTCGCTACCGCGG	AAACCCGCGGTAGCGAGACAGCTC	LibA_11998
DLGAP3 #28	CACCGTGAGAGCCCTAGCCGCATC	AAACGATGCGGCTAGGGCTCTCAC	LibA_13345
DMRTB1 #29	CACCGTGTCCTCGCAGCCAGTACCA	AAACTGGTACTGGCTGCGGGACAC	LibB_13413
HLA-DOB #30	CACCTGGGAATCGTCATCCAGCTA	AAACTAGCTGGATGACGATTCCCA	LibA_21612
LILRB4 #31	CACCCAGACTCACCTGCCTGCATG	AAACCATGCAGGCAGGTGAGTCTG	LibB_26480
PPP4R2 #32	CACCGGAAGCCATGGACGTCGAG	AAACCTCGACGTCCATGGCTTCCC	LibA_38207
SGCE #33	CACCTGATGGGTATACATTCCGAT	AAACATCGGAATGTATACCCATCA	LibA_43805
SGCZ #34	CACCACTCAGATATACCTTCAAGT	AAACACTTGAAGGTATATCTGAGT	LibB_43759
SRGAP2D #35	CACCCCGTGGAGTCAGGGGAGCAT	AAACATGCTCCCTGACTCCACGG	LibA_46979
PPFIBP2 #36	CACCGCCTCAAGTCCTCGATGAGA	AAACTCTCATCGAGGACTTGAGGC	LibA_37889
RAB11FIP4 #37	CACCTGTGCTGTGCGGTGGAGAGCG	AAACCGCTCTCCACCGACAGCACA	LibB_39752
ANKS1A #38	CACCCTGCACCATGCTGCTTTGAA	AAACTTCAAAGCAGCATGGTGCAG	LibB_2147
PATL2 #39	CACCGCCAAGATGAATTGCCTTGA	AAACTCAAGGCAATTCATCTTGGC	LibA_35285
PPP2R4 #40	CACCGATTGATGAGACTCCTCCAG	AAACCTGGAGGAGTCTCATCAATC	LibB_38118
UNC93B1 #41*	CACCCTACGACGAGACCTACCGCG	AAACCGCGGTAGGTCTCGTCGTAG	LibA_53037
TLR3 #42	CACCTTCGGAGCATCAGTCGTTGA	AAACTCAACGACTGATGCTCCGAA	LibA_49648
DLX1 #43*	CACCCTCGTCCTTCTCCCGACCGC	AAACGCGGTGCGGAGAAGGACGAG	LibA_13372

PRR9 #45	CACCGCTATTCCAGACAAAATGTG	AAACCACATTTTGTCTGGAATAGC	LibB_38804
YY1 #46	CACCGTCGGGTCGTCGGTGACCAG	AAACCTGGTCACCGACGACCCGAC	LibA_54757
DLL3 #47	CACCGGGGGAGGAAAATGAGCGCT	AAACAGCGCTCATTTTCCCTCCCC	LibB_13343
C9orf169 #48	CACCCCTCGGTCGGCTGCAAGAGG	AAACCCTCTTGCAGCCGACCGAGG	LibB_6699
HS3ST1 #49	CACCCGCCATCGCGGACGTCATCC	AAACGGATGACGTCCGCGATGGCG	LibA_22121
FXVD6 #52	CACCGCAGTTTCAATCAGAAGCCC	AAACGGGCTTCTGATTGAAACTGC	LibB_18215
KLK8 #53	CACCATCCACGTCTTGGCCGCACG	AAACCGTGCGGCCAAGACGTGGAT	LibA_25269
SCGB2A1 #54	CACCACTCACCTGCATAGCAGTGC	AAACGCACTGCTATGCAGGTGAGT	LibB_42870
SOD1 #55*	CACCTAAATAGGCTGTACCAGTGC	AAACGCACTGGTACAGCCTATTTA	LibA_46144
TMEM147 #56	CACCCTTGTCATGTCCCGGAATGC	AAACGCATTCCGGGACATGACAAG	LibA_49976
CD2BP2 #57	CACCGATCACACCCTTTAACCTGC	AAACGCAGGTAAAGGGTGTGATC	LibB_8324
MAP2K2 #58	CACCGATCTCCCGTCACTGTAGA	AAACTCTACAGTGACGGGGAGATC	LibA_28142
PDZD7 #59	CACCGGGCATCTTCGTCAGCAAAG	AAACCTTTGCTGACGAAGATGCCC	LibB_35936
ZNF14 #60	CACCTTCAAAAACCTGGTTTGTCT	AAACAGACAAACCAGGTTTTTGAA	LibB_55412
ZNF586 #61	CACCCTGAGCAGGCGCCCTCAGAG	AAACCTCTGAGGGCGCCTGCTCAG	LibA_56327
AHR #62*	CACCAAGTCGGTCTCTATGCCGCT	AAACAGCGGCATAGAGACCGACTT	LibA_1306
C6orf163 #63	CACCTCGAAGCTGTGGAGAAAAGCC	AAACGGCTTTCTCCACAGCTTCGA	LibB_6450
CELA1 #64	CACCCCTCAGTCCCTCCGACTACG	AAACCGTAGTCGGAGGGACTGAGG	LibA_8990
CLIP2 #65	CACCGTCATGGGTCTTCCGGGACA	AAACTGTCCCGGAAGACCCATGAC	LibA_10044
CXXC11 #66	CACCCGTCGTGACCCGCGGTGACC	AAACGGTCACCGCGGGTCACGACG	LibA_11968
CYB5D2 #67	CACCAGCATGTGATGGCTAGCGGT	AAACACCGCTAGCCATCACATGCT	LibB_11986
DLGAP3 #68	CACCCTCGCTGGTATGGTAGTGTG	AAACCACACTACCATAACCAGCGAG	LibA_13344
DMRTB1 #69	CACCCCCCTACTGCCCGTTCCCGC	AAACGCGGGAACGGGCAGTAGGGG	LibB_13414
LILRB4 #71	CACCCCCAGGACCCACATGCAGGC	AAACGCCTGCATGTGGGTCTGGG	LibB_26479
PPP4R2 #72	CACCGTGAATTGTTAACAGATCCA	AAACTGGATCTGTTAACAATTAC	LibB_38158
SGCE #73	CACCGTTACCCAGACCGACCTGGA	AAACTCCAGGTCGGTCTGGGTAAAC	LibA_43806
SGCZ #74	CACCGACCATAGGAGCTGATGCTG	AAACCAGCATCAGCTCCTATGGTC	LibB_43758
SRGAP2D #75	CACCTCAGCACCAAGCCAAGTACA	AAACTGTACTTGGCTTGGTGCTGA	LibA_46980
PPFIBP2 #76	CACCAACGCTTGGCACGTCTAGAA	AAACTTCTAGACGTGCCAAGCGTT	LibA_37888
ANKS1A #78	CACCCTCGAATTTGTTGTTGCGCA	AAACTGCGCAACAACAAATTCGAG	LibA_2150
PATL2 #79	CACCGCCATGGTACCTGGGTGTTG	AAACCAACACCCAGGTACCATGGC	LibB_35240
PPP2R4 #80	CACCTAGGCATACGCTGACTACAT	AAACATGTAGTCAGCGTATGCCTA	LibA_38166

8 Discussion

TLR3 fait partie des senseurs du système immunitaire capables de détecter les acides nucléiques. Les sources connues de ces acides nucléiques sont de plus en plus diverses, puisqu'elles ne se limitent plus aux acides nucléiques exogènes issus de virus. En effet, l'ARNdb issu de cellules nécrotiques ou irradiées par des UV induit l'activation de TLR3. D'autres acides nucléiques endogènes, issus de rétro-éléments endogènes, ont aussi la capacité d'induire une réponse immunitaire dépendante de TLR3. La compréhension de la régulation de TLR3 est donc essentielle pour le développement de nouveaux traitements et adjuvants ciblant TLR3, qui nécessitent une connaissance approfondie des effets déclenchés. Le but de ma thèse a été de mettre à jour de nouvelles protéines requises dans la signalisation déclenchée par l'activation de TLR3.

Les résultats de ma thèse mettent en avant le rôle d'Ahr comme modulateur de la voie TLR3. De plus, il apparaît que CHUK, SOD1 (*superoxide dismutase 1*), et DLX1 (*distal-less homeobox 1*) jouent aussi un rôle encore mal défini dans la réponse au poly(I:C).

8.1 Le modèle expérimental utilisé

8.1.1 Le principe d'un crible génétique

Le principe d'un crible génétique repose sur la capacité à sélectionner des cellules ou des organismes présentant un phénotype d'intérêt parmi un ensemble de mutants. Dans le cas de cellules, il s'agit d'induire des mutations ou KO dans de nombreuses cellules, avant de les tester et d'effectuer une sélection de celles présentant un phénotype d'intérêt. Une seconde étape consiste à identifier les gènes mutés présents spécifiquement dans les cellules possédant le phénotype d'intérêt. Deux types de cribles existent : les cribles « gain de fonction » et les cribles « perte de fonction ». Les cribles gain de fonction partent d'une population déficiente pour une fonction donnée, comme par exemple la résistance à une toxine, et vont rechercher les individus ou cellules ayant acquis par mutation ladite fonction. Les cribles perte de fonction partent d'une population possédant une fonction d'intérêt, comme la capacité de répondre au poly(I:C), et vont sélectionner les individus ou cellules ayant perdu cette fonction.

Les méthodes de sélection utilisées en biologie cellulaire sont classiquement fondées sur la survie ou la mort des cellules, ou bien sur un tri par cytométrie en flux de cellules marquées

ou exprimant un rapporteur fluorescent. Dans cette étude, nous avons utilisé une sélection par tri : nous avons réalisé trois tris successifs afin de favoriser les cellules mutantes au phénotype consistant, au détriment de celles triées par hasard. Chaque tri permet d'enrichir la population en cellules présentant le phénotype d'intérêt.

8.1.2 Les avantages des cribles génétiques par CRISPR/Cas9

Les cribles génétiques ont longtemps utilisé des agents chimiques pour induire des mutations aléatoires dans le génome. Cependant, ces cribles sont inefficaces si les cellules présentent plusieurs allèles par gène (comme c'est le cas dans les cellules diploïdes). La présence de deux allèles d'un même gène permet en effet d'atténuer ou de compenser une mutation d'un seul des allèles. Or les mutations induites par des agents chimiques étant aléatoires, la probabilité de créer une mutation sur les deux allèles d'un même gène dans une cellule est quasi nulle. Cette limitation est éliminée lors de l'utilisation du système CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas9. En effet, les mutations induites ne seront plus aléatoires, mais seront introduites au niveau de séquences de 20 nucléotides choisis. Si deux allèles partagent les mêmes 20 nucléotides ciblés, les deux allèles seront mutés.

L'intérêt de l'utilisation du système CRISPR/Cas9 réside aussi dans la capacité à produire des mutations dans des séquences d'intérêt prédéfinies du génome (souvent les séquences codantes). Cela permet de restreindre le nombre de cellules utilisées, en évitant d'obtenir des cellules mutées pour des régions non choisies du génome. De plus, l'identification des gènes candidats ne se fait plus par le séquençage fastidieux des mutations, mais par celui des ARN guides (ARNg) complémentaires de la séquence du génome visée. Ce séquençage est facilité par la connaissance des séquences adjacentes aux ARNg. Les cribles CRISPR/Cas9 nécessitent comme seules conditions d'application : 1) la capacité technique de muter les cellules à l'aide de la Cas9 et d'ARNg, 2) un phénotype franc définissant clairement deux populations cellulaires, 3) une méthode permettant de sélectionner les cellules d'intérêt basée sur la reconnaissance de ce phénotype. Les cribles CRISPR/Cas9 sont aussi applicables à des organismes entiers (en induisant les mutations dans le zygote).

8.1.3 Les défauts inhérents aux cribles génétiques CRISPR/Cas9

Si la création de mutations de manière ciblée est intéressante, elle peut aussi être délétère pour l'identification de séquences importantes inattendues en introduisant un biais sur ce qui

est recherché. Un autre inconvénient à l'utilisation de CRISPR/Cas9 est l'apparition de mutations non souhaitées, hors-cible, sur des séquences similaires à celles ciblées. Par ailleurs, l'utilisation de CRISPR/Cas9 étant récente, les ARNg ne sont pas encore créés avec une efficacité optimale, conduisant certains à ne pas induire de KO.

D'autres défauts communs à tous les cribles génétiques restent présents. Les gènes vitaux n'apparaîtront jamais comme candidats potentiels, car leur mutation est fatale aux cellules, qui ne pourront donc pas être sélectionnées. Il est entendu que ces gènes vitaux pourront être les candidats recherchés dans les cribles cherchant à les identifier. Les gènes dont la fonction est redondante ne seront pas détectés, car leur disparition n'induit pas le phénotype d'intérêt. Enfin, un crible n'est probablement jamais exhaustif et nécessite nécessairement des étapes de validation des candidats afin d'éviter d'accorder de l'importance à des faux-positifs.

Un tel crible est réalisé « en vrac », les cellules sont toutes dans le même milieu de culture. Ceci rend possible l'utilisation de nombreux ARNg, car la lourdeur technique est peu impactée par le nombre de cellules. En revanche, cela implique que chaque cellule peut être transduite par plusieurs ARNg, ce qui complique l'interprétation des données. Pour pallier cela, il est d'usage de transduire les cellules de sorte que seules 30 % des cellules contiennent un ARNg. Cela permettrait que parmi les cellules transduites, seules 30 % ont deux ARNg, 9 % trois ARNg, etc. (en prenant pour hypothèse que la probabilité pour une cellule d'être transduite une seconde fois est indépendante d'une transduction préliminaire). Ainsi, la majeure partie des cellules n'auront qu'un ARNg et, statistiquement, les interactions entre deux ARNg seront négligeables, car une paire précise d'ARNg ne sera statistiquement présente au maximum que dans une seule cellule. Si un ARNg est enrichi au cours des diverses sélections, ce sera donc pour son action propre.

L'objectif du crible réalisé au cours de ma thèse était de conduire à l'identification des protéines nécessaires à la voie de signalisation TLR3. Il est important de noter que la question posée *via* le crible est légèrement différente. Étant donné que l'on utilise un gène rapporteur de l'activité NF- κ B dont l'expression repose spécifiquement sur les motifs RelA:p50 et cRel:p50, la question est plutôt : « Quelles sont les protéines nécessaires pour l'activation de la voie NF- κ B (RelA:p50 et cRel:p50) en réponse au poly(I:C) ? » La question reste proche, mais les candidats issus du crible sont donc tous spécifiques de la voie NF- κ B déclenchée par TLR3, et on ne pourra pas identifier de gène spécifique des voies IRF ou MAPK. De même, si le poly(I:C) induit une réponse indépendante de TLR3 conduisant à l'activation d'NF- κ B, les protéines responsables de cette réponse sont des candidats potentiels.

8.1.4 Le choix de la lignée cellulaire

L'utilisation des KBM7-TLR3-NF- κ B-rapporteurs est due au fait que l'on souhaitait mettre en place un crible génétique sur cellules humaines. Au début de ma thèse, la méthode récente préexistante nécessitait l'utilisation d'une lignée de cellules haploïdes (Carette *et al.* 2009). Les cellules KBM7 ont en effet la propriété de n'avoir qu'un exemplaire de chaque chromosome à l'exception de la paire de chromosomes 8 et des gonosomes (qui sont X et Y) (Kotecki, Reddy et Cochran 1999). Bien que l'haploïdie de la lignée soit superflue pour un crible CRISPR/Cas9, les KBM7 présentent des avantages non négligeables pour la réalisation d'un crible. C'est une lignée de cellules non-adhérentes, ce qui facilite sa culture en quantités importantes. Les KBM7 se transduisent relativement aisément et le tri par cytométrie en flux n'est pas spécialement dommageable pour ces cellules. Un autre avantage par rapport à d'autres cellules testées est que les KBM7 ne présentent pas d'activation basale de la voie NF- κ B, permettant une différenciation nette entre les cellules activées et non-activées. Le défaut majeur de ces cellules, dans le cadre de cette thèse, fut l'absence d'expression de TLR3, qui nous a contraints à l'exprimer au moyen d'une cassette d'expression exogène. Par ailleurs, le choix des KBM7 n'est pas pertinent du point de vue physiologique car elles sont d'origine tumorale, quasi haploïdes et n'expriment pas TLR3 de manière endogène. Cependant, elles présentent des qualités importantes pour la réalisation d'un crible génétique, et la complémentation par TLR3 a permis de reconstituer une voie TLR3 classique.

8.1.5 Le choix de la bibliothèque d'ARNg

Nous avons choisi la librairie GeCKO, généreusement fournie par le laboratoire de Zhang (Sanjana, Shalem et Zhang 2014), qui était la seule disponible au début de ma thèse. Cette librairie a la particularité de contenir environ 123 000 ARNg, avec 6 ARNg par gène (19 050 ciblés), 4 par micro-ARN (miARN) (1 864 ciblés) et 1 000 ARNg non ciblant servant de contrôle. Cette librairie a été générée afin d'éviter au maximum tout effet hors-cible en maximisant les différences entre les ARNg et les régions non ciblées dont la séquence est proche. Les ARNg ne sont cependant pas tous aussi efficaces, et les différents paramètres impactant cette efficacité restent encore mal connus (Tim Wang et al. 2014). De nouvelles librairies sont maintenant utilisées. Elles utilisent plus d'ARNg par gène, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique ainsi que la probabilité de créer des KO. De plus, la génération de ces librairies vise à maximiser l'efficacité des ARNg (Tim Wang et al. 2015).

8.2 Les protéines requises pour la voie de signalisation de TLR3

8.2.1 Les protéines issues du crible jouant un rôle dans la voie TLR3-NF- κ B

Les résultats issus de l'analyse du crible ont été représentés de deux façons différentes. La première, la plus directe, fut de moyenner l'enrichissement ($\log(p\text{-value})$) obtenu pour chaque crible après l'analyse utilisant l'algorithme RSA (*redundant siRNA activity*). Cela donne la représentation en deux dimensions que l'on peut observer figure 2B de l'article. Il ressort de cette représentation que UNC93B1 et TLR3 sont les deux gènes avec le $\log(p\text{-value})$ le plus bas dans les deux cribles. Leur présence attendue est un témoin de la validité de notre approche. Ils se démarquent très fortement du reste des autres gènes.

La présence de RelA confirme que le rapporteur GFP dépend bien de la voie classique NF- κ B (avec des sites de liaison pour les dimères RelA:p50 ainsi que cRel:p50). Bien que TRIF/TICAM1 soit aussi présent parmi les gènes les plus enrichis, son enrichissement est plus faible que pour UNC93B1 et TLR3. Il serait intéressant de déterminer si, en l'absence de TRIF dans les KBM7, la réponse TLR3 est totalement absente ou fortement atténuée.

La présence de CHUK/IKK α , en revanche, est inattendue : en effet, la voie classique d'activation de RelA fait intervenir principalement IKK β . Bien que IKK α participe à la voie d'activation de RelA (Hayden et Ghosh 2012; Clark *et al.* 2011), il n'est pas décrit comme étant activé dans la voie TLR3. Dans le crible, le fait que CHUK/IKK α apparaisse aussi enrichi, et qu'IKK β n'apparaisse pas, suggère qu'IKK α est nécessaire, et IKK β est vital pour la cellule, ou bien superflu ou redondant pour la voie TLR3. L'activation d'IKK α pourrait être le témoin de l'activation de la voie NF- κ B alternative faisant intervenir RelB. L'activation de la voie NF- κ B alternative n'a, à ma connaissance, jamais été démontrée dans la réponse déclenchée par TLR3. L'activation d'une cascade alternative conduisant à l'activation de CHUK est une hypothèse intéressante. Il y a cependant plusieurs contradictions : la protéine clef NIK n'est pas présente parmi les candidats du crible, RelA est présent parmi les candidats alors que la voie alternative ne passe pas par RelA, et enfin, le rapporteur GFP est contrôlé par le dimère classique RelA:p50.

8.2.2 Le choix des candidats à valider

Afin de ne pas accorder plus ou moins d'importance à certains cribles, certains tris ou certains séquençages qu'à d'autres, nous avons décidé de tous les mettre au même niveau et de

ne considérer que les gènes qui apparaissaient comme les plus enrichis, même de manière ponctuelle. L'utilisation de la moyenne des enrichissements, si elle est représentative, ne permet pas de prendre en compte le détail. Un gène apparaissant enrichi dans un tri, même s'il ne l'est pas dans les autres, reste intéressant. C'est pourquoi nous avons choisi comme critères de sélection des gènes à valider, un enrichissement ($-\log(p\text{-value})$) supérieur à 4 pour au moins deux séquençages. La présence attendue de TLR3, UNC93B1 et RelA parmi ces gènes valide notre approche. Un autre critère plus large a également été pris en compte afin d'inclure dans la liste des candidats TRIF : il s'agit des gènes présentant un enrichissement supérieur à 3 dans au moins cinq séquençages. Bien qu'ils auraient été intéressants, nous avons décidé d'exclure de l'étape de validation CHUK, RelA, TRIF ainsi que les miARN, afin de nous focaliser sur la découverte de nouvelles protéines de la voie de signalisation TLR3.

L'ensemble de ces candidats est représenté par rapport aux autres gènes dans la figure 2B. Il apparaît que, bien qu'ils soient spécialement enrichis à l'issue de certains tris ou certains séquençages, leur moyenne ne ressort pas nécessairement parmi les autres gènes. La différence entre les tris est due à la stochasticité inhérente à un crible dont les conditions ne sont pas optimales (il faudrait idéalement une réponse tout ou rien, l'absence de bruit de fond, et un tri par cytométrie en flux parfait). De plus, il est envisageable que les KO soient plus ou moins rapides à se mettre en place, certains candidats ne seraient donc enrichis que dans les tris tardifs.

8.3 La validation des candidats

8.3.1 La réalisation d'un test sur 80 lignées

Pour valider les cibles, nous avons choisi un système au plus proche de ce qui avait été fait pour le crible. Les deux meilleurs ARNg du crible pour chacun des gènes candidats ont été choisis pour générer des KO afin de valider individuellement chaque gène. Cette étape de validation s'est déroulée comme un test, avec pour chaque ARNg la génération d'une lignée transduite avec la Cas9 et l'ARNg. Chaque lignée fut stimulée avec différentes doses de poly(I:C) ou du TNF α . Cela a permis notamment d'observer si les candidats jouaient un rôle global sur la voie NF- κ B, ou spécifique à TLR3. La carte de chaleur obtenue, figure 3A, a été réalisée avec un regroupement non-supervisé des différentes lignées.

8.3.2 Les protéines AhR, DLX1 et SOD1 sont des membres de la voie TLR3

Nous nous sommes focalisés sur les lignées contenant les ARNg ciblant les protéines AhR, DLX1 et SOD1. Il en ressort que l'intensité de fluorescence corrélée à l'expression de la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP), la production d'IL-8 et celle d'IP-10 (protéine induite par l'IFN γ 10) sont contrôlées de manière différente. AhR, DLX1 et SOD1 sont nécessaires pour une expression maximale de la GFP, ainsi que pour la production d'IL-8. La sécrétion d'IP-10 est au contraire amplifiée dans les lignées transduites avec des ARNg ciblant SOD1 et AhR. Ces trois protéines ont donc été identifiées pour leur rôle dans la voie de signalisation de TLR3. Le rôle de SOD1 et DLX1 dans la voie TLR3 n'a pas été étudié de manière plus approfondie dans cette thèse, en raison de leur faible impact sur l'expression d'IP-10. Les prochains paragraphes vont se concentrer sur ce qui est connu de ces deux protéines afin de proposer des mécanismes qui expliqueraient l'impact qu'elles ont sur la réponse NF- κ B. Il serait intéressant de tester ces hypothèses pour faire progresser nos connaissances de la voie TLR3.

Nous avons choisi d'approfondir l'étude de AhR, car il s'agissait de la protéine dont l'impact était le plus marqué, que ce soit sur les niveaux d'expression d'IL-8 ou d'IP-10 en présence de poly(I:C) ou de TNF α .

8.3.2.1 Le suivi de la production d'IL-8 et d'IP-10

L'intérêt du suivi de la GFP comme témoin d'activation de la voie NF- κ B réside dans la capacité à mesurer aisément son niveau d'expression intracellulaire par cytométrie en flux. Cependant, on peut reprocher à ce rapporteur de ne pas être physiologique et de ne dépendre que de NF- κ B alors que la réponse déclenchée par TLR3 est plus complexe. L'activation de TLR3 induit en effet l'activation des facteurs de transcription IRF3 et AP-1.

Les KBM7 produisent en réponse au poly(I:C) les chimiokines IL-8 et IP-10. D'autres protéines comme l'IL-6 ou le TNF α ne sont pas produites à un niveau détectable (données non montrées). L'IL-8 et l'IP-10 sont donc suivies par dans cette étude, bien que la régulation de leur expression soit plus complexe que celle de la GFP. Ce suivi est effectué au moyen d'un dosage immunologique sur billes dont le résultat est connu par cytométrie en flux.

L'IL-8 est une chimiokine permettant l'attraction des neutrophiles, basophiles et lymphocytes T. Elle favorise l'angiogenèse et la phagocytose (Brat, Bellail et Van Meir 2005). IL-8 est régulée notamment par AP-1 et NF- κ B (Brat, Bellail et Van Meir 2005). Dans les cancers, IL-8 semblerait avoir un rôle pro-tumoral, en participant à un environnement

immunosuppressif et en favorisant la transition néfaste des cellules tumorales d'épithéliales à mésenchymales (David *et al.* 2016). Il semblerait que l'IL-8 fasse partie d'une réponse plus antibactérienne, en favorisant notamment le recrutement de neutrophiles et la phagocytose.

L'IP-10 est une chimiokine se liant à un récepteur exprimé à la surface des cellules Th1 (*type 1 helper T cells*), des cellules NK, des DC inflammatoires, des macrophages et des cellules B. (Liu, Guo et Stiles 2011). Le promoteur d'IP-10 contient des éléments de réponse à AP-1, NF- κ B et IRF3 (M. Liu et al. 2011; Brownell et al. 2014; T. Kawai et al. 2001). De par sa capacité à recruter des cellules Th1, l'IP-10 pourrait être associée à une réponse plus anti-cellulaire.

8.3.2.2 La protéine SOD1

SOD1 est une métallo-enzyme présente sous forme d'homo-dimère dans toutes les cellules (Doucette *et al.* 2004). Elle est principalement présente dans le cytoplasme, mais peut aussi se trouver dans le noyau, les lysosomes ou les mitochondries (Zelko, Mariani et Folz 2002). Elle catalyse la dismutation des anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène ($2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) (Fukai et Ushio-Fukai 2011). La perte de SOD1 induit deux changements au niveau des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ou *reactive oxygen species* : une augmentation de $\text{O}_2^{\bullet-}$, et une diminution de H_2O_2 (Dimayuga *et al.* 2007).

Les molécules $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 sont toutes deux des DRO. La littérature sur l'impact des DRO sur l'activation d'NF- κ B est riche mais manque partiellement de détails sur les DRO mis en jeu (Morgan et Liu 2011; Siomek 2012). Dans le cytoplasme, les DRO peuvent activer la voie NF- κ B, alors que dans le noyau ils ont un effet inhibiteur de cette même voie (Kabe *et al.* 2004). Plusieurs études ont mis en avant le rôle de SOD1 dans l'activation de la voie NF- κ B. La présence d'IL-1 β induit la formation d'un complexe contenant SOD1, la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase et Rac1 (GTPase de la famille Ras). Ce complexe entraîne la production de H_2O_2 . Cette étape est nécessaire au recrutement de TRAF6 par IL-1R afin de déclencher une réponse NF- κ B (Q. Li et al. 2006). Un autre récepteur, le TLR2, nécessite l'activation de Rac1 afin de déclencher une réponse NF- κ B via PI3K et Akt (Arbibe *et al.* 2000). L'ARNdb active Rac1, et en cas d'infection virale, Rac1 est requise pour l'activation d'IRF3 (Ehrhardt *et al.* 2004). Il est donc possible que la réponse TLR3 repose partiellement sur SOD1 et une production de H_2O_2 . D'autant plus que SOD1 contribue possiblement à la réponse déclenchée par TLR4 (Meissner, Molawi et Zychlinsky 2008; Zhu et Lei 2011; Dimayuga *et al.* 2007).

Si le rôle de l'enzyme SOD1 dans la voie TLR3 repose certainement sur sa fonction enzymatique et la propriété oxydative des molécules mise en jeu, l'interaction, ou la synergie avec la voie TLR3, restent moins appréciables. Il serait intéressant d'observer les modifications en DRO induites par la perte de SOD1 et l'impact de SOD1 dans les différentes voies menant à NF- κ B ou IRF3. L'accumulation de O₂[•], et la diminution de H₂O₂ dans le cytoplasme pourrait être pour la cellule un moyen efficace d'induire une réponse cellulaire rapide.

Dans les KBM7, les cellules transduites avec l'ARNg ciblant SOD1 ne phénotypent pas les cellules UNC93B1 KO. En effet, si l'ARNg ciblant SOD1 induit bien une déficience pour la production d'IL-8, la réduction d'expression de GFP est partielle et l'expression d'IP-10 est plus importante. Ainsi, SOD1 jouerait un rôle dans certaines des voies de signalisation déclenchées par TLR3, dont NF- κ B, étant donné l'impact négatif de la perte de SOD1 sur l'expression du rapporteur GFP.

8.3.2.3 La protéine DLX1

La famille DLX regroupe des facteurs de transcription présentant des homologies de séquences avec le gène *distal-less* (*dll*) de *Drosophila melanogaster* (Merlo *et al.* 2000). Les gènes DLX sont impliqués principalement chez l'homme dans le développement des appendices, du cerveau et du crâne (Merlo *et al.* 2000). En dehors de la biologie du développement, DLX1 est très peu étudiée. Cependant, dans certains cancers comme les cancers ovariens, DLX1 est surexprimée, ce qui induit la migration et la prolifération cellulaire. Dans ces cancers, DLX1 module positivement la réponse à TGF- β en interagissant directement avec la protéine SMAD4 (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4*) dans le noyau (Chan *et al.* 2017). Si DLX1 amplifie l'action de TGF- β dans le cerveau (Maira *et al.* 2009), cela ne semble pas être le cas dans des lignées cellulaires hématopoïétiques. DLX1 est exprimé dans certaines lignées hématopoïétiques, ce qui peut être un effet de leur transformation. Bien que son rôle dans ces lignées ne soit absolument pas décrit outre mesure, la présence de DLX1 va diminuer la réponse cellulaire à des ligands de la famille de TGF- β (Chiba *et al.* 2003).

Le lien entre DLX1 et la réponse immunitaire est pour l'instant inexistant à ma connaissance. En conditions physiologiques, DLX1 ne semble pas exprimé en dehors du cerveau chez l'adulte (<https://gtexportal.org/home/gene/DLX1>), ce qui soulève la question de la pertinence de ce résultat issu du criblage. Pourtant, dans ma thèse, deux ARNg différents ciblant DLX1 impactent la réponse NF- κ B médiée par stimulation par poly(I:C). L'ARNg ciblant DLX1 impacte de manière partielle la voie TLR3, aucun effet n'étant observable au niveau de

la sécrétion d'IP-10. La fonction de DLX1 dans la réponse médiée par TLR3 serait via son seul rôle connu, celui de facteur de transcription, ce qui permettrait d'expliquer que son action sur la réponse ne soit pas globale comme peut l'être UNC93B1.

