Interactions VIH/autophagie dans les cellules dendritiques : de la réplication à la présentation des antigènes

Pierre-Grégoire Coulon

▶ **To cite this version:**

Pierre-Grégoire Coulon. Interactions VIH/autophagie dans les cellules dendritiques : de la réplication à la présentation des antigènes. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066552 . tel-01165045

HAL Id: tel-01165045
https://theses.hal.science/tel-01165045

Submitted on 18 Jun 2015

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie (ED394)

Équipe d'Arnaud Moris (CIMI – Centre d'immunologie et des maladies infectieuses)

« Immunobiologie des infections virales et présentation des antigènes »

Interactions VIH/autophagie dans les cellules dendritiques : de la réplication à la présentation des antigènes

Par Pierre-Grégoire COULON

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Arnaud MORIS

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr. Vincent MARÉCHAL	Président
Pr. Mathias FAURE	Rapporteur
Dr. Anne HOSMALIN	Rapporteur
Dr Philippe BENAROCH	Examinateur
Dr. Fabien BLANCHET	Examinateur

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Dédicace

Je dédie ce travail de longue haleine à ma famille, mes ami(e)s et ma chérie, sans qui je n'aurais peut-être pas eu ce goût pour la réflexion et la découverte. Merci de m'avoir transmis la curiosité du monde qui m'entoure.

Remerciements

- ***Au membres du jury*** *:*

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury, Vincent Maréchal, Mathias Faure, Anne Hosmalin, Philippe Benaroch et Fabien Blanchet pour avoir accepté d'évaluer mon travail et fourni leurs avis éclairés.

- ***A mon laboratoire :***

Je remercie également tout particulièrement Arnaud Moris, mon chef de laboratoire et encadrant, qui m'a soutenu, aidé et guidé lors de cette thèse, aussi bien scientifiquement (intellectuellement ou manuellement) qu'humainement. Je le remercie pour sa disponibilité et sa vision de la recherche, avec laquelle je partage de nombreux points d'accroche. Merci également de m'avoir fait participer à de grands congrès scientifiques, de m'avoir donné l'opportunité d'encadrer des étudiants en master et merci, en résumé, de m'avoir appris ce que signifiait « faire de la recherche ».

Ensuite, je voudrais remercier aussi les membres du laboratoire qui m'ont aidé à mener à bien mes expériences et qui m'ont motivé dans les moments plus difficiles, notamment Sylvain Cardinaud, Stéphanie Graff-Dubois et Alexandra Urrutia. Sans eux, je n'aurais très certainement pas été capable de progresser aussi rapidement dans ma réflexion et mes manipulations.

Merci à tous mes amis du laboratoire. Les étudiants avec qui j'ai travaillé et me suis amusé, comme Julian Buchrieser, Emmanuel Atangana Maze, Angéline Rouers, Pauline Louche et Lucie Colineau, Ophélie Momméja et Julien.

- ***A nos collaborateurs***

Merci à nos collaborateurs, Fabien Blanchet, Olivier Schwartz, Vincent Piguet et Nicolas Manel.

- ***Aux membres des plateformes***

Merci à l'EFS pour les échantillons de sang et les anneaux de cytaphérèse. Merci aux personnel des plates-formes de biologie moléculaire P3S (Plate-forme Post-génomique de la Pitié Salpétrière) et de microscopie PICPS (Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière) pour m'avoir formé et permis d'utiliser leurs machines. Je remercie particulièrement Aurélien Daufin pour ses formations claires et didactiques à l'utilisation des microscopes confocaux et du logiciel ImageJ et Phillipe Lefèvre pour la formation à l'utilisation de l'irradiateur de l'institut Cochin.

- ***A mon école doctorale***

Merci également à mon école doctorale ED394 « Physiologie et Physiopathologie » pour son soutien et ses formations.

- ***A mes collègues, amis et membres du CIMI***

Merci également aux personnes des laboratoires du CIMI, Fabrice Licata, Charles Nuttens, Clément Levin, Elodie Guyon, Virginie Felouzis, Anya Lissina, Olivia Bonduelle,

Olivia Briceno, Hélène Perrin, et tous les autres avec qui j'ai passé de très bons moments et qui m'aidaient et me soutenaient. Merci à Céline Méaudre pour les typages HLA. Merci également à tous ceux qui, de près ou de loin, ont aidé à l'avancement du projet par leurs suggestions et leurs discussions.

- ***A mes amis***

Merci à mes amis de l'université et mes amis d'enfance, qui ne m'ont rien apporté scientifiquement, mais tout apporté humainement, parce que parfois ça fait du bien de ne plus penser « science » ! Merci à ma chérie pour m'avoir donné le sourire et du courage.

- ***A ma famille***

Enfin, merci à mes parents et a ma famille, qui m'ont inculqué mes envies de découverte et de réflexion, les plus importantes de toutes selon moi.

MERCI A TOUS POUR VOTRE SOUTIENT !

SOMMAIRE

PREFACE

I - INTRODUCTION 1

A - L'AUTOPHAGIE 1

1. GENERALITES 1

2. LA MACROAUTOPHAGIE 2

2.1. Mécanismes moléculaires 2

2.1.1. L'initiation 3

2.1.2. Le complexe PI3K (Beclin 1:hVps34:p150) 3

2.1.3. Le complexe ULK (ULK1/2:Atg13:FIP200 et Atg101) 4

2.1.4. La nucléation sur le site de l'omégasome 5

2.1.5. Elongation du phagophore et complétion 7

2.1.6. Maturation et dégradation des autophagosomes 10

2.1.7. Les voies d'induction et de régulation de l'autophagie 12

2.2. L'autophagie sélective 14

2.2.1. Formation des agrégats protéiques : interconnexions entre le protéasome et la voie autophagique 14

2.2.2. Les protéines réceptrices des cargos 16

2.2.3. Formes spécifiques d'autophagie sélective 18

3. L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR LES CHAPERONNES 18

3.1. Mécanismes moléculaires 18

3.2. Régulation 19

3.3. Relevance physiologique 20

B - CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNITE 22

1. ROLE DES DC DANS L'IMMUNITE INNEE 22

1.1. Reconnaissance des pathogènes 22

1.2. Capture des antigènes 24

1.3. Maturation et migration 25

2. ROLE DES DC DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE ET LA PRESENTATION DES ANTIGENES 26

2.1. Les molécules du CMH pour la présentation des antigènes 26

2.1.1. Molécules du CMH-I 26

2.1.2. Molécules du CMH-II 27

2.2. Présentation sur les molécules du CMH-I 28

2.2.1. Présentation des antigènes endogènes sur les CMH-I 28

2.2.2. Présentation croisée d'antigènes exogènes sur les CMH-I 31

2.3. Présentation sur les molécules du CMH-II 33

2.3.1. Présentation des antigènes exogènes sur les CMH-II 33

2.3.2. Présentation des antigènes endogènes sur les CMH-II 37
3. BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES 38
3.1. Les DC, une population distincte des monocytes et des macrophages. 38
3.2. Les différentes familles de DC chez l'Homme 38

C - AUTOPHAGIE ET IMMUNITE 42
1. ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS L'IMMUNITE INNEE 43
1.1. Détection des pathogènes : induction de l'autophagie et de la xénophagie 43
1.1.1. Rôles des SLR dans l'induction de la xénophagie 43
1.1.2. Modulation de l'autophagie par les PRR et les cytokines 44
1.1.3. Phagocytose associée à LC3 (LAP) 47
1.2. Rôle de l'autophagie dans le contrôle de l'inflammation 47
1.2.1. Induction des voies TLR par l'autophagie 47
1.2.2. Rôle de l'autophagie dans l'inhibition de l'inflammation 48
2. ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE : PRESENTATION DES ANTIGENES 51
2.1. Autophagie et présentation des antigènes par les CMH-II 51
2.1.1. Connexions moléculaires entre l'autophagie et les voies de présentation CMH-II 51
2.1.2. Autophagie et présentation des antigènes endogènes par les CMH-II 51
2.1.3. Autophagie et présentation des antigènes exogènes par les CMH-II 54
2.2. Autophagie et présentation des antigènes par les CMH-I 55
2.2.1. Autophagie et présentation des antigènes endogènes par les CMH-I 55
2.2.2. Autophagie et présentation croisée par les CMH-I 55
2.3. Autophagie et vaccin 56
2.4. Rôle de la CMA dans la présentation des antigènes 57
3. MANIPULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR LES VIRUS 58
3.1. Des virus ADN inhibent l'induction de l'autophagie 58
3.2. Des virus ARN bloquent la maturation des autophagosomes 59

D - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) : INFECTION ET IMMUNITE 61
1. LE VIH : GENERALITES 61
1.1. Découverte et Epidémiologie 61
1.2. Physiopathologie 62
1.3. La structure du virus 64
1.4. Le cycle viral 65
2. INTERACTIONS DC/VIH 67
2.1. Infection des DC et transmission du virus aux LT CD4 67
2.1.1. Evidences de l'infection des DC par le VIH 67
2.1.2. Capture du VIH par les DC 67
2.1.3. Transfert du VIH aux LT CD4 par *trans*-infection 68

2.1.4. Infection des DC et transfert du VIH par cis-infection. 69
2.2. Rôle des DC dans l'immunité innée anti-VIH 70
2.2.1. Facteurs de restriction de la réplication du VIH dans les DC 71
2.2.2. Reconnaissance du VIH par les PRR des DC 72
2.3. Rôle des DC dans la présentation des antigènes du VIH 75
2.3.1. Rôle de la réponse immune adaptative dans le contrôle de l'infection 75
2.3.2. Présentation d'antigènes viraux exogènes par les CMH-I et CMH-II 76
2.3.3. Présentation d'antigènes viraux endogènes par les CMH-I et CMH-II 77
2.4. Dérégulation des fonctions des DC pendant l'infection VIH 79

E - AUTOPHAGIE ET VIH 81
1. INTRODUCTION 81
2. ETUDES GENETIQUES 81
3. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES LT CD4 82
3.1. LT CD4 non infectés 82
3.2. LT CD4 infectés 83
4. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES 86
4.1. Monocytes/macrophages non infectés 86
4.2. Monocytes/macrophages infectés 88
5. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES DC 92
5.1. hpDC chargées avec le virus 92
5.2. hmDC chargées avec le virus 92
5.2.1. Xénophagie du VIH et échappement viral 92
5.2.2. Interactions autophagie/TLR/VIH 93
5.2.3. Autophagie et présentation des antigènes du VIH. 94

II - OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 96

III - RESULTATS 98

A - PREAMBULE 98

B - ARTICLE 100

C - RESULTATS NON PUBLIES 139

IV - DISCUSSION/CONCLUSION ET PERSPECTIVES 148

BIBLIOGRAPHIE 157

ANNEXES 194

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 – Les trois formes d'autophagie 2
Figure 2 – Le complexe PI3K et ses partenaires 4
Figure 3 – Régulation de l'autophagie par les différents complexes PI3K 4
Figure 4 – Le complexe ULK régulé par mTOR 5
Figure 5 – Recrutement au site de l'omegasome : la nucleation 7
Figure 6 – Les systèmes de conjugaison : élongation/complétion du phagophore 10
Figure 7 – Dégradation des agrégats et relations protéasome/autophagie 15
Figure 8 – p62, structure et fonction 17
Figure 9 – La CMA : mécanismes et régulations 20
Figure 10 – Les molécules de CMH 27
Figure 11 – Voies de présentation CMH-I 31
Figure 12 – Présentation CMH-II d'antigène exogènes par les DC / Régulation 36
Figure 13 – Autophagie et immunité 42
Figure 14 – Capture des pathogènes par les SLR 44
Figure 15 – Autophagie et TLR ; détection des pathogènes et inflammation 45
Figure 16 – NOD1/2 : détection des bactéries intracellulaires et xénophagie 46
Figure 17 – Interactions autophagie et infllammasome : contrôle de l'inflammation 50
Figure 18 – Autophagie et présentation des antigènes 56
Figure 19 – Estimation du nombre d'individus vivants avec le VIH en 2012 62
Figure 20 – Évolution de l'infection VIH 63
Figure 21 – Structure du VIH 64
Figure 22 – Organisation du génome viral 64
Figure 23 – Intéractions DC/VIH 69
Figure 24 – Les senseurs cytosoliques du VIH dans les DC 75
Figure 25 – Voies de présentation des antigènes du VIH 79
Figure 26 – Objectifs de mon projet de thèse 97

Tableaux:

Tableau 1 – Les protéines accessoires du VIH 65
Tableau 2 – Senseurs/PRR et facteurs de restrictions dans les DC 70
Tableau 3 – Intéractions autophagie/VIH dans les LT CD4 86
Tableau 4 – Intéractions autophagie/VIH dans les Monocytes/Macrophages 91
Tableau 5 – Intéractions autophagie/VIH dans les DC 94

Liste des abréviations

3-MA	3-méthyladénine
ADN/ARN	Acide désoxyribonucléique/ Acide ribonucléique
Alfy	Autophagy-linked FYVE protein
ALIS/DALIS	(DC) Aggresome-like inducible structure
AMBRA1	Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy
AP1/2	Clathrin adaptator protein 1/2
APC	Antigen presenting cells
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic
Arf1	ADP-ribosylation factor 1
AT-2	Aldrithiol-2
ATF4	Activating transcription factor 4
Atg	Autophagy related genes
ATP	Adenosine triphosphate
AZT/NVP	Azidothymidine / Neverapine
Baf A1	Bafilomycin A1
BAG	Bcl-2-associated athanogene
BATS	BARKOR(Atg14) autophagosome targeting sequence
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BCR	B-cell receptor
BH3	Bcl-2 homology 3 domain
Bif-1	Bax-interacting factor 1
BIP	Binding immunoglobulin protein
BMDC	Bone-marrow derived dendritic cells
BST-2	Tétherine
CA	Protéine de la capside virale
CARD	Caspase activation and recruitment domains
CD	Cluster of differenciation
cGAS	cGAMP synthesis enzyme
CHIP	C-terminus of Hsc70-interacting protein
CHIP	C-terminus of HSC70-interacting protein
ChQ	Chloroquine
CIITA	Class II major histocompatibility complex transactivator
CLEC9A	C-type lectin domain family 9
CLIP/li	Invariant chain
CLR	C lectin like receptor
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CMH/HLA	Complexe majeur d'histocompatibilité/Human Leucocyte Antigen
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
CXCR/CCR	Recepteurs de chimiokines (et leurs ligands CXCL/CCL)
CypA	Cyclophilin A
DC	Dendritic cells
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DC/hDC	Cellules dendritiques / cellules dendritiques humaines
DCIR	Dendritic Cell Immunoreceptor
DFCP1	Double FYVE domain-containing protein 1
dNTP	Désoxyribonucléotides tri-phosphate
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator
DRiPs	Defective ribosomal products
EBNA1	Epstein–Barr nuclear antigen 1
EBV	Epstein Barr virus
EF1α	Elongation factor 1A
EFS	Etablissement francais du sang
eIF2	Eukaryotic initiation factor 2
Env (TM/SU)	Protéine de l'enveloppe virale gp41, gp120 (transmembrannaire / surface)
ERAAP	Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200kDa
FYCO	FYVE and coiled-coil domain-containing 1
GABARAP	GABAA receptor-associated protein
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GCN2	General control nonderepressible 2
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP/RFP	Green/Red fluorescent protein
GSL	Glycosphingolipide
HBV	Hepatitis B virus (virus de l'hépatite B)
HCMV	Human Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis B virus (virus de l'hépatite C)
HDAC6	Histone deacétylase 6
HHV1/8	Human herpes virus (type 8) (virus de l'herpes de type 8)
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
hmDC/mDC	(Human) myeloid DC
hMDM	Human monocyte derived macrophages
hpDC	(Human) plasmacytoid DC
HSC70/90	Heat shock cognate proteins 70/90 kDa
HSP	Heat shock protein
HSV-1	Herpes simplex virus 1
hVps34	Human vacuolar protein sorting 34
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ICP	Infected Cell Protein (Herpes)
IFI16	IFNγ-inducible protein 16

