

# LE SYSTEME IFN-I

virus. Dans une étude, des souris balb/c nude ont été inoculées avec une souche porcine de HEV-4 et des antigènes viraux ont été détectés au niveau du foie et dans d'autres sites extra

hépatiques <sup>202</sup>. De plus, des modifications histologiques au niveau du foie et de la rate et une augmentation du niveau des enzymes hépatiques ont été observées. De plus, très récemment, un modèle de souris chimérique possédant un foie humanisé a été développé. Pour cela, le foie de souris UPA/SCID a été repeuplé avec des hépatocytes primaires humains puis les animaux ont été inoculés avec des souches de HEV-1 ou HEV-3 <sup>203</sup>. Une excrétion du virus dans les fèces et une virémie ont été observées. Dans ce modèle, une transmission naturelle a été observée entre une souris infectée et trois souris humanisées naïves hébergées dans la même cage. L'exposition au HEV par voie orale ou micro lésions a permis de transmettre l'infection. De plus, les souris humanisées peuvent également développer des infections chroniques et être traitées avec succès avec de la ribavirine <sup>204,205</sup>. Ce modèle de souris humanisé semble donc être un bon outil pour étudier les infections chroniques et pour l'évaluation de traitements. Cependant, ce modèle ne permet pas les études d'immunopathogénèse impliquant des réponses immunitaires adaptatives. Des améliorations, telles que le transfert de cellules immunitaires, pourrait permettre de passer outre ces limitations dans le futur.

## LE SYSTEME IFN-I

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme face à des infections virales. Elle est basée sur des récepteurs cellulaires appelés PRR (*pattern-recognition receptors*) qui détectent des motifs spécifiques des pathogènes appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*), conduisant à la production de cytokines, comme les interférons de type I (IFN-I), qui vont jouer un rôle important dans la lutte antivirale en activant plusieurs voies de signalisation.

## A- Les interférons

L'interféron (IFN) a été décrit pour la première fois en 1957 par Isaacs et Lindenmann comme une substance produite par les cellules et capable d'interferer avec l'infection par le virus Influenza (IAV) <sup>206,207</sup>. Par la suite, il apparut que l'IFN n'était pas qu'une seule molécule mais représentait toute une famille de molécules. Il existe trois grands types d'IFN : les IFN de type I (IFN-I), les IFN de type II (IFN-II) et les IFN de type III (IFN-III).

Les IFN-I comprennent de nombreux sous types chez l'homme: l'IFN- $\alpha$  (qui peut être lui-même divisé en 13 sous-types différents : IFN- $\alpha$ 1,- $\alpha$ 2, - $\alpha$ 4,- $\alpha$ 5, - $\alpha$ 6,- $\alpha$ 7, - $\alpha$ 8,- $\alpha$ 10, - $\alpha$ 13,- $\alpha$ 14, - $\alpha$ 16,- $\alpha$ 17, - $\alpha$ 21), IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  et IFN- $\omega$ . Tous les IFN-I vont s'associer à un récepteur commun, le récepteur IFNAR (pour *Interferon alpha/beta receptor beta chain*). Les IFN-I sont induits suite à une infection par des microorganismes tel que les virus, bactéries, parasites. Ils présentent une expression différente en fonction des tissus, de l'espèce et n'ont pas tous la même affinité au récepteur IFNAR. Ils vont présenter des activités biologiques variées telles qu'une activité antivirale, antiproliférative, stimulatrice de l'activité cytotoxique de nombreuses cellules du système immunitaire, inductrice de gènes pro-apoptotiques et inhibitrice de gènes anti-apoptotiques <sup>208</sup>.

Au contraire il n'existe qu'un seul type d'IFN-II, l'IFN- $\gamma$ , qui va s'associer à un récepteur spécifique au niveau de la cellule, le récepteur IFN $\gamma$ GR (pour *Interferon gamma receptor*). L'IFN- $\gamma$  est principalement produit par les lymphocytes T (LT) après stimulation par des antigènes spécifiques et va jouer un rôle crucial dans la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative <sup>209</sup>.

Enfin la famille des IFN-III comprend l'IFN- $\lambda$ 1 (aussi connu comme interleukine-29 (IL-29)), - $\lambda$ 2 (connu aussi sous le nom d'IL-28A), - $\lambda$ 3 (aussi connu sous le nom d'IL-28B) et l'IFNL4. Ces différents sous-types vont s'associer à un troisième type de récepteur composé de deux chaînes : IFNLR1 (pour *IFN- $\lambda$  receptor 1*) et IL-10R $\beta$ , induisant ainsi des signaux similaires à ceux des IFN-I <sup>210</sup>.

## B- Les voies de signalisation du système IFN-I

### 1- L'induction de l'IFN-I

Les PRRs peuvent permettre de détecter des acides nucléiques et sont divisés en deux grandes catégories en fonction de leur localisation subcellulaire. Le premier groupe comprend de nombreux membres de la famille des TLRs (pour *Toll-like receptors*) qui sont localisés au niveau des membranes cellulaires et endosomales. Le deuxième groupe est présent au niveau du cytoplasme et comprend à la fois des PRRs qui vont détecter de l'ADN cytoplasmique, tels que le facteur l'ARN polymérase III, DAI (pour *DNA dependent activator of IRFs*), IFIT16 (pour *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 16*) et DDX41 (pour *DEAD-box helicase 41*) mais aussi des membres de la famille RLR (pour *RIG-I-like receptor*) qui vont détecter de l'ARN dérivé de pathogènes dans le cytosol.

#### *α- Les voies de signalisation dépendante des TLRs*

Les TLRs sont des protéines très conservées que l'on retrouve chez différentes espèces. Chez l'homme, 10 TLRs ont été identifiés. Ils sont présents dans les cellules immunitaires mais également dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Cependant, leur expression varie en fonction du type cellulaire. Les récepteurs TLR7 et TLR9 sont par exemple principalement exprimés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Les TLRs sont des protéines transmembranaires composées d'un ectodomaine N-terminal permettant la reconnaissance du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique C-terminal appelé TIR (pour *toll interleukin-1(IL-1) receptor*), responsable du signal envoyé à des adaptateurs situés en aval <sup>211</sup>. Parmi les 10 TLRs identifiés chez l'homme, 6 sont impliqués dans la reconnaissance des virus : Les TLR2 et 4 permettent la reconnaissance des virus au niveau de la membrane plasmique alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 permettent la reconnaissance des acides nucléiques au niveau des endosomes.

## Détection des PAMPs viraux par les TLRs

TLR2 et TLR4 vont permettre la reconnaissance de glycoprotéines virales à la membrane cellulaire. TLR4 a été initialement identifié comme le ligand des lipopolysaccharides (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries gram positives. Cependant, il a également été montré que TLR4 est impliqué dans la reconnaissance de nombreux virus notamment de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV) <sup>212</sup>, de la protéine d'enveloppe du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) <sup>213</sup>, du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) <sup>214</sup>, du virus Ebola (EBOV) <sup>215</sup> ou de la protéine NS1 du virus de la Dengue (DENV) <sup>216</sup>. De la même manière, TLR2 permet la reconnaissance de l'enveloppe de certains virus : la protéine hémagglutinine du virus de la rougeole (MV) <sup>217</sup>, le cytomégalovirus humain (hCMV) <sup>218</sup>, le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) <sup>219</sup>, le virus Epstein-Barr (EBV) <sup>220</sup>, la protéine nsp4 du rotavirus (RV) <sup>221</sup>, et les protéines Core et NS3 du HCV <sup>222</sup>.

Au contraire, TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés au niveau de la membrane des endosomes. Trois mécanismes peuvent être impliqués dans le transfert des acides nucléiques viraux vers les compartiments endosomaux : l'entrée de certains virus par endocytose et la dégradation des virions par des protéases pour libérer le génome viral <sup>223</sup>, l'entrée par un mécanisme de fusion membranaire conduisant à l'autophagie et à la dégradation des particules virales <sup>224</sup> et le transfert d'acide nucléique viral depuis la cellule infectée vers les pDCs via la formation d'exosomes <sup>225</sup>. L'autophagie consiste en la dégradation par la cellule d'une partie du matériel présent dans le cytoplasme par ses lysosomes. Une fois les acides nucléiques au niveau des endosomes, ils vont être reconnus par des TLRs différents en fonction de leur nature : ADN, ARN simple brin (ARNsb) ou ARN double brin (ARNdb).

TLR3 permet la reconnaissance des ARNdb <sup>226</sup>, pouvant correspondre au génome du virus ou à des intermédiaires réplicatifs. Il reconnaît notamment les ARNs du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) <sup>227</sup>, de HSV-1 <sup>228</sup> mais également l'ARN double brin synthétique poly(I :C) (pour *Polynosinic acid-cytidylic acid*) <sup>226</sup>.