8.3.2.4 La protéine AhR

Comme décrit dans l'introduction, AhR est un facteur de transcription dépendant de sa liaison à un ligand. Les ligands d'AhR peuvent provenir de multiples sources (polluants, alimentation, microbiote ou métabolisme) (H. Wang, Wei et Yu 2015). Un ligand a notamment été rapporté comme étant présent dans les milieux de culture : il s'agit du FICZ, dérivé de la photo-oxydation du tryptophane (Veldhoen *et al.* 2009). Parmi les protéines dont l'expression est contrôlée par AhR, on retrouve des protéines associées à la réduction de stress oxydatif, et notamment l'enzyme SOD1 (Dietrich 2016). Il est intéressant de noter que les ARNg ciblant AhR ou SOD1 ont un effet similaire sur la réponse initiée par TLR3. Il serait intéressant de regarder si en l'absence de SOD1, AhR joue encore un rôle sur la réponse déclenchée par TLR3.

AhR étant le gène dont l'absence avait le plus d'impact sur la réponse déclenchée par TLR3, nous avons décidé de poursuivre son étude à l'aide d'agonistes et d'antagonistes.

8.3.2.4.1 L'impact d'AhR dans les KBM7

Dans les KBM7, AhR impacte le profil d'expression d'IL-8 et d'IP-10 en réponse au poly(I:C) et au TNF α . AhR n'abroge pas de manière uniforme la voie TLR3, mais modifie la forme de la réponse, il joue donc un rôle en aval de TLR3 dans une voie de signalisation commune avec celle initiée par le TNF α . Il est important de rappeler l'existence de ligands d'AhR dans le milieu de culture, due notamment à la photo-dégradation du tryptophane (Veldhoen *et al.* 2009). Le rôle d'AhR est au moins partiellement ligand dépendant, puisque l'utilisation d'antagoniste d'AhR (SR-1) tend à phénocopier dans une moindre mesure le KO d'AhR. Cette observation rejoint celle, présente dans la littérature, selon laquelle AhR semble jouer un rôle en l'absence de ligand ajouté, et que ce rôle peut être amplifié ou inhibé par l'ajout d'agonistes ou d'antagonistes (Vogel, Sciullo et Matsumura 2007). Cela peut être dû à une activation basale d'AhR, liée à une fuite contrôlée du système de régulation, ou bien à cause de ligands présents dans le milieu de culture. Cela rejoint le fait qu'AhR serait constitutivement actif à un faible niveau dans la peau ((Haarmann-Stemmann, Esser et Krutmann 2015)).

Le rôle d'ARNT n'a pas été étudié ici, il serait intéressant de regarder son impact sur la signalisation de TLR3. Cependant, son absence parmi les résultats du crible, ainsi que le fait

que la voie NF- κ B soit impliquée (au moins pour l'expression de la GFP) rend son implication dans une voie de signalisation « classique » sous forme de dimère AhR:ARNT peu probable. Le KO d'AhR n'abroge pas de manière uniforme la voie TLR3, mais va bloquer la production d'IL-8, limiter la production de GFP et augmenter celle d'IP-10 dans les KBM7.

La perte de production d'IL-8 est identique à ce que Vogel *et al.* ont déjà observé (Vogel *et al.* 2007; Vogel, Sciullo et Matsumura 2007; Kado *et al.* 2017), ainsi un dimère RelB:AhR serait mis en place et responsable de l'expression d'IL-8. Le promoteur présent sur la cassette d'expression du rapporteur GFP ne présente que des sites de liaisons pour les dimères RelA:p50 et cRel:p50, mais il n'est pas impossible que certains dimères contenant AhR soient capables de s'y fixer et d'augmenter l'expression de la GFP via les sites de liaison XRE, NC-XRE ou RelBAhRE. AhR a aussi la possibilité d'interagir directement avec RelA et de jouer un rôle au niveau des sites de liaison de NF- κ B. Deux articles contradictoires à ce sujet (Tian et al. 1999; P. H. Chen et al. 2012) démontrent respectivement que ce dimère inhibe ou augmente l'expression NF- κ B dépendante. AhR pourrait aussi moduler la voie NF- κ B indirectement via l'expression de nouvelles protéines. En effet, comme évoqué plus haut, le promoteur de SOD1 possède une séquence XRE (Dietrich 2016). Les ARNg ciblant SOD1 et AhR induisent un phénotype similaire dans les KBM7, il serait intéressant de regarder si ces deux cas récapitulent simplement la disparition de SOD1 de la cellule et l'accumulation de superoxyde.

La surexpression d'IP-10 fait probablement intervenir un autre mécanisme. Il est tentant de penser que dans les KBM7, IP-10 est contrôlé par la voie IRF3, ce qui expliquerait la différence observée avec la diminution d'IL-8 et de GFP. De plus, il a déjà été montré qu'AhR pouvait inhiber de manière constitutive l'activation de TBK1, ce qui diminue l'activation d'IRF3 (Yelamanchi *et al.* 2016). Cependant, ni TBK1 ni IRF3 ne sont impliqués dans la réponse déclenchée par le TNF α , ce qui rend leur contribution dans la surexpression d'IP-10 improbable. Le mécanisme impactant la production d'IP-10 reste donc à élucider. AhR pourrait là aussi avoir un rôle direct sur le promoteur, qui conduirait à une inhibition d'IP-10.

Il serait intéressant de comprendre en détail l'impact d'AhR dans la voie de signalisation déclenchée par TLR3 ou TNF α . L'utilisation de mutants d'AhR déficients pour le domaine de liaison au ligand, ou de liaison à l'ADN, pourrait permettre de savoir si l'un ou l'autre est requis pour le rôle d'AhR. De même, la localisation d'AhR en présence ou en l'absence de poly(I:C) permettrait de savoir s'il joue un rôle dans le noyau. Bien qu'AhR semble jouer un rôle au niveau du contrôle de la transcription, la question reste toujours ouverte.

8.3.2.4.2 L'impact d'Ahr dans les macrophages dérivés de monocytes

Dans les macrophages dérivés de monocytes (MDM), AhR semble jouer le même rôle que dans les KBM7, du moins en réponse à FICZ et SR-1 – à l'exception notable de l'expression d'IP-10, dont le niveau diminue en présence d'agonistes comme d'antagonistes d'Ahr. Ainsi, le contrôle d'IP-10 serait bien AhR dépendant, mais différentes voies seraient impliquées et leur équilibre serait nécessaire pour une production maximale d'IP-10. Ce point de différence entre KBM7 et MDM indiquerait que le type cellulaire impacterait le rôle d'Ahr. Cela renforce l'importance à attacher à la compréhension fine du mécanisme d'action d'Ahr afin d'adapter une stratégie thérapeutique potentielle au type cellulaire ciblé.

8.4 Résumé et conclusion

Le crible réalisé a permis d'identifier des intervenants majeurs de la voie TLR3, qui pour certains étaient attendus (TLR3, UNC93B1, TRIF et RelA). De nouveaux intervenants comme DLX1, SOD1 et AhR ont aussi été découverts. Suite à la concentration de nos efforts sur AhR, nous avons pu démontrer son rôle dans la réponse déclenchée par TLR3, notamment dans la modulation de deux gènes codant pour IL-8 et IP-10. L'activation d'Ahr va avoir une action anti-inflammatoire et induire une réponse plus adaptée pour répondre à des infections bactériennes (Vorderstrasse et Lawrence 2006). Une analyse des modifications du transcriptome induites par la perte d'Ahr ou par son activation permettrait d'identifier des groupes de gènes spécifiquement modulés par AhR dans la réponse déclenchée par TLR3. Il se pourrait qu'Ahr modifie la réponse immunitaire afin de privilégier une réponse antibactérienne par rapport à une réponse antivirale/anti-cellulaire.

Ainsi, la modulation de la réponse TLR3 via l'inhibition d'Ahr pourrait être un nouveau levier de contrôle afin de favoriser une réponse anticancéreuse lors d'injection de ligands de TLR3.

9 Bibliographie

- Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. “The Toll-Like Receptor 3-Mediated Antiviral Response Is Important for Protection against Poliovirus Infection in Poliovirus Receptor Transgenic Mice.” *Journal of Virology* 86 (1): 185–94. doi:10.1128/JVI.05245-11.
- Ajibade, Adebisola A., Helen Y. Wang, and Rong Fu Wang. 2013. “Cell Type-Specific Function of TAK1 in Innate Immune Signaling.” *Trends in Immunology* 34 (7): 307–16. doi:10.1016/j.it.2013.03.007.
- Akira, Shizuo, and Kiyoshi Takeda. 2004. “Toll-like Receptor Signalling.” *Nature Reviews Immunology* 4 (7): 499–511. doi:10.1038/nri1391.
- Alexopoulou, Lena, Agnieszka Czopik Holt, Ruslan Medzhitov, and Richard A. Flavell. 2001. “Recognition of Double-Stranded RNA and Activation of NF-KB by Toll-like Receptor 3.” *Nature* 413 (6857): 732–38. doi:10.1038/35099560.
- Andersen, Line Lykke, Nanna Mørk, Line S. Reinert, Emil Kofod-Olsen, Ryo Narita, Sofie E. Jørgensen, Kristian A. Skipper, et al. 2015. “Functional IRF3 Deficiency in a Patient with Herpes Simplex Encephalitis.” *The Journal of Experimental Medicine* 212 (9): 1371–79. doi:10.1084/jem.20142274.
- Anderson, Kathryn V., Liselotte Bokla, and Christiane Nüsslein-Volhard. 1985. “Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: The Induction of Polarity by the Toll Gene Product.” *Cell* 42 (3): 791–98. doi:10.1016/0092-8674(85)90275-2.
- Andersson, Patrik, Jacqueline McGuire, Carlos Rubio, Katarina Gradin, Murray L Whitelaw, Sven Pettersson, Annika Hanberg, and Lorenz Poellinger. 2002. “A Constitutively Active Dioxin/Aryl Hydrocarbon Receptor Induces Stomach Tumors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 9990–95. doi:10.1073/pnas.152706299.
- Arbibe, Laurence, Jean-Paul Mira, Nicole Teusch, Lois Kline, Mausumee Guha, Nigel Mackman, Paul J Godowski, Richard J Ulevitch, and Ulla G Knaus. 2000. “Toll-like Receptor 2-Mediate NF-KB Activation Requires a Rac1-Dependent Pathway.” *Nature* 1: 533–40.
- Aylward, Lesa L., Robert C. Brunet, Gaétan Carrier, Sean M. Hays, Colleen A. Cushing, Larry L. Needham, Donald G. Patterson, Pier Mario Gerthoux, Paolo Brambilla, and Paolo Mocarelli. 2005. “Concentration-Dependent TCDD Elimination Kinetics in Humans:

- Toxicokinetic Modeling for Moderately to Highly Exposed Adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and Impact on Dose Estimates for the NIOSH Cohort.” *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 15 (1): 51–65. doi:10.1038/sj.jea.7500370.
- Bai, Dong, Lynn Ueno, and Peter K. Vogt. 2009. “Akt-Mediated Regulation of NFκB and the Essentialness of NFκB for the Oncogenicity of PI3K and Akt.” *International Journal of Cancer* 125 (12): 2863–70. doi:10.1002/ijc.24748.
- Bai, Wenjuan, Haipeng Liu, Qun Ji, Yilong Zhou, Le Liang, Ruijuan Zheng, Jianxia Chen, et al. 2014. “TLR3 Regulates Mycobacterial RNA-Induced IL-10 Production through the PI3K/AKT Signaling Pathway.” *Cellular Signalling* 26 (5). Pergamon: 942–50. doi:10.1016/j.cellsig.2014.01.015.
- Bauman, J W, T L Goldsworthy, C S Dunn, and T R Fox. 1995. “Inhibitory Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Rat Hepatocyte Proliferation Induced by 2/3 Partial Hepatectomy.” *Cell Prolif.* 28 (8): 437–51.
- Bell, J. K., I. Botos, P. R. Hall, J. Askins, J. Shiloach, D. M. Segal, and D. R. Davies. 2005. “The Molecular Structure of the Toll-like Receptor 3 Ligand-Binding Domain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (31): 10976–80. doi:10.1073/pnas.0505077102.
- Bell, Jessica K., Gregory E.D. Mullen, Cynthia A. Leifer, Alessandra Mazzoni, David R. Davies, and David M. Segal. 2003. “Leucine-Rich Repeats and Pathogen Recognition in Toll-like Receptors.” *Trends in Immunology* 24 (10): 528–33. doi:10.1016/S1471-4906(03)00242-4.
- Bernard, Jamie J., Christopher Cowing-Zitron, Teruaki Nakatsuji, Beda Muehleisen, Jun Muto, Andrew W. Borkowski, Laisel Martinez, Eric L. Greidinger, Benjamin D. Yu, and Richard L. Gallo. 2012. “Ultraviolet Radiation Damages Self Noncoding RNA and Is Detected by TLR3.” *Nature Medicine* 18 (8): 1286–90. doi:10.1038/nm.2861.
- Bessede, Alban, Marco Gargaro, Maria T. Pallotta, Davide Matino, Giuseppe Servillo, Cinzia Brunacci, Silvio Biciato, et al. 2014. “Aryl Hydrocarbon Receptor Control of a Disease Tolerance Defence Pathway.” *Nature* 511 (7508): 184–90. doi:10.1038/nature13323.
- Bhattacharyya, Sumit, Alip Borthakur, Pradeep K. Dudeja, and Joanne K. Tobacman. 2010. “Lipopolysaccharide-Induced Activation of NF-KB Non-Canonical Pathway Requires BCL10 Serine 138 and NIK Phosphorylations.” *Experimental Cell Research* 316 (19): 3317–27. doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.004.
- Borkowski, Andrew W., Kyungho Park, Yoshikazu Uchida, and Richard L. Gallo. 2013.

- “Activation of TLR3 in Keratinocytes Increases Expression of Genes Involved in Formation of the Epidermis, Lipid Accumulation, and Epidermal Organelles.” *Journal of Investigative Dermatology* 133 (8): 2031–40. doi:10.1038/jid.2013.39.
- Boule, Lisbeth A., Catherine G. Burke, Guang Bi Jin, and B. Paige Lawrence. 2018. “Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Modulates Antiviral Immune Responses: Ligand Metabolism Rather than Chemical Source Is the Stronger Predictor of Outcome.” *Scientific Reports* 8 (1). doi:10.1038/s41598-018-20197-4.
- Brat, Daniel J, Anita C Bellail, and Erwin G Van Meir. 2005. “The Role of Interleukin-8 and Its Receptors in Gliomagenesis and Tumoral Angiogenesis.” *Neuro-Oncology* 7 (2): 122–33. doi:10.1215/S1152851704001061.
- Brázda, Václav, Jan Coufal, Jack C.C. Liao, and Cheryl H. Arrowsmith. 2012. “Preferential Binding of IFI16 Protein to Cruciform Structure and Superhelical DNA.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422 (4): 716–20. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.065.
- Brentano, Fabia, Olivier Schorr, Renate E. Gay, Steffen Gay, and Diego Kyburz. 2005. “RNA Released from Necrotic Synovial Fluid Cells Activates Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts via Toll-like Receptor 3.” *Arthritis and Rheumatism* 52 (9): 2656–65. doi:10.1002/art.21273.
- Brinkmann, Melanie M., Eric Spooner, Kasper Hoebe, Bruce Beutler, Hidde L. Ploegh, and You Me Kim. 2007. “The Interaction between the ER Membrane Protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 Is Crucial for TLR Signaling.” *Journal of Cell Biology* 177 (2): 265–75. doi:10.1083/jcb.200612056.
- Broemer, Meike, Daniel Krappmann, and Claus Scheidereit. 2004. “Requirement of Hsp90 Activity for IκB Kinase (IKK) Biosynthesis and for Constitutive and Inducible IKK and NF-κB Activation.” *Oncogene* 23 (31): 5378–86. doi:10.1038/sj.onc.1207705.
- Brownell, J., J. Bruckner, J. Wagoner, E. Thomas, Y.-M. Loo, M. Gale, T. J. Liang, and S. J. Polyak. 2014. “Direct, Interferon-Independent Activation of the CXCL10 Promoter by NF-κB and Interferon Regulatory Factor 3 during Hepatitis C Virus Infection.” *Journal of Virology* 88 (3): 1582–90. doi:10.1128/JVI.02007-13.
- Buchrieser, Julian, Maria Jose Oliva-Martin, Michael D Moore, Joshua C D Long, Sally A Cowley, Jose Antonio Perez-Simón, William James, and Jose Luis Venero. 2018. “RIPK1 Is a Critical Modulator of Both Tonic and TLR-Responsive Inflammatory and Cell Death Pathways in Human Macrophage Differentiation.” *Cell Death and Disease*. doi:10.1038/s41419-018-1053-4.
- Bugge, Marit, Bjarte Bergstrom, Oda Kamilla Eide, Helene Solli, Ingrid F. Kjøenstad, Jørgen

- Stenvik, Terje Espevik, and Nadra J. Nilsen. 2017. "Surface Toll-Like Receptor 3 Expression in Metastatic Intestinal Epithelial Cells Induces Inflammatory Cytokine Production and Promotes Invasiveness." *Journal of Biological Chemistry*, July, jbc.M117.784090. doi:10.1074/jbc.M117.784090.
- Burnet, F. M., and F. Fenner. 1951. "The Production of Antibodies (2nd Edition)." *The Journal of Immunology* 66 (4): 485–86.
- Burnet, F M. 1969. "Self and Not-Self : Cellular Immunology Book One."
- Byun, Jin Seok, Yang Gun Suh, Hyon Seung Yi, Young Sun Lee, and Won Il Jeong. 2013. "Activation of Toll-like Receptor 3 Attenuates Alcoholic Liver Injury by Stimulating Kupffer Cells and Stellate Cells to Produce Interleukin-10 in Mice." *Journal of Hepatology* 58 (2): 342–49. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.016.
- Carette, Jan E., Carla P. Guimaraes, Malini Varadarajan, Annie S. Park, Irene Wuethrich, Alzbeta Godarova, Maciej Kotecki, et al. 2009. "Haploid Genetic Screens in Human Cells Identify Host Factors Used by Pathogens." *Science* 326 (5957): 1231–35. doi:10.1126/science.1178955.
- Carrasco, Sebastian E., Sishun Hu, Denise M. Imai, Ramesh Kumar, George E. Sandusky, X. Frank Yang, and Wilbert A. Derbigny. 2018. "Toll-like Receptor 3 (TLR3) Promotes the Resolution of Chlamydia Muridarum Genital Tract Infection in Congenic C57BL/6N Mice." *PLoS ONE* 13 (4). doi:10.1371/journal.pone.0195165.
- Casrouge, Armanda, Shen Ying Zhang, Céline Eidenschenk, Emmanuelle Jouanguy, Anne Puel, Kun Yang, Alexandre Alcais, et al. 2006. "Herpes Simplex Virus Encephalitis in Human UNC-93B Deficiency." *Science* 314 (5797): 308–12. doi:10.1126/science.1128346.
- Cavassani, Karen A., Makoto Ishii, Haitao Wen, Matthew A. Schaller, Pamela M. Lincoln, Nicholas W. Lukacs, Cory M. Hogaboam, and Steven L. Kunkel. 2008. "TLR3 Is an Endogenous Sensor of Tissue Necrosis during Acute Inflammatory Events." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (11): 2609–21. doi:10.1084/jem.20081370.
- Chan, D. W., W. W.Y. Hui, J. J. Wang, M. M.H. Yung, L. M.N. Hui, Y. Qin, R. R. Liang, et al. 2017. "DLX1 Acts as a Crucial Target of FOXM1 to Promote Ovarian Cancer Aggressiveness by Enhancing TGF- β /SMAD4 Signaling." *Oncogene* 36 (10): 1404–16. doi:10.1038/onc.2016.307.
- Chang, Mikyoung, Wei Jin, and Shao Cong Sun. 2009. "Peli1 Facilitates TRIF-Dependent Toll-like Receptor Signaling and Proinflammatory Cytokine Production." *Nature Immunology* 10 (10): 1089–95. doi:10.1038/ni.1777.

- Chen, Chan, Yan Feng, Lin Zou, Larry Wang, Howard H. Chen, Jia Yan Cai, Jun Mei Xu, David E. Sosnovik, and Wei Chao. 2014. "Role of Extracellular RNA and TLR3-Trif Signaling in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of the American Heart Association* 3 (1). doi:10.1161/JAHA.113.000683.
- Chen, G. 2009. "Nod-like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease." *Ann. Rev. Pathol.* 4. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239.
- Chen, P. H., H. Chang, J. T. Chang, and P. Lin. 2012. "Aryl Hydrocarbon Receptor in Association with RelA Modulates IL-6 Expression in Non-Smoking Lung Cancer." *Oncogene* 31 (20): 2555–65. doi:10.1038/onc.2011.438.
- Chen, Zhijian J. 2012. "Ubiquitination in Signaling to and Activation of IKK." *Immunological Reviews* 246 (1): 95–106. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01108.x.
- Cheng, Liang, Qi Wang, Guangming Li, Riddhima Banga, Jianping Ma, Haisheng Yu, Fumihiko Yasui, et al. 2018. "TLR3 Agonist and CD40-Targeting Vaccination Induces Immune Responses and Reduces HIV-1 Reservoirs." *Journal of Clinical Investigation*, August. doi:10.1172/JCI99005.
- Chiao, P. J., S. Miyamoto, and I. M. Verma. 1994. "Autoregulation of I Kappa B Alpha Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1): 28–32. doi:10.1073/pnas.91.1.28.
- Chiba, Shigeru, Kenichi Takeshita, Yoichi Imai, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa, Shigeo Masuda, Kiyoshi Shimizu, Shuji Nakamura, Frank H Ruddle, and Hisamaru Hirai. 2003. "Homeoprotein DLX-1 Interacts with Smad4 and Blocks a Signaling Pathway from Activin A in Hematopoietic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 15577–82. doi:10.1073/pnas.2536757100.
- Chin, Arnold I., Andrea K. Miyahira, Anthony Covarrubias, Juli Teague, Beichu Guo, Paul W. Dempsey, and Genhong Cheng. 2010. "Toll-like Receptor 3-Mediated Suppression of TRAMP Prostate Cancer Shows the Critical Role of Type I Interferons in Tumor Immune Surveillance." *Cancer Research* 70 (7): 2595–2603. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1162.
- Choe, J. 2005. "Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain." *Science* 309 (5734): 581–85. doi:10.1126/science.1115253.
- Clark, Kristopher, Mark Peggie, Lorna Plater, Ronald J. Sorcek, Erick R. R. Young, Jeffrey B. Madwed, Joanne Hough, Edward G. McIver, and Philip Cohen. 2011. "Novel Cross-Talk within the IKK Family Controls Innate Immunity." *Biochemical Journal* 434 (1): 93–104. doi:10.1042/BJ20101701.

- Clemens, Michael J, and Androulla Elia. 1997. "The Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR : Structure and Function." *JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH* 524: 503–24.
- Cole, Jennifer E., Tina J. Navin, Amanda J. Cross, Michael E. Goddard, Lena Alexopoulou, Anuja T. Mitra, Alun H. Davies, Richard A. Flavell, Marc Feldmann, and Claudia Monaco. 2011. "Unexpected Protective Role for Toll-like Receptor 3 in the Arterial Wall." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (6): 2372–77. doi:10.1073/pnas.1018515108.
- Cusson-Hermance, Nicole, Smriti Khurana, Thomas H. Lee, Katherine A. Fitzgerald, and Michelle A. Kelliher. 2005. "Rip1 Mediates the Trif-Dependent Toll-like Receptor 3- and 4-Induced NF-KB Activation but Does Not Contribute to Interferon Regulatory Factor 3 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 36560–66. doi:10.1074/jbc.M506831200.
- Daffis, S., M. A. Samuel, M. S. Suthar, M. Gale, and M. S. Diamond. 2008. "Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection." *Journal of Virology* 82 (21): 10349–58. doi:10.1128/JVI.00935-08.
- Dang, Jason, Shashi Kant Tiwari, Gianluigi Lichinchi, Yue Qin, Veena S. Patil, Alexey M. Eroshkin, and Tariq M. Rana. 2016. "Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3." *Cell Stem Cell* 19 (2): 258–65. doi:10.1016/j.stem.2016.04.014.
- Davarinos, Nikos A., and Richard S. Pollenz. 1999. "Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus Following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome Following Nuclear Export." *Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28708–15. doi:10.1074/jbc.274.40.28708.
- David, Justin, Charli Dominguez, Duane Hamilton, and Claudia Palena. 2016. "The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance." *Vaccines* 4 (3): 22. doi:10.3390/vaccines4030022.
- Didierlaurent, A., M. Simonet, and J. C. Sirard. 2005. "Innate and Acquired Plasticity of the Intestinal Immune System." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (12): 1285–87. doi:10.1007/s00018-005-5032-4.
- Dietrich, Cornelia. 2016. "Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor." *Stem Cells International* 2016. doi:10.1155/2016/7943495.
- Dimayuga, Filomena O., Chunmei Wang, Jordan M. Clark, Edgardo R. Dimayuga, Vanessa M. Dimayuga, and Annadora J. Bruce-Keller. 2007. "SOD1 Overexpression Alters ROS

- Production and Reduces Neurotoxic Inflammatory Signaling in Microglial Cells.” *Journal of Neuroimmunology* 182 (1–2): 89–99. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.10.003.
- Doan, Thao, Roger Melvold, Susan Viselli, and Carl Waltenbaugh. 2013. “Lippincott’s Illustrated Reviews Immunology 2nd Edition,” 34–169.
- Dogusan, Zeynep, Mónica García, Daisy Flamez, Lena Alexopoulou, Michel Goldman, Conny Gysemans, Chantal Mathieu, Claude Libert, Decio L Eizirik, and Joanne Rasschaert. 2008. “Double-Stranded RNA Induces Pancreatic Beta-Cell Apoptosis by Activation of the Toll-like Receptor 3 and Interferon Regulatory Factor 3 Pathways.” *Diabetes* 57 (5): 1236–45. doi:10.2337/db07-0844.
- Domínguez-Acosta, O., L. Vega, E. Estrada-Muñiz, M. S. Rodríguez, F. J. Gonzalez, and G. Elizondo. 2018. “Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates the LPS/IFN γ -Induced Inflammatory Response by Inducing Ubiquitin-Proteosomal and Lysosomal Degradation of RelA/P65.” *Biochemical Pharmacology* 155 (June). Elsevier: 141–49. doi:10.1016/j.bcp.2018.06.016.
- Doucette, Peter A., Lisa J. Whitson, Xiaohang Cao, Virgil Schirf, Borries Demeler, Joan Selverstone Valentine, Jeffrey C. Hansen, and P. John Hart. 2004. “Dissociation of Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase Dimers Using Chaotrope and Reductant: Insights into the Molecular Basis for Dimer Stability.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (52): 54558–66. doi:10.1074/jbc.M409744200.
- Doyle, Sean E., Sagar A. Vaidya, Ryan O’Connell, Hajir Dadgostar, Paul W. Dempsey, Ting Ting Wu, Govinda Rao, et al. 2002. “IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program.” *Immunity* 17 (3). Cell Press: 251–63. doi:10.1016/S1074-7613(02)00390-4.
- Eberl, Gérard. 2016. “Immunity by Equilibrium.” *Nature Reviews Immunology* 16 (8): 524–32. doi:10.1038/nri.2016.75.
- Ehrhardt, Christina, Christian Kardinal, Walter J. Wurzer, Thorsten Wolff, Christoph Von Eichel-Streiber, Stephan Pleschka, Oliver Planz, and Stephan Ludwig. 2004. “Rac1 and PAK1 Are Upstream of IKK- ϵ and TBK-1 in the Viral Activation of Interferon Regulatory Factor-3.” *FEBS Letters* 567 (2–3): 230–38. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.069.
- Ermolaeva, Maria A, Marie-Cécile Michallet, Nikoletta Papadopoulou, Olaf Utermöhlen, Ksanthi Kranidioti, George Kollias, Jürg Tschopp, and Manolis Pasparakis. 2008. “Function of TRADD in Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling and in TRIF-Dependent Inflammatory Responses.” *Nature Immunology* 9 (9): 1037–46. doi:10.1038/ni.1638.

- Esposito, Susanna, Claudio Giuseppe Molteni, Silvia Giliani, Cinzia Mazza, Alessia Scala, Laura Tagliaferri, Claudio Pelucchi, Emilio Fossali, Alessandro Plebani, and Nicola Principi. 2012. "Toll-like Receptor 3 Gene Polymorphisms and Severity of Pandemic A/H1N1/2009 Influenza in Otherwise Healthy Children." *Virology Journal* 9 (1): 270. doi:10.1186/1743-422X-9-270.
- Estornes, Y., F. Toscano, F. Virard, G. Jacquemin, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, et al. 2012. "DsRNA Induces Apoptosis through an Atypical Death Complex Associating TLR3 to Caspase-8." *Cell Death and Differentiation* 19 (9): 1482–94. doi:10.1038/cdd.2012.22.
- Ewald, Sarah E., Alex Engel, Jiyou Lee, Miqi Wang, Matthew Bogyo, and Gregory M. Barton. 2011. "Nucleic Acid Recognition by Toll-like Receptors Is Coupled to Stepwise Processing by Cathepsins and Asparagine Endopeptidase." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (4): 643–51. doi:10.1084/jem.20100682.
- Ewald, Sarah E., Bettina L. Lee, Laura Lau, Katherine E. Wickliffe, Guo Ping Shi, Harold A. Chapman, and Gregory M. Barton. 2008. "The Ectodomain of Toll-like Receptor 9 Is Cleaved to Generate a Functional Receptor." *Nature* 456 (7222): 658–62. doi:10.1038/nature07405.
- Fan, Y, G P Boivin, E S Knudsen, D W Nebert, Y Xia, and A Puga. 2010. "The Aryl Hydrocarbon Receptor Functions as a Tumor Suppressor of Liver Carcinogenesis." *Cancer Research* 70 (1): 212–20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3090.
- Feoktistova, Maria, Peter Geserick, Beate Kellert, Diana Panayotova Dimitrova, Claudia Langlais, Mike Hupe, Kelvin Cain, Marion MacFarlane, Georg Häcker, and Martin Leverkus. 2011. "CIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by CFLIP Isoforms." *Molecular Cell* 43 (3): 449–63. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.011.
- Finberg, Robert W., and Evelyn A. Kurt-Jones. 2006. "CD14: Chaperone or Matchmaker?" *Immunity* 24 (2): 127–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.010.
- Fitzgerald, Katherine A., Sarah M. McWhirter, Kerrie L. Faia, Daniel C. Rowe, Eicke Latz, Douglas T. Golenbock, Anthony J. Coyle, Sha Mei Liao, and Tom Maniatis. 2003. "IKKE and TBKI Are Essential Components of the IRF3 Signalling Pathway." *Nature Immunology* 4 (5): 491–96. doi:10.1038/ni921.
- Forte, G., A. Rega, S. Morello, A. Luciano, C. Arra, A. Pinto, and R. Sorrentino. 2012. "Polyinosinic-Polycytidylic Acid Limits Tumor Outgrowth in a Mouse Model of Metastatic Lung Cancer." *The Journal of Immunology* 188 (11): 5357–64. doi:10.4049/jimmunol.1103811.