IFNα/β/γ	Interferon α/β/γ
IL	Interleukine
ILV	Intraluminal vesicules
IN	Intégrase virale
infDC	Inflammatory DC
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IPS-1	IFN promoter stimulator 1
IRE1	Inositol-requiring enzyme-1
IRF	Interferon-regulatory factor
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
ISG	IFNβ stimulated genes
IκBα	NF-κB inhibitor
JNK1	c-jun N-terminal kinase 1
LAMP1/2	Lysosome associated membrane protein (Ex : LAMP-2A)
LAP	LC3-associated phagocytosis
LAPTM5	Lysosomal protein transmembrane 5
LC	Langerhans cells
LDL	Low density lipoprotein
LIR/AIM	LC3-interacting region / Atg8 interactinf motif
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
LRSAM1	Leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1 (E3 ubiquitine ligase)
LT/LB	Lymphocytes T / B
LTR	Long terminal repeat
MA	Protéine de la matrice virale (Gag et dérivées)
MAM	Mitochondria-associated ER membrane
MAP-LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARCH	Membrane-Associated RING-CH protein family
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MDDC/hMDDC	Human monocytes-derived dendritic cells
MDM/hMDM	human macrophages derived monocytes
MeV	Measles virus (virus de la rougeole)
MIIC	MHC-II compartment
MR	Mannose receptor
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
MUC1	Mucin 1
MVB	Multivesicular bodies
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
NC	Protéine de la nucléocapside
NDP52	Nuclear dot protein of 52 kDA
Nef	Negative regulatory factor
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide oligomerization domain
NP	Nucleoprotease
Nrf2	Nuclear factor-like 2
OMS	Organisation mondiale de la santé
OVA	Ovalbumin
P38IP	p38 (MAPK) interacting protein
P70S6K	Ribosomal protein S6 kinase
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAS	Pre-autophagosomal structure
PCL	Peptide-loading complex
PE	Phosphatidylethanolamine
PI3K (III)	Phosphatidylinositol-3-kinase (de type III)
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PKB/AKT	Protein kinase B / AKT
PKM2	Pyruvate kinase muscle isozyme
PKR	Protein kinase R
PLC	Peptides loading complex
PR	Protéine de la protéase virale
PRR	Pattern recognition receptor
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
Rab/Rag	Ras superfamily GTPase
RE	Reticulum endoplasmique
Rev	Regulator of expression of virion proteins
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RLR	Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)–like receptor
ROS	Reactive oxygen species
RSV	Respiratory syncytial virus
RUBICON	RUN domain Beclin1-interacting protein
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1 protein
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
Siglec-1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1
siRNA/shRNA	RNA interference (short hairpin / small interfering)
SLC	Solute carrier family protein
SLE	Systemic lupus erythematosus,
SLR	Sequestosome 1/p62-like receptors
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SQSTM1/p62	Sequestosome1 ou p62
SR-BI	Scavenger receptor class B member 1
STAT (1/3)	Signal transducers and activators of transcription (1/3)
STING	Stimulator of interferon genes
TAP	Transporter associated with antigen processing
Tat	Trans-activator of transcription
TBK1	TANK binding kinase 1
TCR	T-cell receptor
TEC	Thymic epithelial cells
TEM	Transmission electron microscopy
TGN	Trans-Golgi network
TIR	Toll interleukin receptor (domain)

TLR	Toll-like recepteur
TNF	Tumor necrosis factor
TPPII	Tripeptidyl peptidase II
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
Trex1	Three prime repair exonuclease 1
TREX1	Three prime repair exonuclease 1
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRIM5α	Tripartite motif-containing protein 5
TUFM	Elongation factor Tu, mitochondrial
UBD	Ubiquitin-binding domain
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2
UPR	Unfolded protein response
UPS	Ubiquitin-proteasome system
UVRAG	Irradiation resistance-associated gene
VAMP	Vesicle associated membrane protein
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor 1 écrit VEGFR-1
Vif	Viral infectivity factor
VIH/VIS	Virus de l'immunodéficience humaine / simienne
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein unique
Vpx	Viral protein X
VSV	Vesicular stomatitis virus
WIPI2	WD repeat domain PtdIns3P interacting protein
XCR1	"C" sub-family of chemokine receptors 1 (ligand : XCL)
zbtb46	Zinc finger and BTB domain containing 46

PREFACE

Mon intérêt pour la recherche remonte à mon enfance, lorsqu'en primaire je voulais déjà être « inventeur ». Depuis, j'ai continué mes études avec pour objectif fixé de faire une thèse et me lancer dans la recherche. Au lycée, j'ai très rapidement pris goût aux sciences et à la biologie en particulier, matière pour laquelle j'ai eu des professeurs passionnants et passionnés, dont certains avaient eux-mêmes fait un doctorat lors de leurs études. Je me suis donc orienté vers l'université, en me spécialisant dans l'immunologie, une matière qui me parlait de par ses interactions directes avec la médecine. En master, j'ai étudié les interactions hôtes-pathogènes. J'ai très rapidement pris goût aux relations bidirectionnelles complexes qu'un pathogène pouvait développer avec son hôte, relations qui se sont construites sur des millions d'années au travers de l'évolution des espèces. J'étais fasciné par les stratégies de symbioses, d'antibioses et de parasitismes que ces êtres vivants « primaires » arrivaient à développer : avec d'un côté, chez l'hôte, l'élaboration de mécanismes de défense immunitaire toujours plus recherchés, complexes et finement régulés, et de l'autre, chez les pathogènes, des stratégies d'échappement tout aussi compliquées, il s'agit là d'un combat invisible pour la survie qui me passionne.

Je voulais travailler sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) parce qu'il incarne à la perfection les dérèglements qu'un pathogène peut induire dans notre système immunitaire et constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes immuns. Par ailleurs, ma motivation était aussi liée au fait que le VIH est un problème de santé publique majeur. Arnaud Moris m'a proposé de travailler sur les interactions entre le virus et l'autophagie, dans des cellules qui sont parmi les premières à être infectées, les cellules dendritiques. A cette époque un certain engouement pour l'étude de l'autophagie a vu le jour car celle-ci joue un rôle important dans le métabolisme des cellules et qu'elle est une composante essentielle de notre système immunitaire inné et adaptatif. Un élément original du projet tenait à ce qu'on voulait étudier, chez l'homme, le rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes du virus, initiant la réponse adaptative. De plus, Arnaud Moris avait déjà quelques résultats préliminaires intéressants et il venait d'arriver sur le site de la Pitié-Salpêtrière pour monter son propre laboratoire au sein de l'UMR-945, maintenant CIMI. Le sujet m'intéressait, tout comme l'idée d'intégrer un jeune laboratoire et de participer activement à son développement. C'est comme cela que j'ai débuté ma thèse.