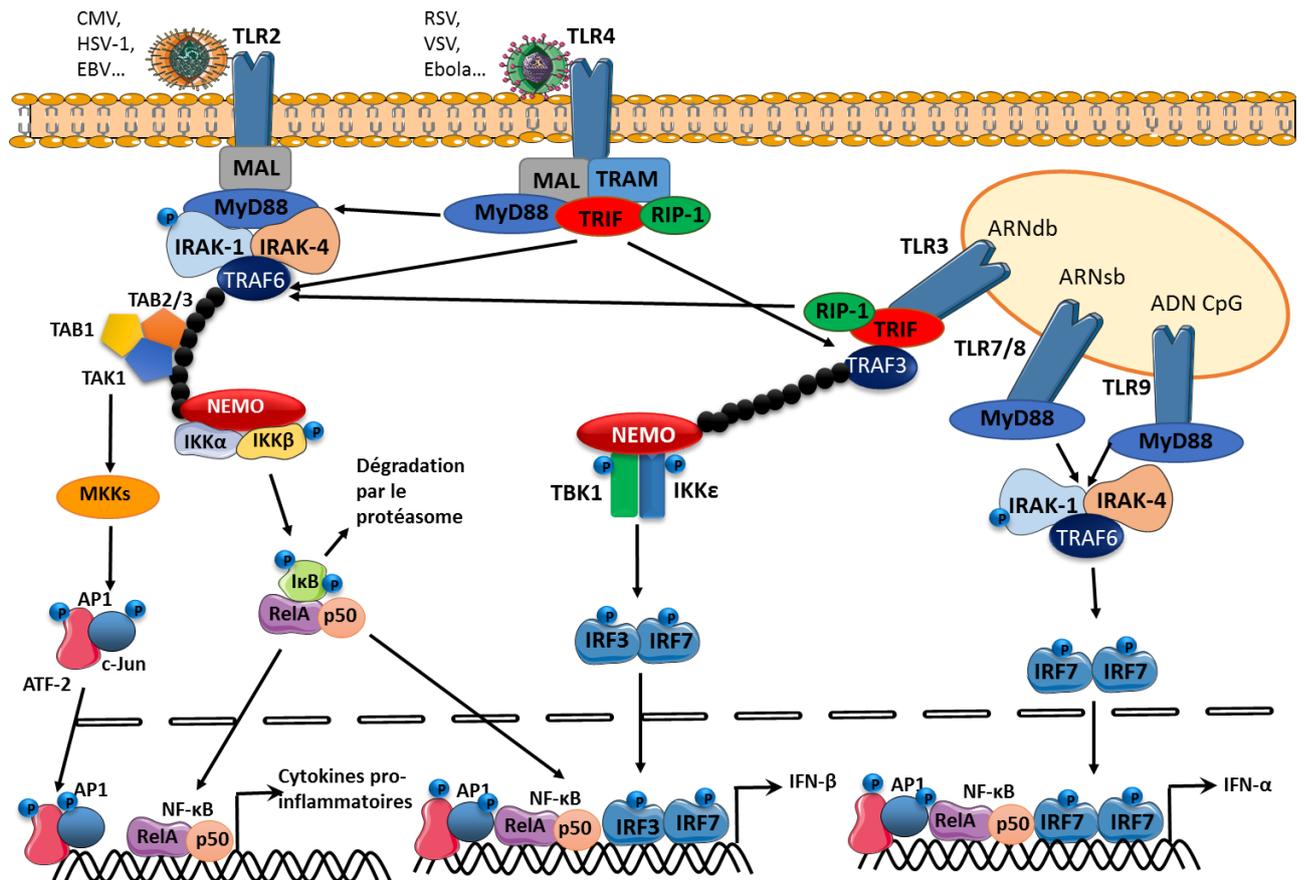
TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARNsb. Ils sont notamment capables de détecter les ARNsb du VIH, du IAV, du VSV <sup>229</sup>, du HCV <sup>230</sup> et du DENV <sup>231</sup>.

TLR9 reconnaît des motifs cytosine-guanosine non méthylés (CpG) souvent présents sur l'ADN des micro-organismes mais rares sur les génomes de mammifères, permettant ainsi la distinction hôte-pathogène. Ce récepteur est capable de reconnaître des virus à ADNdb comme le parapoxvirus ovis <sup>232</sup>, le cytomégalovirus murin (MCMV) <sup>233</sup>, HSV-1 et HSV-2 <sup>234</sup> et

EBV <sup>235</sup>. Quelques études ont également suggéré un rôle de ce TLR dans la détection du parvovirus, un virus à ADNsb <sup>236,237</sup>.

### **Voies de signalisation activées par les TLRs**

La stimulation des TLRs par leurs différents ligands va activer des cascades de signalisation, conduisant à l'induction de gènes impliqués dans la défense de l'hôte contre les micro-organismes. La liaison du ligand au TLR va induire leur dimérisation et entraîner un changement conformationnel conduisant au recrutement des adaptateurs contenant un domaine TIR qui se lie au domaine TIR du récepteur TLR. Il existe 4 molécules adaptatrices recrutées au niveau des TLRs : MyD88 (pour *Myeloid differentiation primary response 88*), TIRAP/MAL (pour *TIR-associated protein/MyD88 adaptator like*), TRIF/TICAM1 (pour *TIR-domain containing adaptator protein inducing IFN- $\beta$ /TIR-domain containing molecule 1*) et TRAM (pour *TRIF-related adaptator molecule*). MyD88 et TRIF sont responsables de l'activation de différentes voies de signalisation, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'IFN-I. Alors que TLR3 va induire l'activation de l'adaptateur TRIF, les TLR2, TLR7, TLR8 et TLR9 vont activer MyD88. TLR4 va quant à lui pouvoir activer les deux adaptateurs MyD88 et TRIF. Les deux adaptateurs vont conduire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (pour *nuclear factor kappa B*) alors que IRF3 (pour *interferon regulatory factor 3*) va être seulement activé par la voie dépendante de TRIF <sup>238</sup>. Les principales protéines impliquées dans les voies de signalisation activées par les TLRs et conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires et à la production d'IFN-I sont représentées figure 11.



**Figure 11. Voies de signalisation dépendantes des TLRs.**  
(Voir texte pour explications détaillées).

- Production de cytokines pro-inflammatoires

MyD88 est un adaptateur critique pour la signalisation via tous les TLRs sauf TLR3. Après une stimulation, MyD88 s'associe avec le domaine cytoplasmique des TLRs et recrute les protéines IRAK1 et IRAK4 (pour *IL-1-R associated kinase 1 et 4*) qui vont s'associer de manière homotypique. Dans la signalisation TLR2 et TLR4, un autre adaptateur TIRAP/MAL est requis pour le recrutement de MyD88 au récepteur<sup>239-242</sup>. Après l'association de IRAK1 avec MyD88, IRAK1 est phosphorylé par IRAK4, puis s'associe à TRAF6 (pour *TNF-R associated factor 6*), qui est une E3-ubiquitine ligase<sup>243</sup>. TRAF6, en association avec un complexe d'enzymes d'ubiquitylation, conduit à la polyubiquitylation de TRAF6 lui-même et de la protéine NEMO (pour *IKK-γ/NF-κB essential modulator*), conduisant à leur activation<sup>244</sup>. Un complexe comprenant TAK1 (pour *TGF-β-activated kinase 1*), et les protéines associées à TAK1 nommées TAB1, TAB2 et TAB3 (pour *TAK1-binding protein*) est alors recruté<sup>245</sup>. TAK1 phosphoryle IKK-β (pour *inductible IκB kinase β*), qui, en association avec IKKα, va phosphoryler la protéine IκB. Cette phosphorylation va induire l'ubiquitylation en

K48 de I $\kappa$ B, qui est alors dirigé vers le protéasome. NF- $\kappa$ B, constitué des sous-unités RelA (également appelée p65) et p50, va être libre d'entrer dans le noyau pour induire l'activation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire <sup>246</sup>. TAK1 va également induire la phosphorylation des kinases MAPK (pour *Mitogen-activated protein kinase*), conduisant à la phosphorylation du facteur de transcription AP1 (pour *activator protein 1*), aussi appelé ATF-2/c-Jun, qui va alors migrer dans le noyau pour activer l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

#### - Production d'IFN-I

La stimulation des récepteurs TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9 induit la production d'IFN-I en plus de signaux pro-inflammatoires.

La stimulation de TLR3 et TLR4 induit l'activation d'une voie de signalisation initiée par l'adaptateur TRIF <sup>247,248</sup>. TRAM, un autre adaptateur, est spécifiquement impliqué dans la voie de signalisation TLR4 <sup>249,250</sup>. TRAM s'associe avec TLR4 et TRIF, suggérant que TRAM est un adaptateur entre TLR4 et TRIF. D'un côté, TRIF interagit avec RIP-1 (pour *receptor-interacting protein-1*), qui est responsable de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B <sup>251</sup>. D'un autre côté, TRIF active la protéine TBK1 (pour *TRAF-family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) binding kinase 1*) via TRAF3 <sup>252,253</sup>. TBK1 s'associe avec IKK- $\epsilon$  et ces kinases phosphorylent directement IRF3 et IRF7 <sup>254,255</sup>. IRF3 et IRF7 phosphorylés forment des hétérodimères et sont transférés dans le noyau pour s'associer au promoteur IFN- $\beta$  et induire la production d'IFN- $\beta$ . Le promoteur IFN- $\beta$  contient également un site de liaison au facteur de transcription NF- $\kappa$ B et un site de liaison au facteur de transcription ATF-2/c-Jun, formant ainsi, avec les facteurs de transcription IRF3-IRF7, un complexe appelé « enhanceosome » qui joue un rôle crucial dans les phases précoces de l'induction de l'IFN- $\beta$  <sup>256,257</sup>. L'expression de l'IFN- $\alpha$  est au contraire principalement dépendante du facteur de transcription IRF7. Or l'expression basale de l'IRF7 est très faible dans la plupart des types cellulaires. La production initiale d'IFN- $\beta$  permet la production d'IRF7, qui permet dans un second temps la production d'IFN- $\alpha$ .

TLR7 et TLR9 sont très exprimés dans les pDCs et induisent la production d'IFN- $\alpha$ . Par ailleurs, la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , dépendante de TLR9, est dépendante de MyD88 mais n'implique pas TBK1 au contraire des signalisations par TLR3 et TLR4. Dans les pDCs, IRF7 présente un niveau d'expression basale plus élevé que dans les autres types cellulaires, permettant ainsi

une forte production d'IFN- $\alpha$  dès l'activation primaire des TLRs. Après stimulation, un complexe comprenant MyD88, IRAK-4, IRAK-1, TRAF6 et IRF-7 est formé et recruté au TLR7/9 <sup>258,259</sup>. TLR8 est physiologiquement proche de TLR7 et active des voies de signalisation similaires.