- Franchi, Luigi, Neil Warner, Kyle Viani, and Gabriel Nuñez. 2009. "Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense." *Immunological Reviews* 227 (1): 106–28. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.
- Fritsche, E., C. Schafer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hubenthal, et al. 2007. "Lightening up the UV Response by Identification of the Arylhydrocarbon Receptor as a Cytoplasmatic Target for Ultraviolet B Radiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (21): 8851–56. doi:10.1073/pnas.0701764104.
- Fukai, T, and M Ushio-Fukai. 2011. "Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases." *Antioxid.Redox.Signal.* 15 (1557–7716 (Electronic)): 1583–1606.
- Funami, Kenji, Misako Matsumoto, Hiroyuki Oshiumi, Takashi Akazawa, Akitsugu Yamamoto, and Tsukasa Seya. 2004. "The Cytoplasmic 'linker Region' in Toll-like Receptor 3 Controls Receptor Localization and Signaling." *International Immunology* 16 (8): 1143–54. doi:10.1093/intimm/dxh115.
- Gabhann, Joan Ní, Rowan Higgs, Kiva Brennan, Warren Thomas, Jacqueline E. Damen, Nadia Ben Larbi, Gerald Krystal, and Caroline A. Jefferies. 2010. "Absence of SHIP-1 Results in Constitutive Phosphorylation of Tank-Binding Kinase 1 and Enhanced TLR3-Dependent IFN- β Production." *The Journal of Immunology* 184 (5): 2314–20. doi:10.4049/jimmunol.0902589.
- Galluzzi, Lorenzo, Erika Vacchelli, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, Jerome Galon, Catherine Sautès-Fridman, Eric Tartour, Laurence Zitvogel, and Guido Kroemer. 2012. "Trial Watch: Experimental Toll-like Receptor Agonists for Cancer Therapy." *OncoImmunology* 1 (5): 699–716. doi:10.4161/bact.21658.
- Garcia-Cattaneo, A., F.-X. Gobert, M. Muller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery, and P. Benaroch. 2012. "Cleavage of Toll-like Receptor 3 by Cathepsins B and H Is Essential for Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (23): 9053–58. doi:10.1073/pnas.1115091109.
- Glaffig, Markus, Natascha Stergiou, Edgar Schmitt, and Horst Kunz. 2017. "Immunogenicity of a Fully Synthetic MUC1 Glycopeptide Antitumor Vaccine Enhanced by Poly(I:C) as a TLR3-Activating Adjuvant." *ChemMedChem* 12 (10): 722–27. doi:10.1002/cmdc.201700254.
- Goffic, Ronan Le, Viviane Balloy, Micheline Lagranderie, Lena Alexopoulou, Nicolas Escriou, Richard Flavell, Michel Chignard, and Mustapha Si-Tahar. 2006. "Detrimental Contribution of the Toll-like Receptor (TLR)3 to Influenza A Virus-Induced Acute

- Pneumonia.” *PLoS Pathogens* 2 (6): 0526–35. doi:10.1371/journal.ppat.0020053.
- Goh, Eddy T. H., J. Simon C. Arthur, Peter C. F. Cheung, Shizuo Akira, Rachel Toth, and Philip Cohen. 2012. “Identification of the Protein Kinases That Activate the E3 Ubiquitin Ligase Pellino 1 in the Innate Immune System.” *Biochemical Journal* 441 (1): 339–46. doi:10.1042/BJ20111415.
- Gohda, Jin, Takayuki Matsumura, and Jun-ichiro Inoue. 2004. “Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling.” *The Journal of Immunology* 173 (5): 2913–17. doi:10.4049/jimmunol.173.5.2913.
- Gopinath, Smita, Myoungjoo V. Kim, Tasfia Rakib, Patrick W. Wong, Michael van Zandt, Natasha A. Barry, Tsuneyasu Kaisho, Andrew L. Goodman, and Akiko Iwasaki. 2018. “Microbiota-Independent Antiviral Protection Conferred by Aminoglycoside Antibiotics.” *BioRxiv*, January, 248617. doi:10.1101/248617.
- Goudot, Christel, Alice Coillard, Alexandra Chloé Villani, Paul Gueguen, Adeline Cros, Siranush Sarkizova, Tsing Lee Tang-Huau, et al. 2017. “Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages.” *Immunity* 47 (3): 582–596.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.016.
- Gowen, B. B., J. D. Hoopes, M.-H. Wong, K.-H. Jung, K. C. Isakson, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and R. W. Sidwell. 2006. “TLR3 Deletion Limits Mortality and Disease Severity Due to Phlebovirus Infection.” *The Journal of Immunology* 177 (9): 6301–7. doi:10.4049/jimmunol.177.9.6301.
- Gramatzki, D, G Pantazis, J Schittenhelm, G Tabatabai, C Köhle, W Wick, M Schwarz, M Weller, and I Tritschler. 2009. “Aryl Hydrocarbon Receptor Inhibition Downregulates the TGF-Beta/Smad Pathway in Human Glioblastoma Cells.” *Oncogene* 28 (28): 2593–2605. doi:10.1038/onc.2009.104.
- Guillot, L, R Le Goffic, S Bloch, N Escriou, S Akira, M Chignard, M Si-Tahar, et al. 2005. “Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-Stranded RNA and Influenza A Virus.” *J Biol Chem* 280 (7): 5571–80. doi:10.1074/jbc.M410592200.
- Guo, Yiqi, Magali Audry, Michael Ciancanelli, Laia Alsina, Joana Azevedo, Melina Herman, Esperanza Anguiano, et al. 2011. “Herpes Simplex Virus Encephalitis in a Patient with Complete TLR3 Deficiency: TLR3 Is Otherwise Redundant in Protective Immunity.” *The Journal of Experimental Medicine* 208 (10): 2083–98. doi:10.1084/jem.20101568.

- Guo, Zhongying, Li Chen, Yuanyuan Zhu, Yixin Zhang, Song He, Jin Qin, Xiaojun Tang, Jiaming Zhou, and Yingze Wei. 2012. "Double-Stranded RNA-Induced TLR3 Activation Inhibits Angiogenesis and Triggers Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells." *Oncology Reports* 27 (2): 396–402. doi:10.3892/or.2011.1538.
- Gutiérrez-Vázquez, Cristina, and Francisco J. Quintana. 2018. "Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor." *Immunity* 48 (1): 19–33. doi:10.1016/j.immuni.2017.12.012.
- Guyton, Kathryn Z., Ivan Rusyn, Weihsueh A. Chiu, Denis E. Corpet, Martin van den Berg, Matthew K. Ross, David C. Christiani, Frederick A. Beland, and Martyn T. Smith. 2018. "Application of the Key Characteristics of Carcinogens in Cancer Hazard Identification." *Carcinogenesis* 39 (4): 614–22. doi:10.1093/carcin/bgy031.
- Haarmann-Stemann, Thomas, Charlotte Esser, and Jean Krutmann. 2015. "The Janus-Faced Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in the Skin: Consequences for Prevention and Treatment of Skin Disorders." *Journal of Investigative Dermatology* 135 (11): 2572–76. doi:10.1038/jid.2015.285.
- Hall, Julie M, Melissa a Barhoover, Dmitri Kazmin, Donald P McDonnell, William F Greenlee, and Russell S Thomas. 2010. "Activation of the Aryl-Hydrocarbon Receptor Inhibits Invasive and Metastatic Features of Human Breast Cancer Cells and Promotes Breast Cancer Cell Differentiation." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (2): 359–69. doi:10.1210/me.2009-0346.
- Hammerschmidt-Kamper, Christiane, Daniel Biljes, Katja Merches, Irina Steiner, Thomas Daldrop, Marianne Bol-Schoenmakers, Raymond H.H. Pieters, and Charlotte Esser. 2017. "Indole-3-Carbinol, a Plant Nutrient and AhR-Ligand Precursor, Supports Oral Tolerance against OVA and Improves Peanut Allergy Symptoms in Mice." *PLoS ONE* 12 (6). doi:10.1371/journal.pone.0180321.
- Handke, W., R. Oelschlegel, R. Franke, D. H. Kruger, and A. Rang. 2009. "Hantaan Virus Triggers TLR3-Dependent Innate Immune Responses." *The Journal of Immunology* 182 (5): 2849–58. doi:10.4049/jimmunol.0802893.
- Hardarson, Hordur S, J Scott Baker, Zhao Yang, Enkhsaikhan Purevjav, Chien-Hua Huang, Lena Alexopoulou, Na Li, Richard a Flavell, Neil E Bowles, and Jesus G Vallejo. 2007. "Toll-like Receptor 3 Is an Essential Component of the Innate Stress Response in Virus-Induced Cardiac Injury." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (1): H251–58. doi:10.1152/ajpheart.00398.2006.
- Harte, Mary T., Ismar R. Haga, Geraldine Maloney, Pearl Gray, Patrick C. Reading, Nathan W.

- Bartlett, Geoffrey L. Smith, Andrew Bowie, and Luke A.J. O'Neill. 2003. "The Poxvirus Protein A52R Targets Toll-like Receptor Signaling Complexes to Suppress Host Defense." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (3): 343–51. doi:10.1084/jem.20021652.
- Hasan, U. A., C. Caux, I. Perrot, A.-C. Doffin, C. Menetrier-Caux, G. Trinchieri, M. Tommasino, and J. Vlach. 2007. "Cell Proliferation and Survival Induced by Toll-like Receptors Is Antagonized by Type I IFNs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (19): 8047–52. doi:10.1073/pnas.0700664104.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2008. "Shared Principles in NF-KB Signaling." *Cell* 132 (3): 344–62. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- . 2012. "NF-KB, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions." *Genes and Development* 26 (3): 203–34. doi:10.1101/gad.183434.111.
- Herman, Melina, Michael Ciancanelli, Yi-Hung Ou, Lazaro Lorenzo, Maja Klaudel-Dreszler, Elodie Pauwels, Vanessa Sancho-Shimizu, et al. 2012. "Heterozygous *TBK1* Mutations Impair TLR3 Immunity and Underlie Herpes Simplex Encephalitis of Childhood." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (9): 1567–82. doi:10.1084/jem.20111316.
- Hewson, Christopher a, Alice Jardine, Michael R Edwards, Vasile Laza-Stanca, and Sebastian L Johnston. 2005. "Toll-like Receptor 3 Is Induced by and Mediates Antiviral Activity against Rhinovirus Infection of Human Bronchial Epithelial Cells." *Journal of Virology* 79 (19): 12273–79. doi:10.1128/JVI.79.19.12273-12279.2005.
- Hidaka, F, S Matsuo, T Muta, K Takeshige, T Mizukami, and H Nunoi. 2006. "A Missense Mutation of the Toll-like Receptor 3 Gene in a Patient with Influenza-Associated Encephalopathy." *Clin Immunol* 119 (2): 188–94. doi:S1521-6616(06)00035-0 [pii]r10.1016/j.clim.2006.01.005 [doi].
- Honda, K, A Takaoka, and T Taniguchi. 2006. "Type I Inteferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors." *Immunity* 25 (3): 349–60. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.009.
- Hou, Xiao-Xiao, Guangjie Chen, Amir M. Hossini, Tingting Hu, Lanqi Wang, Zhanyan Pan, Lingyi Lu, et al. 2018. "Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF- α and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-P65NF-KB/P38MAPK Signaling Pathways." *Journal of Innate Immunity*, 1–11. doi:10.1159/000491029.
- Hoving, J. Claire, Gillian J. Wilson, and Gordon D. Brown. 2014. "Signalling C-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity." *Cellular Microbiology* 16 (2): 185–94. doi:10.1111/cmi.12249.

- Hu, Yun-Hong, Yu Zhang, Li-Qun Jiang, Shuai Wang, Cao-Qi Lei, Ming-Shun Sun, Hong-Bing Shu, and Yu Liu. 2015. "WDFY1 Mediates TLR3/4 Signaling by Recruiting TRIF." *EMBO Reports* 16 (4): 447–55. doi:10.15252/embr.201439637.
- Huang, G., and C. J. Elferink. 2012. "A Novel Nonconsensus Xenobiotic Response Element Capable of Mediating Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Gene Expression." *Molecular Pharmacology* 81 (3): 338–47. doi:10.1124/mol.111.075952.
- Huang, Jun, Ting Liu, Liang Guo Xu, Danying Chen, Zhonghe Zhai, and Hong Bing Shu. 2005. "SIKE Is an IKK ϵ /TBK1-Associated Suppressor of TLR3- and Virus-Triggered IRF-3 Activation Pathways." *EMBO Journal* 24 (23): 4018–28. doi:10.1038/sj.emboj.7600863.
- Hubbard, Troy D, Iain a Murray, and Gary H Perdew. 2015. "Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation." *Drug Metabolism and Disposition* 43 (10): 1522–35. doi:10.1124/dmd.115.064246.
- Huotari, Jatta, and Ari Helenius. 2011. "Endosome Maturation." *EMBO Journal* 30 (17): 3481–3500. doi:10.1038/emboj.2011.286.
- Hushka Dr, and Greenlee Wf. 1995. "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Inhibits DNA Synthesis in Rat Primary Hepatocytes." *Mutation Research* 333 (1–2): 89–99.
- Hutchens, M., K. E. Luker, P. Sottile, J. Sonstein, N. W. Lukacs, G. Nunez, J. L. Curtis, and G. D. Luker. 2008. "TLR3 Increases Disease Morbidity and Mortality from Vaccinia Infection." *The Journal of Immunology* 180 (1): 483–91. doi:10.4049/jimmunol.180.1.483.
- Hyakkoku, K., J. Hamanaka, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Tanaka, S. Uematsu, S. Akira, N. Inagaki, H. Nagai, and H. Hara. 2010. "Toll-like Receptor 4 (TLR4), but Not TLR3 or TLR9, Knock-out Mice Have Neuroprotective Effects against Focal Cerebral Ischemia." *Neuroscience* 171 (1): 258–67. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.054.
- Itoh, Hiroki, Megumi Tatematsu, Ayako Watanabe, Katsunori Iwano, Kenji Funami, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto. 2011. "UNC93B1 Physically Associates with Human TLR8 and Regulates TLR8-Mediated Signaling." *PLoS ONE* 6 (12). doi:10.1371/journal.pone.0028500.
- Janeway, C. A. 1989. "Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 (1): 1–13. doi:10.1101/SQB.1989.054.01.003.
- Jensen, S., and A. R. Thomsen. 2012. "Sensing of RNA Viruses: A Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion." *Journal of Virology* 86 (6): 2900–2910. doi:10.1128/JVI.05738-11.

- Jia, D., W. Yang, L. Li, H. Liu, Y. Tan, S. Ooi, L. Chi, L. G. Fillion, D. Figeys, and L. Wang. 2015. “ β -Catenin and NF-KB Co-Activation Triggered by TLR3 Stimulation Facilitates Stem Cell-like Phenotypes in Breast Cancer.” *Cell Death and Differentiation* 22 (2): 298–310. doi:10.1038/cdd.2014.145.
- Jiang, Zhengfan, Tak W Mak, Ganes Sen, and Xiaoxia Li. 2004. “Toll-like Receptor 3-Mediated Activation of NF-KappaB and IRF3 Diverges at Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN-Beta.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (10): 3533–38. doi:10.1073/pnas.0308496101.
- Jiang, Zhengfan, Maryam Zamanian-Daryoush, Huiqing Nie, Aristobolo M. Silva, Bryan R.G. Williams, and Xiaoxia Li. 2003. “Poly(DI-dC)-Induced Toll-like Receptor 3 (TLR3)-Mediated Activation of NF κ B and MAP Kinase Is through an Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK)-Independent Pathway Employing the Signaling Components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 16713–19. doi:10.1074/jbc.M300562200.
- Jin, G B, B Winans, K C Martin, and B P Lawrence. 2014. “New Insights into the Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Function of CD11c(+) Cells during Respiratory Viral Infection.” *Eur J Immunol* 44 (6): 1685–98. doi:10.1002/eji.201343980.
- Johnsen, Ingvid Bjellmo, Thuy Thanh Nguyen, Monika Ringdal, Anne Merete Tryggestad, Oddmund Bakke, Egil Lien, Terje Espevik, and Marit W. Anthonsen. 2006. “Toll-like Receptor 3 Associates with c-Src Tyrosine Kinase on Endosomes to Initiate Antiviral Signaling.” *EMBO Journal* 25 (14): 3335–46. doi:10.1038/sj.emboj.7601222.
- Jongbloed, Sarah L., Andrew J. Kassianos, Kylie J. McDonald, Georgina J. Clark, Xinsheng Ju, Catherine E. Angel, Chun-Jen J. Chen, et al. 2010. “Human CD141 + (BDCA-3) + Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Myeloid DC Subset That Cross-Presents Necrotic Cell Antigens.” *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1247–60. doi:10.1084/jem.20092140.
- Jun, Hee-Sook, and Ji-Won Yoon. 2003. “A New Look at Viruses in Type 1 Diabetes.” *Diabetes Metab Res Rev* 19: 8–31.
- Kabe, Yasuaki, Kozue Ando, Satoshi Hirao, Makoto Yoshida, and Hiroshi Handa. 2004. “Redox Regulation of NF-KappaB Activation: Distinct Redox Regulation between the Cytoplasm and the Nucleus.” *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (3–4): 395–403. doi:10.1089/ars.2005.7.395.
- Kado, Sarah, W. L. William Chang, Aimy Nguyen Chi, Monika Wolny, David M. Shepherd,

- and Christoph F. A. Vogel. 2017. "Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Modifies Toll-like Receptor-Regulated Responses in Human Dendritic Cells." *Archives of Toxicology* 91 (5). Springer Berlin Heidelberg: 2209–21. doi:10.1007/s00204-016-1880-y.
- Kajita, Emi, Tadashi Nishiya, and Soichi Miwa. 2006. "The Transmembrane Domain Directs TLR9 to Intracellular Compartments That Contain TLR3." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 (2): 578–84. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.014.
- Karikó, Katalin, Houping Ni, John Capodici, Marc Lamphier, and Drew Weissman. 2004. "mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3." *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12542–50. doi:10.1074/jbc.M310175200.
- Karin, Michael. 1996. "The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-Activated Protein Kinases." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351 (1336): 127–34. doi:10.1098/rstb.1996.0008.
- Karwacz, Katarzyna, Christopher Bricogne, Douglas MacDonald, Frederick Arce, Clare L. Bennett, Mary Collins, and David Escors. 2011. "PD-L1 Co-Stimulation Contributes to Ligand-Induced T Cell Receptor down-Modulation on CD8⁺T Cells." *EMBO Molecular Medicine* 3 (10): 581–92. doi:10.1002/emmm.201100165.
- Kato, Hiroki, Osamu Takeuchi, Eriko Mikamo-Satoh, Reiko Hirai, Tomoji Kawai, Kazufumi Matsushita, Akane Hiiragi, Terence S. Dermody, Takashi Fujita, and Shizuo Akira. 2008. "Length-Dependent Recognition of Double-Stranded Ribonucleic Acids by Retinoic Acid-Inducible Gene-I and Melanoma Differentiation-Associated Gene 5." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (7): 1601–10. doi:10.1084/jem.20080091.
- Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J.-i. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. "Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes." *The Journal of Immunology* 167 (10): 5887–94. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5887.
- Kawai, Taro, Osamu Adachi, Tomohiko Ogawa, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. 1999. "Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin." *Immunity* 11 (1): 115–22. doi:10.1016/S1074-7613(00)80086-2.
- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2008. "Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143: 1–20. doi:10.1196/annals.1443.020.
- Kawai, Taro, Shintaro Sato, Ken J. Ishii, Cevayir Coban, Hiroaki Hemmi, Masahiro Yamamoto, Kenta Terai, et al. 2004. "Interferon- α Induction through Toll-like Receptors Involves a Direct Interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." *Nature Immunology* 5 (10): 1061–

68. doi:10.1038/ni1118.
- Kim, You Me, Melanie M. Brinkmann, Marie Eve Paquet, and Hidde L. Ploegh. 2008. "UNC93B1 Delivers Nucleotide-Sensing Toll-like Receptors to Endolysosomes." *Nature* 452 (7184): 234–38. doi:10.1038/nature06726.
- Kindberg, Elin, Sirkka Vene, Aukse Mickiene, Åke Lundkvist, Lars Lindquist, and Lennart Svensson. 2011. "A Functional Toll-like Receptor 3 Gene (TLR3) May Be a Risk Factor for Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Infection." *Journal of Infectious Diseases* 203 (4): 523–28. doi:10.1093/infdis/jiq082.
- Klein, Johanna C., Katrin Moses, Gennadiy Zelinskyy, Simon Sody, Jan Buer, Stephan Lang, Iris Helfrich, Ulf Dittmer, Carsten J. Kirschning, and Sven Brandau. 2017. "Combined Toll-like Receptor 3/7/9 Deficiency on Host Cells Results in T-Cell-Dependent Control of Tumour Growth." *Nature Communications* 8 (March): 14600. doi:10.1038/ncomms14600.
- Kleinman, Mark E., Kiyoshi Yamada, Atsunobu Takeda, Vasu Chandrasekaran, Miho Nozaki, Judit Z. Baffi, Romulo J.C. Albuquerque, et al. 2008. "Sequence- and Target-Independent Angiogenesis Suppression by siRNA via TLR3." *Nature* 452 (7187): 591–97. doi:10.1038/nature06765.
- Ko, Ryeojin, Jin Hee Park, Hyunil Ha, Yongwon Choi, and Soo Young Lee. 2015. "Glycogen Synthase Kinase 3 β Ubiquitination by TRAF6 Regulates TLR3-Mediated pro-Inflammatory Cytokine Production." *Nature Communications* 6: 6765. doi:10.1038/ncomms7765.
- Kobayashi, Norihiko, Yuho Kadono, Asuka Naito, Kunihiro Matsumoto, Tadashi Yamamoto, Sakae Tanaka, and Jun Ichiro Inoue. 2001. "Segregation of TRAF6-Mediated Signaling Pathways Clarifies Its Role in Osteoclastogenesis." *EMBO Journal* 20 (6): 1271–80. doi:10.1093/emboj/20.6.1271.
- Kotecki, Maciej, P. Sanjeeva Reddy, and Brent H. Cochran. 1999. "Isolation and Characterization of a Near-Haploid Human Cell Line." *Experimental Cell Research* 252 (2): 273–80. doi:10.1006/excr.1999.4656.
- Krishnan, Smitha, Yufang Ding, Nima Saedi, Maria Choi, Gautham V. Sridharan, David H. Sherr, Martin L. Yarmush, Robert C. Alaniz, Arul Jayaraman, and Kyongbum Lee. 2018. "LGut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages." *Cell Reports* 23 (4). Elsevier: 172f. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.109.
- Lafaille, Fabien G., Itai M. Pessach, Shen Ying Zhang, Michael J. Ciancanelli, Melina Herman,

- Avinash Abhyankar, Shui Wang Ying, et al. 2012. "Impaired Intrinsic Immunity to HSV-1 in Human iPSC-Derived TLR3-Deficient CNS Cells." *Nature* 491 (7426): 769–73. doi:10.1038/nature11583.
- Lahaye, Xavier, Matteo Gentili, Aymeric Silvin, Cécile Conrad, Léa Picard, Mabel Jouve, Elina Zueva, et al. 2018. "NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote CGAS-Mediated Innate Immune Activation." *Cell* 0 (0). doi:10.1016/j.cell.2018.08.062.
- Lamothe, Betty, Arnaud Besse, Alejandro D. Campos, William K. Webster, Hao Wu, and Bryant G. Darnay. 2007. "Site-Specific Lys-63-Linked Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 Auto-Ubiquitination Is a Critical Determinant of I κ B Kinase Activation." *Journal of Biological Chemistry* 282 (6): 4102–12. doi:10.1074/jbc.M609503200.
- Lampkin, B C, A S Levine, H Levy, W Krivit, and D Hammond. 1985. "Phase II Trial of a Complex Polyribonucleosinic-Polyribocytidylic Acid with Poly-L-Lysine and Carboxymethyl Cellulose in the Treatment of Children with Acute Leukemia and Neuroblastoma: A Report from the Children's Cancer Study Group." *Cancer Res* 45 (11 Pt 2): 5904–9.
- Larigot, Lucie, Ludmila Juricek, Julien Dairou, and Xavier Coumoul. 2018. "AhR Signaling Pathways and Regulatory Functions." *Biochimie Open* 7: 1–9. doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001.
- Lawrence, B P, A D Roberts, J J Neumiller, J A Cundiff, and D L Woodland. 2006. "Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Impairs the Priming but Not the Recall of Influenza Virus-Specific CD8⁺ T Cells in the Lung." *J Immunol* 177 (9): 5819–28. doi:10.1016/j.jim.2006.05.001 [pii].
- Lawrence, Toby, Magali Beben, George Y. Liu, Victor Nizet, and Michael Karin. 2005. "IKK α Limits Macrophage NF- κ B Activation and Contributes to the Resolution of Inflammation." *Nature* 434 (7037): 1138–43. doi:10.1038/nature03491.
- Lee, Bettina L., and Gregory M. Barton. 2014. "Trafficking of Endosomal Toll-like Receptors." *Trends in Cell Biology* 24 (6): 360–69. doi:10.1016/j.tcb.2013.12.002.
- Lee, Bettina L., Joanne E. Moon, Jeffrey H. Shu, Lin Yuan, Zachary R. Newman, Randy Schekman, and Gregory M. Barton. 2013. "UNC93B1 Mediates Differential Trafficking of Endosomal TLRs." *ELife* 2013 (2). doi:10.7554/eLife.00291.
- Lee, Hyun K., Stefan Dunzendorfer, Katrin Soldau, and Peter S. Tobias. 2006. "Double-Stranded RNA-Mediated TLR3 Activation Is Enhanced by CD14." *Immunity* 24 (2): 153–63. doi:10.1016/j.immuni.2005.12.012.

- Lee, Seon-Yeong, Bo-Young Yoon, Ju-In Kim, Yang-Mi Heo, Yun-Ju Woo, Sung-Hwan Park, Ho Youn Kim, Sung-Il Kim, and Mi-La Cho. 2014. "Interleukin-17 Increases the Expression of Toll-like Receptor 3 via the STAT3 Pathway in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes." *Immunology* 141 (3): 353–61. doi:10.1111/imm.12196.
- Lemaitre, Bruno, Emmanuelle Nicolas, Lydia Michaut, Jean-marc Reichhart, and Jules a Hoffmann. 1996. "The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spätzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults." *Cell* 86 (imd): 973–83. doi:16/S0092-8674(00)80172-5.
- Leonard, J. N., R. Ghirlando, J. Askins, J. K. Bell, D. H. Margulies, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2008. "The TLR3 Signaling Complex Forms by Cooperative Receptor Dimerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (1): 258–63. doi:10.1073/pnas.0710779105.
- Levine, A S, and H B Levy. 1978. "Phase I-II Trials of Poly IC Stabilized with Poly-L-Lysine." *Cancer Treat Rep* 62 (11): 1907–12.
- Li, Jieliang, Li Ye, Xu Wang, Shuxian Hu, and Wenzhe Ho. 2012. "Induction of Interferon-?? Contributes to Toll-like Receptor 3-Mediated Herpes Simplex Virus Type 1 Inhibition in Astrocytes." *Journal of Neuroscience Research* 90 (2): 399–406. doi:10.1002/jnr.22758.
- Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. M. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon. 2005. "Immune Evasion by Hepatitis C Virus NS3/4A Protease-Mediated Cleavage of the Toll-like Receptor 3 Adaptor Protein TRIF." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (8): 2992–97. doi:10.1073/pnas.0408824102.
- Li, Kui, Nan L. Li, Dahai Wei, Susan R. Pfeffer, Meiyun Fan, and Lawrence M. Pfeffer. 2012. "Activation of Chemokine and Inflammatory Cytokine Response in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes Depends on Toll-like Receptor 3 Sensing of Hepatitis C Virus Double-Stranded RNA Intermediates." *Hepatology* 55 (3): 666–75. doi:10.1002/hep.24763.
- Li, Q., M. M. Harraz, W. Zhou, L. N. Zhang, W. Ding, Y. Zhang, T. Eggleston, C. Yeaman, B. Banfi, and J. F. Engelhardt. 2006. "Nox2 and Rac1 Regulate H2O2-Dependent Recruitment of TRAF6 to Endosomal Interleukin-1 Receptor Complexes." *Molecular and Cellular Biology* 26 (1): 140–54. doi:10.1128/MCB.26.1.140-154.2006.
- Li, Yang, Xu Lin Xu, Dan Zhao, Lin Na Pan, Chun Wei Huang, Lian Jun Guo, Qing Lu, and Jian Wang. 2015. "TLR3 Ligand Poly IC Attenuates Reactive Astrogliosis and Improves Recovery of Rats after Focal Cerebral Ischemia." *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21 (11): 905–13. doi:10.1111/cns.12469.

- Li, Yong Gang, Uamporn Siripanyaphinyo, Uranan Tumkosit, Nitchakarn Noranate, Atchareeya A-Nuegoonpipat, Yang Pan, Masanori Kameoka, et al. 2012. "Poly (I:C), an Agonist of Toll-like Receptor-3, Inhibits Replication of the Chikungunya Virus in BEAS-2B Cells." *Virology Journal* 9. doi:10.1186/1743-422X-9-114.
- Liang, Yisha, Xuezhi Cao, Qiang Ding, Yanan Zhao, Zhenliang He, and Jin Zhong. 2018. "Hepatitis C Virus NS4B Induces the Degradation of TRIF to Inhibit TLR3-Mediated Interferon Signaling Pathway." Edited by Stacy M. Horner. *PLoS Pathogens* 14 (5): e1007075. doi:10.1371/journal.ppat.1007075.
- Lin, Q., D. Fang, J. Fang, X. Ren, X. Yang, F. Wen, and S. B. Su. 2011. "Impaired Wound Healing with Defective Expression of Chemokines and Recruitment of Myeloid Cells in TLR3-Deficient Mice." *The Journal of Immunology* 186 (6): 3710–17. doi:10.4049/jimmunol.1003007.
- Litzenburger, Ulrike M., Christiane A. Opitz, Felix Sahm, Katharina J. Rauschenbach, Saskia Trump, Marcus Winter, Martina Ott, et al. 2014. "Constitutive IDO Expression in Human Cancer Is Sustained by an Autocrine Signaling Loop Involving IL-6, STAT3 and the AHR." *Oncotarget* 5 (4): 1038–51. doi:10.18632/oncotarget.1637.
- Liu, Bo, Xia Wang, Tai Zhong Chen, Guang Liang Li, Chang Chun Tan, Yong Chen, and Shao Qiang Duan. 2016. "Polarization of M1 Tumor Associated Macrophage Promoted by the Activation of TLR3 Signal Pathway." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9 (5): 484–88. doi:10.1016/j.apjtm.2016.03.019.
- Liu, Lin, Istvan Botos, Yan Wang, Joshua N. Leonard, Joseph Shiloach, David M. Segal, and David R. Davies. 2008. "Structural Basis of Toll-like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA." *Science* 320 (5874): 379–81. doi:10.1126/science.1155406.
- Liu, Mingli, Shanchun Guo, Jacqueline M. Hibbert, Vidhan Jain, Neeru Singh, Nana O. Wilson, and Jonathan K. Stiles. 2011. "CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 22 (3): 121–30. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001.
- Liu, Mingli, Shanchun Guo, and Jonathan K. Stiles. 2011. "The Emerging Role of CXCL10 in Cancer." *Oncology Letters* 2 (4): 583–89. doi:10.3892/ol.2011.300.
- Liu, Xiao Qian, Rui Sheng, and Zheng Hong Qin. 2009. "The Neuroprotective Mechanism of Brain Ischemic Preconditioning." *Acta Pharmacologica Sinica* 30 (8): 1071–80. doi:10.1038/aps.2009.105.
- Loo, Yueh Ming, and Michael Gale. 2011. "Immune Signaling by RIG-I-like Receptors." *Immunity* 34 (5): 680–92. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003.