I - INTRODUCTION

A - L'AUTOPHAGIE

1. GENERALITES

Découverte dans les années 1960 par Christian de Duve, l'autophagie (du grec αυτο : « soi-même » et φαγειν « manger ») est un processus biologique cellulaire d'auto-digestion, primordial pour l'équilibre métabolique d'une cellule. Ce processus ubiquitaire et constitutif joue un rôle déterminant dans l'homéostasie cellulaire pour garder constant l'équilibre entre les voies anaboliques et cataboliques. C'est une voie de dégradation des composants cytoplasmiques très conservée[1] (de la levure au mammifère), mais qui, contrairement au système ubiquitine/protéasome (UPS), implique la voie lysosomale. De plus, alors que le système UPS est impliqué dans la dégradation de protéines à courte durée de vie, l'autophagie est spécialisée dans la dégradation des protéines à durée de vie longue[2], ou même de plus gros substrats. Ainsi, l'autophagie intervient dans la destruction et le recyclage des protéines mal repliées et agrégées[3], dans la clearance des organelles défectueuses telles que les mitochondries en fin de vie (mitophagie[4]), les peroxysomes (pexophagie[5]), les ribosomes (ribophagie[4]), mais également dans la destruction de nombreux pathogènes intracellulaires. Elle est essentielle au développement embryonnaire[6]. Au regard de ces fonctions, l'autophagie est généralement décrite comme un mécanisme de survie et de sauvegarde de l'intégrité cellulaire lors de stress ou de carences nutritionnelles, bien que des dérégulations de ce mécanisme (principalement observées dans certaines maladies neurodégénératives), soient impliquées comme l'un des signaux d'initialisation d'une mort cellulaire programmée dite « non classique »[7].

Il existe trois formes définies d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA), lesquelles induisent toutes les trois la dégradation de composants cytosoliques dans le lysosome (cf. Figure 1). Au cours de la macroautophagie, des portions du cytoplasme sont capturées et séquestrées par une double membrane d'isolation, ou phagophore, qui se referme pour former l'autophagosome. L'autophagosome va ensuite fusionner avec plusieurs compartiments endosomaux d'acidité croissante pour former un amphisome, qui mature en autolysosome après fusion lysosomale[8] (cf. Figure 1). Dans la microautophagie, la cargaison cytoplasmique est directement capturée par le lysosome lui-même par invagination de sa membrane. Cette forme d'autophagie a été décrite dans les levures et les cellules de mammifères[9] par l'observation de lysosomes multivésiculés, mais elle reste très peu étudiée. Avec la macroautophagie, elle permettrait la destruction de larges structures comme des organelles entières.

A l'inverse, la CMA diffère des autres formes d'autophagie et des voies de dégradation lysosomale en général car elle n'implique pas de trafic vésiculaire (cf. Figure 1). Elle est impliquée dans la dégradation spécifique de protéines mal repliées prises en charge par des protéines chaperonnes. Un complexe se forme entre la protéine substrat, le complexe

de protéines chaperonnes et un transporteur lysosomal, LAMP-2A, qui agit comme récepteur de translocation[10]. La CMA est décrite uniquement chez les eucaryotes supérieurs.

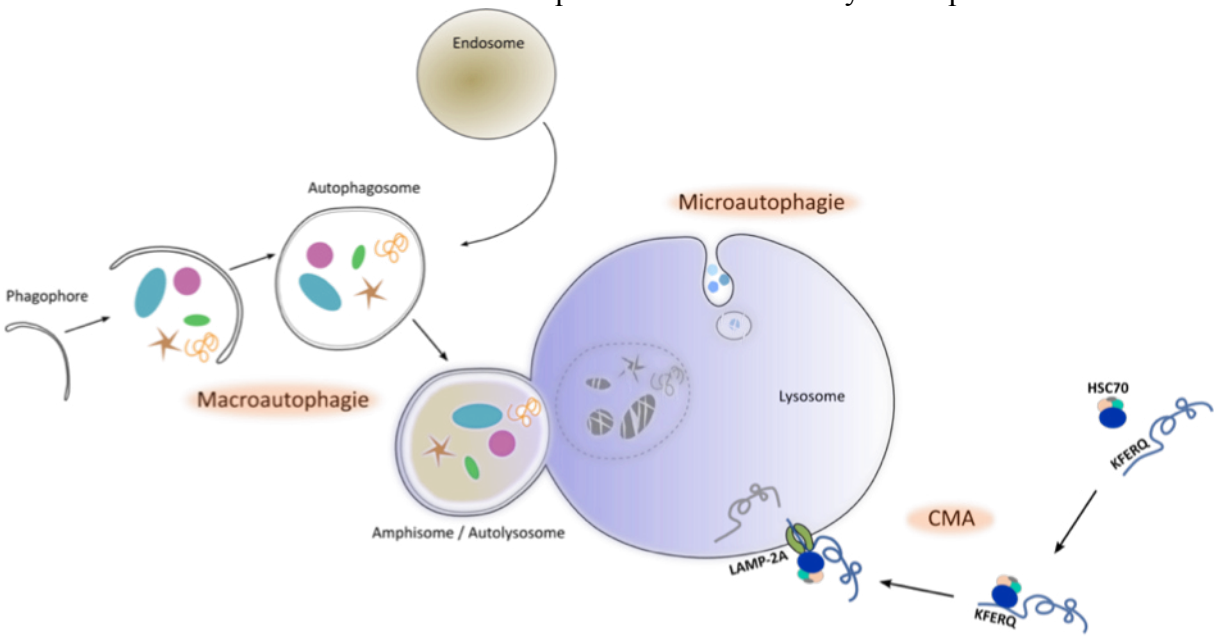


Figure 1 – Les trois formes d'autophagie

Légende : CMA : autophagie médiée par les chaperonnes
KFERQ : motif canonique de reconnaissance par HSC70
HSC70 : Protéine chaperonne de choc thermique de 70kDa

2. LA MACROAUTOPHAGIE

2.1. Mécanismes moléculaires

La macroautophagie est le type d'autophagie le plus étudié, et nous restreindrons ici le terme « d'autophagie » à cette seule forme. Les mécanismes moléculaires qui la gouvernent ont été découverts dans le milieu des années 1990 par des études de mutants chez la levure[11], avec la découverte des gènes Atg (Autophagy related). Ils ont ensuite été élargis à d'autres organismes comme la drosophile ou les mammifères. Du fait de la conservation évolutive de ce processus, la trentaine de gènes décrits dans la levure et impliqués dans l'autophagie ont pour la plupart un homologue chez les mammifères.

De façon simplifiée, on peut subdiviser le processus de formation d'un autophagosome jusqu'à sa maturation en plusieurs étapes :

- la formation du complexe d'initiation
- la formation du phagophore (membrane d'isolation) pendant la nucléation
- L'élongation du phagophore et sa complétion permettant l'agrandissement de la double membrane et la formation de l'autophagosome refermé.
- L'étape finale de maturation, où l'autophagosome nouvellement formé va fusionner avec différents compartiments endosomaux et lysosomaux.

2.1.1. L'initiation

Cette étape correspond au recrutement et à l'activation de différents complexes protéiques qui permettront la formation du phagophore. La transmission de ces signaux se fait à proximité de structures membranaires du reticulum endoplasmique (RE)[12], où se déroulera ensuite la nucléation de la membrane d'isolation.

Deux complexes agissent de concert pour l'induction de l'autophagie: le complexe PI3K de classe III, composé de l'hétérodimère à activité kinase hVps34 (human vacuolar protein sorting 34), de sa sous-unité régulatrice p150, de Beclin 1 et d'autres protéines régulatrices comme Atg14L, et le complexe ULK composé des protéines ULK1/2 (UNC51 like kinases), Atg13, FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200kDa) et Atg101.

2.1.2. Le complexe PI3K (Beclin 1:hVps34:p150)

Le complexe PI3K (cf. Figure 2) possède une fonction clef dans l'initiation et la formation du phagophore[13]. Il est donc finement régulé par l'ajout de différentes protéines régulatrices qui rentrent en compétition[14]. Son activité kinase, portée par la sous-unité hVps34, permet la production sur les membranes proches du site de nucléation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P)[12], un lipide qui jouera un rôle primordial dans le recrutement de facteurs indispensables à la formation de la membrane d'isolation et de l'autophagosome[12,15,16] (cf. partie I -A -2.1.4). Ainsi la modulation des niveaux de PtdIns3P par l'ajout de lipides synthétiques[17] ou par des phosphatases[18] altère le nombre et la taille des autophagosomes. Des drogues inhibitrices de l'activité kinase du complexe PI3K, comme la 3-MA ou la spautine-1, sont couramment utilisées en laboratoire pour bloquer l'autophagie[17].