#### *b- La voie de signalisation RLR*

Les trois membres de la famille des récepteurs cytoplasmiques RLR sont RIG-I (pour *retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (pour *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) et LGP2 (pour *laboratory of genetics and physiology 2*). Ces trois RLRs contiennent des structures très conservées, notamment une région centrale hélicase de la famille des DExD/H-box et une région C-terminale (CTD pour *C-terminal domain*) qui confère la spécificité au ligand. Du côté N-terminal de RIG-I et MDA5 on trouve deux domaines CARD (pour *caspase activation and recruitment domain*) qui permettent la signalisation vers les adaptateurs situés en aval. LGP2 ne possédant pas de domaine CARD, il a pendant longtemps été considéré comme un régulateur négatif de la voie de signalisation RLR. Cependant, des études plus récentes ont montré que LGP2 pourrait avoir un rôle activateur sur MDA5 <sup>260</sup>. En effet, LGP2 agirait en synergie avec MDA5 pour détecter les acides nucléiques étrangérés et ainsi induire la réponse antivirale cellulaire.

#### **Détection des PAMPs viraux par les RLRs**

Les récepteurs RIG-I et MDA5 ne reconnaissent pas forcément les mêmes virus. RIG-I permet la reconnaissance de virus de la famille des *Paramyxoviridae* comme le virus Sendai (SeV) et le virus de la maladie de Newcastle (NDV), des virus de la famille des *Flaviviridae* comme le virus de l'encéphalite Japonnaise (JEV) et le HCV et des virus de la famille des *Rhabdoviridae* comme le VSV. MDA5 détecte quant à lui des virus de la famille des *Picornaviridae* comme le virus de la Polio (PV) et EMCV. Certains virus, comme le Reovirus, le DENV et le virus West Nile (WNV) <sup>261</sup> sont reconnus par les deux récepteurs. Les deux récepteurs reconnaissent des ARNdb mais de tailles différentes : les longs fragments (>4kb) sont préférentiellement reconnus par MDA5 alors que les petits fragments (~300pb) présentant une extrémité 5'-triphosphate ou 5'-diphosphate sont reconnus par RIG-I <sup>262-264</sup>. Les ARNm présents dans les cellules présentent une coiffe en 5'. Ils n'ont donc pas d'extrémité 5'-triphosphate libre, ce

qui permet de les discriminer. RIG-I permet également la reconnaissance des ARN cappés mais dont la position 2'-ribose du premier nucléotide n'est pas méthylée<sup>265,266</sup>. Une autre structure essentielle pour la reconnaissance des acides nucléiques par RIG-I est la présence d'une courte séquence d'ARNdb, d'au moins 10pb<sup>267</sup>. De plus, une autre catégorie d'ARN permet l'activation de RIG-I : les ARN courts présentant des extrémités 5'-hydroxyl (5'-OH) et 3'-monophosphoryl qui sont produits par le clivage d'ARNsb par la ribonucléase L (RNase L)<sup>268,269</sup>. En effet, La RNase L, activée pendant la réponse IFN-I, clive les ARNsb viraux ou cellulaires, permettant la génération de petits fragments d'ARN<sup>268</sup>. Ces petits fragments d'ARN peuvent être reconnus par RIG-I et MDA5, permettant ainsi l'amplification de la réponse immunitaire. Les ligands de RIG-I peuvent donc être, en fonction du type cellulaire et des conditions, soit le génome viral complet, soit des intermédiaires de la réplication, soit des transcrits viraux ou soit de l'ARN clivé par la RNase L.

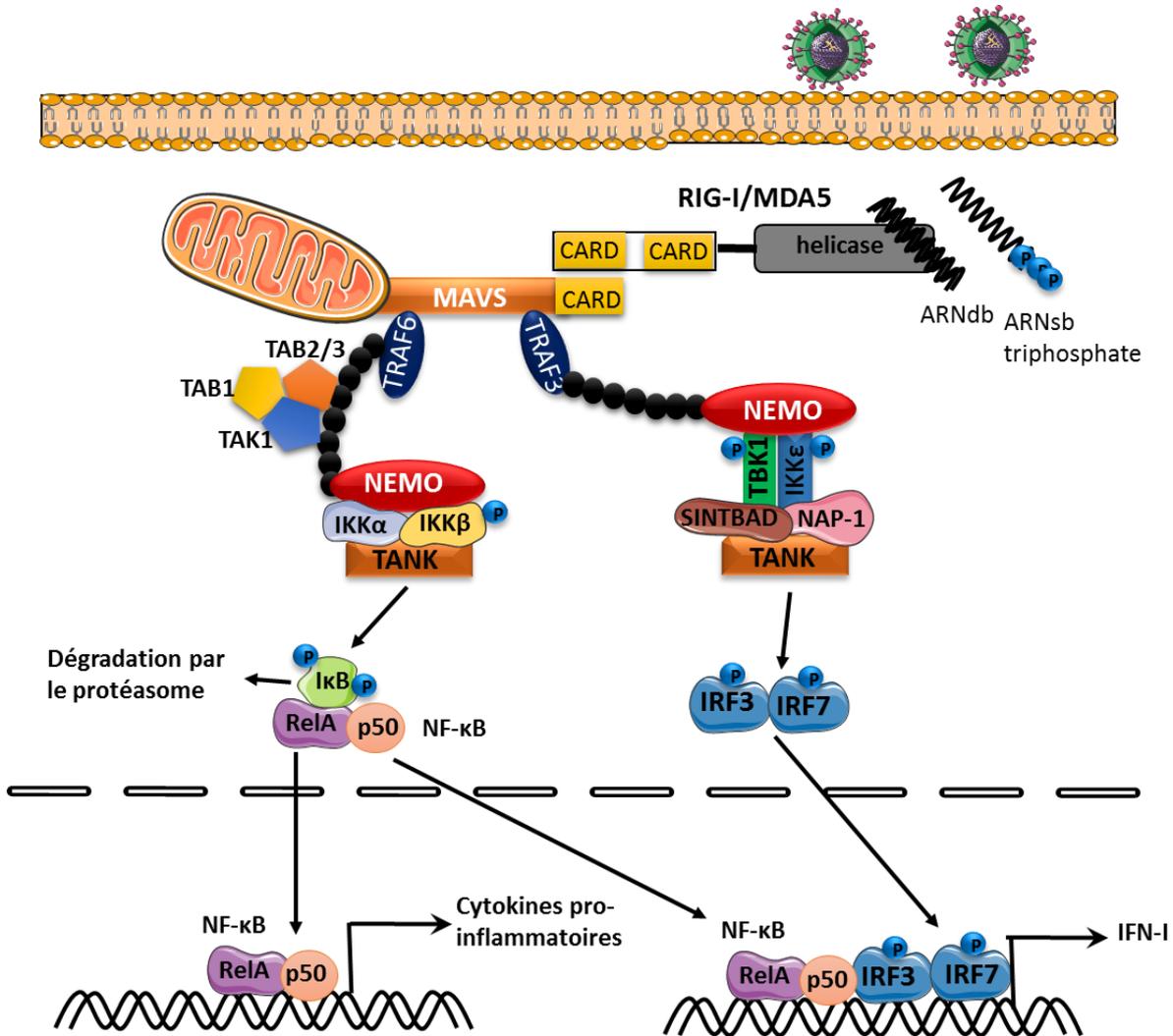
Au contraire, les ligands de MDA5 ne sont pas très bien caractérisés. MDA5 reconnaît les longs fragments d'ARNdb<sup>263,270</sup>. Certains virus peuvent produire des ARN de hauts poids moléculaire pendant la réplication. Ces ARN de hauts poids moléculaires, composés d'ARNsb et d'ARNdb, formant des structures en réseau, sont reconnus par MDA5<sup>271</sup>.

### **Signalisation des RLRs**

Les voies de signalisation induites par RIG-I et MDA5 sont représentées figure 12. RIG-I possède des domaines CARD qui permettent l'activation de la voie de signalisation RLR. Sans la présence d'un ligand au niveau de la région CTD, les domaines CARD sont dans une conformation d'auto-répression ou la région N-terminale du domaine CARD2 interagit avec la région C-terminale du domaine CARD1<sup>272</sup>. La reconnaissance d'un ARN étranger entraîne un changement de conformation du récepteur qui permet la libération des domaines CARDS. Les domaines CARDS sont alors disponibles pour la polyubiquitinylation par les protéines E3-ubiquitine ligases TRIM25 (pour *tripartite motif protein 25*) et Riplet<sup>273-275</sup>. La liaison aux chaînes de polyubiquitine est une étape requise pour l'activation des domaines CARDS<sup>276</sup> (voir partie II-C-1-a-).

L'activation des domaines CARDS permet l'activation de l'adaptateur MAVS<sup>277-280</sup> (pour *mitochondrial antiviral signaling*, également connu sous le nom IPS-1, CARDIF et VISA). MAVS comporte un domaine CARD à son extrémité N-terminale, suivi d'un domaine riche en proline et d'une région transmembranaire à son extrémité C-terminale qui permet la

localisation de MAVS sur la membrane externe de la mitochondrie. L'interaction homotypique entre le domaine CARD de MAVS et les domaines CARDS de RIG-I et MDA5 est requise pour l'activation de MAVS.



**Figure 12. Voies de signalisation dépendante des RLRs.**

(Voir texte pour explications détaillées.)

MAVS va servir de plateforme pour le recrutement de nombreuses protéines TRAF, notamment TRAF2, TRAF3, TRAF5 et TRAF6 <sup>281</sup>. Les protéines TRAF sont des E3-ubiquitine ligases, elles vont induire le recrutement de NEMO au niveau de MAVS via des réactions d'ubiquitinylation. NEMO active les complexes IKKα/IKKβ et TBK1/IKKε, conduisant respectivement à l'activation de la voie NF-κB et IRF3/IRF7 <sup>281</sup>. D'un côté, l'engagement de TRAF3 va permettre l'activation des protéines kinase TBK1 et IKKε. Le complexe, composé également des protéines NEMO, NAP-1 (pour *NF-κB activating kinase associated protein 1*) et SINTBAD (pour *similar to NAP-1 TBK1 adaptor*) <sup>282</sup> va alors phosphoryler IRF3 et IRF7

induisant un changement de conformation, leurs dimérisation, leur translocation dans le noyau et la transcription des gènes codant pour l'IFN- $\beta$ . D'un autre côté, l'engagement de TRAF6, en s'associant avec la kinase TAK1 et les protéines TAB1, TAB2 et TAB3 conduit, par l'intermédiaire de la protéine TANK (pour *TRAF-family member-associated NF- $\kappa$ B activator*), au recrutement du complexe IKK composé d'IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ . Cela va conduire à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, conduisant à la production de cytokines pro inflammatoires.