- Lu, Chen, Danyang Ren, Xiaohui Wang, Tuanzhu Ha, Li Liu, Eric J. Lee, Jing Hu, et al. 2014. "Toll-like Receptor 3 Plays a Role in Myocardial Infarction and Ischemia/Reperfusion Injury." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842 (1): 22–31. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.006.
- Lundberg, Anna M., Stefan K. Drexler, Claudia Monaco, Lynn M. Williams, Sandra M. Sacre, Marc Feldmann, and Brian M. Foxwell. 2007. "Key Differences in TLR3/Poly I:C Signaling and Cytokine Induction by Human Primary Cells: A Phenomenon Absent from Murine Cell Systems." *Blood* 110 (9): 3245–52. doi:10.1182/blood-2007-02-072934.
- Lv, Sihan, Jian Li, Xinchun Qiu, Weida Li, Chao Zhang, Zhen Ning Zhang, and Bing Luan. 2017. "A Negative Feedback Loop of ICER and NF- κ B Regulates TLR Signaling in Innate Immune Responses." *Cell Death and Differentiation* 24 (3). Nature Publishing Group: 492–99. doi:10.1038/cdd.2016.148.
- Ma, Zhe, Guoxin Ni, and Blossom Damania. 2018. "Innate Sensing of DNA Virus Genomes." *Annual Review of Virology*.
- Mackay, Ian, and Noel R Rose. 2006. "The Autoimmune Diseases." In *The Autoimmune Diseases*.
- Maira, Mario, Jason E. Long, Amie Y. Lee, John L R Rubenstein, and Stefano Stifani. 2009. "Role for TGF- β Superfamily Signaling in Telencephalic GABAergic Neuron Development." *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2 (1): 48–60. doi:10.1007/s11689-009-9035-6.
- Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. "Subcellular Localization of Toll-Like Receptor 3 in Human Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 171 (9): 4934–4934. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4934-b.
- Matsumoto, Misako, Satomi Kikkawa, Masayoshi Kohase, Kensuke Miyake, and Tsukasa Seya. 2002. "Establishment of a Monoclonal Antibody against Human Toll-like Receptor 3 That Blocks Double-Stranded RNA-Mediated Signaling." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (5): 1364–69. doi:10.1016/S0006-291X(02)00380-7.
- Matsumoto, Misako, Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Masahiro Azuma, Noriko Ishii, Akiko Morii-Sakai, Hiroaki Shime, and Tsukasa Seya. 2015. "Defined TLR3-Specific Adjuvant That Induces NK and CTL Activation without Significant Cytokine Production in Vivo." *Nature Communications* 6 (February). doi:10.1038/ncomms7280.
- Matzinger, P. 1994. "Tolerance, Danger, and the Extended Family." *Annual Review of Immunology* 12 (1): 991–1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.

- McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, and T. Maniatis. 2004. "IFN-Regulatory Factor 3-Dependent Gene Expression Is Defective in Tbk1-Deficient Mouse Embryonic Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (1): 233–38. doi:10.1073/pnas.2237236100.
- Medzhitov, Ruslan, and Charles Janeway. 2000. "Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways." *Immunological Reviews* 173 (1): 89–97. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x.
- Meissner, F, K Molawi, and A Zychlinsky. 2008. "Superoxide Dismutase 1 Regulates Caspase-1 and Endotoxic Shock." *Nature Immunology*.
- Meng, Liesu, Wenhua Zhu, Congshan Jiang, Xiaojing He, Weikun Hou, Fang Zheng, Rikard Holmdahl, and Shemin Lu. 2010. "Toll-like Receptor 3 Upregulation in Macrophages Participates in the Initiation and Maintenance of Pristane-Induced Arthritis in Rats." *Arthritis Research and Therapy* 12 (3). doi:10.1186/ar3034.
- Merlo, G. R., B. Zerega, L. Paleari, S. Trombino, S. Mantero, and G. Levi. 2000. "Multiple Functions of Dlx Genes." *International Journal of Developmental Biology* 44 (6): 619–26. doi:10.1387/IJDB.11061425.
- Meylan, Etienne, Kim Burns, Kay Hofmann, Vincent Blancheteau, Fabio Martinon, Michelle Kelliher, and Jürg Tschopp. 2004. "RIP1 Is an Essential Mediator of Toll-like Receptor 3-Induced NF KB Activation." *Nature Immunology* 5 (5): 503–7. doi:10.1038/ni1061.
- Meylan, Etienne, Fabio Martinon, Margot Thome, Michael Gschwendt, and Jürg Tschopp. 2002. "RIP4 (DIK/PKK), a Novel Member of the RIP Kinase Family, Activates NF-KB and Is Processed during Apoptosis." *EMBO Reports* 3 (12): 1201–8. doi:10.1093/embo-reports/kvf236.
- Miettinen, M., T. Sareneva, I. Julkunen, and S. Matikainen. 2001. "IFNs Activate Toll-like Receptor Gene Expression in Viral Infections." *Genes and Immunity* 2 (6): 349–55. doi:10.1038/sj.gene.6363791.
- Mimura, J, M Ema, K Sogawa, and Y Fujii-Kuriyama. 1999. "Identification of a Novel Mechanism of Regulation of Ah (Dioxin) Receptor Function." *Genes Dev* 13 (1): 20–25. doi:10.1101/gad.13.1.20.
- Mineev, Konstantin S., Sergey A. Goncharuk, and Alexander S. Arseniev. 2014. "Toll-like Receptor 3 Transmembrane Domain Is Able to Perform Various Homotypic Interactions: An NMR Structural Study." *FEBS Letters* 588 (21): 3802–7. doi:10.1016/j.febslet.2014.08.031.
- Mordmüller, Benjamin, Daniel Krappmann, Meral Esen, Elmar Wegener, and Claus

- Scheidereit. 2003. "Lymphotoxin and Lipopolysaccharide Induce NF- κ B-P52 Generation by a Co-Translational Mechanism." *EMBO Reports* 4 (1): 82–87. doi:10.1038/sj.embor.embor710.
- Morgan, M J, and Z G Liu. 2011. "Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF-KB Signaling." *Cell Res* 21 (1): 103–15. doi:cr2010178 [pii]r10.1038/cr.2010.178.
- Moura-Alves, Pedro, Kellen Faé, Erica Houthuys, Anca Dorhoi, Annika Kreuchwig, Jens Furkert, Nicola Barison, et al. 2014. "AhR Sensing of Bacterial Pigments Regulates Antibacterial Defence." *Nature* 512 (7515): 387–92. doi:10.1038/nature13684.
- Mulero-Navarro, Sonia, and Pedro M. Fernandez-Salguero. 2016. "New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4 (May). Frontiers: 45. doi:10.3389/fcell.2016.00045.
- Naka, Kazuhito, Hiromichi Dansako, Naoya Kobayashi, Masanori Ikeda, and Nobuyuki Kato. 2006. "Hepatitis C Virus NS5B Delays Cell Cycle Progression by Inducing Interferon- β via Toll-like Receptor 3 Signaling Pathway without Replicating Viral Genomes." *Virology* 346 (2): 348–62. doi:10.1016/j.virol.2005.10.023.
- Nandakumar, R, and S R Paludan. 2015. "Catching the Adaptor--WDFY1, a New Player in the TLR-TRIF Pathway." *EMBO Reports* 16 (4): 397–98. doi:10.15252/embr.201540145.
- Napolitano, Maddalena, and Cataldo Patruno. 2018. "Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) a Possible Target for the Treatment of Skin Disease." *Medical Hypotheses* 116: 96–100. doi:10.1016/j.mehy.2018.05.001.
- Nebert, D W, A L Roe, M Z Dieter, W A Solis, Y Yang, and T P Dalton. 2000. "Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis." *Biochem.Pharmacol* 59 (1): 65–85.
- Negishi, Hideo, Tomoko Osawa, Kentaro Ogami, Xinshou Ouyang, Shinya Sakaguchi, Ryuji Koshiba, Hideyuki Yanai, et al. 2008. "A Critical Link between Toll-like Receptor 3 and Type II Interferon Signaling Pathways in Antiviral Innate Immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (51): 20446–51. doi:10.1073/pnas.0810372105.
- Nishiya, Tadashi, Emi Kajita, Soichi Miwa, and Anthony L. DeFranco. 2005. "TLR3 and TLR7 Are Targeted to the Same Intracellular Compartments by Distinct Regulatory Elements." *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 37107–17. doi:10.1074/jbc.M504951200.
- O'Neill, Luke A.J., and Andrew G. Bowie. 2007. "The Family of Five: TIR-Domain-Containing Adaptors in Toll-like Receptor Signalling." *Nature Reviews Immunology* 7 (5): 353–64. doi:10.1038/nri2079.

- Oganesyan, Gagik, Supriya K. Saha, Beichu Guo, Jeannie Q. He, Arash Shahangian, Brian Zarnegar, Andrea Perry, and Genhong Cheng. 2006. "Critical Role of TRAF3 in the Toll-like Receptor-Dependent and -Independent Antiviral Response." *Nature* 439 (7073): 208–11. doi:10.1038/nature04374.
- Opitz, Christiane A., Ulrike M. Litzenburger, Felix Sahm, Martina Ott, Isabel Tritschler, Saskia Trump, Theresa Schumacher, et al. 2011. "An Endogenous Tumour-Promoting Ligand of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor." *Nature* 478 (7368): 197–203. doi:10.1038/nature10491.
- Oshiumi, Hiroyuki, Misako Matsumoto, Kenji Funami, Takashi Akazawa, and Tsukasa Seya. 2003. "TICAM-1, an Adaptor Molecule That Participates in Toll-like Receptor 3-Mediated Interferon- β Induction." *Nature Immunology* 4 (2). Nature Publishing Group: 161–67. doi:10.1038/ni886.
- Oshiumi, Hiroyuki, Masaaki Okamoto, Ken Fujii, Takashi Kawanishi, Misako Matsumoto, Satoshi Koike, and Tsukasa Seya. 2011. "The TLR3/TICAM-1 Pathway Is Mandatory for Innate Immune Responses to Poliovirus Infection." *The Journal of Immunology* 187 (10): 5320–27. doi:10.4049/jimmunol.1101503.
- Pan, Lin Na, Wei Zhu, Cai Li, Xu Lin Xu, Lian Jun Guo, and Qing Lu. 2012. "Toll-like Receptor 3 Agonist Poly I:C Protects against Simulated Cerebral Ischemia in Vitro and in Vivo." *Acta Pharmacologica Sinica* 33 (10): 1246–53. doi:10.1038/aps.2012.122.
- Park, Boyoun, Melanie M Brinkmann, Eric Spooner, Clarissa C Lee, You-Me Kim, L Ploegh, and Hidde L Ploegh. 2009. "Proteolytic Cleavage in an Endolysosomal Compartment Is Required for Toll-like Receptor 9 Activation." *Nature Immunology* 9 (12): 1407–14. doi:10.1038/ni.1669.Proteolytic.
- Patel, Mira, Kari Ann Shirey, Lioubov Pletneva, Marina Boukhvalova, Alfredo Garzino-Demo, Stefanie Vogel, and Jorge Blanco. 2014. "Novel Drugs Targeting Toll-like Receptors for Antiviral Therapy." *Future Virology* 9 (9): 811–29.
- Patel, Rushang D., Iain A. Murray, Colin A. Flaveny, Ann Kusnadi, and Gary H. Perdew. 2009. "Ah Receptor Represses Acute-Phase Response Gene Expression without Binding to Its Cognate Response Element." *Laboratory Investigation* 89 (6). Nature Publishing Group: 695–707. doi:10.1038/labinvest.2009.24.
- Paun, Andrea, Jorgen T Reinert, Zhaozhao Jiang, Carey Medin, Yaseen Balkhi, Katherine A Fitzgerald, and Paula M Pitha. 2008. "Functional Characterization of Murine Interferon Regulatory Factor 5 (IRF-5) and Its Role in the Innate Antiviral Response * □ S." *J Bio Chem* 283: 14295–14308. doi:10.1074/jbc.M800501200.

- Pelka, Karin, Damien Bertheloot, Elisa Reimer, Kshiti Phulphagar, Susanne V. Schmidt, Anette Christ, Rainer Stahl, et al. 2018. "The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport." *Immunity* 48 (5). Elsevier: 911–922.e7. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.011.
- Peng, Tie, Jie Chen, Wei Mao, Xin Song, and Min Chen. 2009. "Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway Activation Enhances Gastric Cancer Cell Invasiveness Likely through a C-Jun-Dependent Induction of Matrix Metalloproteinase-9." *BMC Cell Biology* 10 (1): 27. doi:10.1186/1471-2121-10-27.
- Perales-Linares, Renzo, and Sonia Navas-Martin. 2013. "Toll-like Receptor 3 in Viral Pathogenesis: Friend or Foe?" *Immunology* 140 (2): 153–67. doi:10.1111/imm.12143.
- Pérez de Diego, Rebeca, Vanessa Sancho-Shimizu, Lazaro Lorenzo, Anne Puel, Sabine Plancoulaine, Capucine Picard, Melina Herman, et al. 2010. "Human TRAF3 Adaptor Molecule Deficiency Leads to Impaired Toll-like Receptor 3 Response and Susceptibility to Herpes Simplex Encephalitis." *Immunity* 33 (3): 400–411. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.014.
- Petrulis, John R., and Gary H. Perdew. 2002. "The Role of Chaperone Proteins in the Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex." *Chemico-Biological Interactions* 141 (1–2): 25–40. doi:10.1016/S0009-2797(02)00064-9.
- Pirher, Nina, Karolina Ivičák, Jelka Pohar, Mojca Benčina, and Roman Jerala. 2008. "A Second Binding Site for Double-Stranded RNA in TLR3 and Consequences for Interferon Activation." *Nature Structural and Molecular Biology* 15 (7): 761–63. doi:10.1038/nsmb.1453.
- Pisegna S, Pirozzi G Piccoli M Frati L Santoni A Palmieri G. 2004. "P38 MAPK Activation Controls the TLR3-Mediated up-Regulation of Cytotoxicity and Cytokine Production in Human NK Cells." *Blood* 104 (13): 4157–64.
- Pohar, Jelka, Nina Pirher, Mojca Benčina, Mateja Manček-Keber, and Roman Jerala. 2013. "The Role of UNC93B1 Protein in Surface Localization of TLR3 Receptor and in Cell Priming to Nucleic Acid Agonists." *Journal of Biological Chemistry* 288 (1): 442–54. doi:10.1074/jbc.M112.413922.
- . 2014. "The Ectodomain of TLR3 Receptor Is Required for Its Plasma Membrane Translocation." Edited by Kui Li. *PLoS ONE* 9 (3): e92391. doi:10.1371/journal.pone.0092391.
- Pott, Johanna, Silvia Stockinger, Natalia Torow, Anna Smoczek, Cornelia Lindner, Gerald McInerney, Fredrik Bäckhed, et al. 2012. "Age-Dependent TLR3 Expression of the

- Intestinal Epithelium Contributes to Rotavirus Susceptibility.” *PLoS Pathogens* 8 (5). doi:10.1371/journal.ppat.1002670.
- Pradere, J. P., D. H. Dapito, and R. F. Schwabe. 2014. “The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer.” *Oncogene* 33 (27): 3485–95. doi:10.1038/onc.2013.302.
- Pradeu, Thomas, Sébastien Jaeger, and Eric Vivier. 2013. “The Speed of Change: Towards a Discontinuity Theory of Immunity?” *Nature Reviews Immunology* 13 (10): 764–69. doi:10.1038/nri3521.
- Pradeu, Thomas, and Eric Vivier. 2016. “The Discontinuity Theory of Immunity.” *Science Immunology* 1 (1): aag0479-aag0479. doi:10.1126/sciimmunol.aag0479.
- Qi, Rongsu, Divyendu Singh, and C. Cheng Kao. 2012. “Proteolytic Processing Regulates Toll-like Receptor 3 Stability and Endosomal Localization.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (39): 32617–29. doi:10.1074/jbc.M112.387803.
- Quintana, F J, A S Basso, A H Iglesias, T Korn, M F Farez, E Bettelli, M Caccamo, M Oukka, and H L Weiner. 2008. “Control of T(Reg) and T(H)17 Cell Differentiation by the Aryl Hydrocarbon Receptor.” *Nature* 453 (7191): 65–71.
- Rabeony, Hanitriniaina, Mathilde Pohin, Philippe Vasseur, Isabelle Petit-paris, François Jégou, Laure Favot, Eric Frouin, et al. 2015. “Self-Regulation and Cross-Regulation of Pattern-Recognition Receptor Signalling in Health and Disease.” *Nature Reviews Immunology* 16 (1): 483–92. doi:10.1038/nri.2015.5.
- Reinert, Line S., Louis Harder, Christian K. Holm, Marie B. Iversen, Kristy A. Horan, Frederik Dagnæs-Hansen, Benedicte P. Uhløi, et al. 2012. “TLR3 Deficiency Renders Astrocytes Permissive to Herpes Simplex Virus Infection and Facilitates Establishment of CNS Infection in Mice.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1368–76. doi:10.1172/JCI60893.
- Richer, Martin, Danielle Lavallée, Iryna Shanina, and Marc Horwitz. 2009. “Toll-like Receptor 3 Signaling on Macrophages Is Required for Survival Following Coxsackievirus B4 Infection.” *PloS One* 4 (1): e4127. doi:doi: 10.1371/journal.pone.0004127.
- Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1998. “Lippincott’s Illustrated Reviews Immunology 2nd Edition.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (2): 588–93. doi:10.1073/pnas.95.2.588.
- Saitoh, T., M. Yamamoto, M. Miyagishi, K. Taira, M. Nakanishi, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2005. “A20 Is a Negative Regulator of IFN Regulatory Factor 3 Signaling.” *The Journal of Immunology* 174 (3): 1507–12. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1507.

- Salaun, B., I. Coste, M.-C. Rissoan, S. J. Lebecque, and T. Renno. 2006. "TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells." *The Journal of Immunology* 176 (8): 4894–4901. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4894.
- Salem, Mohamed L., Andre N. Kadima, David J. Cole, and William E. Gillanders. 2005. "Defining the Antigen-Specific T-Cell Response to Vaccination and Poly(I:C)/TLR3 Signaling: Evidence of Enhanced Primary and Memory CD8 T-Cell Responses and Antitumor Immunity." *Journal of Immunotherapy* 28 (3): 220–28. doi:10.1097/01.cji.0000156828.75196.0d.
- Sancho-Shimizu, Vanessa, Rebeca Pérez De Diego, Lazaro Lorenzo, Rabih Halwani, Abdullah Alangari, Elisabeth Israelsson, Sylvie Fabrega, et al. 2011. "Herpes Simplex Encephalitis in Children with Autosomal Recessive and Dominant TRIF Deficiency." *Journal of Clinical Investigation* 121 (12): 4889–4902. doi:10.1172/JCI59259.
- Sanjana, Neville E., Ophir Shalem, and Feng Zhang. 2014. "Improved Vectors and Genome-Wide Libraries for CRISPR Screening." *Nature Methods* 11 (8): 783–84. doi:10.1038/nmeth.3047.
- Sarkar, Saumendra N., Kristi L. Peters, Christopher P. Elco, Shuji Sakamoto, Srabani Pal, and Ganes C. Sen. 2004. "Novel Roles of TLR3 Tyrosine Phosphorylation and PI3 Kinase in Double-Stranded RNA Signaling." *Nature Structural and Molecular Biology* 11 (11): 1060–67. doi:10.1038/nsmb847.
- Sarkar, Saumendra N., Heather L. Smith, Theresa M. Rowe, and Ganes C. Sen. 2003. "Double-Stranded RNA Signaling by Toll-like Receptor 3 Requires Specific Tyrosine Residues in Its Cytoplasmic Domain." *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4393–96. doi:10.1074/jbc.C200655200.
- Sasai, M., M. Shingai, K. Funami, M. Yoneyama, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. "NAK-Associated Protein 1 Participates in Both the TLR3 and the Cytoplasmic Pathways in Type I IFN Induction." *The Journal of Immunology* 177 (12): 8676–83. doi:10.4049/jimmunol.177.12.8676.
- Sasai, Miwa, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, Norimitsu Inoue, Fumitaka Fujita, Makoto Nakanishi, and Tsukasa Seya. 2005. "Cutting Edge: NF-KappaB-Activating Kinase-Associated Protein 1 Participates in TLR3/Toll-IL-1 Homology Domain-Containing Adapter Molecule-1-Mediated IFN Regulatory Factor 3 Activation." *Journal of Immunology* 174 (1): 27–30. doi:10.4049/jimmunol.174.1.27.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. "Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with

- TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor.” *The Journal of Immunology* 171 (8): 4304–10. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4304.
- Sato, Shintaro, Hideki Sanjo, Kiyoshi Takeda, Jun Ninomiya-Tsuji, Masahiro Yamamoto, Taro Kawai, Kunihiro Matsumoto, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. 2005. “Essential Function for the Kinase TAK1 in Innate and Adaptive Immune Responses.” *Nature Immunology* 6 (11): 1087–95. doi:10.1038/ni1255.
- Schoenemeyer, Annett, Betsy J. Barnes, Margo E. Mancl, Eicke Latz, Nadege Goutagny, Paula M. Pitha, Katherine A. Fitzgerald, and Douglas T. Golenbock. 2005. “The Interferon Regulatory Factor, IRF5, Is a Central Mediator of Toll-like Receptor 7 Signaling.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (17): 17005–12. doi:10.1074/jbc.M412584200.
- Schroder, Kate, and Jurg Tschopp. 2010. “The Inflammasomes” 140 (6): 821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Schulz, Oliver, Sandra S. Diebold, Margaret Chen, Tanja I. Näslund, Martijn A. Nolte, Lena Alexopoulou, Yasu Taka Azuma, Richard A. Flavell, Peter Liljeström, and Caetano Reis E Sousa. 2005. “Toll-like Receptor 3 Promotes Cross-Priming to Virus-Infected Cells.” *Nature* 433 (7028): 887–92. doi:10.1038/nature03326.
- Seong, Seung Yong, and Polly Matzinger. 2004. “Hydrophobicity: An Ancient Damage-Associated Molecular Pattern That Initiates Innate Immune Responses.” *Nature Reviews Immunology* 4 (6): 469–78. doi:10.1038/nri1372.
- Sepulveda, Fernando E., Sophia Maschalidi, Renaud Colisson, Lea Heslop, Cristina Ghirelli, Emna Sakka, Ana Maria Lennon-Duménil, Sebastian Amigorena, Lucien Cabanie, and Bénédicte Manoury. 2009. “Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells.” *Immunity* 31 (5): 737–48. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.013.
- Shi, Ming, Xi Chen, Kangruo Ye, Yuanfei Yao, and Yu Li. 2016. “Application Potential of Toll-like Receptors in Cancer Immunotherapy: Systematic Review.” *Medicine* 95 (25): e3951. doi:10.1097/MD.0000000000003951.
- Shim, Jae-Hyuck, Changchun Xiao, Amber E Paschal, Shannon T Bailey, Ping Rao, Matthew S Hayden, Ki-Young Lee, et al. 2005. “TAK1, but Not TAB1 or TAB2, Plays an Essential Role in Multiple Signaling Pathways in Vivo.” *Genes & Development* 19 (22): 2668–81. doi:10.1101/gad.1360605.
- Shime, H., M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue,

- and T. Seya. 2012. “Toll-like Receptor 3 Signaling Converts Tumor-Supporting Myeloid Cells to Tumoricidal Effectors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (6): 2066–71. doi:10.1073/pnas.1113099109.
- Shinde, Rahul, Kebria Hezaveh, Marie Jo Halaby, Andreas Kloetgen, Ankur Chakravarthy, Tiago Da Silva Medina, Reema Deol, et al. 2018. “Apoptotic Cell-Induced AhR Activity Is Required for Immunological Tolerance and Suppression of Systemic Lupus Erythematosus in Mice and Humans Article.” *Nature Immunology* 19 (6). Nature Publishing Group: 571–82. doi:10.1038/s41590-018-0107-1.
- Siednienko, Jakub, Annett Halle, Kamalpreet Nagpal, Douglas T. Golenbock, and Sinéad M. Miggin. 2010. “TLR3-Mediated IFN- β Gene Induction Is Negatively Regulated by the TLR Adaptor MyD88 Adaptor-Like.” *European Journal of Immunology* 40 (11): 3150–60. doi:10.1002/eji.201040547.
- Siednienko, Jakub, Ashwini Maratha, Shuo Yang, Malgorzata Mitkiewicz, Sinéad M. Miggin, and Paul N. Moynagh. 2011. “Nuclear Factor KB Subunits RelB and cRel Negatively Regulate Toll-like Receptor 3-Mediated β -Interferon Production via Induction of Transcriptional Repressor Protein YY1.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (52): 44750–63. doi:10.1074/jbc.M111.250894.
- Siomek, Agnieszka. 2012. “NF-KB Signaling Pathway and Free Radical Impact.” *Acta Biochim Pol* 59 (3): 323–31.
- Song, Wen Yuan, Guo Liang Wang, Li Li Chen, Han Suk Kim, Li Ya Pi, Tom Holsten, J. Gardner, et al. 1995. “A Receptor Kinase-like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21.” *Science* 270 (5243): 1804. doi:10.1126/science.270.5243.1804.
- Sorrentino, Alessandro, Noopur Thakur, Susanne Grimsby, Anders Marcusson, Verena Von Bulow, Norbert Schuster, Shouting Zhang, Carl Henrik Heldin, and Maréne Landström. 2008. “The Type I TGF- β Receptor Engages TRAF6 to Activate TAK1 in a Receptor Kinase-Independent Manner.” *Nature Cell Biology* 10 (10): 1199–1207. doi:10.1038/ncb1780.
- Stack, Julianne, Ismar R. Haga, Martina Schröder, Nathan W. Bartlett, Geraldine Maloney, Patrick C. Reading, Katherine A. Fitzgerald, Geoffrey L. Smith, and Andrew G. Bowie. 2005. “Vaccinia Virus Protein A46R Targets Multiple Toll-like–Interleukin-1 Receptor Adaptors and Contributes to Virulence.” *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6): 1007–18. doi:10.1084/jem.20041442.
- Stanford, E. A., A. Ramirez-Cardenas, Z. Wang, O. Novikov, K. Alamoud, P. Koutrakis, J. P. Mizgerd, et al. 2016. “Role for the Aryl Hydrocarbon Receptor and Diverse Ligands in

- Oral Squamous Cell Carcinoma Migration and Tumorigenesis.” *Molecular Cancer Research* 14 (8): 696–706. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0069.
- Stockinger, Brigitta, Paola Di Meglio, Manolis Gialitakis, and João H. Duarte. 2014. “The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System.” *Annual Review of Immunology* 32 (1): 403–32. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
- Strodtzoff, Daniela, Zuheng Ma, Tina Wirström, Rona J. Strawbridge, Daniel F.J. Ketelhuth, David Engel, Robert Clarke, et al. 2015. “Toll-like Receptor 3 Influences Glucose Homeostasis and β -Cell Insulin Secretion.” *Diabetes* 64 (10): 3425–38. doi:10.2337/db14-0838.
- Su, Xiaoqin, Su Li, Min Meng, Wanqiang Qian, Wei Xie, Danying Chen, Zhonghe Zhai, and Hong Bing Shu. 2006. “TNF Receptor-Associated Factor-1 (TRAF1) Negatively Regulates Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- γ (TRIF)-Mediated Signaling.” *European Journal of Immunology* 36 (1): 199–206. doi:10.1002/eji.200535415.
- Tabeta, Koichi, Philippe Georgel, Edith Janssen, Xin Du, Kasper Hoebe, Karine Crozat, Suzanne Mudd, et al. 2004. “Toll-like Receptors 9 and 3 as Essential Components of Innate Immune Defense against Mouse Cytomegalovirus Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Tabeta, Koichi, Kasper Hoebe, Edith M. Janssen, Xin Du, Philippe Georgel, Karine Crozat, Suzanne Mudd, et al. 2006. “The Unc93b1 Mutation 3d Disrupts Exogenous Antigen Presentation and Signaling via Toll-like Receptors 3, 7 and 9.” *Nature Immunology* 7 (2): 156–64. doi:10.1038/ni1297.
- Takahashi, K., T. Kawai, H. Kumar, S. Sato, S. Yonehara, and S. Akira. 2006. “Cutting Edge: Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA.” *The Journal of Immunology* 176 (8): 4520–24. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4520.
- Takaoka, Akinori, Hideyuki Yanai, Seiji Kondo, Gordon Duncan, Hideo Negishi, Tatsuki Mizutani, Shin Ichi Kano, et al. 2005. “Integral Role of IRF-5 in the Gene Induction Programme Activated by Toll-like Receptors.” *Nature* 434 (7030): 243–49. doi:10.1038/nature03308.
- Takeda, Yohei, Keisuke Kataoka, Junya Yamagishi, Seishi Ogawa, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto. 2017. “A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy.” *Cell Reports* 19 (9): 1874–87. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.015.
- Takeshita, Fumihiko, Ken J. Ishii, Kouji Kobiyama, Yoshitsugu Kojima, Cevayir Coban, Shin

- Sasaki, Norihisa Ishii, et al. 2005. "TRAF4 Acts as a Silencer in TLR-Mediated Signaling through the Association with TRAF6 and TRIF." *European Journal of Immunology* 35 (8): 2477–85. doi:10.1002/eji.200526151.
- Tatematsu, Megumi, Kenji Funami, Noriko Ishii, Tsukasa Seya, Chikashi Obuse, and Misako Matsumoto. 2015. "LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1." *The Journal of Immunology* 195 (10): 4933–42. doi:10.4049/jimmunol.1501305.
- Tian, Yanan, Sui Ke, Michael S. Denison, Arnold B. Rabson, and Michael A. Gallo. 1999. "Ah Receptor and NF-KB Interactions, a Potential Mechanism for Dioxin Toxicity." *Journal of Biological Chemistry* 274 (1): 510–15. doi:10.1074/jbc.274.1.510.
- Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, et al. 2013. "Cleaved/Associated TLR3 Represents the Primary Form of the Signaling Receptor." *The Journal of Immunology* 190 (2): 764–73. doi:10.4049/jimmunol.1202173.
- Touil, T., D. Fitzgerald, G.-X. Zhang, A. Rostami, and B. Gran. 2006. "Cutting Edge: TLR3 Stimulation Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing Endogenous IFN- β ." *The Journal of Immunology* 177 (11): 7505–9. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7505.
- Trapp, S., N. R. Derby, R. Singer, A. Shaw, V. G. Williams, S. G. Turville, J. W. Bess, J. D. Lifson, and M. Robbiani. 2009. "Double-Stranded RNA Analog Poly(I:C) Inhibits Human Immunodeficiency Virus Amplification in Dendritic Cells via Type I Interferon-Mediated Activation of APOBEC3G." *Journal of Virology* 83 (2): 884–95. doi:10.1128/JVI.00023-08.
- Tsai, Su-Yu, Jesus A. Segovia, Te-Hung Chang, Niraj K. Shil, Swechha M. Pokharel, T. R. Kannan, Joel B. Baseman, et al. 2015. "Regulation of TLR3 Activation by S100A9." *The Journal of Immunology* 195 (9): 4426–37. doi:10.4049/jimmunol.1500378.
- Tsai, Yi Ting, Sui Yuan Chang, Chun Nan Lee, and Chuan Liang Kao. 2009. "Human TLR3 Recognizes Dengue Virus and Modulates Viral Replication in Vitro." *Cellular Microbiology* 11 (4): 604–15. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01277.x.
- Tumeh, Paul C., Christina L. Harview, Jennifer H. Yearley, I. Peter Shintaku, Emma J.M. Taylor, Lidia Robert, Bartosz Chmielowski, et al. 2014. "PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance." *Nature* 515 (7528): 568–71. doi:10.1038/nature13954.
- Uematsu, Satoshi, Shintaro Sato, Masahiro Yamamoto, Tomonori Hirotani, Hiroki Kato, Fumihiko Takeshita, Michiyuki Matsuda, et al. 2005. "Interleukin-1 Receptor-Associated