Deux autres protéines se retrouvent dans le noyau du complexe PI3K : p150, qui joue un rôle dans le recrutement aux membranes, et Beclin 1 qui joue un rôle de plate-forme d'assemblage en recrutant diverses protéines régulatrices dans le complexe (cf. Figure 2). Ainsi, Beclin 1 interagit avec de nombreux facteurs importants pour la survie cellulaire (comme Bcl-2, cf. Figure 2 et partie I -A -2.1.7.2) et la régulation de l'autophagie. Parmi ces facteurs, il existe trois protéines régulatrices essentielles dans le contrôle du complexe PI3K : les protéines Atg14L, UVRAG et Rubicon (cf. Figure 2).

La protéine Atg14L est centrale dans l'induction de l'activité kinase du complexe PI3K et de la formation du phagophore. Elle possède deux domaines importants pour sa fonction : une région de fixation aux membranes (domaines BATS) et un motif d'envoi au RE. Par ailleurs, Atg14L est associée à Beclin 1 et cette association est indispensable pour l'assemblage du phagophore[19,20]. Elle colocalise après induction de l'autophagie avec le site d'initiation et de nombreuses protéines Atg[20–24]. Dans des cellules n'exprimant pas Atg14L ou exprimant une version tronquée pour le domaine BATS, la production de PtdIns3P est inhibée ainsi que le flux autophagique[21,24]. Ainsi, Atg14L aurait un rôle fondamental dans l'induction de la production de PtdIns3P et le recrutement du complexe PI3K au site du phagophore pour l'induction de l'autophagie.

La protéine Rubicon aurait un rôle antagoniste à Atg14L[21,22]. Elle régule négativement la formation des autophagosomes en interagissant avec Beclin 1 et en inhibant l'activité kinase de la PI3K (cf. Figure 3).

La protéine UVRAG, elle aussi, interagit avec Beclin 1 et entre en compétition directe avec Atg14L[20,21]. Son rôle est complexe car il dépend des interactions qu'elle engendre avec d'autres protéines au sein du complexe PI3K (Cf. Figure 3). Seule ou en recrutant Bif-1 (endophilin B1/Bax-interacting factor 1, facteur qui régule les dynamiques membranaires des organelles), elle induit l'apparition d'autophagosomes[25,26]. En interagissant avec Rubicon, elle inhibe les phases plus tardives de maturation de l'autophagosome[21]. Cependant la suppression d'UVRAG dans des lignées cellulaires modèles n'affecterait ni le flux autophagique ni la formation du phagophore[20]. L'hypothèse actuelle serait qu'elle agit plus sur les étapes tardives de nucléation[27] et les étapes de maturation endosomale/autophagosomale[21,28] (cf. partie I -A -2.1.6.1) que sur l'induction des phases précoces de l'autophagie.

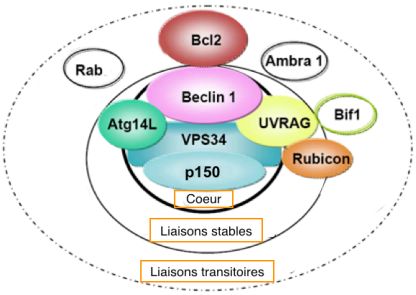


Figure 2 – Le complexe PI3K et ses partenaires

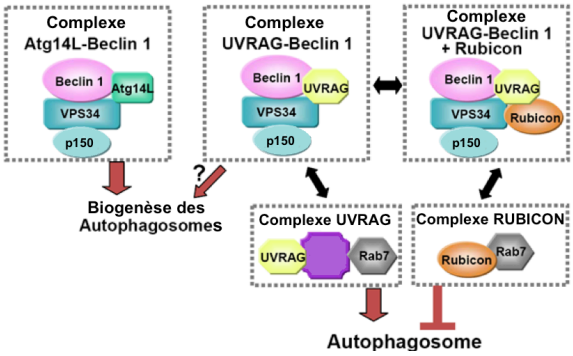


Figure 3 – Régulation de l'autophagie par les différents complexes PI3K

Adapté de Funderburk S.F. et coll. , Trends Cell Biol., 2010

2.1.3. Le complexe ULK (ULK1/2:Atg13:FIP200 et Atg101)

Les kinases ULK1 et ULK2 auraient des fonctions redondantes dans l'induction de l'autophagie, comme l'ont montré des expériences de simple KO chez la souris[29,30]. Elles phosphorylent les protéines Atg13 et FIP200 qui, en retour, recrutent le complexe ULK sur le site de formation du phagophore pour induire l'autophagie[31,32]. De plus, ULK1/2 possèdent un domaine de fixation aux membranes qui pourrait jouer un rôle dans ce recrutement [33].

L'activité kinase des protéines ULK1/2 est régulée par le complexe mTORC1[31,32] (cf. Figure 4) qui contient la kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin), protéine impliquée dans de nombreux processus contrôlant la croissance cellulaire, la synthèse protéique et la transcription[34,35]. mTORC1 est régulé par la voie PI3K/AKT et joue le rôle d'un senseur indirect pour de nombreux stimuli impliqués dans l'activation ou l'inhibition de l'autophagie (cf. partie I -A -2.1.7). En présence de nutriments comme des acides aminés ou du glucose, mTORC1 fixe le complexe ULK et phosphoryle les protéines ULK1/2 et Atg13.

L'activité kinase des protéines ULK est alors inhibée, empêchant l'initiation de l'autophagie. *A contrario*, l'inactivation de mTOR par une carence en acides aminés, un stress ou l'ajout de rapamycine (ou d'analogues, comme la Torin-1) induit sa dissociation du complexe[32] : l'activité kinase des protéines ULK1/2 est restaurée et l'autophagie induite.

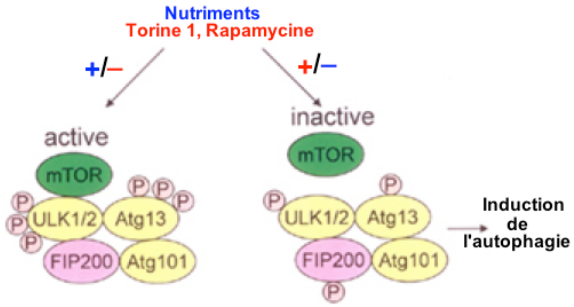


Figure 4 – Le complexe ULK régulé par mTOR
Adapté de Zeng X et coll. , Front. Oncol. 2011

Chez les mammifères, la protéine Atg101 interagit avec Atg13[36], empêche sa dégradation par le protéasome[36] et permet ainsi la stabilisation du complexe ULK. De façon intéressante, Atg101 serait impliquée dans la relocalisation à la membrane d'initiation du complexe ULK[36] lors d'une carence en nutriments.

Certaines protéines d'échafaudage sont importantes pour les interactions et le recrutement concomitant des complexes PI3K et ULK au site d'initiation proche du RE. Parmi elles, la protéine AMBRA1 interagit avec les microtubules et séquestre le complexe PI3K en dehors du site d'initiation[37]. Après activation de l'autophagie, les complexes ULK phosphorylent AMBRA1 qui se décroche des microtubules pour permettre le recrutement du complexe PI3K au niveau du RE[38].

Le complexe d'assemblage exocyste, connu pour sa fonction dans le transfert des vésicules du Golgi à la membrane plasmique, fait, lui aussi, le lien entre les complexes ULK et PI3K[39]. En présence de nutriments, ce complexe rapproche ULK1 et mTORC1 et permet l'inhibition de l'autophagie. Après une carence, le complexe est modifié et permet la séquestration de mTORC1 et le recrutement des complexes ULK et PI3K au site de formation du phagophore.