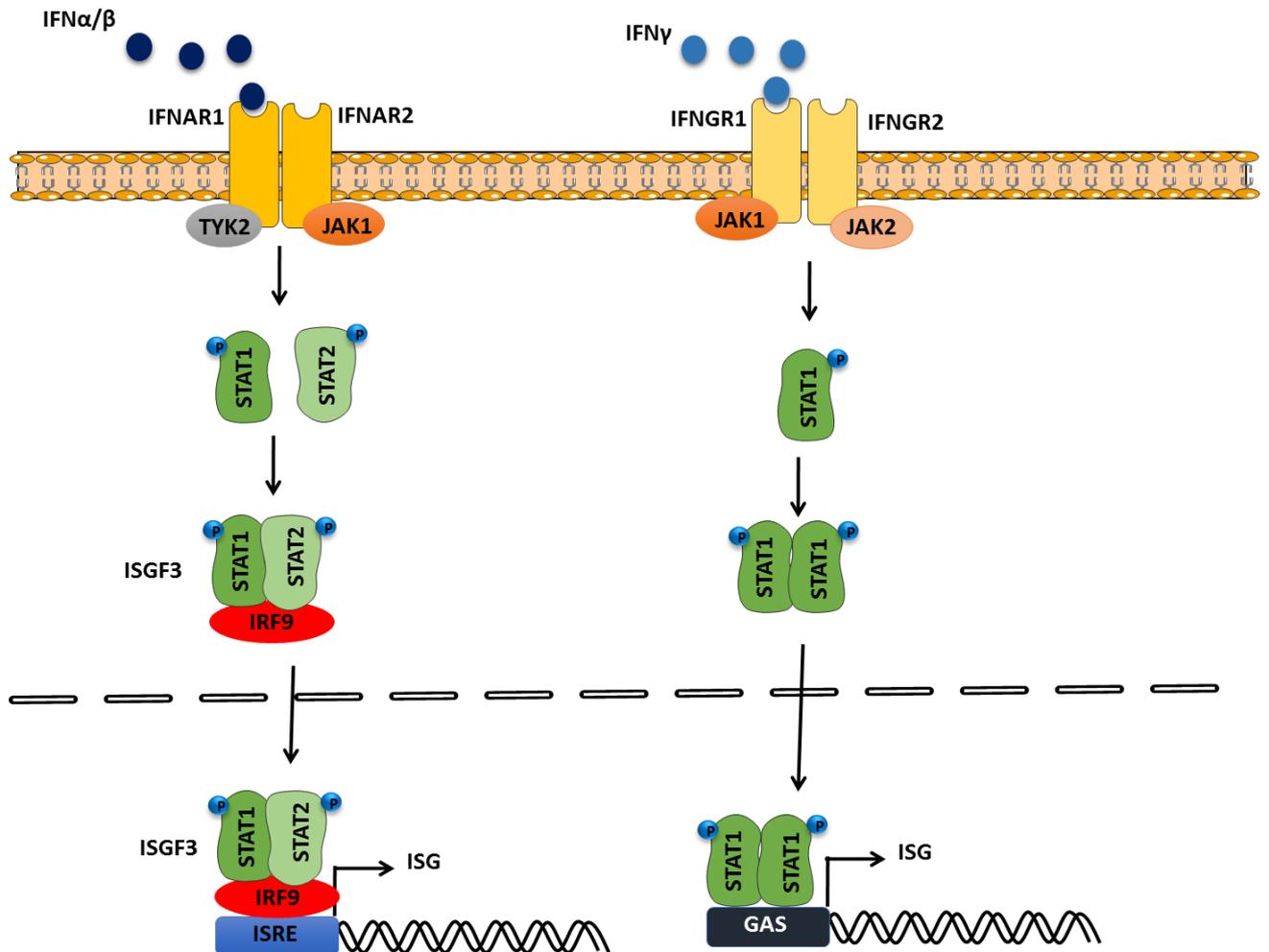
## 2- La signalisation IFN

Une fois l'IFN produit, il va s'associer à son récepteur présent à la surface des cellules. Le récepteur IFNAR va permettre la réponse aux IFN- $\alpha$  et  $\beta$  (IFN-I) alors que le récepteur IFNGR va permettre la réponse à l'IFN- $\gamma$  (IFN-II). Les voies de signalisation induites par les IFN-I et IFN-II sont représentés figure 13.

### $\alpha$ - La voie de signalisation induite par l'IFN-I

Le récepteur à l'IFN-I est composé des deux sous unités IFNAR-1 et IFNAR-2, exprimées dans la plupart des tissus <sup>283</sup>. En fonction des tissus, les récepteurs IFNAR n'ont pas le même niveau d'expression au niveau de la membrane plasmique et les différents types d'IFN n'ont pas tous la même affinité pour les récepteurs IFNAR-1 et 2. En l'absence de stimulation, les sous-unités IFNAR-1 et IFNAR-2 sont respectivement associées aux protéines kinases TYK2 (pour *non-receptor tyrosine-protein kinase 2*) et JAK1 (pour *Janus kinase 1*) <sup>284,285</sup>. L'association de l'IFN-I (principalement l'IFN- $\alpha$  ou l'IFN- $\beta$ ) à l'une des sous unités IFNAR1 ou 2 induit le recrutement de l'autre <sup>286</sup>, leur dimérisation et un changement de conformation <sup>287</sup>, conduisant au rapprochement de JAK1 et TYK2. TYK2 est ensuite phosphorylé sur les tyrosines 1054 et/ou 1055 par un mécanisme dépendant de JAK1 <sup>288-290</sup>. TYK2 phosphoryle ensuite JAK1 sur la tyrosine 1022/1023. Les kinases activées vont phosphoryler les queues cytosoliques des récepteurs IFNAR1 (Tyr 466) et IFNAR2 (Tyr 510) <sup>289,291-294</sup>. Ceci va induire le recrutement de STAT2 (pour *signal transducer and activator of transcription 2*) sur IFNAR1, qui va être à son tour phosphorylé sur la tyrosine 690. STAT1 est ensuite recruté et phosphorylé au niveau de la tyrosine 701 (Tyr701) <sup>289,295,296</sup>. Les protéines STAT1 et STAT2 activées vont ensuite s'associer entre elles, et s'associer à une troisième protéine, IRF9, ce

qui va former le complexe ISGF3 (pour *interferon-stimulated gene factor 3*). Le complexe va ensuite être transféré dans le noyau et s'associer au promoteur ISRE (pour *IFN-stimulated response element*), ce qui va induire la transcription de plus de 300 gènes cibles, les ISGs (pour *interferon stimulated genes*), dont les produits sont des effecteurs de la réponse antivirale <sup>297</sup>.



**Figure 13. Les voies de signalisation conventionnelle de réponse à l'IFN-I et IFN-II.**

D'autres protéines STATs peuvent être impliquées dans la signalisation IFN-I, notamment les protéines STAT3, STAT4, STAT5 et STAT6. En fonction du type cellulaire, différents complexes peuvent être formés entre ces différentes STATs : Des homodimères STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5, STAT6-STAT6 mais également des hétérodimères STAT1-STAT3, STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3 et STAT5-STAT6 <sup>298,299</sup>. Des études ont suggérées que différentes combinaisons de STATs induisent la transcription de différentes ISGs <sup>299</sup>.

De plus, d'autres voies de signalisation sont induites par l'IFN-I, notamment les voies MAPK et PI3K/AKT/mTOR<sup>299</sup>. Ces voies joueraient un rôle antiviral en régulant la différenciation et la croissance cellulaire.

#### *b- La voie de signalisation induite par l'IFN-γ*

La voie de signalisation induite par l'IFN-γ est représentée figure 13. L'activation des récepteurs à l'IFN-γ IFNGR1 et IFNGR2 induit l'activation des protéines kinases JAK1 et JAK2, constitutivement associée à IFNGR1 et IFNGR2, respectivement. L'activation des protéines kinases conduit à la phosphorylation de STAT1, et à la formation d'homodimères qui vont être relocalisés dans le noyau et s'associer au promoteur GAS (pour *IFN-γ-activated site*). Certains ISGs ne sont régulés que par ISRE ou GAS alors que d'autres sont régulés par les deux promoteurs. GAS active également l'expression d'autres gènes, autres que les ISGs.

#### *c- Fonction des ISGs et mécanismes d'action*

Les gènes induits par l'IFN, ou ISGs, jouent un rôle prédominant dans l'immunité innée. En effet, ils codent des protéines qui vont avoir de nombreux rôles antiviraux. Des centaines de protéines codées par les ISGs sont induites par l'IFN-I<sup>300</sup>. Certaines sont directement impliquées dans les voies de signalisation de l'IFN : c'est le cas par exemple de RIG-I, MDA5 ou STAT1, dont l'expression est augmentée suite à la stimulation IFN-I. D'autres ISGs permettent la modulation de ces voies de signalisation, c'est le cas de l'ISG15. Certaines vont également avoir une activité antivirale intrinsèque, comme la protéine PKR. Nous avons choisi ici de parler des protéines Mx, IFIT, OAS, PKR et de l'ISG15 car elles ont été bien caractérisées.