- Kinase-1 Plays an Essential Role for Toll-like Receptor (TLR)7- and TLR9-Mediated Interferon- α Induction.” *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6): 915–23. doi:10.1084/jem.20042372.
- Ulevitch, Richard J. 2004. “Therapeutics Targeting the Innate Immune System.” *Nature Reviews Immunology* 4 (7): 512–20. doi:10.1038/nri1396.
- Uyttenhove, Catherine, Luc Pilotte, Ivan Théate, Vincent Stroobant, Didier Colau, Nicolas Parmentier, Thierry Boon, and Benoît J. Van den Eynde. 2003. “Evidence for a Tumoral Immune Resistance Mechanism Based on Tryptophan Degradation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase.” *Nature Medicine* 9 (10): 1269–74. doi:10.1038/nm934.
- Veldhoen, Marc, Keiji Hirota, Jillian Christensen, Anne O’Garra, and Brigitta Stockinger. 2009. “Natural Agonists for Aryl Hydrocarbon Receptor in Culture Medium Are Essential for Optimal Differentiation of Th17 T Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 43–49. doi:10.1084/jem.20081438.
- Verstak, B., C. J. Arnot, and N. J. Gay. 2013. “An Alanine-to-Proline Mutation in the BB-Loop of TLR3 Toll/IL-1R Domain Switches Signalling Adaptor Specificity from TRIF to MyD88.” *The Journal of Immunology* 191 (12): 6101–9. doi:10.4049/jimmunol.1300849.
- Vijay-Kumar, Matam, Huixia Wu, Jesse Aitken, Vasantha L. Kolachala, Andrews Neish, Shanthi V. Sitaraman, and Andrew T. Gewirtz. 2007. “Activation of Toll-like Receptor 3 Protects against DSS-Induced Acute Colitis.” *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (7): 856–64. doi:10.1002/ibd.20142.
- Villa, Matteo, Manolis Gialitakis, Mauro Tolaini, Helena Ahlfors, Colin J Henderson, C Roland Wolf, Robert Brink, and Brigitta Stockinger. 2017. “Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Optimal B-cell Proliferation.” *The EMBO Journal* 36 (1): 116–28. doi:10.15252/emj.201695027.
- Vogel, Christoph F. A., Eric Sciallo, Wen Li, Pat Wong, Gwendal Lazennec, and Fumio Matsumura. 2007. “RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription.” *Molecular Endocrinology* 21 (12). Oxford University Press: 2941–55. doi:10.1210/me.2007-0211.
- Vogel, Christoph F.A., Dalei Wu, Samuel R. Goth, Jaeun Baek, Anna Lollies, Rowena Domhardt, Annemarie Grindel, and Isaac N. Pessah. 2013. “Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Regulates NF-KB RelB Activation during Dendritic-Cell Differentiation.” *Immunology and Cell Biology* 91 (9). Nature Publishing Group: 568–75. doi:10.1038/icb.2013.43.
- Vogel, Christoph F A, Elaine M. Khan, Patrick S C Leung, M. Eric Gershwin, W. L William

- Chang, Dalei Wu, Thomas Haarmann-Stemmann, Alexander Hoffmann, and Michael S. Denison. 2014. "Cross-Talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response: A Role for Nuclear Factor-KB." *Journal of Biological Chemistry* 289 (3): 1866–75. doi:10.1074/jbc.M113.505578.
- Vogel, Christoph F A, Eric Sciullo, and Fumio Matsumura. 2007. "Involvement of RelB in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of Chemokines." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363 (3): 722–26. doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.032.
- Vorderstrasse, Beth A., Andrea A. Bohn, and B. Paige Lawrence. 2003. "Examining the Relationship between Impaired Host Resistance and Altered Immune Function in Mice Treated with TCDD." *Toxicology* 188 (1): 15–28. doi:10.1016/S0300-483X(02)00749-7.
- Vorderstrasse, Beth A, and B Paige Lawrence. 2006. "Protection against Lethal Challenge with *Streptococcus Pneumoniae* Is Conferred by Aryl Hydrocarbon Receptor Activation but Is Not Associated with an Enhanced Inflammatory Response" 74 (10): 5679–86. doi:10.1128/IAI.00837-06.
- Walsh, Matthew C., Gregory K. Kim, Paul L. Maurizio, Elizabeth E. Molnar, and Yongwon Choi. 2008. "TRAF6 Autoubiquitination-Independent Activation of the NFκB and MAPK Pathways in Response to IL-1 and RANKL." *PLoS ONE* 3 (12). doi:10.1371/journal.pone.0004064.
- Wang, Ce, Yan Zhuang, Yijuan Zhang, Zichao Luo, Ningning Gao, Ping Li, Hong Pan, Lintao Cai, and Yifan Ma. 2012. "Toll-like Receptor 3 Agonist Complexed with Cationic Liposome Augments Vaccine-Elicited Antitumor Immunity by Enhancing TLR3-IRF3 Signaling and Type I Interferons in Dendritic Cells." *Vaccine* 30 (32): 4790–99. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.027.
- Wang, Chen, Li Deng, Mei Hong, Giridhar R. Akkaraju, Jun Ichiro Inoue, and Zhijian J. Chen. 2001. "TAK1 Is a Ubiquitin-Dependent Kinase of MKK and IKK." *Nature* 412 (6844): 346–51. doi:10.1038/35085597.
- Wang, Hao, Yunbo Wei, and Di Yu. 2015. "Control of Lymphocyte Homeostasis and Effector Function by the Aryl Hydrocarbon Receptor." *International Immunopharmacology* 28 (2): 818–24. doi:10.1016/j.intimp.2015.03.046.
- Wang, K., Y. Li, Y.-Z. Jiang, C.-F. Dai, M.S. Patankar, J.-S. Song, and J. Zheng. 2013. "An Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Inhibits Proliferation and Migration of Human Ovarian Cancer Cells." *Cancer Letters* 340 (1). doi:10.1016/j.canlet.2013.06.026.
- Wang, N., Y. Liang, S. Devaraj, J. Wang, S. M. Lemon, and K. Li. 2009. "Toll-Like Receptor 3 Mediates Establishment of an Antiviral State against Hepatitis C Virus in Hepatoma

- Cells.” *Journal of Virology* 83 (19): 9824–34. doi:10.1128/JVI.01125-09.
- Wang, Tian, Terrence Town, Lena Alexopoulou, John F. Anderson, Erol Fikrig, and Richard A. Flavell. 2004. “Toll-like Receptor 3 Mediates West Nile Virus Entry into the Brain Causing Lethal Encephalitis.” *Nature Medicine* 10 (12): 1366–73. doi:10.1038/nm1140.
- Wang, Tim, Kivanç Birsoy, Nicholas W. Hughes, Kevin M. Krupczak, Yorick Post, Jenny J. Wei, Eric S. Lander, and David M. Sabatini. 2015. “Identification and Characterization of Essential Genes in the Human Genome.” *Science* 350 (6264): 1096–1101. doi:10.1126/science.aac7041.
- Wang, Tim, Jenny J. Wei, David M. Sabatini, and Eric S. Lander. 2014. “Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System.” *Science (New York)* 343 (6166): 80–84. doi:10.1126/science.1246981.
- Wang, Xiuling, Zhongchun Liu, Peigang Wang, Shan Li, Jie Zeng, Xiaoning Tu, Qiujin Yan, Zheman Xiao, Mengxian Pan, and Fan Zhu. 2018. “Syncytin-1, an Endogenous Retroviral Protein, Triggers the Activation of CRP via TLR3 Signal Cascade in Glial Cells.” *Brain, Behavior, and Immunity* 67: 324–34. doi:10.1016/j.bbi.2017.09.009.
- Wang, Yan, Lin Liu, David R. Davies, and David M. Segal. 2010. “Dimerization of Toll-like Receptor 3 (TLR3) Is Required for Ligand Binding.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (47): 36836–41. doi:10.1074/jbc.M110.167973.
- Wartz, Ingrid E., Karen M. O’Rourke, Honglin Zhou, Michael Eby, L. Aravind, Somasekar Seshagiri, Ping Wu, et al. 2004. “De-Ubiquitination and Ubiquitin Ligase Domains of A20 Downregulate NF-KB Signalling.” *Nature* 430 (7000): 694–99. doi:10.1038/nature02794.
- Westphal, Andreas, Weijia Cheng, Jinbo Yu, Guntram Grassl, Martina Krautkrämer, Otto Holst, Niko Föger, and Kyeong-Hee Lee. 2017. “Lysosomal Trafficking Regulator Lyst Links Membrane Trafficking to Toll-like Receptor–Mediated Inflammatory Responses.” *The Journal of Experimental Medicine* 214 (1): 227–44. doi:10.1084/jem.20141461.
- Whitmarsh, A. J., and R. J. Davis. 1996. “Transcription Factor AP-1 Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways.” *Journal of Molecular Medicine* 74 (10): 589–607. doi:10.1007/s001090050063.
- Wilson, Shelly R, Aditya D Joshi, and Cornelis J Elferink. 2013. “The Tumor Suppressor Kruppel-Like Factor 6 Is a Novel Aryl Hydrocarbon Receptor DNA Binding Partner.” *J Pharmacol Exp Ther* 345 (3): 419–29. doi:10.1124/jpet.113.203786.
- Wörnle, Markus, Holger Schmid, Bernhard Banas, Monika Merkle, Anna Henger, Maximilian Roeder, Simone Blattner, et al. 2006. “Novel Role of Toll-like Receptor 3 in Hepatitis C-Associated Glomerulonephritis.” *American Journal of Pathology* 168 (2): 370–85.

doi:10.2353/ajpath.2006.050491.

- Wu, Bin, and Sun Hur. 2015. “How RIG-I like Receptors Activate MAVS.” *Current Opinion in Virology* 12: 91–98. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.004.
- Xu, Yingwu, Xiao Tao, Baohe Shen, Tiffany Horng, Ruslan Medzhitov, James L. Manley, and Liang Tong. 2000. “Structural Basis for Signal Transduction by the Toll/Interleukin-1 Receptor Domains.” *Nature* 408 (6808): 111–15. doi:10.1038/35040600.
- Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Hideki Sanjo, Osamu Takeuchi, et al. 2003. “Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway.” *Science* 301 (5633). American Association for the Advancement of Science: 640–43. doi:10.1126/science.1087262.
- Yamashita, Michifumi, Saurabh Chattopadhyay, Volker Fensterl, Paramananda Saikia, Jaime L. Wetzel, and Ganes C. Sen. 2012. “Epidermal Growth Factor Receptor Is Essential for Toll-like Receptor 3 Signaling.” *Science Signaling* 5 (233): ra50-ra50. doi:10.1126/scisignal.2002581.
- Yamashita, Motozo, Karoly Fatyol, Chaoyang Jin, Xiangchun Wang, Zhenggang Liu, and Ying E. Zhang. 2008. “TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and P38 by TGF- β .” *Molecular Cell* 31 (6): 918–24. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.002.
- Yang, Yan, Su-Yun Wang, Zhe-Fu Huang, Hong-Mei Zou, Bing-Ru Yan, Wei-Wei Luo, and Yan-Yi Wang. 2016. “The RNA-Binding Protein Mex3B Is a Coreceptor of Toll-like Receptor 3 in Innate Antiviral Response.” *Cell Research* 26 (3). Nature Publishing Group: 288–303. doi:10.1038/cr.2016.16.
- Yelamanchi, Soujanya D., Hitendra Singh Solanki, Aneesha Radhakrishnan, Lavanya Balakrishnan, Jayshree Advani, Remya Raja, Nandini A. Sahasrabuddhe, et al. 2016. “Constitutive Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Constrains Type I Interferon-Mediated Antiviral Innate Defense.” *Nature Immunology* 16 (1): 1–10. doi:10.1038/ni.3422.
- Yoneyama, Mitsutoshi, and Takashi Fujita. 2007. “Function of RIG-I-like Receptors in Antiviral Innate Immunity.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15315–18. doi:10.1074/jbc.R700007200.
- Yu, Philipp, Wolger Lübben, Heike Slomka, Janine Gebler, Madlen Konert, Chengcong Cai, Luisa Neubrandt, et al. 2012. “Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors Are Essential for the Control of Endogenous Retrovirus Viremia and ERV-Induced Tumors.” *Immunity* 37 (5): 867–79. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.018.
- Zelante, Teresa, Rossana G. Iannitti, Cristina Cunha, Antonella DeLuca, Gloria Giovannini,

- Giuseppe Pieraccini, Riccardo Zecchi, et al. 2013. "Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22." *Immunity* 39 (2). Elsevier Inc.: 372–85. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003.
- Zelensky, Alex N., and Jill E. Gready. 2005. "The C-Type Lectin-like Domain Superfamily." *FEBS Journal* 272 (24): 6179–6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x.
- Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. 2002. "Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression." *Free Radical Biology and Medicine* 33 (3): 337–49. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X.
- Zhang, Hui, Krista Nichols, Gary H. Thorgaard, and Sandra S. Ristow. 2001. "Identification, Mapping, and Genomic Structural Analysis of an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif-Bearing C-Type Lectin from Homozygous Clones of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)." *Immunogenetics* 53 (9): 751–59. doi:10.1007/s00251-001-0394-8.
- Zhang, Jiaren, Shikai Liu, K. V. Rajendran, Luyang Sun, Yu Zhang, Fanyue Sun, Huseyin Kucuktas, Hong Liu, and Zhanjiang Liu. 2013. "Pathogen Recognition Receptors in Channel Catfish: III Phylogeny and Expression Analysis of Toll-like Receptors." *Developmental and Comparative Immunology* 40 (2): 185–94. doi:10.1016/j.dci.2013.01.009.
- Zhang, Qian, Michael J. Lenardo, and David Baltimore. 2017. "30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology." *Cell* 168 (1–2): 37–57. doi:10.1016/j.cell.2016.12.012.
- Zhang, Shen Ying, Melina Herman, Michael J. Ciancanelli, Rebeca Pérez de Diego, Vanessa Sancho-Shimizu, Laurent Abel, and Jean Laurent Casanova. 2013. "TLR3 Immunity to Infection in Mice and Humans." *Current Opinion in Immunology* 25 (1): 19–33. doi:10.1016/j.coi.2012.11.001.
- Zhang, Shen Ying, Emmanuelle Jouanguy, Sophie Ugolini, Asma Smahi, Gaëlle Elain, Pedro Romero, David Segal, et al. 2007. "TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis." *Science* 317 (5844): 1522–27. doi:10.1126/science.1139522.
- Zhang, Shu, Chunhua Qin, and Stephen H. Safe. 2003. "Flavonoids as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists: Effects of Structure and Cell Context." *Environmental Health Perspectives* 111 (16): 1877–82. doi:10.1289/ehp.6322.
- Zhang, Yong Liang, and Chen Dong. 2005. "MAP Kinases in the Immune Responses." *Cell*

Mol Immunol 2 (1): 20–27.

Zhu, Jian Hong, and Xin Gen Lei. 2011. “Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Oxidative Injury Is Not Potentiated by Knockout of GPX1 and SOD1 in Mice.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 (1): 559–63. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.025.

10 Table des Figures

Figure 1 : Les différentes familles de PAMP et leur origine.	3
Figure 2 : Les quatre familles classiques de PRR.	5
Figure 3 : Les détecteurs cytosoliques d’ADN et leurs voies de signalisation.	10
Figure 4 : Structure du complexe TLR3:ARNdb.	14
Figure 5 : Arrangements du complexe constitué de deux TLR3 murin et d’un ARNdb... ..	15
Figure 6 : Voie de signalisation de TLR3.	26
Figure 7 : Voies de signalisation canonique et alternative de NF-κB.	31
Figure 8 : Voie de signalisation canonique d’AhR.	50
Figure 9 : Ligands d’AhR et leur source.	52
Figure 10 : Voies de signalisation canonique et alternatives d’AhR.	54
Fig. 11. Outline of the genome-wide CRISPR/Cas9 forward genetic screen to identify genes required for TLR3 signaling.	84
Fig. 12. Results of the genetic screen.	86
Fig. 13. DLX1, SOD1, and AhR are required for a proper TLR3 response.	88
Fig. 14. Cells edited for AhR exhibit a decreased IL-8 and an increased IP-10 response to poly(I:C)	90
Fig. 15. AhR agonist and antagonist affect IP-10 and IL-8 response to poly(I:C)	91
Fig. 16. Primary myeloid cells response to poly(I:C) is affected by AhR agonist and antagonist.	92

11 Table des Tableaux

Tableau 1 : Liste des TLR humains.	7
Tableau 2 : Rôle de TLR3 dans les infections virales.	40
Tableau 3 : sgRNA used in the study.	96

HIV-2-infected macrophages produce and accumulate poorly infectious viral particles resulting in impaired transmission

Ester Gea-Mallorquí¹, Nicolas Ruffin¹, Laurent Zablocki¹, Mathieu Maurin¹, Mabel San-Roman² and Philippe Benaroch^{1*}

1- Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris, France

2- Institut Curie, PSL Research University, UMR3216, Paris, France

**Correspondance: Philippe Benaroch - philippe.benaroch@curie.fr*

Keywords: macrophages, HIV-2, viral assembly, virus-containing compartment, restriction factors, BST-2, HIV transmission to T cells.

Abstract

Macrophages are an important cellular target of HIV-1, along with CD4⁺ T cells. Recent reports concerning their role in HIV-1 infection have stimulated interest in their potential involvement in viral spreading and constitution of the viral reservoir. HIV-2-infected patients exhibit natural virological control that is generally absent from HIV-1-infected patients. Here, we studied the relationship between macrophages and HIV-2 to approach their potential contribution to the physiopathology of HIV-2 infection, focusing on post-entry steps.

HIV-2-infected monocyte-derived macrophages (MDMs) produced a substantial amount of viral particles that remained mostly intracellular. New viruses were assembled at the limiting membrane of internal compartments similar to those previously documented in HIV-1-infected MDMs, called virus-containing compartments (VCCs). VCCs from MDMs infected with either virus shared protein composition, as seen by confocal microscopy, and morphology, as seen by electron microscopy. Strikingly, HIV-2 Gag was mostly absent from the cytosol and almost exclusively localized to the VCCs, whereas HIV-1 Gag was distributed in both locations, suggesting that HIV-2 Gag is rapidly transported to the VCC membranes once synthesized in the cytosol. Ultrastructural analyses of HIV-2-infected MDMs revealed the presence of numerous VCCs, containing immature and mature particles in the lumen. HIV-2 particles produced *de novo* by MDMs can mature, but they are poorly infectious and inefficiently transferred to activated T cells. This low infectivity did not correlate with expression of the restriction factor BST-2 and was not improved by Vpu-induced down-modulation of BST-2 levels.

Our data suggest that, HIV-2-infected macrophages are unlikely to contribute to viral production and dissemination *in vivo*. However, HIV-2-infected macrophages may accumulate large amounts of intracellular virus that represent a potential source of viral antigens directly presented by macrophages or other antigen presenting cells to stimulate virus specific T cell responses.

Introduction

Macrophages are key players of the innate immune system and can rapidly respond to many pathogens. In HIV-1 infections, macrophages are also targets in which the virus replicates and accumulates. The HIV-1 replication cycle is not cytopathic for macrophages, which can live for long periods of time when infected (Igarashi et al., 2001; Perelson et al., 1996; Swingler et al., 2007). HIV-1- infected macrophages have been found in many tissues (Cribbs et al., 2015; Gyorkey et al., 1985; Jarry et al., 1990; Koenig et al., 1986; Pomerantz et al., 1988) and their contribution to the constitution of a viral reservoir in infected patients has recently received support from several studies performed in macaques and humanized mice (Araínga et al., 2017; Honeycutt et al., 2017; 2016). Tissue macrophages are involved in the physiopathology of the infection at various levels, including in the brain, with the development of HIV-1-associated neurological disorders (Bissel and Wiley, 2004; Cunningham et al., 1997; Koppensteiner et al., 2012). The persistent inflammation observed in HIV-1- infected patients also appears to involve macrophages (Clayton et al., 2017; Deeks et al., 2013; Koppensteiner et al., 2012). A large body of work has characterized the HIV-1 cycle in macrophages (see Rodrigues *et al. in press*)*, the impact of the infection on macrophage function (Ludlow et al., 2012; Mazzolini et al., 2010; Vérollet et al., 2014), and the sensing mechanisms involved (Chattergoon et al., 2014; Decalf et al., 2017; Nasr et al., 2017), but the precise roles of these highly versatile cells during HIV-1 infection are still mostly unknown. In contrast to HIV-1, very few studies have evaluated the relationship of macrophages with HIV-2 infection.

HIV-2 is the second causative agent for AIDS and leads to an immunodeficiency syndrome practically identical to that of HIV-1, once CD4⁺ T cell counts drop. Both viruses share comparable genetic organization, structural architecture, and virological features. Despite this close relationship, however, the clinical progression of HIV-2 to AIDS is much slower (Marlink et al., 1994; Nyamweya et al., 2013) than that of HIV-1 and may reflect better immune control of the infection. Ninety-five percent of untreated HIV-1-infected patients develop AIDS, whereas this proportion drops to 14-5% for HIV-2 (Andersson et al., 2000; Martinez-Steele et al., 2007).

It is not yet understood how the better control of infection by HIV-2 is induced and maintained. Moreover, specific features of the HIV-2 replication cycle may also contribute to the differences observed in the physiopathology. The proviral loads, i.e. the number of copies of HIV DNA integrated into circulating CD4⁺ T cells, in infected patients are similar

* Vasco Rodrigues, Nicolas Ruffin, Mabel San-Roman and Philippe Benaroch. Myeloid cell interaction with HIV: a complex relationship. *Frontiers in Immunology*.

for the two viruses (Gueudin et al., 2008; Rowland-Jones and Whittle, 2007). However, the number of free circulating viral particles, estimated as the circulating viral load in plasma, is substantially lower, and usually undetectable, in HIV-2-infected individuals (Damond et al., 2002; Popper et al., 2000), in sharp contrast to those infected with HIV-1. Such low levels of circulating virus have been associated with a lower rate of vertical and horizontal transmission than that of HIV-1 (Nyamweya et al., 2013). Although viral loads are frequently low or undetectable, ongoing viral replication still occurs in HIV-2-infected patients (Fernandes et al., 2014; Soares et al., 2011). HIV-2 infection is characterized by stronger polyfunctional T cell responses (Duvall et al., 2008) and more robust humoral antibody production than HIV-1 infection (Kong et al., 2012; Makvandi-Nejad and Rowland-Jones, 2015). It is still unclear whether the specific host immune response contributes to the low viral loads observed in HIV-2 infections.

One of the important specific features of HIV-2 particles is that they contain Vpx, an accessory protein that is absent from HIV-1, which efficiently counteracts the restriction factor SAMHD1 by promoting its rapid degradation (Hrecka et al., 2011). SAMHD1 is a cytosolic enzyme, active in resting T cells and dendritic cells (DCs), that depletes the stock of cytosolic dNTPs via its deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase activity, thus blocking reverse transcription (RT) of lentiviruses (Hrecka et al., 2011; Lahouassa et al., 2012; Sunseri et al., 2011). The activity of SAMHD1 appears to be very low in activated CD4⁺ T cells (Descours et al., 2012; Ruffin et al., 2015), intermediate in macrophages, and high in DCs (Cribier et al., 2013). DCs are a heterogeneous population of myeloid cells (See et al., 2017; Villani et al., 2017) that are pivotal for launching anti-viral immune responses. A recent study performed with freshly purified DCs from human blood established their differential susceptibility to several viruses, including HIV-2 (Silvin et al., 2017). Among conventional DCs, freshly purified cDC1s (often called CD141⁺DCs) possess innate resistance to HIV-2 infection, despite the presence of Vpx (Silvin et al., 2017). In contrast, cDC2s (often called CD1c⁺) are susceptible to HIV-2 and produce viruses, but do not survive. Dying infected cDC2s have been proposed to be a source of viral antigens that are cross-presented by cDC1s to launch anti-viral T-cell responses (Silvin et al., 2017). Monocyte-derived DCs (MDDCs) are a widely-used model of in vitro derived DCs often claimed to correspond to inflammatory DCs (Helft et al., 2016). MDDCs appear to be resistant to HIV-2 strains, including primary isolates (Chaveau et al., 2015; Duvall et al., 2007). This resistance occurs at the entry step, as in cDC1s, in which the HIV-2 Envelope glycoproteins promote fusion in T cells, but not in MDDCs (Chaveau et al., 2015; Duvall et

al., 2007). Viral entry can be facilitated, however, by using HIV-2 pseudotyped with another envelope protein, such as VSV-G. Similarly, macrophage susceptibility to HIV-2 appears to result from the combination of weakly effective envelope glycoproteins and efficient RT, due to the presence of Vpx. Primary isolates of HIV-1 and HIV-2 have been shown to have different replication kinetics in MDMs (Marchant et al., 2006). HIV-2 is secreted, with an initial burst at day 2 post-infection (p.i.), which decreases thereafter. In contrast, HIV-1 is produced at a low, but constant, rate over 21 days. A recent study (Hollenbaugh et al., 2016) compared the replication kinetics of HIV-2 GL-AN to three HIV-1 strains in MDMs using particles carrying their own Env and VSV-G to bypass potential restriction at the entry step (Bhattacharya et al., 2004). HIV production by HIV-2 GL-AN, measured as the RT activity detected in the supernatants, was more rapid than and superior to that of the HIV-1 strains tested (Hollenbaugh et al., 2016).

Overall, there is very little knowledge concerning the HIV-2 cycle in macrophages, which is yet to be precisely characterized. Aside from the entry step, which relies on the highly variable Env glycoprotein, differences between the rest of the HIV-1 and HIV-2 genomes may lead to differences in the viral cycle in primary macrophages. We thus used HIV-1 and -2 viruses pseudotyped with VSV-G to normalize the entry step. Here, we showed that HIV-2-infected macrophages efficiently produced new viral particles in apparently intracellular compartments. However, they tended to remain associated with the MDMs, to be poorly infectious, and consequently poorly transmitted to T cells. HIV-2- infected MDMs may thus only weakly contribute to the spread of the infection. However, they may provide a source of cell-associated viral antigens that could potentially stimulate the adaptive anti-viral immune response.

Results

HIV-2 infection and production in primary macrophages

We used HIV-1 and -2 viruses encoding GFP in place of Nef to quantify rates of infection in MDMs independently of antibodies with differential affinity for HIV-1 and -2 proteins. VSV-G pseudotyped HIV-1 NL4.3GFP and HIV-2

ROD9GFP (referred to as HIV-1 X4GFP-G and HIV-2 X4GFP-G, respectively) were produced in HEK 293 T cells by transfection and titrated on GHOST reporter cells for use at similar MOIs on MDMs. Infection rates were consistently lower for HIV-1 than HIV-2 (Fig 1A and B). This likely resulted from the presence of Vpx in HIV-2 particles, which counteracts

SAMHD1 activity. Indeed, the rate of MDM infection by HIV-1 increased roughly ten-fold when the virus was complemented with Vpx, as previously shown (Hrecka et al., 2011; Sunseri et al., 2011) (Fig. 1B). We next compared HIV production by infected MDMs from seven donors, with infection rates from 5 to 40% (Fig 1C), by quantification of genomic viral RNA present in the supernatant (Fig 1D). The amount of released viral RNA was lower for HIV-2-infected MDMs, despite higher levels of infection.

Viral particles of HIV-2-infected MDMs accumulate intracellularly, rather than being released.

Thus, MDMs exposed to HIV-2 X4GFP-G exhibited higher rates of infection but released fewer new virions than those infected with HIV-1 X4GFP-G, suggesting intracellular accumulation in HIV-2 infected cells. We tested this possibility by infecting MDMs with HIV-1 X4GFP-G or HIV-2 X4GFP-G at three different MOIs and washing at eight hours p.i. (Fig 2A). Their supernatants were collected after three days of culture and the cells lysed to measure their intracellular viral content. Quantification of genomic HIV RNA copies confirmed that viral release by HIV-2-infected MDMs was very low (Fig 2B), despite good infection rates, and revealed that intracellular viral content was higher than in HIV-1-infected MDMs (Fig 2C). Thus, HIV-2-infected MDMs produced high amounts of viral particles which were retained intracellularly, rather than being released. These results are preliminary and must be extended to more donors to be conclusive.

HIV-2 accumulates in HIV-1-like VCCs

We next analyzed the intracellular distribution of viral Gag protein in HIV- infected MDMs by immunofluorescence. We extended our analyses to two R5 viruses: HIV-1 R5 (AD8) and HIV-2 R5 (JK), both VSG-pseudotyped. Confocal microscopy analysis (Fig 3A) revealed the presence of punctate patterns of Gag co-localizing with CD44 (see quantification in Fig 3B) and CD9 in MDMs infected with HIV-1 or -2. These Gag-containing structures were free of Lamp 1, but contained CD36 and CD81 (Fig S1). Therefore, Gag concentrated into CD44+CD9+CD36+CD81+Lamp1- compartments in MDMs infected by any of the four HIV strains used. Such composition is typical of VCCs previously described in HIV-1-infected MDMs (Berre et al., 2013; Deneka et al., 2007; Jouve et al., 2007; Pelchen-Matthews et al., 2003), suggesting that, like HIV-1, HIV-2 hijacks these intracellular compartments for their assembly.

Gag is almost absent from the cytosol, but concentrated in VCCs in HIV-2 infected macrophages

Gag staining in HIV-2-infected MDMs appeared to be almost exclusively concentrated in punctate structures and absent from the cytosol (Fig 3A). This was true for both WT R5 and WT X4 HIV-2 (Fig 3A). We confirmed this observation by quantifying cytosolic Gag in infected MDMs on confocal sections. In contrast, HIV-1 Gag not only accumulated in compartments, but was also remarkably present in the cytosol (Fig 3C). These differences in Gag distribution were observed at day 3 p.i. (Fig 3 and S1) and persisted to day 7 p.i. (Fig S2).

We infected MDMs with HIV strains internally tagged with GFP to rule out that the differential distribution of HIV-1 and HIV-2 Gag was due to differential affinity of the H183-H12-5C mAb used for the cytosolic Gag forms. The GFP was inserted between the matrix and capsid within the p55 Gag precursor between two protease sites ((Hübner et al., 2007) and materials and methods). The GFP signal and Gag staining were co-distributed in HIV-1*i*GFP- and HIV-2**i*GFP- infected MDMs, thus confirming the differential distribution of Gag (Fig S3). We generated z stacks of confocal planes of infected MDMs to better quantify the differences in Gag localization (see z projections in Fig 4A). Analysis of the Gag signal distribution, shown in pseudocolors to visualize very low levels, confirmed that Gag was mostly absent from the cytosol in HIV-2-infected macrophages and concentrated in VCCs (Fig 4A, bottom row). This conclusion was further supported by quantification of the Gag signal performed on 3D reconstitutions of the HIV-infected MDMs (Fig 4B). Of note, the addition of Vpx to HIV-1X4 increased the infection rate of MDMs, as expected (Hrecka et al., 2011; Lahouassa et al., 2012; Sunseri et al., 2011), but did not modify Gag distribution (Figure S4). Altogether, these data suggest that HIV-2 Gag was more efficiently recruited to VCCs after synthesis in the cytosol.

Ultrastructural analysis of VCCs from HIV-2-infected macrophages

We analyzed epon sections of HIV-2-infected macrophages by electron microscopy to further characterize their VCCs (Fig 5). VCCs from MDMs infected with HIV-1 R5 or HIV-2 X4 or R5 exhibited highly similar morphologies. In all cases, we observed viral budding profiles at the VCC limiting membranes (see arrowheads), revealing the production of new virions. Moreover, the VCCs contained mature and immature viral particles in their lumen. The presence of mature (with the electron dense capsid visible inside) and immature (with the electron dense Gag precursor at the periphery and an electron lucent zone at the center) particles revealed that they were able to mature. Quantification of the viral density in the lumen of the

VCCs did not reveal any significant differences among the three types of infected MDMs (Fig 5D). We observed higher numbers of compartments per section in HIV-2-infected MDMs, probably reflecting the higher rate of infection than that by HIV-1 (see number of dots per condition in Fig 5D). Overall, these results show that HIV-2 assembled, budded and accumulated in VCCs similarly to those present in HIV-1-infected MDMs. The main difference was the paucity of cytosolic Gag in HIV-2-infected cells.