2.1.4. La nucléation sur le site de l'omégasome

L'origine exacte de la membrane d'isolation reste l'étape la moins comprise du processus d'autophagie. Chez la levure, il y a une synthèse de novo de la double membrane au niveau du site d'assemblage du phagophore, ou PAS, une région définie et centralisée[40]. Chez les mammifères, il n'existe pas à proprement parler de PAS centralisé. Les premières études suggéraient également une synthèse de novo du phagophore, du fait de l'absence relative de protéines et de marqueurs membranaires connus sur la membrane de l'autophagosome dans des fractions purifiées. Cependant, des données contradictoires se sont rapidement accumulées, supportant l'hypothèse d'une origine complexe/multiple de la membrane

d'isolation, pouvant provenir, du moins partiellement, de complexes membranaires du RE[12,21,24,41–43], du réseau trans-golgien (trans-Golgi network, TGN) [27,44], des mitochondries[45,46] ou même de la membrane plasmique[47].

Néanmoins, les récentes observations tendent à montrer qu'un sous-domaine du RE est le candidat le plus plausible au site physique de nucléation (cf. Figure 5) [12,21,24,41–43]. Lors de carences nutritionnelles, les complexes ULK et PI3K sont retrouvés près de la membrane du RE et cette relocalisation est dépendante d'Atg13 et d'Atg14, respectivement[24,48,49]. La production de PtdIns3P par la PI3K sur la membrane du RE va alors permettre le recrutement de protéines contenant des domaines FYVE ou PX fixant la PtdIns3P[50]. DFCP1 (Double FYVE-containing protein 1) et WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2) sont ainsi recrutées à la membrane du RE où elles colocalisent, formant des puncta et participant à la nucléation[12,24,43]. La formation de ces puncta est empêchée par l'ajout de 3-MA, la mutation des domaines de liaison au PtdIns3P ou l'exclusion d'Atg14L des membranes du RE.

Deux études tomographiques en microscopie électronique (TEM) ont permis d'identifier les structures membranaires où s'accumulent DFCP1, WIPI2 et les complexes ULK et PI3K/Atg14L[41,42]. Elles montrent qu'un sous-domaine de la membrane du RE forme une courbe qui entoure la membrane du phagophore en formation (cf. Figure 5). Celui-ci est interconnecté à cette structure nommée omégasome, qui ressemble à une main en forme de pince, qui servirait de support ou d'incubateur à la biogenèse de l'autophagosome. Ce sont les cycles de production de PtdIns3P qui régulent la croissance de l'omégasome. Des données d'imagerie sur cellules vivantes montrent qu'en situation de carence, Atg13 s'accumule de façon dépendante du complexe ULK sur des omégasomes positifs pour PtdIns3P où colocalisent Atg14L, DFCP1 et WIPI2[49]. Lorsque le phagophore atteint une taille limite, le complexe ULK se dissocie de l'omégasome. L'autophagosome nouvellement formé se referme ensuite très rapidement.

Chez les mammifères, Atg9, la seule protéine Atg transmembranaire, colocalise lors d'une carence (ou l'ajout de rapamycine) avec des marqueurs de l'autophagie et interagit dynamiquement avec les autophagosomes en formation sans y être incorporée[51]. En condition nutritionnelle normale, elle transite des compartiments autophagiques vers le TGN et les endosomes tardifs et cette relocalisation est dépendante de l'activité kinase de ULK1[44] mais aussi de l'interaction Bif-1/UVRAG dans le complexe PI3K et de la protéine WIPI2[51].

Il a été proposé qu'Atg9 n'est pas indispensable à la formation des autophagosomes dans des conditions basales mais qu'elle serait importante pour l'induction de l'autophagie après une carence ou un stress[51]. Ces fonctions chez les mammifères seraient alors semblables à celles décrites dans la levure : Atg9 permettrait l'apport de composants lipidiques ou protéiques de sources diverses (TGN et endosomes) vers le phagophore au niveau de l'omégasome pour aider à sa formation puis à son élongation (cf. Figure 5).

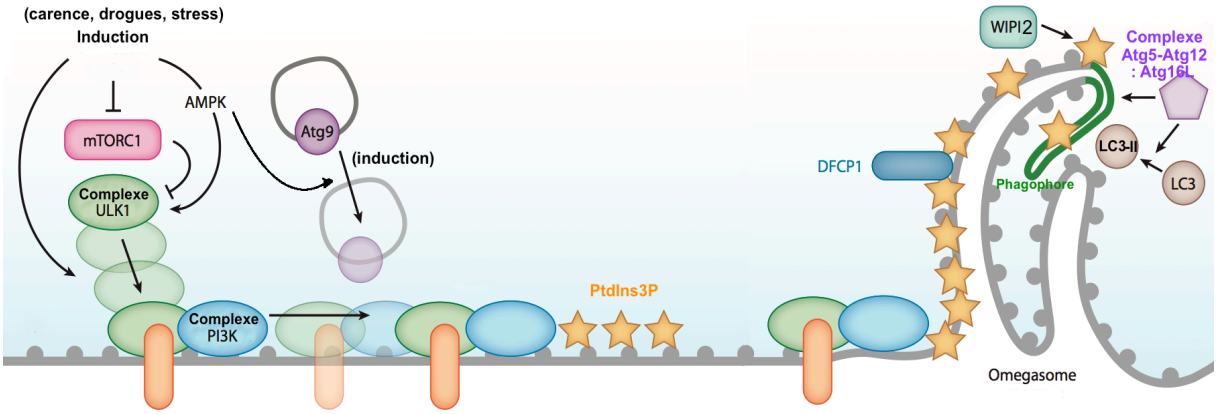


Figure 5 – Recrutement au site de l'omegasome : la nucleation
Adapté de Mizushima N. et coll. , Annu. Rev. Cell. Dev 2011

Récemment, des études ont montré un rôle des mitochondries dans la formation du phagophore et de l'autophagosome[45,46]. Un modèle conciliant le rôle du RE et des mitochondries a été proposé[52] : des protéines Atg sont retrouvées majoritairement aux sites de contact entre le RE et les mitochondries[52]. Ainsi, lors d'une carence nutritionnelle, les membranes associées (mitochondria-associated ER membrane ou MAM) constitueraient des lieux de recrutement de facteurs comme Atg14L[52]. En résulteraient la production de PtdIns3P par la PI3K, le recrutement des protéines WIPI2 et DFCP1 et la déformation de la membrane du RE caractéristique des omégasomes. La croissance du phagophore sur ces sites est très rapide, soutenant l'hypothèse d'une synthèse lipidique locale par des enzymes du RE, ou de la membrane mitochondriale, encore non décrites[52]. Lors de l'induction de l'autophagie, l'apport de lipides serait augmenté, alimenté par des sites externes comme le TGN à travers le trafic de la protéine mAtg9. La protéine p38IP, interagissant avec la voie p38MAPK impliquée dans la division cellulaire et la réponse à divers stimuli de stress, serait impliquée dans le trafic d'Atg9 en réponse à une carence en acide aminé[53]. Atg9 serait donc susceptible de contribuer à la formation de la membrane d'isolation et à son expansion. Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires pour comprendre les rôles exacts de cette protéine.

2.1.5. Elongation du phagophore et complétion

Après l'initiation de l'autophagie, et une fois le phagophore formé lors de la nucléation, celui-ci va s'agrandir. C'est l'étape d'élongation, qui se poursuit jusqu'à la fermeture de l'autophagosome.