#### **Les protéines Mx**

La famille des protéines Mx (pour *Myxovirus resistant protein*) est très conservée chez les vertébrés. Chez la plupart des mammifères, il existe deux membres de la famille Mx, appelés MxA et MxB chez l'homme (Mx1 et Mx2 chez la souris). La protéine MxA a été identifiée dans un premier temps comme une protéine contenant une résistance au IAV<sup>301,302</sup>. Depuis, il a été montré que MxA et MxB sont capables d'inhiber de nombreux virus<sup>303</sup>. Les protéines

Mx sont des GTPases (pour *guanosine triphosphatase*) et cette fonction est le plus souvent requise pour leur activité antivirale <sup>304</sup>. Les protéines Mx peuvent avoir des activités antivirales différentes en fonction du virus ciblé. MxA séquestre la nucléocapside des virus Thogoto et IAV dans le cytoplasme, empêchant ainsi leur transport nucléaire <sup>305,306</sup>. Elle séquestre la protéine virale N du virus La Crosse (LACV) <sup>307</sup> et la protéine de capsid du HBV <sup>308</sup> dans des compartiments périnucléaires. Elle inhibe également la synthèse de l'ARNm viral du VSV <sup>309,310</sup>. MxB cible la capsid du VIH-1 pour bloquer l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte <sup>311</sup>.

### **Les protéines codées par la famille de gènes *IFIT***

La famille des protéines IFIT (pour *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*) est composée de 4 membres chez les mammifères : IFIT1 (également appelé ISG56), IFIT2 (ou ISG54), IFIT3 (ou ISG60) et IFIT5 (ou ISG58). Elles sont induites principalement par l'IFN-I et l'IFN-III et ont de nombreux rôles antiviraux <sup>312</sup>. En s'associant avec eIF3, IFIT1 et IFIT2 diminuent de 60% la traduction (coiffe dépendante et indépendante) des protéines virales <sup>312</sup>. IFIT1 et IFIT3 inhibent la réplication de nombreux virus à ADN et à ARN tels que le HBV, HCV, et le papillomavirus humain (HPV) <sup>312</sup>. De plus, les ARN présentant une extrémité 5'-triphosphate, ainsi que ceux présentant une coiffe non méthylée en position 2'O du premier ribose sont spécifiquement reconnus par IFIT1, suggérant un rôle dans la reconnaissance des virus <sup>313-315</sup>.

Les protéines de la famille IFIT ont également des rôles dans la régulation des voies de signalisation de l'IFN-I. En effet, IFIT3, en interagissant avec TBK1, le redirige vers MAVS à la mitochondrie <sup>316</sup>. IFIT5 régule positivement la voie NF-κB en interagissant avec TAK1 et IKK, permettant ainsi le recrutement du complexe IKK au niveau de TAK1 <sup>317</sup>. IFIT5 est également capable de s'associer directement à RIG-I et MAVS pour réguler positivement la voie <sup>318</sup>. Au contraire, IFIT1 semble être un régulateur négatif en inhibant l'interaction de MAVS et TBK1 <sup>319</sup>.

### **Les protéines OAS**

Les protéines OAS (pour *2',5'-oligoadenylate synthétase*) permettent également l'inhibition de différents types de virus <sup>320</sup>. Les OAS peuvent être considérées comme des PRRs. En effet, elles permettent la reconnaissance des ARNdb dans le cytoplasme. Les OAS s'associent

directement avec l'ARNdb, entraînant son activation et la synthèse de 2',5'-oligoadenylates, conduisant à la dimérisation et l'activation de la RNase L <sup>321</sup>.

### **La protéine PKR**

La protéine kinase PKR (pour *protein kinase regulated by RNA*) est également une protéine induite par l'IFN-I <sup>322</sup>. C'est une sérine/thréonine kinase composée d'un domaine N-terminal régulateur permettant la liaison aux ARNdb et d'un domaine C-terminal possédant une fonction catalytique <sup>323</sup>. En réponse à la stimulation par un ARNdb viral ou synthétique ou d'un autre stimulus (stress oxydatif, facteurs de croissances, cytokines, protéines cellulaires.... <sup>324</sup>), PKR se dimérise et s'autophosphoryle, ce qui induit un changement conformationnel conduisant à son activation. PKR va ensuite phosphoryler eIF2 $\alpha$  (pour *eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -subunit*), ce qui induit un blocage de la traduction des ARN cellulaires et viraux <sup>325</sup>.

Des études ont également suggéré que PKR pourrait avoir un rôle dans l'amplification de la réponse IFN. En effet, l'activation de PKR corrèle avec la phosphorylation de l'IRF3 <sup>326</sup>. Pour de nombreux virus à ARN positif, il a été montré que PKR est requise pour la production d'IFN- $\beta$  en réponse à l'infection virale et pour l'intégrité des ARNm codant pour l'IFN- $\beta$  <sup>327-329</sup>. De plus, PKR interagit avec des membres de la famille de protéines TRAF <sup>330</sup> et permet l'activation des voies NF- $\kappa$ B <sup>331</sup> et MAPK <sup>332</sup>. Les fonctions de PKR dans la détection des ARNdb et dans l'induction des voies de signalisation de l'IFN-I suggèrent que PKR reconnaîtrait directement des infections virales.

### **L'ISG15**

L'ISG15 est une petite protéine de 15kDa similaire à l'ubiquitine qui est rapidement induite après stimulation par l'IFN-I. L'ISG15 joue un rôle antiviral important contre différents virus par différents mécanismes.

L'ISG15 s'associe à de nombreuses protéines cellulaires pour moduler leur activité (processus d'ISGylation). La liaison de l'ISG15 à sa protéine cible nécessite l'intervention de 3 enzymes : E1 Ube1L <sup>333</sup>, E2 UbcH8 <sup>334</sup> et E3 Herc5 <sup>335,336</sup>. Par ailleurs, USP18 (pour *ubiquitin-specific protease 18*) est une enzyme permettant d'enlever l'ISG15 de sa cible (processus de déISGylation) <sup>337</sup>. La plupart des cibles sont des protéines impliquées dans l'épissage des ARN, le remodelage de la chromatine, la transcription, l'organisation du cytosquelette, la

réponse au stress cellulaire et la traduction <sup>338</sup>. L'ISG15 s'associe également à des protéines impliquées dans la lutte antivirale (voir paragraphe C-1-b).

En plus de réguler les voies de signalisation, l'ISG15 s'associe également à des protéines virales. L'ISG15 s'associe à la protéine Gag de HIV-1 ainsi qu'à la protéine Tsg101 du système ESCRT, compromettant ainsi l'assemblage de nouvelles particules virales <sup>339</sup>. L'ISG15 s'associe également à l'ubiquitine ligase Nedd4 pour inhiber l'ubiquitylation de la protéine VP40 du EBOV, empêchant ainsi son association avec le complexe ESCRT <sup>340,341</sup>. L'ISG15 inhibe également le relargage des particules d'ASLV (pour *avian sarcoma leukosis virus*) <sup>342</sup>. De plus, l'association de l'ISG15 à la protéine NS1 du virus IAV-A empêche la propagation du virus, en inhibant la liaison du virus avec l'importine- $\alpha$  et donc le transport de l'ARN viral au noyau <sup>343,344</sup>. La protéine de capsid de HPV est également ISGylée, et cette ISGylation corrèle avec une diminution du nombre de particules relargées et une diminution de l'infectiosité <sup>345</sup>.

De plus, l'ISG15 peut être également retrouvée sous forme libre dans le cytoplasme ou être relarguée dans le milieu extracellulaire où elle aurait une activité de cytokine <sup>346</sup> en stimulant la prolifération des cellules NK (pour *Natural killers*), en augmentant l'activité des cellules LAK (pour *lymphokine-activated killer*) et en stimulant la production d'IFN- $\gamma$  <sup>346-349</sup>. D'autre part, des études récentes semblent indiquer que l'ISG15 aurait un effet régulateur sur le système IFN-I. En effet, un déficit en ISG15 chez des patients <sup>350</sup> ou dans des lignées cellulaires induit une augmentation de la production d'IFN-I et donc une plus grande résistance aux infections virales <sup>351</sup>.

### C- Contrôle des voies de signalisation de l'IFN-I

Les réponses immunitaires non contrôlées pouvant être fatales pour l'hôte, la régulation de ces voies de signalisation est essentielle pour maintenir la réponse immunitaire à un niveau approprié. Ces dernières années, de nombreux régulateurs positifs et négatifs ont été identifiés. Ils permettent le contrôle des voies de signalisation de l'IFN à de nombreux niveaux et par différents mécanismes. Alors que certains régulateurs vont permettre l'amplification de l'activation des voies de signalisation, d'autres vont permettre un rétrocontrôle négatif sur l'activation de ces voies. Ces régulations incluent notamment des modifications post-traductionnelles de protéines.

## 1- *Modification post-traductionnelle de protéines*

Les protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IFN-I peuvent subir des modifications post-traductionnelles permettant la régulation positive ou négative de leur fonction. Ces modifications comprennent des phosphorylations, acétylations, méthylations, ubiquitylations, et d'autres modifications similaires à l'ubiquitylation tels que la SUMOylation (SUMO pour *Small ubiquitin-like modifier*) et l'ISGylation. L'ubiquitylation des protéines est un des mécanismes les plus étudiés. De plus, l'ISGylation semble être un mécanisme important dans la réponse antivirale de l'hôte.

### *α- Ubiquitylation des protéines*

L'ubiquitine, une petite protéine de 8,5KDa, a été caractérisée dans un premier temps comme un signal de dégradation par le protéasome<sup>352</sup>. L'ubiquitylation se fait selon un processus enzymatique dépendant de l'ATP. Les enzymes réalisant l'ubiquitylation sont appelées E1 (enzyme activatrice), E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) et E3 (ligase) et permettent la formation d'une liaison isopeptidique stable entre le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine cible<sup>353,354</sup>. L'ubiquitylation est un processus réversible et le mécanisme inverse est réalisé par des enzymes de déubiquitylation (DUBs)<sup>355</sup>. L'ubiquitine contient 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63), ce qui permet la conjugaison de plusieurs ubiquitines et donc la formation de chaînes de polyubiquitines. Les différentes chaînes de polyubiquitine formées n'ont pas toutes la même fonction. La polyubiquitylation en K48 est reconnue par la sous unité 26S du protéasome et est un signal pour la dégradation de la protéine ubiquitylée. Au contraire, la polyubiquitylation en K63 est un signal d'activation de la protéine cible. De même, l'ubiquitylation linéaire, qui correspond à la liaison de la molécule d'ubiquitine par son extrémité N-terminale à un résidu lysine de la protéine cible, régule positivement les voies de signalisation. Cependant, les fonctions des autres chaînes de polyubiquitine ne sont pas encore très claires.