HIV-2-infected macrophages poorly transmit HIV-2 to activated primary CD4+ T cells

The addition of activated T cells to HIV-1-infected MDMs has been proposed to induce the formation of virological synapses between the two cell types (Gousset et al., 2008). Moreover, such synapses could promote polarization of VCCs and transfer of their viral contents to T cells (Gousset et al., 2008). We performed MDM-to-T cell transmission assays to evaluate whether activated T cells could stimulate HIV-2-infected MDM to release and transfer their intra-VCC viral stocks (Fig 6A). Infection of MDM at various MOIs yielded similar or higher rates of infection for HIV-2 X4GFP-G than HIV-1 X4GFP-G (Fig 6B and C). However, although HIV-1-infected MDMs efficiently transmitted the virus to T cells, transmission by HIV-2-infected MDMs was very low (Fig 6D and E). Thus, viral transfer to T cells by HIV-2 infected MDMs was inefficient, despite the presence of numerous viral particles in their VCCs.

HIV-2 particles produced by MDM are poorly infectious

The observed poor viral transfer to T cells may either reflect a tendency of HIV-2-infected MDMs to retain the viral particles they produce and/or result from a low infectious capacity of the particles. To test these possibilities, we infected MDMs with either HIV-1 X4GFP-G, HIV-2 R5GFP-G, HIV-2 X4GFP-G, or HIV-2DEnv X4GFP-G as a negative control (Fig 7A and B). The infection rates of the MDMs were in the expected ranges (Fig 7B). We titrated the viral particles produced by infected MDM in the supernatant at day 3 p.i. using the TZM-bl reporter cell line (Fig 7C), which allowed estimating the infection rates for each type of virus (Fig 7D). The infection rates were much lower for both HIV-2 strains than that of HIV-1 and it was null for HIV-2DEnv. Combined with the estimation of the viral content of the supernatants (Fig 7E), the infectious capacity of the HIV-2 viruses produced by MDM was very low (Fig 7F): less than 40% (for HIV-2 X4GFP) and 20% (for HIV-2 R5GFP) of the infectivity of HIV-1 (Fig 7G). Thus, HIV-2-infected MDM released low amounts of viral particles with a much lower infectious capacity than those produced by HIV-1-infected MDMs.

BST-2 regulation in HIV-infected macrophages

The low amounts and low infectivity of HIV-2 particles produced by MDMs may result from partial down-regulation of the restriction factor BST-2/Tetherin. BST-2 is an IFN-stimulated gene (ISG) and localizes to the VCCs in infected MDMs (Chu et al., 2012). It affects viral release and entry (Neil et al., 2007; 2008). A possible inhibitory role for BST-2 was supported by EM profiles of HIV-2- infected macrophages, in which viral particles released near MDMs appeared to be tethered to each other (Fig 8A). Vpu from HIV-1 counteracts BST-2 in infected cells (Neil et al., 2008), whereas this role is ensured by the Env glycoprotein for HIV-2, which does not possess Vpu (Le Tortorec and Neil, 2009). We first analyzed total BST-2 levels by flow cytometry of MDMs infected by HIV-1 X4GFP-G, HIV-2 X4GFP-G, HIV-2 R5GFP-G, or HIV-2DEnv X4GFP-G, as a negative control (Fig 8B). Infection by HIV-2DEnv X4GFP-G induced the highest level of BST-2 expression relative to non-infected cells, showing that HIV-2 was detected by MDMs, probably as for HIV-1 (Decalf et al., 2017). In contrast, total BST-2 levels were down-regulated in MDMs infected with Env-encoding HIV-2 (Fig 8B). Thus, expression of Env from HIV-2 reduced total BST-2 levels in MDMs as previously shown for surface BST-2 levels in HeLa cells (Hauser et al., 2010).

We addressed the role of BST-2 more directly by providing VLP encoding Vpu from HIV-1 fused with mCherry to MDMs together with HIV-2. Vpu decreased BST-2 levels for both HIV-2 (Fig 9A and B). Analysis of BST-2 expression as a function of Vpu expression confirmed the downregulating activity of Vpu (Fig S5). Exposure to Vpu did not significantly modify the rate of infection of MDMs by HIV-2 X4GFP-G nor R5GFP-G (Fig 9C).

HIV-2 X4GFP-G-infected MDM transmission to MT4C5 cells increased upon addition of Vpu, but remained lower than that of HIV-1 (Fig 9D). There was no transmission between HIV-2 R5GFP-G-infected MDMs and MT4C5 cells, independently of Vpu, confirming the lower infectious capacity of HIV-2R5 relative to that of the HIV-2X4 strain (Fig 9D). The addition of Vpu had no effect on the infectious capacity of the virions produced nor on their release (not shown). Overall, the low amounts and low infectivity of the HIV-2 produced by infected MDMs cannot be ascribed to the action of BST-2, or only marginally.

Differential CD4⁺ T-cell susceptibility to HIV-1 and HIV-2

The poor infectivity of HIV-2 produced by MDMs could be due to the intrinsic features of HIV-2, reducing their infectious capacity, as well as differing susceptibility of the T cells to HIV-1 and HIV-2. We tested this possibility by producing (non-pseudotyped) HIV-1 X4GFP, HIV-2 X4GFP, and HIV-2 R5GFP in HEK 293T cells, titrating the preparations on GHOST

reporter cells, and infecting primary activated CD4⁺ T cells (Fig 10). The HIV-1 and -2 X4GFP strains had similarly low titers, whereas HIV-2 R5GFP was highly infectious in GHOST cells (Fig S6A). Rates of HIV-2 infection of T cells were much lower, but detectable, for both HIV-2 strains (Fig 10). In contrast, HIV-1 X4 exhibited much higher rates of infection despite high donor variability (Fig 10). This held true even when comparing the rates obtained with the three viruses at comparable MOIs in GHOST cells (see windows in Fig 10). The viability of T cells used for titration, determined in parallel, were roughly similar for the three viral strains (Fig S6B). Overall, these results show that the HIV-2 strains used in the study can infect activated T cells, but with limited efficiency.

Discussion

The involvement of macrophages in the physiopathology of HIV-1 infection has recently been highlighted (Araínga et al., 2017; Honeycutt et al., 2016; 2017). Macrophages are rapidly infected and produce infectious virus, contributing to the spread of the infection (Clayton et al., 2017; Koppensteiner et al., 2012; Schuitemaker et al., 1991). Infected macrophages are present in many tissues of infected patients (Cribbs et al., 2015; Gyorkey et al., 1985; Jarry et al., 1990; Koenig et al., 1986; Pomerantz et al., 1988). Moreover, they probably fuel the maintenance of the viral reservoir in infected patients under anti-retroviral therapy, due to i) their resistance to the cytopathic effect of the virus, ii) their capacity to store infectious particles, and iii) their being embedded in tissues. In contrast to HIV-1, knowledge concerning the relationship between macrophages and HIV-2 is scarce. We undertook the present study, using an in vitro model of primary human MDMs and focusing on post-entry steps, to improve our understanding of this relationship.

HIV-2-infected MDMs contained similar or even higher amounts of intracellular virions than their HIV-1-infected counterparts at similar rates of infection. HIV-2 assembly occurred at the limiting membrane of apparently intracellular compartments (VCCs), where new viruses accumulate, as for HIV-1. The composition of the VCCs appeared to be similar for the two viruses, although the characterization presented here is based on the presence of specific markers and ultrastructural analyses. Comparative proteomic analysis of HIV-1 and HIV-2 particles produced by macrophages would be informative as composition of the viral membrane directly reflects that of the VCC limiting membrane, see (Chertova et al., 2006). These compartments pre-exist in uninfected MDMs (Berre et al., 2013; Deneka et al., 2007). They are thought to originate from specific areas of the plasma membrane which are internally

sequestered (Pelchen-Matthews et al., 2012). As a result of their origin, they often stay connected to the plasma membrane via microchannels (Deneka et al., 2007) or conduits (Bennett et al., 2009) which are too narrow to allow the virions they contain access to the external medium. As a result of these features, the VCC possess a neutral pH (Jouve et al., 2007). These connections allow small molecules, such as dextrans (Gaudin et al., 2013) or dyes, such as ruthenium red (Deneka et al., 2007; Jouve et al., 2007), to rapidly access the lumen. Whether such connections are also present with VCCs HIV-2-infected MDM still needs to be determined. Here, we show, at the ultra-structural level, that VCCs from HIV-2 R5- or HIV-2 X4-infected MDMs exhibited viral budding profiles and contained immature and mature virions with features similar to VCCs from HIV-1-infected MDMs.

One striking difference between the two types of infected MDMs concerned the intracellular distribution of the Gag precursor. HIV-2 Gag was almost absent from the cytosol and concentrated solely in VCCs, whereas HIV-1 Gag was clearly present in both locations. Quantification on 2D confocal sections and 3D reconstitutions confirmed this difference. This suggests that once HIV-2 Gag is synthesized in the cytosol, it is rapidly targeted to the limiting membrane of the VCC. Future studies will determine whether this represents an intrinsic feature of the Gag protein or results from the action of another viral gene product.

Spontaneous viral release by HIV-2-infected MDMs was surprisingly much less efficient than that of HIV-1-infected MDMs, despite efficient production of HIV-2 particles and their accumulation. Whether viral release from HIV-1-infected MDMs is regulated and inducible is still elusive. One of the few documented stimuli is extracellular ATP (eATP), which rapidly induces viral release through P2X7R (Graziano et al., 2015). It is still unclear, however, whether viral release is a direct consequence of exposure to eATP or indirectly due to the major rearrangements of the MDM cytoskeleton induced by eATP, leading to the widening of the VCC connections with the plasma membrane. We explored another possibility, as activated T cells have been proposed to promote the transfer of virions from VCCs of HIV-1-infected MDMs to T cells via virological synapses (Gousset et al., 2008). However, the addition of activated CD4⁺ T cells resulted in lower transfer for HIV-2- than HIV-1-infected MDMs, raising the question of the mechanism responsible for the cellular retention of the newly produced HIV-2 particles.

An obvious candidate behind this retention was BST-2, as electronmicrographs of HIV-2 particles released by MDMs showed them to be possibly tethered. However, BST-2 levels in HIV-1- and HIV-2-infected MDMs were similar. Moreover, providing HIV-1 Vpu, which down-regulates BST-2, to HIV-2- infected MDMs did not modify the poor viral release

observed. Thus, the molecular mechanism responsible for HIV-2 retention is probably BST-2 independent, although this is yet to be elucidated.

Another important difference between HIV-1 and HIV-2 documented here was that HIV-2 particles produced by macrophages are very poorly infectious, as shown by reporter cell and transfer-to-T cell experiments. A role for BST-2 in this low infectivity appears unlikely for the reasons explained above. Additional experiments are needed to determine whether such low infectivity only reflects the poor capacity of the Env of the two HIV-2 strains used to mediate viral entry or whether there are macrophage-specific factors involved.

In conclusion, HIV-2-infected MDMs can produce viral particles that accumulate in VCCs, are poorly released, and poorly infectious. This would imply that macrophages contribute very poorly to the spread of the HIV-2 infection if these features are conserved *in vivo*. Rather, macrophages would act as a trap for circulating viruses. Such macrophages, containing high amounts of HIV-2, could also be an important source of viral antigens. They could directly present HIV-2-derived antigens and stimulate T cells, although the antigen presentation capacities are deeply affected by HIV infection (see (Benaroch et al., 2010)). Alternatively, they can die and be taken up by dendritic cells which more efficiently elicit cellular immune responses. Macrophages could thus participate in multiple ways in the immune control of HIV-2 infection, including trapping and degrading viral particles via phagocytosis or becoming infected and producing poorly infectious viral particles that are retained intracellularly, thus providing viral antigens to DCs when they engulf debris of infected MDMs, efficiently stimulating the adaptive immune response.

Acknowledgments

The authors would like to thank Vasco Rodrigues, Francesca Graziano, and Nicolas Manel at the Institut Curie for critical reading of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the « Agence Nationale de Recherche contre le SIDA et les hépatites virales » (ANRS), « Ensemble contre le SIDA » (Sidaction), ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, and ANR-11-LABX-0043 to PB. EGM and NR were supported by post-doctoral fellowships from the ANRS and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Materials and methods

Cells

Plasmapheresis residues were obtained from healthy adult donors (Saint-Antoine Crozatier Blood Bank, Paris, France), where all donors signed informed consent allowing the use of their blood for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated using Ficoll- Paque (GE Healthcare). Monocytes were isolated by CD14⁺ positive selection using magnetic microbeads (Miltenyi) and differentiated into macrophages for 7 days in RPMI (Gibco, Life Technologies) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS; BioWest), 5% human serum AB (Sigma), penicillin- streptomycin (Gibco), and 25 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF; ImmunoTools). CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by CD4⁺ negative selection using magnetic microbeads (Miltenyi)

Cell culture

T cells were cultured in RPMI 1640 medium, GlutaMAX complemented with FBS 10% and Penicillin/Streptomycin at 10⁶ cells/mL in the presence of 5 µg/mL PHA (Lectin from Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; Sigma L2769) and 50U/mL of IL-2 (eBioscience). On day 2 of culture, cells were washed and additionally cultured with IL-2. HEK293T cells were cultured in DMEM medium, GlutaMAX (Thermo Fisher 61965-026) complemented with FBS 10% (Thermo Fisher 10270-106) and Penicillin/Streptomycin. GHOSTX4R5 and TZM-bl cells were cultured in DMEM medium, GlutaMAX complemented with FBS 10% and Penicillin/Streptomycin. MT4C5 cells were cultured in RPMI medium, GlutaMAX complemented with FBS 10% and Penicillin/Streptomycin. All cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ atmosphere.

Plasmids

HIV-1 NL4-3 (kindly provided by O. Schwartz, Institut Pasteur, Paris, France), HIV-1 NL-AD8 (Freed and Martin, 1995) derived from of NL4-3 with BaL env, HIV-2 ROD9 and HIV-2 JK(both gift from N. Manel). The GFP viruses all harbor GFP instead of Nef: HIV-1 NL4-3 X4GFP (N. Manel), HIV-2 ROD9GFP and HIV-2 ROD9ΔEnvGFP (both kindly provided by O.T. Keppler), HIV-2 JKGFP (Silvin et al., 2017). HIV-1iGFP (Hübner et al., 2007) and HIV-2 ROD9GagiGFP was generated from HIV-2 ROD9GagiGFPΔEnv (N. Manel) with EGFP sequence between CA and MA and Gag from this plasmid was introduced into pROD9. Vpu-Lai (S.Saragosti (Saint Louis Hospital)). The Vpu-Cherry was generated by introducing Cherry

in the place of GFP. Vpu-Cherry was cloned to a pDONOR vector and introduced in an adapted to gateway technology version of pCDH- CMV-MCS-EF1-Puro (SBI bioscience). pSIV3+ plasmid for Vpx, psPAX2 for lentiviral encapsidation and pDM2G for VSV-G pseudotyping. pSVRΔNBDM (Manel) was used to encapsidate HIV-2ROD9iGFP for productive infection.

HIV-1 and lentiviral production and titration

HIV Viral particles were produced by transfection of HEK293T cells in 6-well plates with 3μg DNA and 8μl TransIT-293 (Mirus Bio) per well. For non- pseudotyped virus 3μg of HIV plasmid were used. For VSV-G pseudotyped virus 0.4μg pDM2G and 2.6μg HIV plasmid were used. For Vpx and Vpu-Cherry lentivectors 0.4μg pDM2G, 1 μg psPAX and 1.6μg Vpx or Vpu-Cherry plasmid were used. For HIV-2*GagiGFP 0.4μg pDM2G, 1 μg pSVRΔNBDM and 1.6μg pROD9 iGFP plasmid were used. 16h after transfection, media was removed, and fresh RPMI medium was added. Viral supernatants were harvested 36h later, filtered at 0.45μM, used freshly or aliquoted and frozen at -80°C. Viral titers were determined on GHOST X4R5 cells as described (Manel et al., 2010).

Drugs

Azidothymidine (AZT; Sigma) was used at 25μM final concentration and added at time of co-culture with T cells as control or after 24h of co-culture to avoid T- to-T cell transmission.

Flow cytometry

Macrophages were harvested after TrypLETM Express treatment (Gibco) and gentle scraping. Cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde (PFA), washed in PBS, and when stained, permeabilized for 30 min in PBS plus 0.2% BSA and 0.05% saponin. Infection was detected by GFP coding viruses and BST2 was detected using a coupled BST2-PE antibody (eBioscience) or IgG1-PE (eBioscience) as a control and analyzed on a FACS Verse (BD). For Vpu-Cherry expressing cells CYTOFLEX cytometer (Beckman Coulter) was used.

Recovery of intracellular virus

Macrophages in a 24-well plate were washed twice in PBS after supernatant collection and 400μL of media were added and put at -80°C. After couple of hours the plate was thaw and medium was collected and centrifuged at 15000rpm 1h30 at 4°C. The pellet was resuspended in 200μL. 100 μL were used for RNA extraction and 100 μL were diluted with 300 μL of PBS for titration into TZM-bl. RNA isolation, reverse transcription, and qPCR. At the time of

collection, supernatant was collected directly and 400 μ L of supernatant and 100 μ L of recovered intracellular virus were lysed with 1400 μ L and 350 μ L of lysis buffer respectively. 200 pg of Luciferase control RNA (Promega) were added to each sample for absolute quantification. RNA was collected and purified using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) by following the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were verified with a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), and reverse transcription was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) by following the manufacturer's instructions. qPCR was performed using SYBRgreen Master Mix (Roche). Primers for Full length gag HIV-1 and HIV-2 were designed to be in the same part of the gag sequence with similar length, Tm and % GC (HIV-2 Fw 5'-CGGCGGAAAGAAAAAGTACA-3' and Rv 5'-CACCAAATGACGCAGACAGT-3'; and HIV-1 Fw 5'-CGAGAGCGTCGGTATTAAGC-3' and Rv 5'-CTGAAGGGATGGTTGTAGCTG-3') based on (Houzet et al., 2007) for gRNA quantification.

Viral genomic RNA quantification

Standard curves of each plasmid and Luciferase RNA control (Promega) were run for each donor and plate of qPCR. The equations from the standard curves were used to calculate absolute values for HIV gRNA copies/ μ L with sample normalization for RNA luciferase.

Rate of infection on TZM-bl and infectivity

Supernatant and recovered intracellular virus from macrophages were titrated on TZM-bl cells for 48h and Steady-Glo Luciferase assay system (Promega) was used using manufacturer's instructions and Luminescence was read in FLUOstar OPTIMA. The slope on the linear regression of the titration was considered the rate of infection (AU/ μ L). Infectivity was calculated normalizing the rate of infection by the HIV RNA copies/ μ L.

Confocal Microscopy. Immunostaining

Cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde (PFA), washed in PBS, and when stained, permeabilized for 30 min in PBS plus 0.2% BSA and 0.05% saponin. Gag was stained with H183-H12-5C hybridoma (mouse IgG1, NIH) or p24 (goat polyclonal, Abcam) only when co-stained with CD36. For cellular proteins CD44 (rat, Abcam), CD9 (rabbit, Santa Cruz), CD36 (mouse IgG1, StemCell), CD81 (mouse IgG2a, Abcam) and Lamp1 (rabbit, Abcam) were used. For secondary antibodies goat anti-IgG1 A546, goat anti-IgG2a A647, donkey anti-

rabbit A488, donkey anti-goat A488, chicken anti-mouse A647, donkey anti-rabbit Cy3, donkey anti-mouse A488 and donkey anti-rat A647 were used (Life technologies).

For the p24/CD44 co-localization experiments, single plane images (pixel size 70nm) were acquired using an inverted confocal microscope (Zeiss, LSM780) equipped with a 40x oil immersion objective (NA=1.3), an argon laser and three laser diodes (405,546 and 633nm).

For the % of Gag signaling measurement, Zstack (pixel size 70nm, Zstep=0.3 μ m) were acquired using an inverted confocal microscope (Leica DMI8, SP8 scanning head unit) equipped with a 63x oil immersion objective (NA=1.4) and four laser diodes (405,488,546 and 633 nm).

Image analysis

Image processing and analysis was performed using Fiji software (Schindelin et al., 2012)

For the analysis of the VCC's Gag concentration, VCCs were segmented by applying a threshold on the Gag channel. Cytoplasm was segmented by applying a threshold on the CD44 channel and subtracting the nucleus obtained after threshold on the DAPI channel. The ratio between the p24 mean fluorescence intensity (MFI) inside the VCC versus the cytoplasm for each channel was computed.

For the analysis of the Gag/CD44 colocalization, cytoplasm of infected cells were segmented by applying a threshold on the CD44 channel to obtain a mask. When necessary, masks were manually corrected. Then, for each cytoplasmic region, we analyzed colocalization by computing Pearson coefficient between the CD44 channel image and the Gag channel image using coloc2 plugin.

For the 3D volumes measurement, 3D masks were obtained for the cytoplasm, the nucleus, and the compartments by applying threshold respectively on CD44 channel, DAPI channel and p24 channel. Masks were corrected or adjusted manually when necessary. The volume of each masks and their GFP intensities were then measured. 3D reconstructions were achieved using Volume Viewer plugin and the 3D masks.

Electron Microscopy

Cells were fixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 1h, post fixed for 1h with 2% buffered osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol solution, and then embedded in epoxy resin. Images were acquired with a digital camera Quemesa (SIS) mounted on a Tecnai Spirit transmission electron microscope (FEI Company) operated at 80kV. Density of viral particles was determined as viral particles/ μ m² within VCC.

Measurement of VCC area was done using iTEM analySIS software (Soft Imaging Systems). VCC were from three donors.

Macrophage-to-T cell transmission/ MT4C5

For Macrophage-to-T cell transmission, macrophages in 96-well plate and 24- well plate were infected with VSV-G–pseudotyped HIV-1 X4GFP, HIV-2 X4GFP, HIV-2 R5GFP at different MOIs, washed extensively 3 days later, and received 7.5×10^5 CD4⁺ T lymphocytes/ well in the 96-well plate. The macrophages on 24-well plate were harvested for %of infected cells. The CD4⁺ T lymphocytes were purified by negative selection (Miltenyi Biotec) from heterologous PBMCs that had been activated 48 h before in RPMI, 10% FCS, 2.5 µg/ml PHA-L, and 30 U/ml IL2. 25 µM AZT was added at 0 h (as a negative control) or 24 h after the beginning of the co- cultures. At 48 h, CD4⁺ T cells were collected, washed and fixed with 4% PFA, permeabilized, stained with PE-Cy7 anti-CD3 (BD), and analyzed on a FACS Verse (BD).

For Macrophage-to-MT4C5 cell transmission, macrophages were infected 96-well plate and 24-well plate with VSV-G–pseudotyped HIV-1 X4GFP, HIV-2 X4GFP, HIV-2 R5GFP and HIV-2ΔEnv X4GFP at MOI 1.5, washed extensively 8 h later and at day 3, when received 7.5×10^5 MT4C5 cells/ well in the 96-well plate. The macrophages on 24-well plate were harvested for % of infected cells, and supernatant was harvested for gRNA and infectivity quantification. 25 µM AZT was added at 24 h after the beginning of the co- cultures. At 48 h, MT4C5 cells were collected, washed and fixed with 4% PFA and analyzed on a FACS Verse (BD). Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac (GraphPad).

Statistics

Data were analyzed using using Prism v7 for Mac (GraphPad). On Figures where the same donor was compared in different conditions P values were calculated using nonparametric Wilcoxon paired test. On Figures 3, 4 and 5 P values were calculated using Kruskal-Wallis multiple comparison non-parametric test. P value lower than 0.05 was considered as significant (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 and ****p<0.0001). For experiments for which n was lower than 4 or uneven numbers on conditions statistics were not included due to lack of power.

References

Andersson, S., Norrgren, H., da Silva, Z., Biague, A., Bamba, S., Kwok, S., Christopherson, C., Biberfeld, G., and Albert, J. (2000). Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch. Intern. Med.* 160, 3286–3293.

Araínga, M., Edagwa, B., Mosley, R.L., Poluektova, L.Y., Gorantla, S., and Gendelman, H.E. (2017). A mature macrophage is a principal HIV-1 cellular reservoir in humanized mice after treatment with long acting antiretroviral therapy. *Retrovirology* 14, 1–13.

Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., and Jouve, M. (2010). HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29.

Bennett, A.E., Narayan, K., Shi, D., Hartnell, L.M., Gousset, K., He, H., Lowekamp, B.C., Yoo, T.S., Bliss, D., Freed, E.O., et al. (2009). Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 5, e1000591.

Berre, S., Gaudin, R., Cunha de Alencar, B., Desdouits, M., Chabaud, M., Naffakh, N., Rabaza-Gairi, M., Gobert, F.X., Jouve, M., and Benaroch, P. (2013). CD36- specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to T cells. *Journal of Experimental Medicine* 210, 2523–2538.

Bhattacharya, J., Peters, P.J., and Clapham, P.R. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins that lack cytoplasmic domain cysteines: impact on association with membrane lipid rafts and incorporation onto budding virus particles. *J. Virol.* 78, 5500–5506.

Bissel, S.J., and Wiley, C.A. (2004). Human immunodeficiency virus infection of the brain: pitfalls in evaluating infected/affected cell populations. *Brain Pathol.* 14, 97–108.

Chattergoon, M.A., Latanich, R., Quinn, J., Winter, M.E., Buckheit, R.W., Blankson, J.N., Pardoll, D., and Cox, A.L. (2014). HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathog.* 10, e1004082.

Chaveau, L., Puigdomènech, I., Bruni, D., Visseaux, B., Descamps, D., and Schwartz, O. (2015). HIV-2 infects resting CD4⁺ T cells but not monocyte-derived dendritic cells.

Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Sowder, R.C., Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J., et al. (2006). Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 80, 9039–9052.

Chu, H., Wang, J.-J., Qi, M., Yoon, J.-J., Chen, X., Wen, X., Hammonds, J., Ding, L., and Spearman, P. (2012). Tetherin/BST-2 Is Essential for the Formation of the Intracellular Virus-Containing Compartment in HIV-Infected Macrophages. *Cell Host Microbe* 12, 360–372.

Clayton, K.L., Garcia, J.V., Clements, J.E., and Walker, B.D. (2017). HIV Infection of Macrophages: Implications for Pathogenesis and Cure. *Pathog Immun* 2, 179–192.

Cribbs, S.K., Lennox, J., Caliendo, A.M., Brown, L.A., and Guidot, D.M. (2015). Healthy HIV-1-Infected Individuals on Highly Active Antiretroviral Therapy Harbor HIV-1 in Their Alveolar Macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 31, 64–70.

Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguet, N., and Benkirane, M. (2013). Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *CellReports* 3, 1036–1043.

Cunningham, A.L., Naif, H., Saksena, N., Lynch, G., Chang, J., Li, S., Jozwiak, R., Alali, M., Wang, B., Fear, W., et al. (1997). HIV infection of macrophages and pathogenesis of AIDS dementia complex: interaction of the host cell and viral genotype. *J. Leukoc. Biol.* 62, 117–125.

Damond, F., Gueudin, M., Pueyo, S., Farfara, I., Robertson, D.L., Descamps, D., Chène, G., Matheron, S., Campa, P., Brun-Vézinet, F., et al. (2002). Plasma RNA viral load in human

immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3654–3659.

Decalf, J., Desdouits, M., Rodrigues, V., Gobert, F.-X., Gentili, M., Marques- Ladeira, S., Chamontin, C., Mougél, M., Cunha de Alencar, B., and Benaroch, P. (2017). Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages. *J. Virol.* 91, e00147–17.

Deeks, S.G., Tracy, R., and Douek, D.C. (2013). Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity* 39, 633–645.

Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M.(2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* 177, 329–341.

Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology* 9, 87.

Duvall, M.G., Loré, K., Blaak, H., Ambrozak, D.A., Adams, W.C., Santos, K., Geldmacher, C., Mascola, J.R., McMichael, A.J., Jaye, A., et al. (2007). Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *J. Virol.* 81, 13486–13498.

Duvall, M.G., Precopio, M.L., Ambrozak, D.A., Jaye, A., McMichael, A.J., Whittle, H.C., Roederer, M., Rowland-Jones, S.L., and Koup, R.A. (2008). Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur. J. Immunol.* 38, 350–363.

Fernandes, S.M., Pires, A.R., Ferreira, C., Tendeiro, R., Correia, L., Paulo, S.E., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2014). Gut disruption in HIV-2 infection despite reduced viremia. *Aids* 28, 290–292.

Freed, E.O., and Martin, M.A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *Journal of Biological Chemistry* 270, 23883–23886.

Gaudin, R., Berre, S., Cunha de Alencar, B., Decalf, J., Schindler, M., Gobert, F.- X., Jouve, M., and Benaroch, P. (2013). Dynamics of HIV-Containing Compartments in Macrophages Reveal Sequestration of Virions and Transient Surface Connections. *PLoS ONE* 8, e69450.

Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E., and Freed, E.O. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS Pathog.* 4, e1000015.

Graziano, F., Desdouits, M., Garzetti, L., Podini, P., Alfano, M., Rubartelli, A., Furlan, R., Benaroch, P., and Poli, G. (2015). Extracellular ATP induces the rapid release of HIV-1 from virus containing compartments of human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 112, E3265–E3273.

Gueudin, M., Damond, F., Braun, J., Taïeb, A., Lemée, V., Plantier, J.-C., Chène, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., and Simon, F. (2008). Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected patients. *Aids* 22, 211–215.

Gyorkey, F., Melnick, J.L., Sinkovics, J.G., and Gyorkey, P. (1985). Retrovirus resembling HTLV in macrophages of patients with AIDS. *Lancet* 1, 106.

Hauser, H., Lopez, L.A., Yang, S.J., and Oldenburg, J.E. (2010). Research HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment.

Helft, J., Böttcher, J.P., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C. (2016). Alive but Confused: Heterogeneity of CD11c(+) MHC Class II(+) Cells in GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures. *Immunity* 44, 3–4.

Hollenbaugh, J.A., Montero, C., Schinazi, R.F., Munger, J., and Kim, B. (2016). Metabolic profiling during HIV-1 and HIV-2 infection of primary human monocyte-derived macrophages. *Virology* 491, 106–114.

Honeycutt, J.B., Thayer, W.O., Baker, C.E., Ribeiro, R.M., Lada, S.M., Cao, Y., Cleary, R.A., Hudgens, M.G., Richman, D.D., and Garcia, J.V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nature Medicine* 23, 638–643.

Honeycutt, J.B., Wahl, A., Baker, C., Spagnuolo, R.A., Foster, J., Zakharova, O., Wietgreffe, S., Caro-Vegas, C., Madden, V., Sharpe, G., et al. (2016). Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J. Clin. Invest.* 1–14.

Houzet, L., Morichaud, Z., and Mougel, M. (2007). Fully-spliced HIV-1 RNAs are reverse transcribed with similar efficiencies as the genomic RNA in virions and cells, but more efficiently in AZT-treated cells. *Retrovirology* 4, 30.

Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661.

Hübner, W., Chen, P., Del Portillo, A., Liu, Y., Gordon, R.E., and Chen, B.K. (2007). Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J. Virol.* 81, 12596–12607.

Igarashi, T., Brown, C.R., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., and Martin, M.A. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4⁺ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Pnas* 98, 658–663.

Jarry, A., Cortez, A., René, E., Muzeau, F., and Brousse, N. (1990). Infected cells and immune cells in the gastrointestinal tract of AIDS patients. An immunohistochemical study of 127 cases. *Histopathology* 16, 133–140.

Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* 2, 85–95.

Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A., and Fauci, A.S. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089–1093.

Kong, R., Li, H., Bibollet-Ruche, F., Decker, J.M., Zheng, N.N., Gottlieb, G.S., Kiviat, N.B., Sow, P.S., Georgiev, I., Johnson, P.R., et al. (2012). Broad and potent neutralizing antibody responses elicited in natural HIV-2 infection. *J. Virol.* 86, 947–960.

Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., and Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* 9, 82.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13, 223–228.

Le Tortorec, A., and Neil, S.J.D. (2009). Antagonism to and Intracellular Sequestration of Human Tetherin by the Human Immunodeficiency Virus Type 2 Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* 83, 11966–11978.

Ludlow, L.E., Zhou, J., Tippet, E., Cheng, W.-J., Hasang, W., Rogerson, S.J., and Jaworowski, A. (2012). HIV-1 Inhibits Phagocytosis and Inflammatory Cytokine Responses of Human Monocyte-Derived Macrophages to *P. falciparum* Infected Erythrocytes. *PLoS ONE* 7, e32102.

Makvandi-Nejad, S., and Rowland-Jones, S. (2015). How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? *Immunol. Lett.* 163, 69–75.

Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010). A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467, 214–217.

Marchant, D., Neil, S.J.D., and McKnight, A. (2006). Human immunodeficiency virus types 1 and 2 have different replication kinetics in human primary macrophage culture. *J. Gen. Virol.* 87, 411–418.

Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., and Gueye, E.H. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587–1590.

Martinez-Steele, E., Awasana, A.A., Corrah, T., Sabally, S., van der Sande, M., Jaye, A., Togun, T., Sarge-Njie, R., McConkey, S.J., Whittle, H., et al. (2007). Is HIV-2- induced AIDS different from HIV-1-associated AIDS? Data from a West African clinic. *Aids* 21, 317–324.

Mazzolini, J., Herit, F., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Niedergang, F. (2010). Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef- dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. *Blood* 115, 4226–4236.

Nasr, N., Alshehri, A.A., Wright, T.K., Shahid, M., Heiner, B.M., Harman, A.N., Botting, R.A., Helbig, K.J., Beard, M.R., Suzuki, K., et al. (2017). Mechanism of Interferon Stimulated Gene Induction in HIV-1 Infected Macrophages. *J. Virol.* JVI.00744–17–47.

Neil, S.J.D., Sandrin, V., Sundquist, W.I., and Bieniasz, P.D. (2007). An Interferon- α - Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein. *Cell Host Microbe* 2, 193–203.

Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.

Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Macallan, D.C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* 23, 221–240.

Pelchen-Matthews, A., Giese, S., Mlcochova, P., Turner, J., and Marsh, M. (2012). β 2 integrin adhesion complexes maintain the integrity of HIV-1 assembly compartments in primary macrophages. *Traffic* 13, 273–291.

Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., and Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162, 443–455.

Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., and Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582–1586.

Pomerantz, R.J., la Monte, de, S.M., Donegan, S.P., Rota, T.R., Vogt, M.W., Craven, D.E., and Hirsch, M.S. (1988). Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann. Intern. Med.* 108, 321–327.

Popper, S.J., Sarr, A.D., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (2000). Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J. Virol.* 74, 1554–1557.

Rowland-Jones, S.L., and Whittle, H.C. (2007). Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 8, 329–331.

Ruffin, N., Brezar, V., Ayinde, D., Lefebvre, C., Schulze Zur Wiesch, J., van Lunzen, J., Bockhorn, M., Schwartz, O., Hocini, H., Lelievre, J.D., et al. (2015). Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4⁺ T cells susceptible to HIV-1. *Aids* 29, 519–530.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.

Schuitmaker, H., Kootstra, N.A., de Goede, R.E., de Wolf, F., Miedema, F., and Tersmette, M. (1991). Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants

detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J. Virol.* 65, 356–363.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356, eaag3009.

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

Soares, R.S., Tendeiro, R., Foxall, R.B., Baptista, A.P., Cavaleiro, R., Gomes, P., Camacho, R., Valadas, E., Doroana, M., Lucas, M., et al. (2011). Cell-associated viral burden provides evidence of ongoing viral replication in aviremic HIV-2- infected patients. *J. Virol.* 85, 2429–2438.

Sunseri, N., O'Brien, M., Bhardwaj, N., and Landau, N.R. (2011). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Modified To Package Simian Immunodeficiency Virus Vpx Efficiently Infects Macrophages and Dendritic Cells. *J. Virol.* 85, 6263–6274.

Swingler, S., Mann, A.M., Zhou, J., Swingler, C., and Stevenson, M. (2007). Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathog.* 3, 1281–1290.

Vérollet, C., Souriant, S., Bonnaud, E., Jolicoeur, P., Raynaud-Messina, B., Kinnaer, C., Fourquaux, I., Imle, A., Benichou, S., Fackler, O.T., et al. (2014). HIV-1 reprograms the migration of macrophages. *Blood* 125, 1611–1622.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, eaah4573.

Figure 1

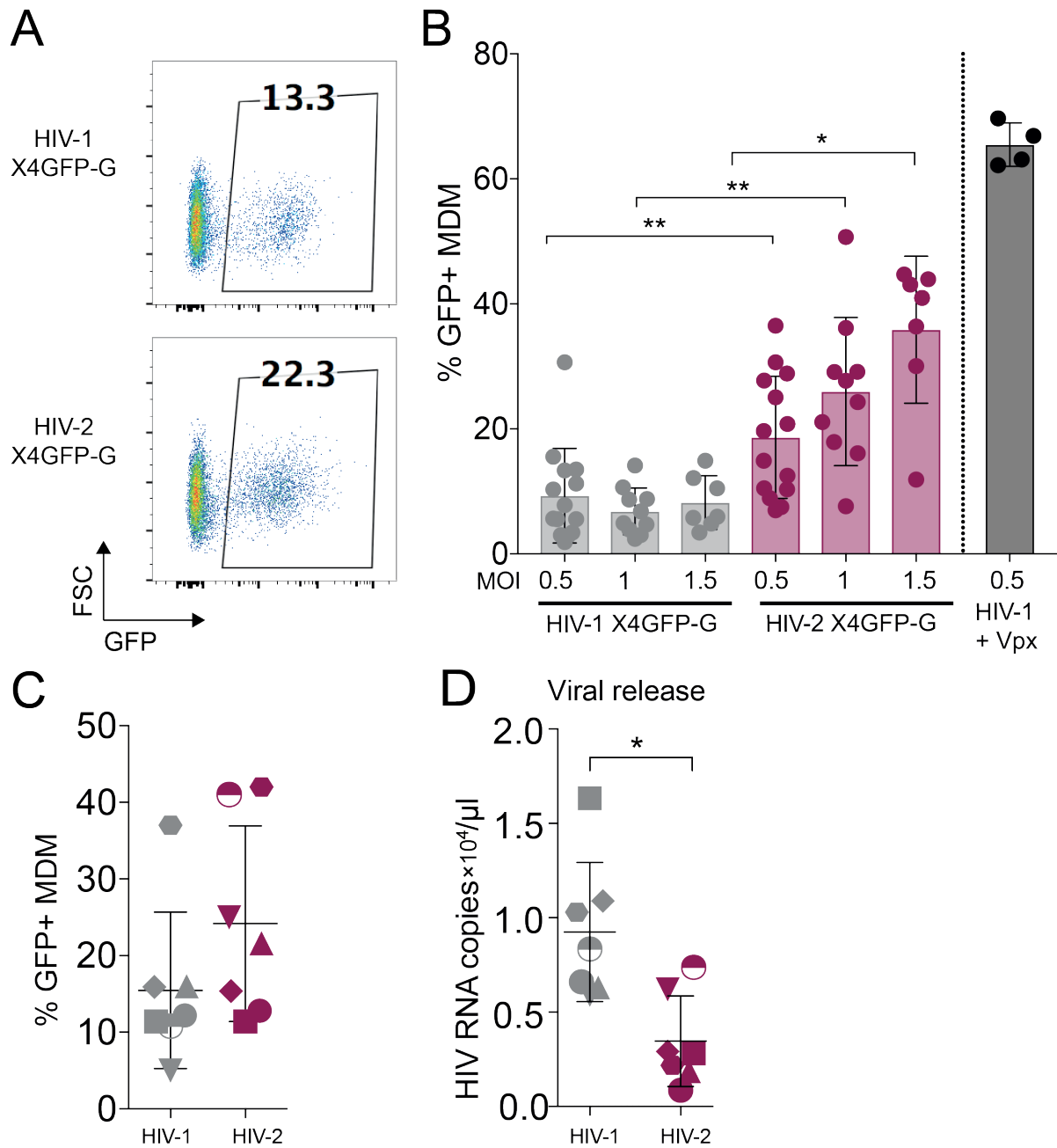


Figure 1 HIV-2-infected MDM release low levels of virus. GFP expression in monocyte-derived macrophages differentiated for 7 days with M-CSF (MDMs), infected with the indicated viruses and harvested at 3dpi. (A) Representative dot plot analyses of MDMs infected with the same MOI are presented. The percentages of GFP+ cells indicated in the plots. (B) Percentage of GFP+ MDMs at 3 dpi with the indicated viruses. Each dot represents MDMs from one donor. Bars represent the mean $\pm$ SD. (C) and (D) MDMs from 7 donors were infected with HIV-1 X4GFP-G or HIV-2 at the same MOI. Their rate of infection was determined by flow cytometry at 3dpi (C) and viral release was estimated in parallel by measurement of HIV RNA copies/ μL by RT-qPCR. P values were calculated using nonparametric Wilcoxon paired test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Figure 2

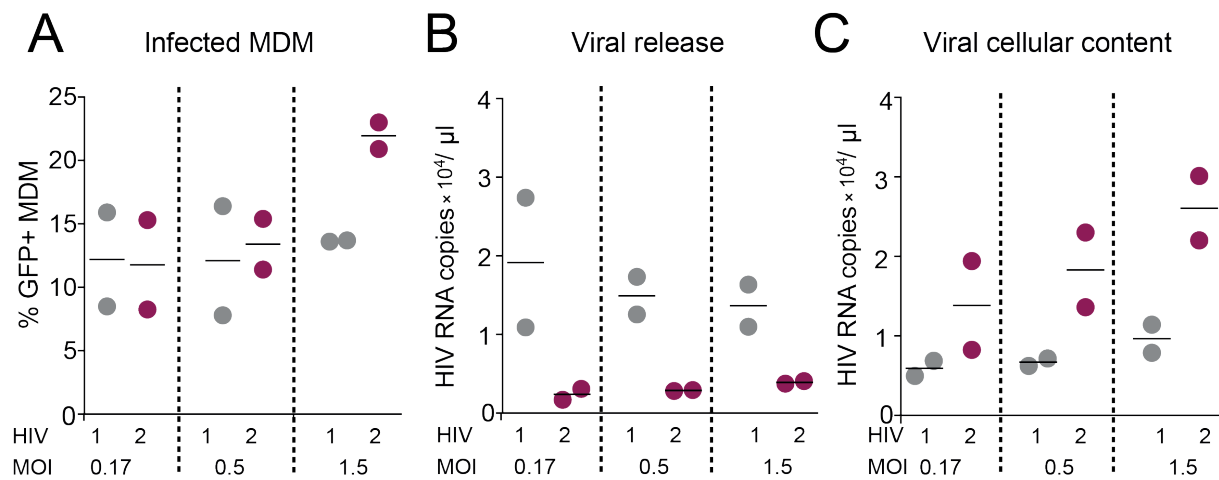


Figure 2 Intracellular and extracellular viral production by HIV-1- and HIV-2-infected MDMs. (A) MDMs were infected with HIV-1 X4GFP VSV-G or HIV-2 X4GFP VSV-G at various MOI. At 3 dpi, (A) rates of MDM infection were determined by flow cytometry, and (B) HIV RNA copies/ μ L present in the supernatant and (C) intracellularly after lysis were evaluated by RT-qPCR.

Figure 3

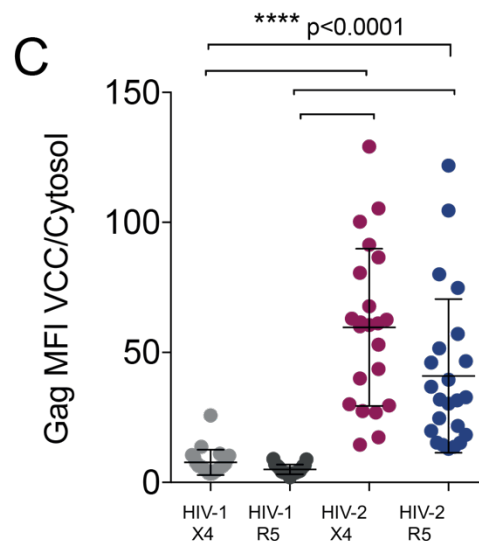
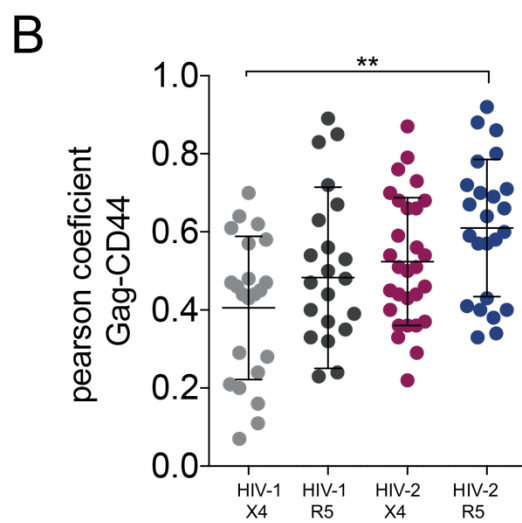
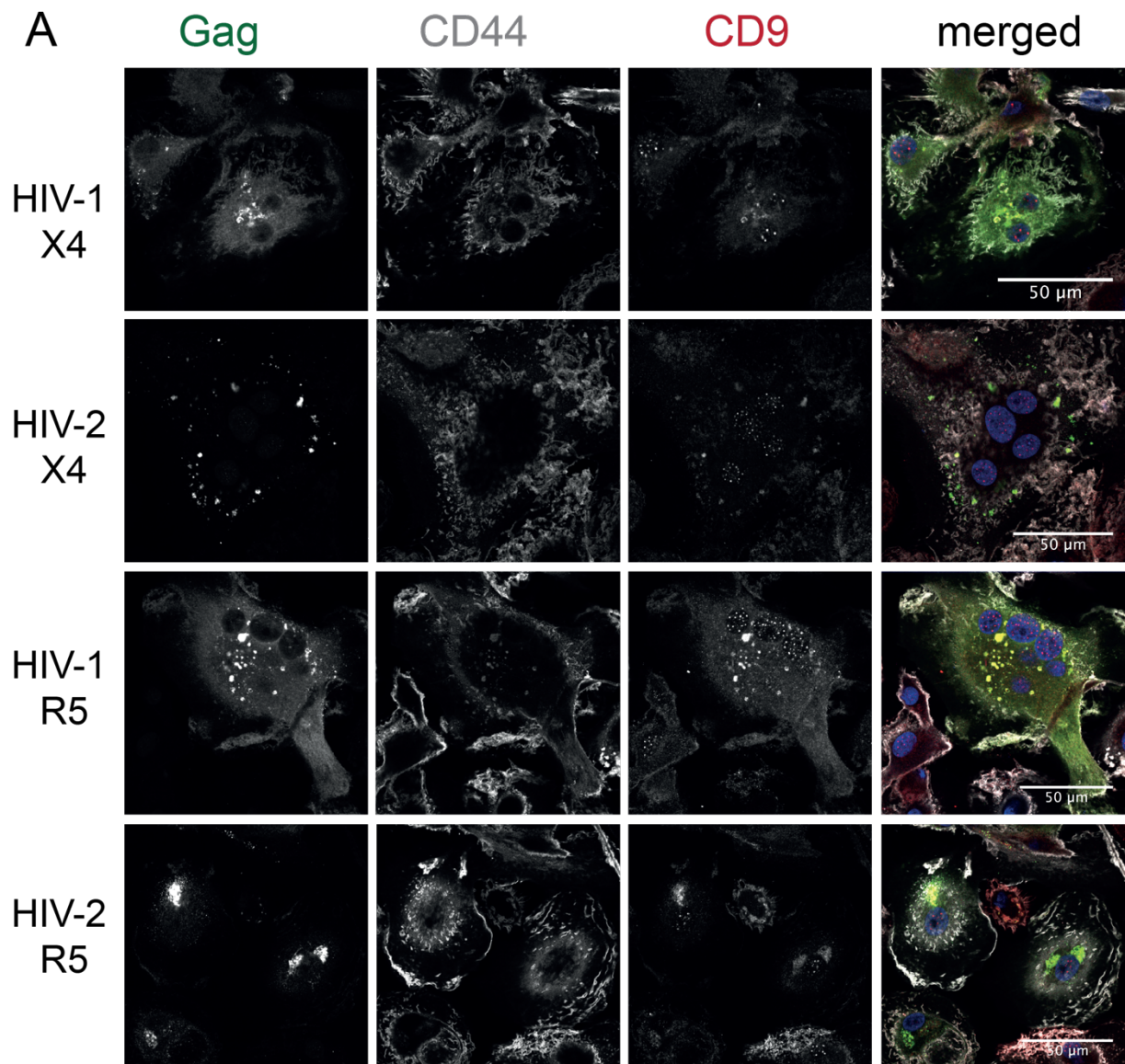


Figure 3 HIV-2 Gag localizes in Virus-Containing Compartments in primary human MDMs. (A) MDMs were infected with the following viruses for three days: HIV-1 X4 VSV-G, HIV-1 R5 VSV-G, HIV-2 X4 VSV-G or HIV-2 R5 VSV-G. Samples were stained for the indicated markers by immunofluorescence. Representative confocal sections are presented. (B) Analysis of the co-distribution of Gag and CD44 on confocal sections by estimation of the Pearson coefficient. Each dot is a cell. (C) Quantification of Gag distribution in VCCs calculated as the ratio of Gag mean fluorescent intensity in the VCC versus the Gag mean fluorescent intensity in the cytosol. Compartments and cytosol were defined by masks on Gag and CD44 respectively. P values were calculated using Kruskal-Wallis multiple comparison non-parametric test. P value lower than 0.05 was considered as significant ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).*

Figure 4

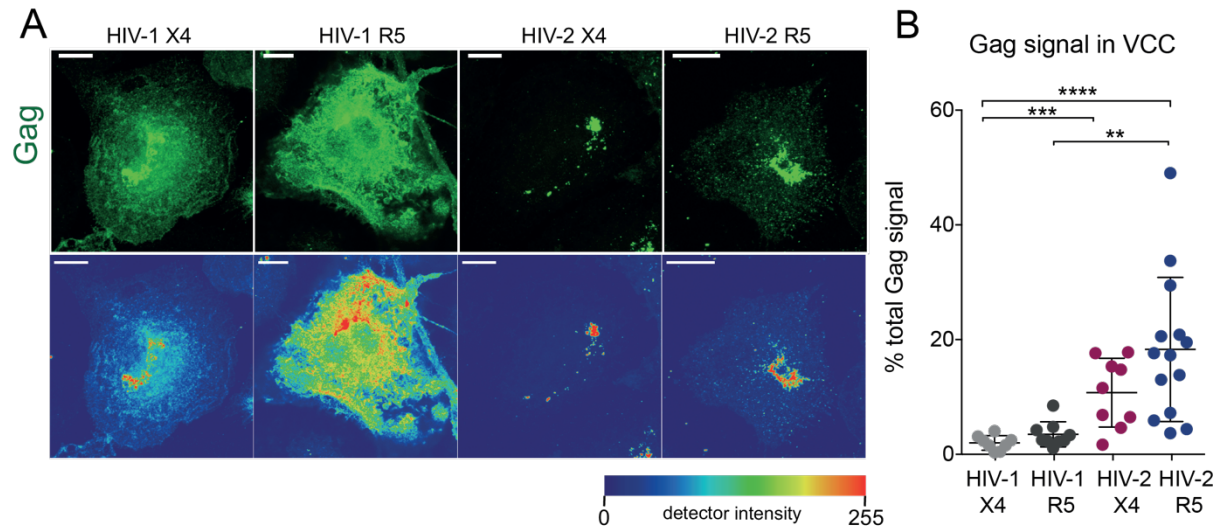


Figure 4 Gag is concentrated in the Viral-Containing Compartment of HIV-2-infected MDMs. Z stacks of confocal sections of MDMs infected with the indicated viruses and stained for Gag, were acquired with a $0.5\ \mu\text{M}$ interval. (A) Representative Z projections of stacks are presented. Images on the second row represent intensity maps for Gag expression of the same projections as in the first row. Bar = $10\ \mu\text{m}$. (B) Z stacks of infected MDMs were used to build 3D reconstructions and to determine the % Gag signal present in VCCs over Gag signal present in the rest of the cells. Each dot represents a cell. P values were calculated using Kruskal-Wallis multiple comparison non-parametric test. P value lower than 0.05 was considered as significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Figure 5

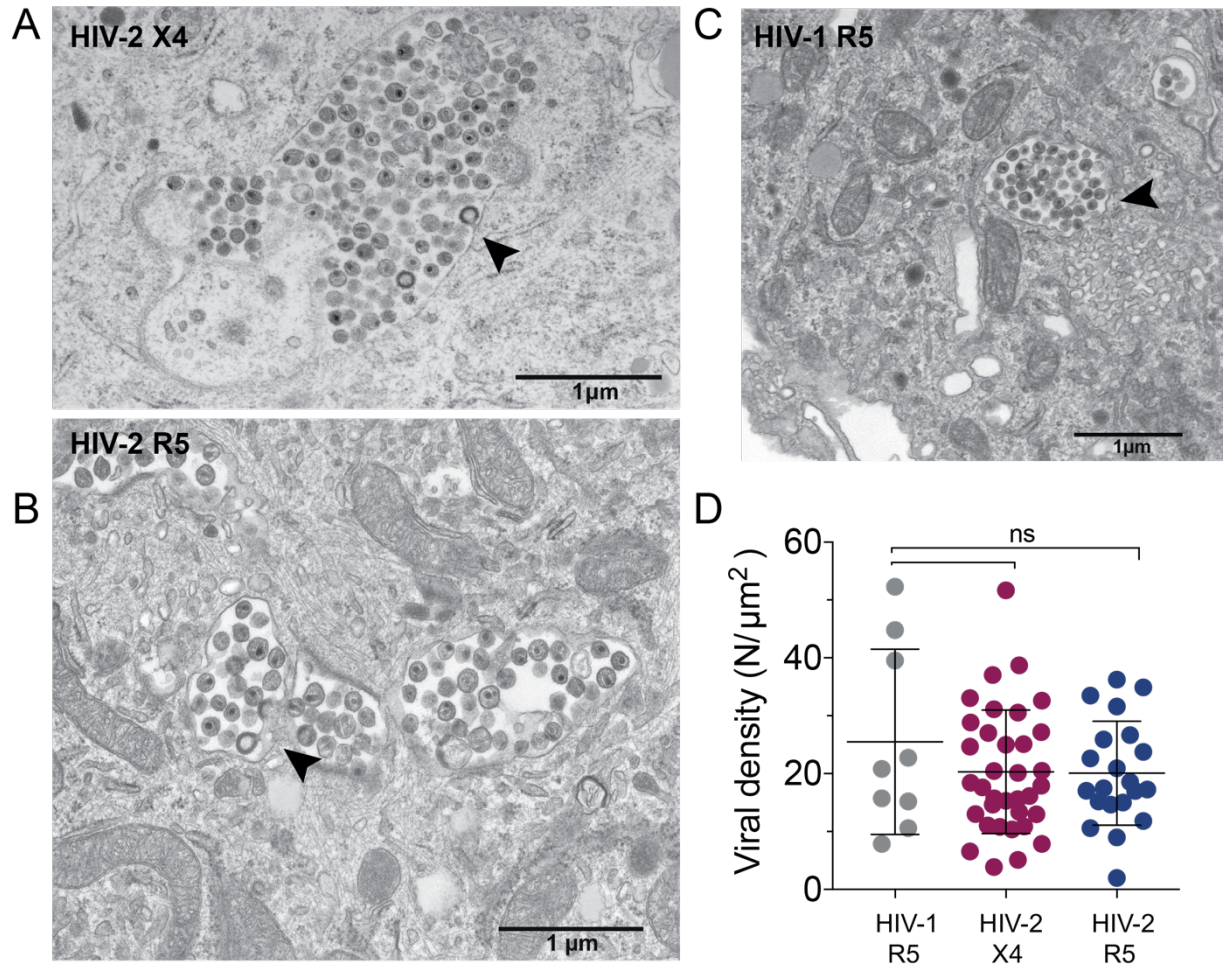


Figure 5 HIV-2 assembles and buds in bona fide VCC of MDMs.

(A, B and C) MDM infected with the indicated viruses for three days were fixed and processed to perform electron microscopy. A representative epon section of infected MDM is presented. Arrowheads point to nascent viral buds. (D) Epon sections of infected MDMs were used to quantify the viral density present within the VCCs. Each dot is a VCC. Bars represent mean $\pm$ SD. P values were calculated using Kruskal-Wallis multiple comparison non-parametric test. P value lower than 0.05 was considered as significant.

Figure 6

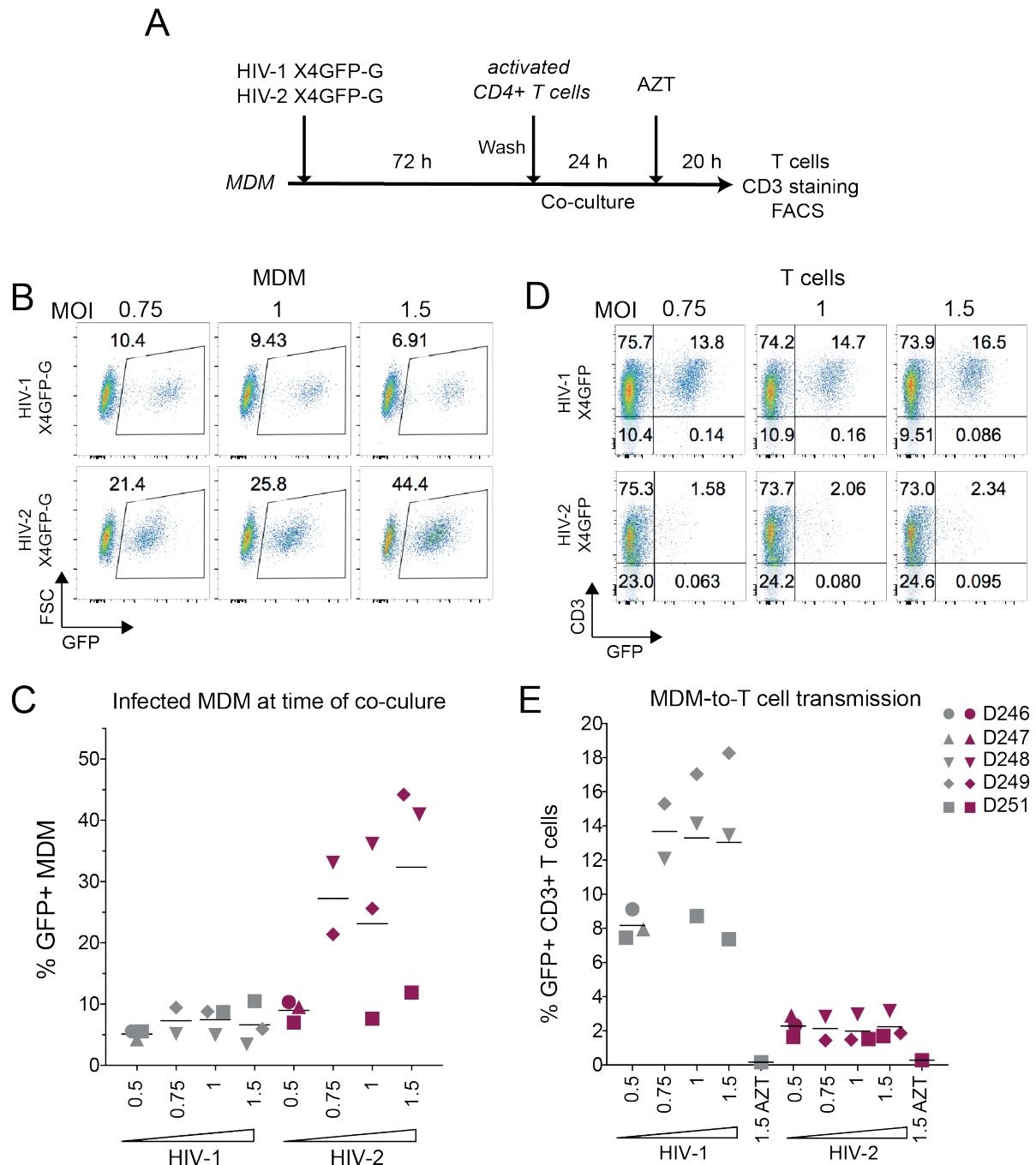


Figure 6 HIV-2 transmission from infected MDM to activated CD4+ T cells is inefficient. (A) Macrophage-to-T cell transmission, outline of the experiment. (B) MDM infected at three different MOI and with HIV-1 or HIV-2 X4GFP VSV-G were analyzed at 3 dpi by flow cytometry. Dot plot analyses of MDM from one donor are presented (percentages of GFP+ cells are indicated in the windows). (C) As in (B), percentages of GFP+ MDM at 3dpi, n=5 donors from 3 independent experiments with bars representing the mean. (D) Evaluation of the MDM transmission to T cells at the end of the co-culture experiments was performed by flow cytometry to determine the percentages of CD3+GFP+ T cells. Dot plot analyses for T cells from one donor that were co-cultured with MDM analyzed in (B). (E) As in (D), percentages of

CD3+GFP+ T cells after co-culture with infected MDM (see in C), n=5 donors from 3 independent experiments with bars representing the mean.