Cette étape d'élongation fait intervenir deux systèmes de conjugaison similaires (homologie de fonction) aux systèmes de conjugaison de l'ubiquitine : le système de conjugaison Atg12-Atg5:Atg16L[54,55] et le système de conjugaison LC3[56] (orthologue d'Atg8). Chacun fait intervenir une enzyme d'activation (E1-like), une enzyme de conjugaison (E2-like) et une ligase (E3-like). (cf. Figure 6)

2.1.5.1. Le système de conjugaison Atg12-Atg5

Le complexe Beclin1:hVps34:Atg14L va permettre le recrutement au site du phagophore via l'interaction entre Atg16L et WIPI2[57,58] du premier système de conjugaison Atg12-Atg5:Atg16L[48]. La conjugaison entre Atg12 et Atg5 s'effectue très rapidement après leur synthèse individuelle. Lors de ce processus, Atg12 est activée en présence d'ATP par la protéine Atg7[59] (E1-like) qui, par ajout d'un groupe carboxyle, permet la formation d'un pont thioester entre une glycine sur Atg12 et une cystéine sur Atg7. Atg12 se lie ensuite à Atg10 (E2-like) par transfert de la liaison thioester[60]. Cette liaison étant peu stable, Atg12 va très vite se lier à la protéine Atg5 au niveau d'une lysine, formant le complexe Atg12-Atg5 stable. Le conjugué Atg12-Atg5 peut ensuite s'associer avec des protéines Atg16L[48] de façon non covalente, ce qui induit l'homo-oligomérisation des complexes, dont une fraction colocalise sur la membrane de l'autophagosome. Atg12-Atg5 :Atg16 va alors jouer son rôle d'enzyme E3-like (cf. ci-dessous).

2.1.5.2. Le système de conjugaison LC3

Le deuxième système impliqué dans le processus autophagique est unique car il est le seul connu permettant la conjugaison d'une protéine à un lipide. Il s'agit de la protéine Atg8 chez la levure. Les cellules de mammifères elles, expriment plusieurs protéines Atg8-like divisées en deux sous-familles[56,61,62] :

- la sous-famille MAP-LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) comprenant les protéines LC3A, LC3B et LC3C.
- la sous-famille GABARAP (GABAA receptor-associated protein) comprenant les protéines GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2, GABARAPL3).

Ces orthologues d'Atg8 ont été originairement décrits pour leurs interactions avec la tubuline et les microtubules et leurs implications dans le trafic membranaire. Cependant, ils sont tous impliqués dans le processus d'autophagie mais interviennent dans des étapes différentes de l'élongation des autophagosomes. Les protéines MAP-LC3 seraient impliquées dans l'élongation[63,64] alors que les protéines GABARAP joueraient un rôle plus important dans des étapes plus tardives de maturation[63].

Les protéines LC3/GABARAP sont d'abord clivées par la protéase Atg4[65], dévoilant un résidu glycine en C-terminal. La famille des protéines Atg4 est composée de quatre membres, Atg4A à D ; Atg4B clive LC3 avec la plus grande efficacité et son mutant dominant négatif pour l'activité protéase Atg4bC74A est utilisé pour inhiber la complétion des vésicules d'autophagie[66]. En réponse à l'induction de l'autophagie, LC3 est conjugué au niveau de son C-terminal à la tête polaire de la phosphatidylethanolamine (PE), composant de la couche lipidique des membranes de l'autophagosome[62]. Cette réaction s'opère de façon similaire à la réaction de conjugaison entre Atg12 à Atg5. Elle requiert un système de conjugaison composé de la protéine Atg7[59] (E1-like), la protéine Atg3[67] (E2-like) et du complexe E3-like ligase Atg12-Atg5 :Atg16L[68,69]. Ainsi les deux complexes de conjugaison ubiquitine-like vont permettre ensemble l'incorporation du LC3 à la membrane de

l'autophagosome. Atg16L aurait pour rôle d'indiquer aux pools de protéines LC3 leur site de lipidation pour l'élongation de la membrane autophagique. La forme LC3 non lipidée est couramment appelée « LC3-I » et sa forme lipidée fixée aux membranes des autophagosomes est nommée « LC3-II ».

De façon intéressante, la quantité de LC3-II mobilisée au niveau du phagophore corrèle avec la taille de l'autophagosome[56,64], suggérant son implication directe dans l'expansion de la double membrane. Cependant, le mécanisme précis est encore mal décrit.

Récemment pourtant, une étude *in vitro* sur des membranes artificielles[70] a permis une meilleure compréhension du mécanisme d'échafaudage des membranes autophagiques faisant intervenir les deux systèmes de conjugaison Atg12-Atg5 et LC3-II. D'un point de vue cinétique, l'activité ligase d'Atg12-Atg5 faciliterait tout d'abord la lipidation du LC3-I clivé, comme décrit précédemment. Le LC3-II pourrait ensuite recruter par une interaction directe de nouveaux complexes Atg12-Atg5[70]. En outre, Atg16L permettrait l'assemblage de l'échafaudage membranaire, en établissant des liaisons transversales entre les complexes LC3-II/Atg12-Atg5 accumulés, ordonnés alors en un réseau maillé qui permettrait la courbure et l'allongement de la double membrane[70]. Atg16L favoriserait donc l'arrivée du LC3 sur les autophagosomes[71]. De façon intéressante, l'interaction entre Atg12-Atg5 et LC3-II fait intervenir un motif AIM (Atg8 interacting motif – ou LIR pour LC3 interacting region) non canonique sur Atg12[70]. Ces motifs sont classiquement portés par des protéines cargo ciblées spécifiquement et dégradées par les autophagosomes (cf. partie I -A -2.2.2). Ainsi, ces protéines cargo rentreraient en compétition avec Atg12-Atg5 pour la liaison au LC3-II, empêchant ou plutôt retardant la formation de l'échafaudage et la fermeture de l'autophagosome[70]. Ce modèle expliquerait comment le LC3-II pourrait agir d'une part comme un composant rigide de l'échafaudage membranaire qui facilite la courbure du phagophore et d'autre part comme un adaptateur flexible pour les protéines cargo ciblées. Le complexe Atg5-Atg12:Atg16L se dissocie ensuite, une fois l'autophagosome formé[55]. La protéine LC3-II, quant à elle, reste associée à l'autophagosome même après sa maturation. Le LC3-II associé à la membrane interne de l'autophagosome est dégradé tandis que le LC3-II associé à la membrane externe est délipidé par Atg4 et recyclé[72].

La découverte de la protéine LC3 et sa caractérisation fonctionnelle ont joué un rôle primordial dans l'étude du processus d'autophagie et de son flux[73]. Son association sur les membranes autophagiques (phagophores, autophagosomes et autolysosomes) en a fait un marqueur spécifique des vésicules d'autophagie. En marquant la protéine LC3 avec des anticorps couplés ou un tag GFP, on peut aisément suivre les vésicules d'autophagie par imagerie photonique ou électronique. De plus, la lipidation du LC3 modifie ses propriétés électrophorétiques : LC3-I migre avec un poids moléculaire de 18 kDa alors que LC3-II migre avec un poids apparent de 16 kDa. En faisant le rapport entre les deux, on évalue facilement l'induction de l'autophagie dans les cellules.