L'ubiquitine module de nombreux processus cellulaires, notamment la régulation du trafic vésiculaire et la réparation de l'ADN mais également les voies de signalisation dépendantes

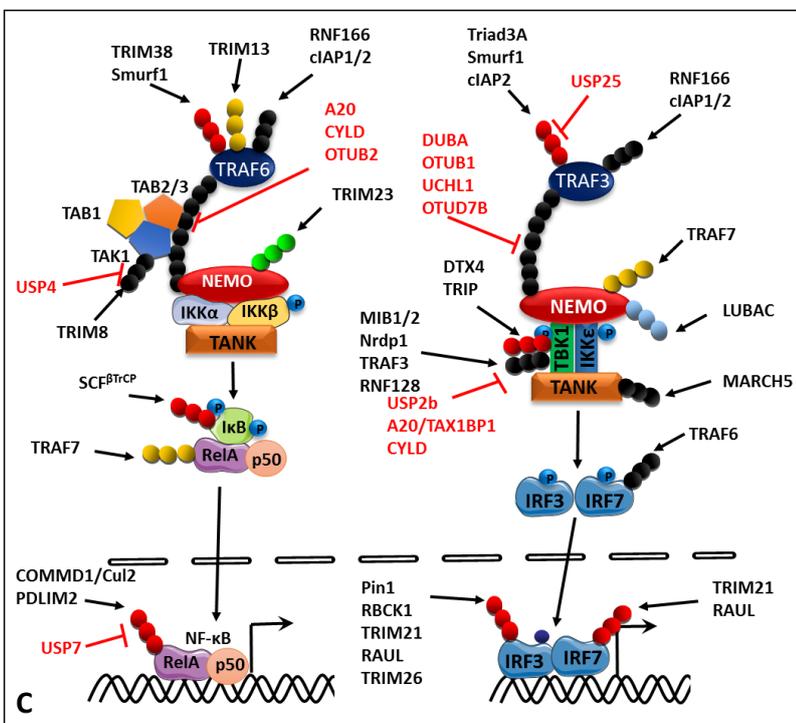
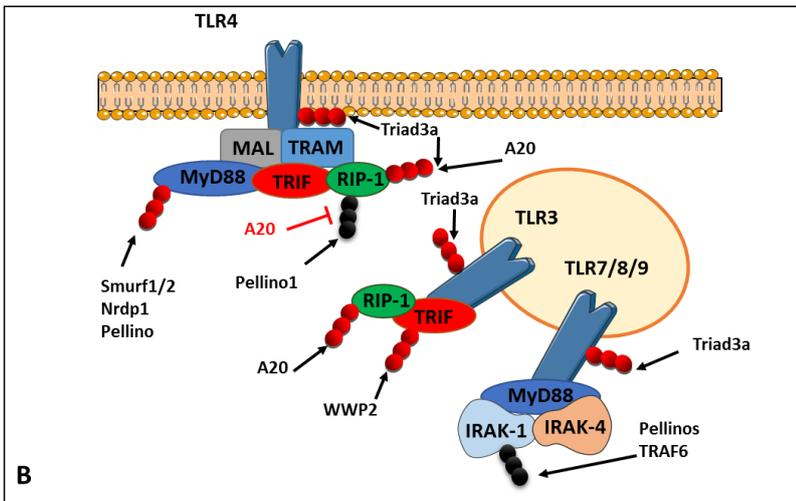
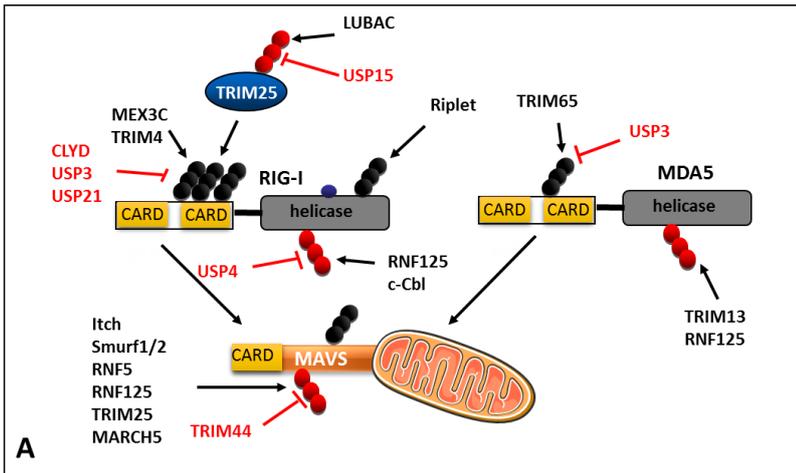
de l'IFN-I. Au vu de leur importance dans la régulation de nombreuses voies de signalisation, la régulation des enzymes réalisant l'ubiquitinylation est elle-même finement contrôlée afin d'éviter l'activation ou la dégradation inappropriée des protéines cibles. Des niveaux de régulation supplémentaires peuvent être mis en jeu, telles des modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter leur activation <sup>356</sup>. De plus, de nombreuses enzymes d'ubiquitinylation et de déubiquitinylation affectant les voies de signalisation de l'IFN-I sont induites par la stimulation IFN-I, permettant ainsi une amplification ou une inhibition de l'activation des voies en fonction des conditions.

## **Régulation de l'induction de l'IFN-I**

### Régulation des RLRs et de l'adaptateur MAVS

Les RLRs et l'adaptateur MAVS sont hautement régulés par différentes enzymes d'ubiquitinylation et de déubiquitinylation (Figure 14A). L'ubiquitinylation en K63 de RIG-I et MDA5 étant nécessaire à leur activité, de nombreuses E3 ubiquitine ligase catalysent cette réaction <sup>357</sup>. Au contraire, trois DUBs cellulaires enlèvent les ubiquitines en K63 liées à RIG-I pour réguler négativement la voie ont été identifiés <sup>357</sup>. Certains régulateurs vont induire une polyubiquitinylation de RIG-I et MDA5 en K48, conduisant à leur dégradation par le protéasome <sup>357,358</sup>. Cette polyubiquitinylation en K48 peut être également bloquée par une DUB USP4.

MAVS jouant une position centrale dans l'activation de la voie RLR, de nombreuses enzymes d'ubiquitinylation vont également le cibler <sup>357</sup>. La polyubiquitinylation en K63 permet le recrutement d'IKKε à la mitochondrie, son activation, et donc l'activation des voies de signalisation en aval. Au contraire, 7 E3 ubiquitine ligases ciblent MAVS pour la dégradation, via la polyubiquitinylation en K48 (Figure 14A). Cette polyubiquitinylation en K48 peut être ciblée par des DUB, telles que TRIM44, stabilisant ainsi MAVS.



**Figure 14. Régulation par des protéines cellulaires ayant des fonctions d'ubiquitylation (noire), déubiquitylation (rouge) et par l'ISGylation.**

**(A)** Régulation des RLRs et de leur adaptateurs. **(B)** Régulation des TLRs et de leur adaptateurs. **(C)** Régulation des protéines des voies de signalisation en aval des RLRs et des TLRs. Figure réalisée en utilisant différentes revues

335,336,344,345

### Régulation des TLRs et de leurs adaptateurs

Les TLRs sont peu touchés par des processus d'ubiquitylation/déubiquitylation (Figure 14B). TLR3, 4 et 9 sont ciblés par l'ubiquitine ligase Triad3A qui les polyubiquitylent en K48 pour entraîner leurs dégradation, permettant ainsi la régulation négative des voies de signalisation dépendantes des TLRs <sup>359</sup>. Les adaptateurs en aval des TLRs sont plus souvent touchés (Figure 14B).

### Régulation en aval des PRRs et des protéines adaptatrices

Les protéines TRAFs sont la cible d'ubiquitine ligases (Figure 14C). En effet, l'auto-ubiquitylation en K63 des protéines TRAFs est un mécanisme clé pour leur activation. De plus, il a récemment été montré que TRAF6 peut être polyubiquitylé en K29 par TRIM13 et que cette polyubiquitylation régule positivement les voies de signalisation en aval de TRAF6 <sup>360</sup>. Au contraire, certaines E3 ubiquitine ligases catalysent une polyubiquitylation en K48, induisant ainsi la dégradation des protéines TRAFs. TRAF3 et TRAF6 peuvent également être déubiquitylés par différentes DUBs cellulaires qui enlèvent les chaînes de polyubiquitine en K63 <sup>357</sup>. Au contraire, USP25 régule positivement TRAF3 en enlevant spécifiquement les chaînes de polyubiquitine en K48 <sup>361</sup>. Tous ces mécanismes permettent d'orienter l'activité des TRAFs. Les TRAFs activés vont ensuite permettre l'ubiquitylation d'autres protéines de la voie. TRAF6 activée va induire la polyubiquitylation en K63 de IRF7 et NEMO, induisant leur activation <sup>259</sup>. NEMO subit une polyubiquitylation linéaire par LUBAC (pour *linear ubiquitin assembly complex*), et cette polyubiquitylation est indispensable pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, alors qu'elle régule négativement la synthèse d'IFN- $\alpha$  <sup>357</sup>. TRIM23, en catalysant une réaction de polyubiquitylation en K27 sur NEMO, est importante pour l'activation de IRF3 et NF- $\kappa$ B <sup>362</sup>. TRAF7 est un autre régulateur qui va entraîner une polyubiquitylation en K29 de NEMO, altérant son activation et résultant en sa dégradation lysosmale <sup>363</sup>.

TBK1 est une autre cible importante des polyubiquitylation en K63 et K48 (Figure 14C). L'ubiquitylation en K63 de TBK1 est requise pour son activité enzymatique <sup>364</sup>. Au contraire, la polyubiquitylation en K48 va entraîner la dégradation de TBK1. Différentes DUBs enlèvent les chaînes de polyubiquitine en K63 de TBK1, ce qui bloque sa signalisation <sup>357</sup>.