Figure 7

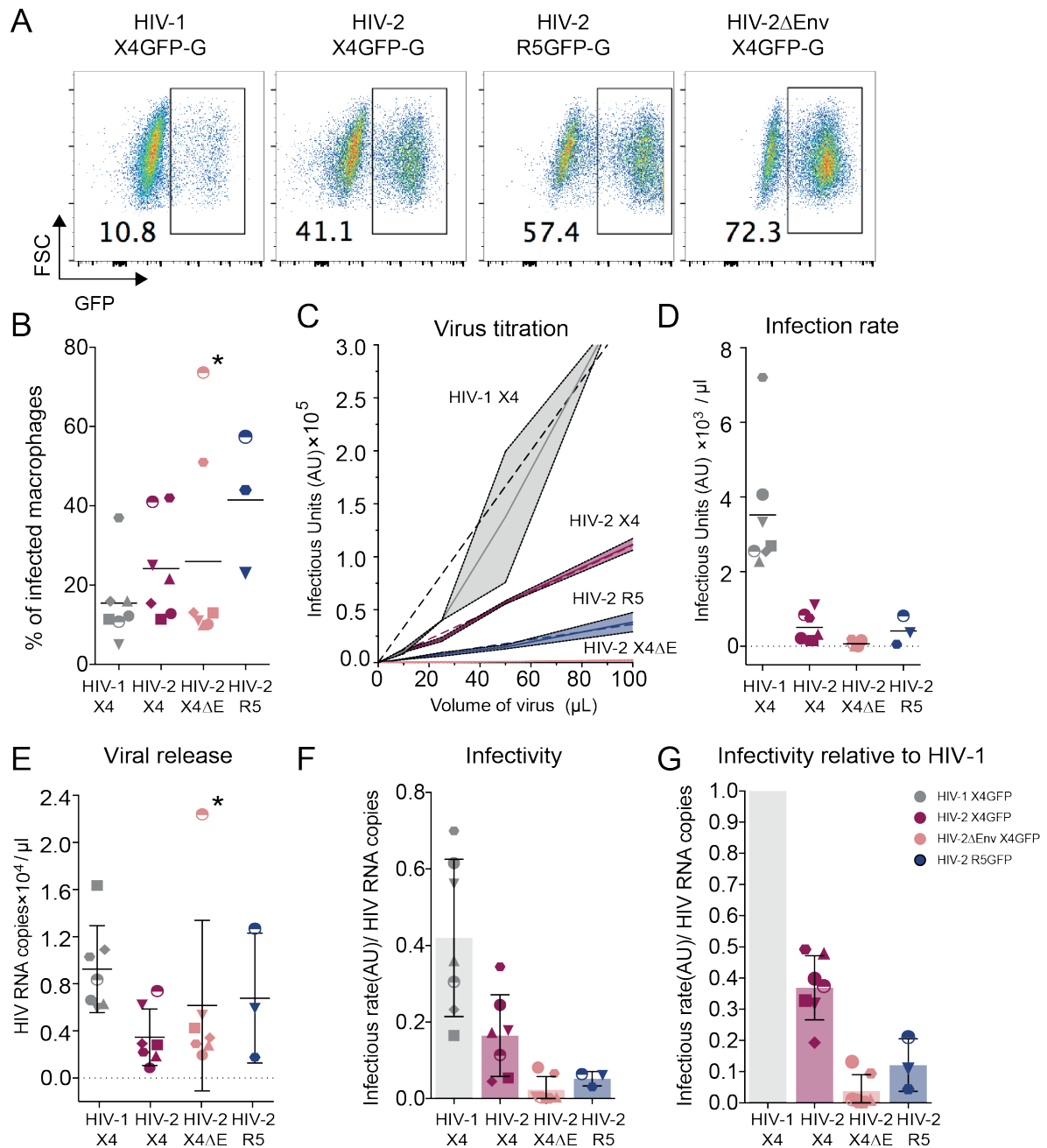


Figure 7 Infected MDM produce poorly infectious HIV-2 particles. MDM were infected with the indicated viruses. (A) At 3 dpi, rates of MDM infection were determined by flow cytometry. Dot plots obtained with MDM from one donor are presented with the percentages of GFP+ cells indicated. (B) Percentages of infected MDM, i.e. GFP+, at 3 dpi, $n=7$ donors (3 for HIV-2 R5) from 5 independent experiments, with bars representing the mean. Each symbol corresponds to a donor. (C) Titration of the virus present in the supernatant of MDM infected with the various viruses. Serial dilutions of supernatant from each type of HIV-infected MDM were titrated on the TZM-bl reporter cell line (MDM came from the same cells isolated from donor in A). We deduced from the titrations, the slopes that were considered as Infection rate (Infectious Units/μL). (D) Infection rates determined as in (C) with MDM from 7 donors. (E)

Viral release at 3 dpi in the supernatant of infected MDM evaluated by RT-qPCR. (F) Infectivity of the released viruses was calculated as follows: rate of infection/ HIV RNA copies. (G) Infectivity normalized to HIV-1 for each donor.

Figure 8

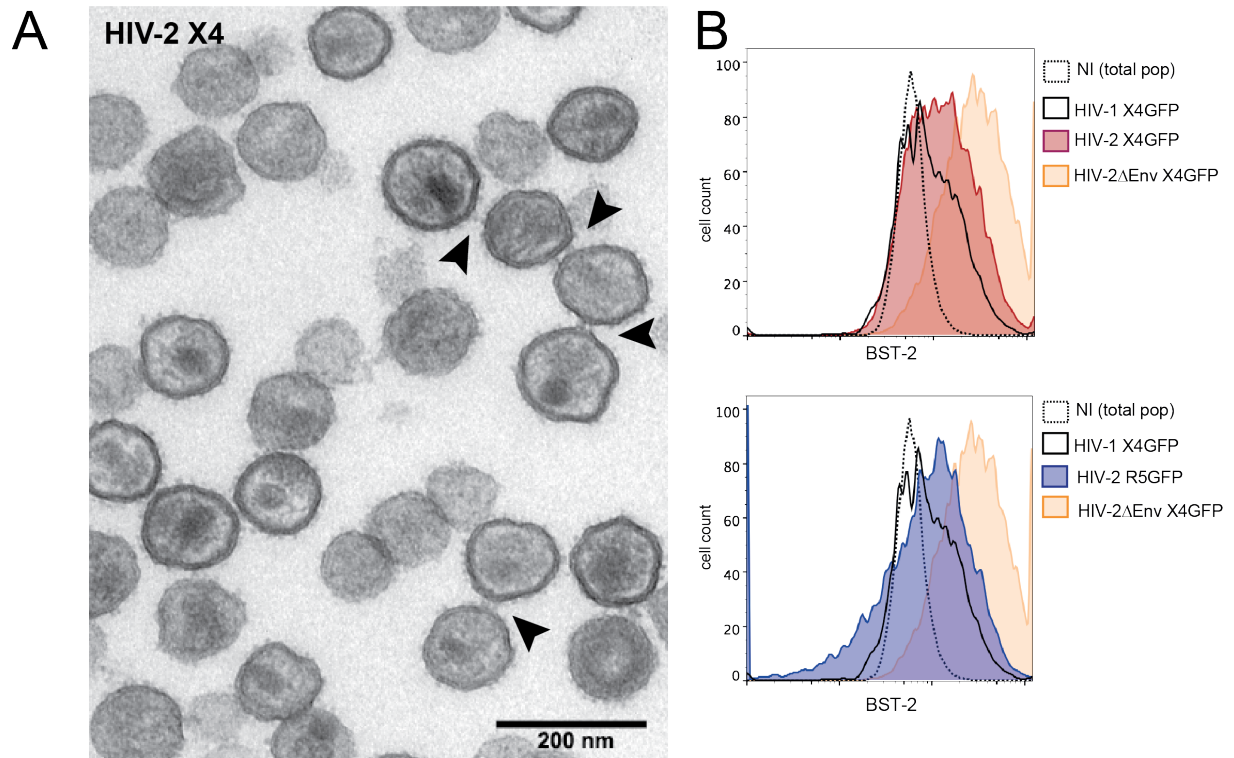


Figure 8 BST-2 expression in HIV-infected macrophages. (A) EM micrograph of an epon section in the vicinity of HIV-2 X4 VSV-G-infected MDM. Released particles appear tethered. Arrowheads point at visible connections between viral particles. (B) Flow cytometry overlay histograms of BST-2 expression by MDMs infected or not with the indicated HIV. HIV-1 X4GFP-infected MDMs were used as a positive control and HIV-2 ROD9ΔEnvGFP-infected MDMs as a negative one. To better visualize the differences, the two types of HIV-2-infected MDM are presented on two different overlays with the same controls.

Figure 9

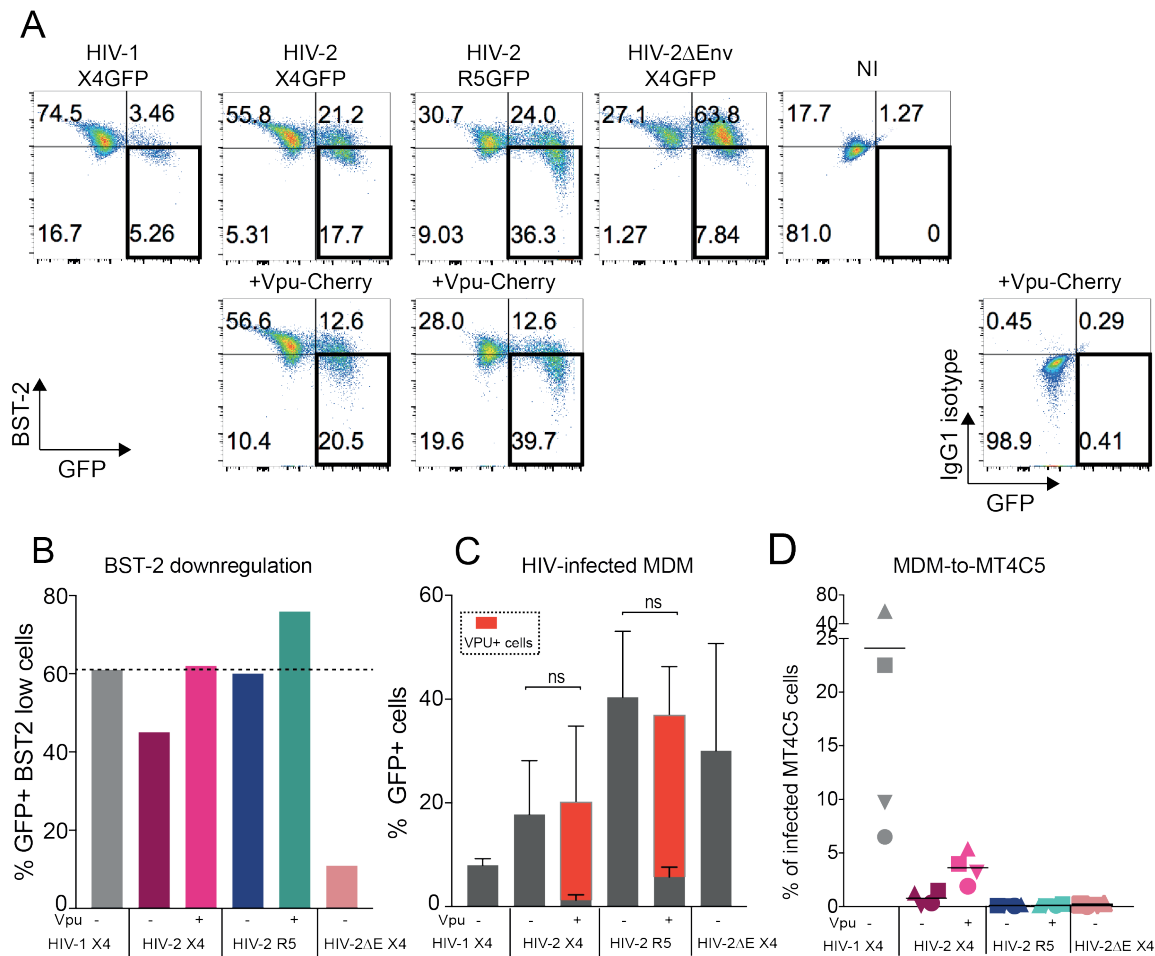


Figure 9 Supplying HIV-1 Vpu together with HIV-2 does not rescue viral transmission to T cells. (A) MDMs were infected with the indicated HIV or not (NI= non-infected) supplemented with VLP carrying the fusion protein Vpu-Cherry. At 3 dpi, cells were recovered and stained for BST-2. Flow cytometry dot plots obtained with MDM from one donor are presented. Percentages of cells are indicated in the quadrants. The GFP+BST-2low box is drawn in bold to ease comparisons. (B) Percentage values of GFP+BST-2low, see bold box in (A), are presented to evaluate BST-2 downregulation in the different populations. The dotted line corresponds to the level of BST-2 observed in HIV-1-infected MDM. (C) Rates of infection were evaluated by measuring the percentage of GFP+ MDM exposed or not to Vpu-Cherry VLP. Percentages of GFP+ cells and of GFP+Vpu+ (in red) are displayed. (D) MDM infected with the indicated viruses in the presence or not of VLP Vpu-Cherry were co-cultured at 3 dpi with the T cell line MT4C5, which is CD4+CCR5+CXCR4+. Percentages of MT4C5 cells expressing GFP+ after co-culture with macrophages, n=5 with bars representing the mean.

Figure 10

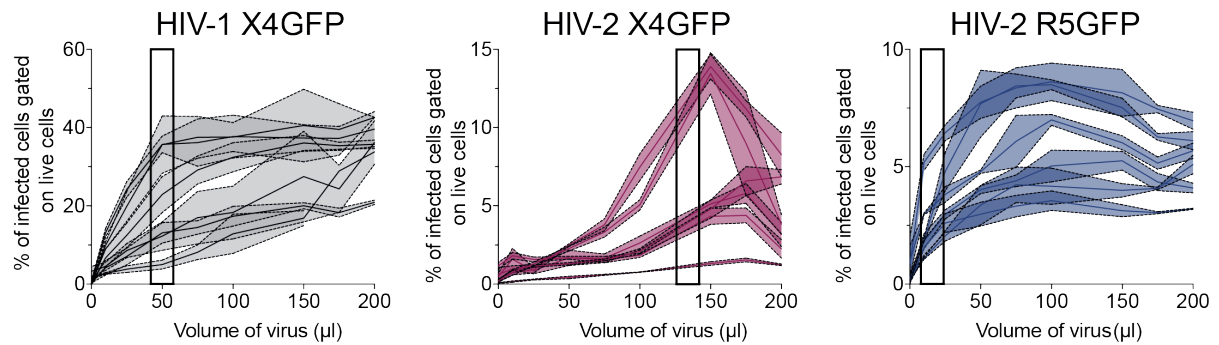


Figure 10 Activated primary CD4⁺ T cells are more resistant to HIV-2 infection than to HIV-1. Indicated viruses were produced by transfection of HEK293T cells and titrated first on GHOST reporter cells and in parallel on activated primary human CD4⁺ T cells. At 3 dpi cells were recovered and analyzed by flow cytometry. Vertical boxes indicate for each virus volumes of supernatant which generated similar levels of infected GHOST cells (see Fig S6A for GHOST titration and MDM viability assay).

Figure S1

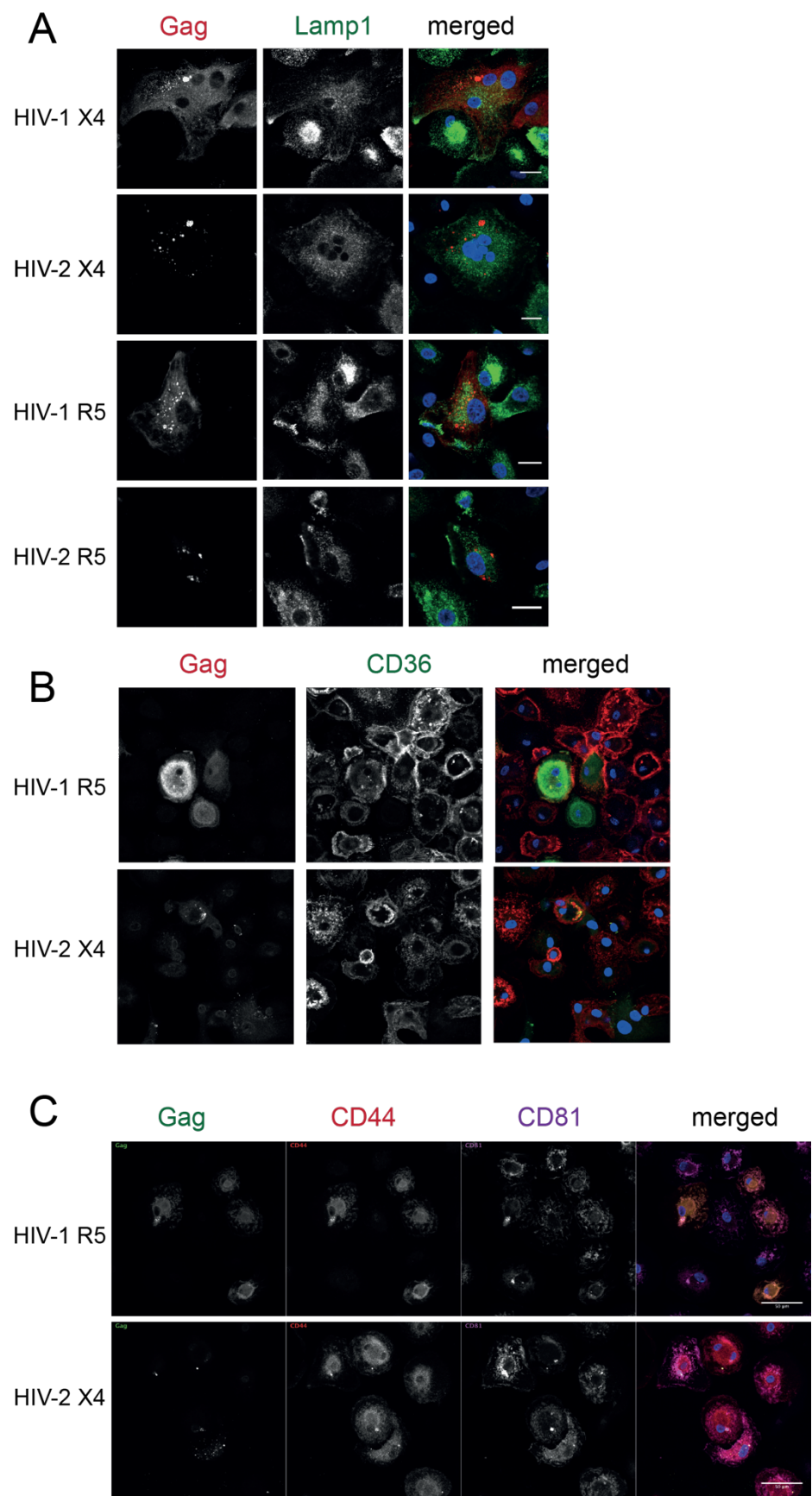


Figure S1 HIV-2 Gag localizes in Viral-Containing compartments.

(A, B and C) As in Fig 3A, MDMs were infected with the indicated viruses. At 3dpi, MDMs were stained for the indicated markers by immunofluorescence. Representative confocal sections are presented, bar = 20 μ m.

Figure S2

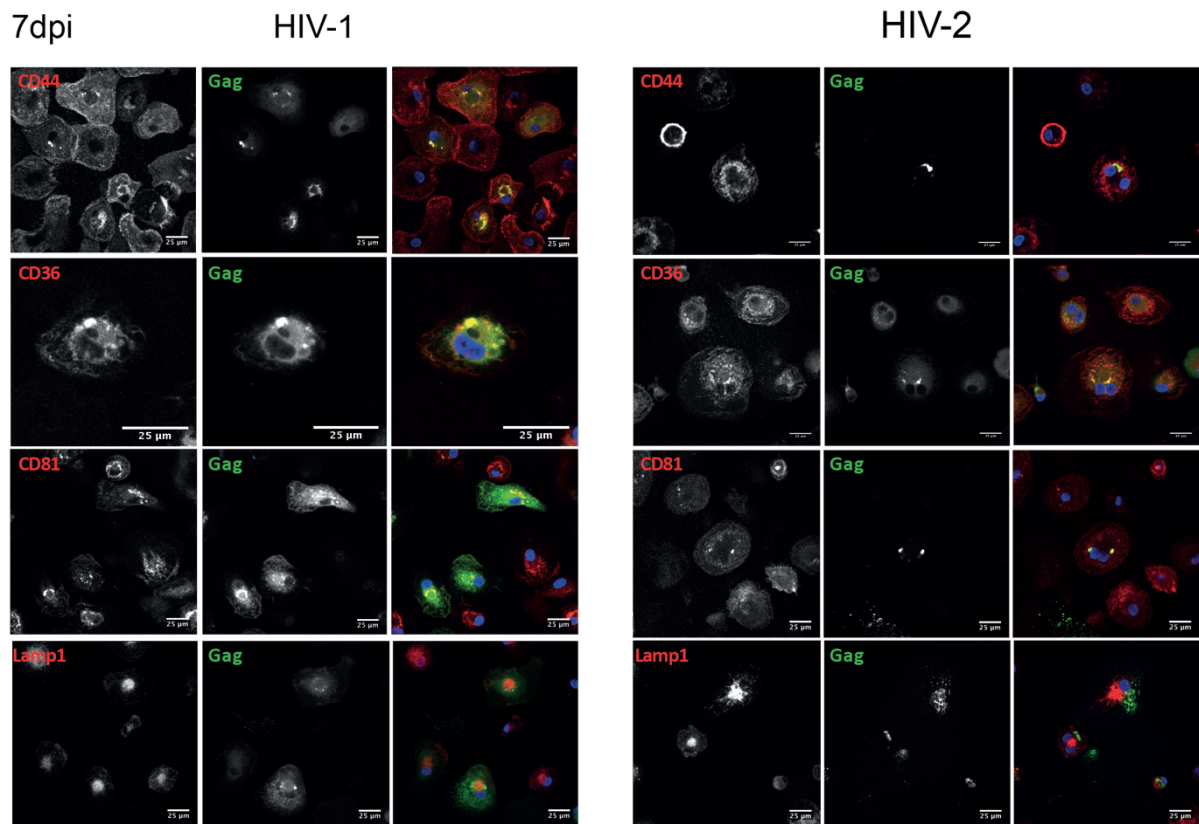


Figure S2 HIV-2 Gag localizes in Viral-Containing compartments at day 7 post infection. MDM were infected with HIV-1 R5 VSV-G and HIV-2 X4 VSV-G. At 7 dpi, MDMs were stained for the indicated markers by immunofluorescence. Representative confocal sections are presented, bar = 20 µm.

Figure S3

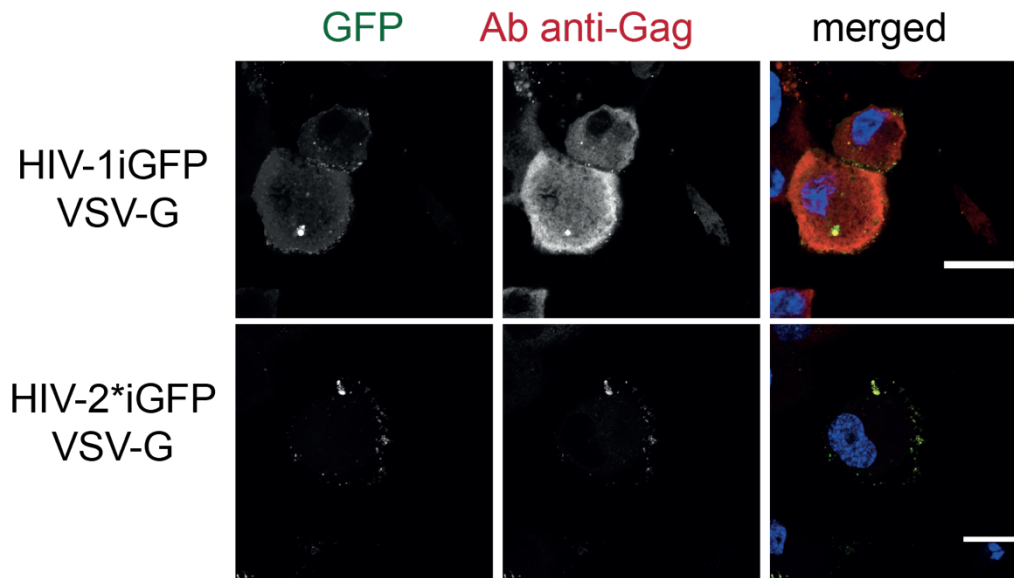


Figure S3 Anti-Gag antibody staining co-localizes with internally tagged HIV-2 in infected MDMs. MDMs were infected with HIV-1iGFP VSV-G or HIV-2iGFP VSV-G complemented with HIV-2ΔPsi. Both iGFP viruses carry a GFP encoding sequence inserted between the Matrix and the Capsid of the Gag precursor that is flanked by protease sites. However, HIV-2iGFP* requires to be mixed with wild type HIV-2 Gag precursor in the HEK293T cells to be properly assembled. At 3 dpi, MDM were fixed and stained with a mAb specific for Gag. Representative confocal sections are presented. Bar = 20 μ m*

Figure S4

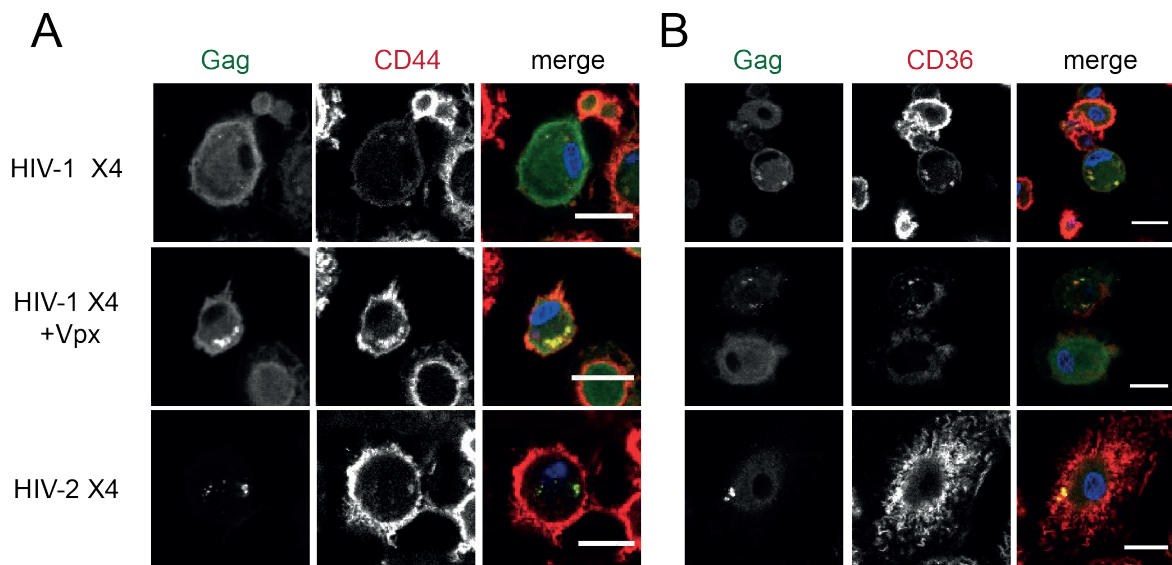


Figure S4 Vpx is not responsible for HIV-2 Gag rapid localization into VCCs. MDMs were infected with HIV-1 X4 VSV-G in the presence or absence of Vpx, or HIV-2 X4 VSV-G. At 3dpi, MDM were fixed and stained for the indicated markers. Representative confocal sections are presented. Bar = 20 μm

Figure S5

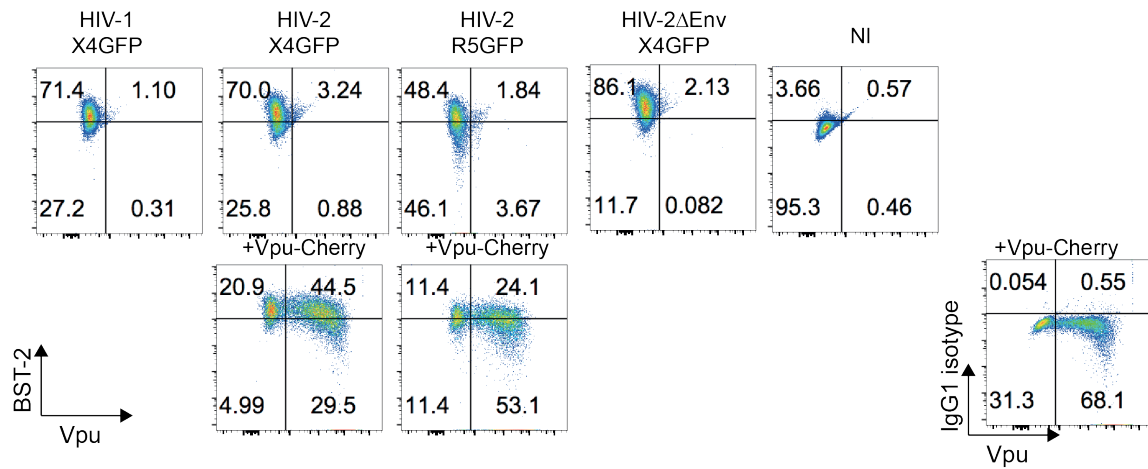


Figure S5 HIV-2-infected MDM complemented with HIV-1 Vpu. Corresponds to Fig 9A. MDMs were infected with the indicated HIV or not (NI= non-infected) supplemented with VLP carrying the fusion protein Vpu-Cherry. At 3 dpi, cells were recovered and stained for BST-2. Flow cytometry dot plots, Vpu-Cherry versus BST-2 obtained with MDM from one donor are presented. Percentages of cells are indicated in the quadrants. Cells expressing Vpu clearly downregulate BST-2 expression.

Figure S6

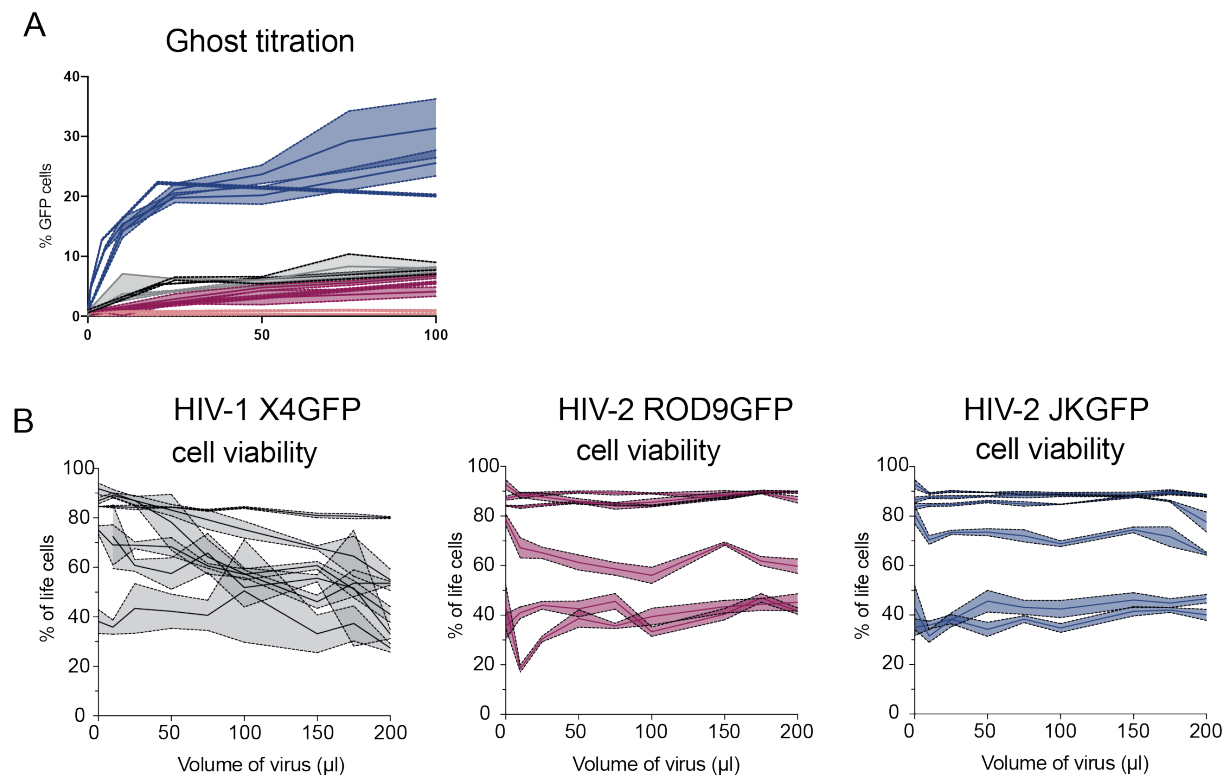


Figure S6 Activated primary CD4⁺ T cells are more resistant to HIV-2 infection than to HIV-1. HIV-1 X4GFP (grey lines), HIV-2 X4GFP (violet lines) and HIV-2 R5GFP (red lines) were produced by transfection of HEK293T cells and titrated first on GHOST reporter cells (A) and in parallel on activated primary human CD4⁺ T cells (see Fig 10). (B) Cell viability of HIV exposed primary T cells corresponding to experiments depicted in Fig 10).