Les facteurs de transcription IRF font partie des protéines des voies de signalisation de l'IFN- $\alpha$  les plus contrôlées par les modifications post-traductionnelles, notamment par les

mécanismes d'ubiquitinylation/déubiquitinylation (Figure 14C). L'ubiquitinylation d'IRF7 par TRAF6 semble être un pré-requis pour son activation <sup>365</sup>. Au contraire, de nombreuses enzymes vont cibler IRF3 et IRF7 pour polyubiquitinylation en K48 et donc entraîner leur dégradation <sup>357</sup>.

### Régulation de la voie JAK-STAT

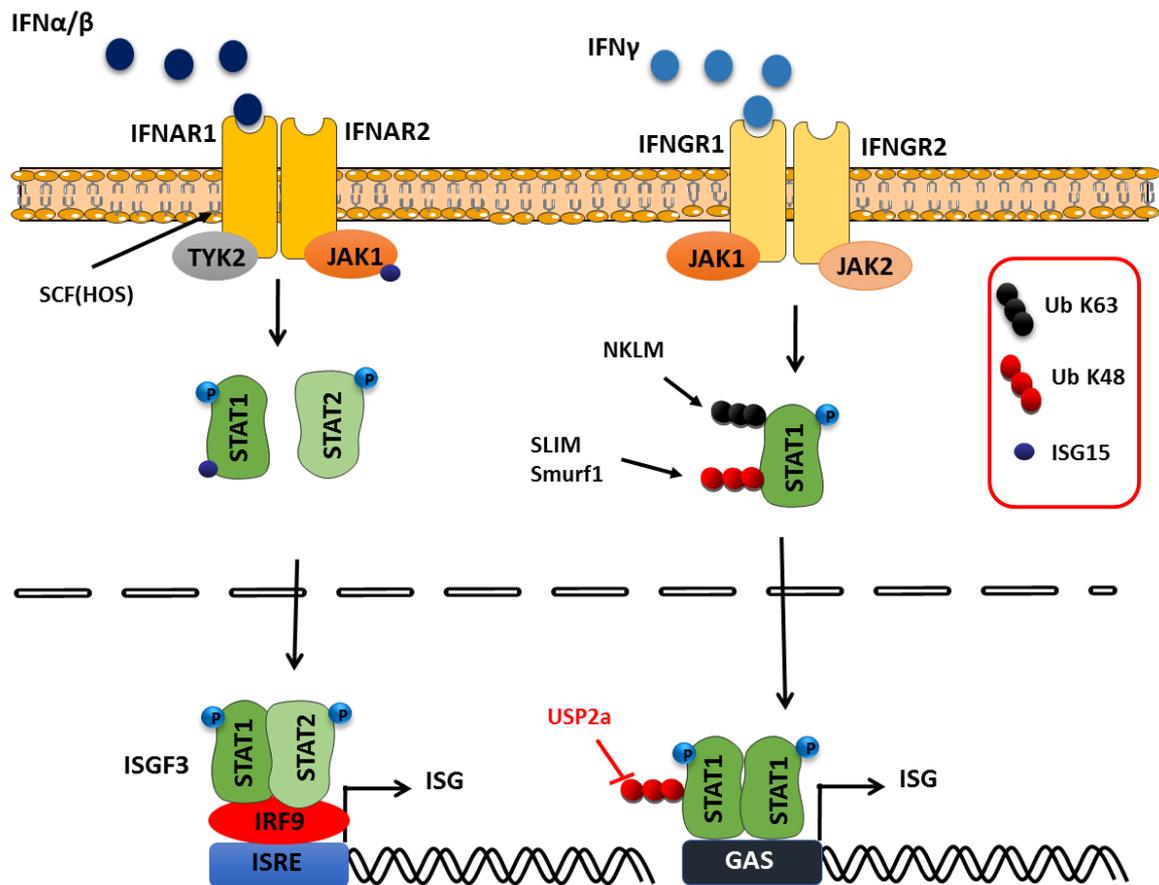


Figure 15. Régulation de la voie de réponse à l'IFN-I par des mécanismes d'ubiquitinylation/déubiquitinylation et ISGylation des protéines.

Alors que de nombreuses études portent sur l'ubiquitinylation des protéines des voies de signalisation RLR et TLR, peu d'études ont été réalisées sur l'ubiquitinylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT (Figure 15). L'ubiquitine ligase Skp1-Cullin1-HOS-Roc1 (SCF(HOS)) interagit avec IFNAR1 et catalyse son ubiquitinylation et sa dégradation *in vitro* <sup>366</sup>. STAT1 serait également régulée par différentes E3 ubiquitine ligases : SLIM (pour *STAT-interacting LIM protein*) et Smurf1 (pour *SMAD ubiquitination regulatory factor*) catalysent sa polyubiquitinylation en K48 et ainsi sa dégradation <sup>367,368</sup>. La

polyubiquitinylation en K48 induit la translocation dans le noyau de la déubiquitineuse USP2a, qui s'associe avec STAT1 et bloque sa dégradation, régulant ainsi positivement l'activation du promoteur ISRE <sup>369</sup>. Dans une autre étude, il a été montré que l'E3 ubiquitine ligase, NKLAM (pour *natural killer lytic-associated molecule*) régule positivement la voie JAK/STAT <sup>370</sup>. En effet, après stimulation avec l'IFN- $\gamma$ , NKLAM serait transitoirement localisé au niveau d'IFN $\beta$  où il s'associerait à STAT1 et permettrait sa polyubiquitinylation en K63, permettant ainsi une régulation positive de sa phosphorylation et de son activité transcriptionnelle.

### *b- ISGylation des protéines*

Des études ont montré que des protéines des voies de signalisation de l'IFN-I peuvent également subir des processus d'ISGylation, modulant ainsi leur activité.

Certaines protéines des voies d'activation de l'IFN-I (voies dépendantes de TLR et RLR) sont ISGylées. C'est le cas de RIG-I <sup>338</sup> et IRF3 <sup>371,372</sup>. L'ISGylation d'IRF3 stabilise la protéine, régulant ainsi positivement la réponse à l'IFN-I (Figure 14C). Au contraire, l'ISGylation de RIG-I aurait un rôle de rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation, en permettant de garder un niveau de réponse à l'IFN-I optimal <sup>373</sup> (Figure 14A). De plus, l'ISG15 s'associe à Ubc13 <sup>374</sup>, une enzyme permettant l'ubiquitination de TAK1. L'ISGylation de Ubc13 inhibe l'ubiquitinylation de TAK1, régulant ainsi négativement la voie NF- $\kappa$ B <sup>375</sup>.

L'ISGylation touche également des protéines de la voie de réponse à l'IFN-I (voie JAK-STAT) (Figure 15). Dans un cribble recherchant des protéines ISGylées dans le thymus humain, il a été montré que JAK1 et STAT1 sont ISGylées <sup>376</sup>. L'ISGylation de STAT1 a ensuite été confirmée dans un autre cribble <sup>377</sup>. Il a été suggéré que l'ISGylation de JAK1 et STAT1 aurait un rôle de régulateur positif. D'autres études doivent être réalisées afin de mieux comprendre l'impact de l'ISGylation sur l'activité des protéines cibles.

## *2- Contrôle des voies de signalisation par d'autres mécanismes*

En plus des modifications post-traductionnelles, d'autres mécanismes vont intervenir dans la régulation des voies de signalisation de l'IFN-I, notamment via des interactions directes avec des protéines de ces voies de signalisation, bloquant leurs activités. Par exemple, Plk1 (pour *polo-like-kinase 1*) est une protéine régulatrice qui, en interagissant avec MAVS via son

domaine PDB (pour *polo-box domain*), inhibe sa capacité à activer la voie de signalisation <sup>378</sup>. Les protéines PIAS1 (pour *protein inhibitor of activated STAT1*) et PIAS3 interagissent respectivement avec STAT1 et STAT3 pour bloquer leur activité transcriptionnelle <sup>379</sup>. C'est également le cas des protéines SOCS (pour *suppressor of cytokine signaling*). Les SOCS sont des régulateurs négatifs cruciaux des voies de signalisation de la réponse aux cytokines et facteurs de croissance. Il existe 8 membres de la famille de protéines SOCS : CIS et SOCS1-7. SOCS1 et SOCS3 sont les mieux caractérisées, elles sont induites par la signalisation IFN-I et jouent un rôle de rétrocontrôle négatif sur la voie JAK-STAT. SOCS1 est capable de se lier directement à JAK1/2, inhibant ainsi leur activité kinase. SOCS3 va se lier au récepteur IFNAR et aux protéines JAK pour inhiber leur activité kinase. De plus, les protéines SOCS contiennent un motif « SOCS box » qui permet le recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase, entraînant la dégradation des protéines JAK par le protéasome <sup>380</sup>. Des récepteurs et protéines transmembranaires sont également capables de réguler la signalisation IFN-I. C'est le cas du récepteur SIRPα (pour *signal regulatory protein α*), qui permet l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de TLR3 et des RLRs <sup>381</sup>. La signalisation IFN-I est également très régulée par des modifications épigénétiques telles que des modifications des histones, la méthylation de l'ADN et des ARN non codants <sup>382</sup>, permettant ainsi le contrôle de l'expression des gènes.

#### D- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques (DCs) sont les cellules sentinelles du système immunitaire. Elles surveillent les tissus et détectent les infections et l'inflammation. Il existe différents types de DC spécialisées dans certaines fonctions. Après phagocytose d'un potentiel antigène et/ou réception de signaux de danger, les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T (LT) naïfs, ce qui va entraîner leur maturation. Un autre type de DCs, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont recrutées au niveau des sites d'inflammation où elles jouent un rôle clé dans la réponse antivirale précoce en produisant de grandes quantités d'IFN-I (IFN-α et IFN-β) (jusqu'à 1000 fois plus que les autres cellules <sup>383</sup>) et d'IFN-III. La réponse est rapide et implique principalement les récepteurs TLR7 et TLR9, exprimés essentiellement dans ce type cellulaire.

## 1- Fonctions des pDCs

Bien que ne représentant que 0.2%-0.8% des PBMCs (pour *peripheral blood mononuclear cells*), les pDCs jouent un rôle primordial dans la production d'IFN-I en réponse à une infection virale. En effet, 60% de leur activité transcriptionnelle est dédiée à la production d'IFN-I<sup>384</sup>. Chez un macaque infecté par le virus de l'immunodéficience simien (SIV), il a été montré que les pDCs sont la seule source d'IFN- $\alpha$  dans les phases précoces de l'infection<sup>385</sup>. Pour certains virus, il a été montré un lien entre la réponse IFN-I induite par les pDCs et l'élimination du virus de l'organisme. Il a été mis en évidence une production très importante d'IFN $\alpha$  par les pDCs de patients infectés par le VIH-1 qui présentent un titre viral indétectable en absence de thérapie, en comparaison avec des patients présentant une virémie<sup>386</sup>. De la même manière, une étude a montré que chez des patients infectés par le DENV, le titre viral et la sévérité de la maladie dépendaient du nombre de pDCs circulantes et de leur production d'IFN-I<sup>387</sup>. Différentes études dans des modèles murins ont également mis en évidence le rôle des pDCs dans l'élimination d'infections virales. En effet, la déplétion en pDCs a montré qu'elles jouent un rôle critique dans la production précoce d'IFN- $\alpha$  en réponse à des virus tels que le MHV<sup>388</sup>, le LCMV (pour *lymphocytic choriomeningitis virus*), le VSV<sup>389,390</sup>, les virus HSV-1 et HSV-2<sup>391</sup> et le RSV<sup>392</sup>.

En plus de la production d'IFN, les pDCs peuvent aussi avoir une activité de cellule présentatrice d'antigène (CPA) pour activer la réponse immunitaire médiée par les LT CD8+ cytotoxiques<sup>393-396</sup>. Des signaux spécifiques, différents de ceux permettant l'induction d'IFN, sont requis pour l'acquisition de cette fonction. Notamment, l'acquisition de ce phénotype nécessite l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Les pDCs sont ainsi capables de reconnaître des cellules infectées par le virus IAV, de capturer du matériel viral et de se différencier en CPA, permettant l'activation spécifique de LT cytotoxiques<sup>394</sup>. Au contraire, les cellules infectées par le VIH sont capables de produire de l'IFN- $\alpha$  mais ne se différencient pas en CPA<sup>397</sup>.

L'IFN-I sécrété va permettre l'induction de l'expression du récepteur TRAIL (pour *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) à la surface des cellules NK et des LT. Le récepteur TRAIL va permettre la reconnaissance de la cellule infectée à lyser et ainsi induire

l'activité cytotoxique des cellules NK. Des études ont montré que TRAIL peut être exprimé par les pDCs, faisant des pDCs des cellules cytotoxiques jouant un rôle direct dans l'élimination des cellules infectées <sup>398-400</sup>.

La réponse des pDCs aux pathogènes peut donc être variable et va notamment dépendre de la localisation subcellulaire où les TLRs reconnaissent le pathogène <sup>401</sup>. L'engagement des TLR7/9 au niveau des endosomes précoces des pDCs active principalement la voie de signalisation IRF7 conduisant à la production d'IFN-I alors que leur engagement au niveau des lysosomes va préférentiellement conduire à l'activation de la voie NF-κB et donc à la production de cytokines pro-inflammatoires, de molécules de co-stimulation et à la maturation en un phénotype de CPA <sup>401,402</sup>.

## **2- Reconnaissance des acides nucléiques par les pDCs**

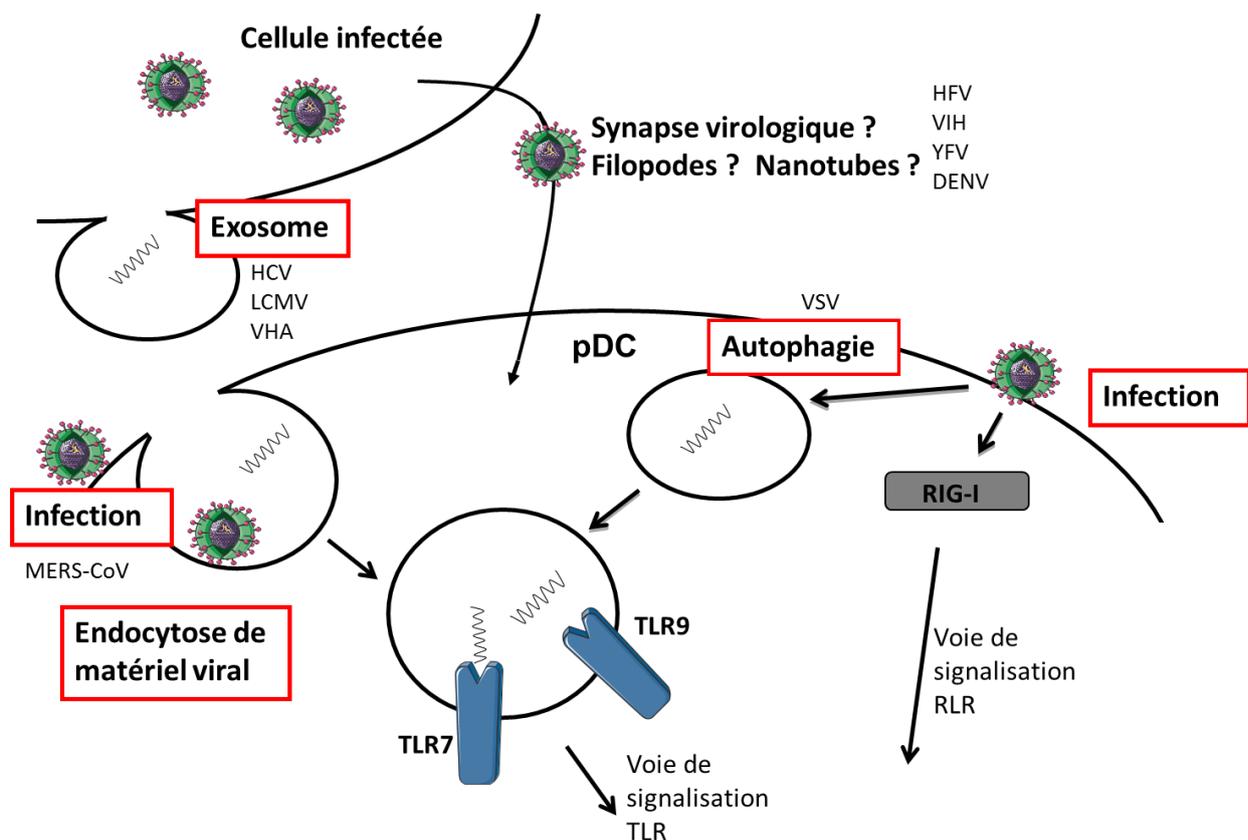
Chez l'homme, les pDCs expriment les TLR7 et TLR9. TLR9 permet la reconnaissance de virus à ADN tels que HSV-1 <sup>403</sup>, HSV-2 <sup>234</sup> et le MCMV <sup>233,404</sup> alors que TLR7 est requis pour la réponse aux virus à ARNs tels que l'IAV, le RSV, le SeV, le VSV, le DENV et le virus de la fièvre jaune (YFV) <sup>223,224,405-407</sup>. Certaines études ont suggéré que RIG-I n'était pas requis pour la production d'IFN-α dans les pDCs <sup>408,409</sup>. Cependant, d'autres études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de RIG-I après stimulation des TLR7 et 9, indépendamment de l'IFN-I <sup>410</sup>. De plus, une étude récente a montré que RIG-I et TLR7 permettaient la reconnaissance du YFV, induisant ainsi l'activation des pDCs <sup>405</sup>. De la même manière, la reconnaissance du HCV par les pDCs dépend à la fois de la signalisation RLR et TLR <sup>411</sup>.

## **3- Activation des pDCs par différents mécanismes**

De nombreux virus sont capables d'activer les pDCs. Cependant, les mécanismes d'activation peuvent varier suivant les virus impliqués (activation directe ou indirecte), engendrant l'activation de voies de signalisations différentes (Figure 16).

L'activation peut être directe dans certains cas. En effet, certains virus peuvent infecter les pDCs. C'est le cas du RV <sup>412</sup>, du YFV, du SeV <sup>405</sup>, du HAV <sup>413</sup> du virus Junin (JUNV) <sup>414</sup> et du VIH <sup>415,416</sup>. Ces virus, après infection, sont reconnus par des récepteurs de la famille des RLRs

dans le cytoplasme ou, s'il y a endocytose, ils sont reconnus par TLR7/9 dans les endosomes. L'infection des pDCs par le YFV est productive dans les pDCs et conduit à l'activation de RIG-I<sup>405</sup>. De la même manière, les virus de la famille des arenavirus, LCMV et Lassa (LASV), infectent directement les pDCs, établissent un cycle de réplication productif et sont capables d'activer le TLR7<sup>417</sup>. Au contraire, certains virus peuvent infecter des pDCs mais ne sont pas capables d'induire un cycle de réplication complet. C'est le cas du MERS-CoV (pour *Middle east respiratory syndrome coronavirus*) qui est capable de s'associer à son récepteur à la surface des pDCs, d'être endocyté, d'activer les voies de signalisation dépendantes de TLR7 mais le cycle viral est bloqué dans les phases précoces<sup>418</sup>.



**Figure 16. Les pDCs peuvent être activées par différents mécanismes.**

D'autres virus peuvent subir un processus d'autophagie<sup>224</sup>. L'autophagie de matériel viral induit l'activation de voies de signalisation dépendantes des TLRs situés dans les lysosomes. D'autres virus ne peuvent pas infecter les pDCs et donc ils ne les activent pas directement. L'activation des pDCs par ces virus nécessite alors un contact entre les cellules infectées et