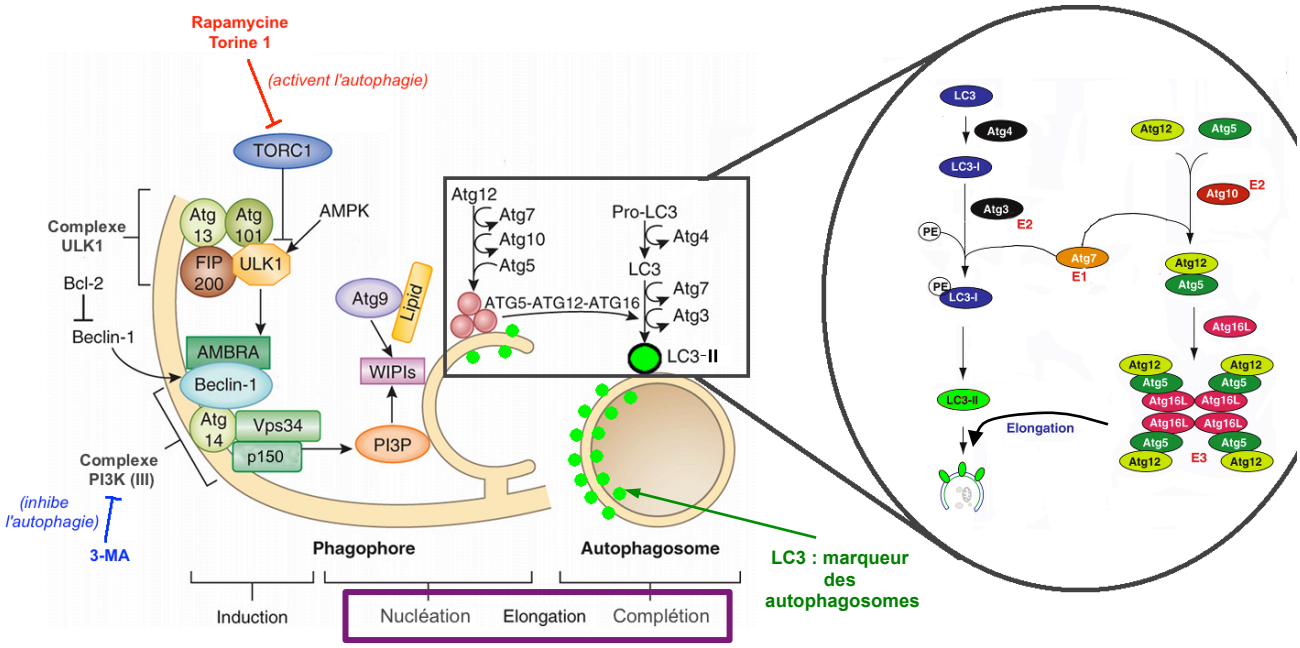


Figure 6 – Les systèmes de conjugaison : élongation/complétion du phagophore
Adapté de Ralp A Nixon, Nature Med Review, 2013

2.1.6. Maturation et dégradation des autophagosomes

Une fois la fusion des extrémités en expansion de la membrane du phagophore terminée, l'autophagosome nouvellement formé va pouvoir maturer. Ce processus passe par plusieurs étapes permettant *in fine* la dégradation du cargo dans la matrice lysosomale et son recyclage.

Ces étapes sont importantes dans l'étude du flux autophagique. En effet l'accumulation de vésicules d'autophagie (marquées LC3-II) peut être le résultat de l'induction de la formation des autophagosomes lors des événements précoces, ou de l'inhibition de la maturation par blocage de la fusion lysosomale. Par exemple, des inhibiteurs de l'acidification lysosomale comme la chloroquine (ChQ) et la bafilomycine A1 (Baf A1) empêchent la fusion lysosomale et induisent ainsi l'accumulation des autophagosomes qui ne sont plus dégradés[73]. La pepstatine, un inhibiteur des protéases lysosomales, est aussi utilisée. Un outil ingénieux permettant d'évaluer le flux a été mis au point : l'expression forcée de la molécule de fusion mRFP-GFPLC3 dans une cellule permet de différencier les autophagosomes non matures des amphisomes ou autolysosomes. En effet, la protéine GFP perd de sa fluorescence verte dans un environnement acide, contrairement à la mRFP qui reste rouge[73,74]. Avec cet outil, on peut aisément évaluer si l'accumulation de vésicules autophagiques est fonction d'une induction de la formation du phagophore ou d'une inhibition de la maturation lors des étapes de fusion lysosomale.

2.1.6.1. Interactions voies endosomales & lysosomales / autophagosomes : acidification et dégradation

L'autophagosome peut tout d'abord s'agrandir par fusion avec des compartiments endosomaux d'acidité croissante[75] (endosomes précoces, tardifs [76,77] et corps multivésiculaires ou MVB[78]), créant un amphisome[79], avant de fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome[80]. Ces étapes tardives dépendent de molécules Atg et d'une machinerie moléculaire proche de celle impliquée dans la voie d'endocytose et la fusion vésiculaire.

Ainsi, les clathrines interagissent avec Atg16L et l'inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines perturbe la formation des autophagosomes matures[47]. De plus, la maturation et l'agrandissement des autophagosomes nécessitent des événements de fusion homotypiques et hétérotypiques qui font intervenir des complexes protéiques contenant respectivement les protéines SNARES VAMP7[71] et VAMP3[81] (vesicle associated membrane proteins). VAMP7 colocalise avec des vésicules marquées Atg16L qui correspondent à des autophagosomes non matures, et provoque leur fusion[71]. L'augmentation de la taille de ces vésicules semble faciliter le recrutement du LC3 par le complexe Agt12-Atg5:Atg16L (cf. partie I -A -2.1.5.2) sur la membrane de l'autophagosome qui mature[71]. VAMP3 permet la fusion d'endosomes de recyclage positifs pour Rab11 et Atg16L avec des endosomes précoces marqués Atg9, et ce processus est activé après une carence nutritionnelle, augmentant la formation d'autophagosomes matures[81]. De concert avec Atg9, Rab11 est donc requis pour la maturation des autophagosomes[82,83]. En outre, VAMP3 induit la fusion des autophagosomes avec les MVB, et les amphisomes ainsi formés fusionnent avec les lysosomes par un mécanisme qui dépend de VAMP7[83]. Rab7[28,84–86] et le complexe ESCRT[78,87] (endosomal sorting complexes required for transport) sont également importants pour la fusion des endosomes/MVB avec les autophagosomes. UVRAG contrôle positivement la maturation des autophagosomes en activant Rab7 [28] et négativement en interagissant avec Rubicon [21,22] (cf.Figure 3).

VAMP3 et VAMP7 présentes sur les membranes endosomales/lysosomales ne sont pas retrouvées sur la membrane des autophagosomes maturés. De plus ces SNARES régissent les étapes de maturation des autophagosomes en amphisomes, mais ne sont pas directement impliquées dans la formation des autolysosomes[88]. Or la fusion autophagosome/lysosome se doit d'être régulée, et seul les autophagosomes complétés doivent pouvoir fusionner avec les lysosomes pour une dégradation efficace de leur cargo. De fait, la maturation finale de l'autophagosome en autolysosome passe par le recrutement sur la membrane externe de la protéine SNARE Stx17 (syntaxine 17) qui s'effectue uniquement une fois l'autophagosome refermé[88]. Stx17 sur les autophagosomes interagit avec la protéine VAMP8 retrouvée à la membrane des lysosomes pour conduire à la fusion entre ces deux types de vésicules[88]. Une fois la fusion autophagosome/lysosome accomplie, des hydrolases H+-ATPase augmentent le pH et activent les protéases de la famille des cathepsines, qui dégradent le cargo séquestré. La membrane interne de l'autophagosome est également dégradée par le pH acide et par des protéines à activité lipase présentes dans le lysosome. En bloquant la fusion autophagosomes/lysosomes avec la ChQ ou la Baf A1, on empêche ainsi sa dégradation.

2.1.6.2. Recyclage du cargo

La dégradation lysosomale du cargo apporté par l'autophagosome est impliquée dans la régulation du métabolisme des protéines, des lipides et des carbohydrates[89]. Atg22 est une perméase présente à la membrane des autolysosomes qui recycle vers le cytosol les acides aminés issus des protéines dégradées[90].

2.1.6.3. Rôle du cytosquelette

Les microtubules, polymères de tubuline α et β dont l'assemblage et le désassemblage sont finement régulés par la cellule, sont impliqués dans l'ancrage et le transport des autophagosomes vers les compartiments endosomaux et lysosomaux[91]. Ce transport bidirectionnel est dépendant de la dynéine qui joue son rôle de moteur pour le déplacement de divers vésicules dont les autophagosomes[92]. De plus, Rab7, en s'associant avec la protéine FYCO (FYVE and coiled-coil domain-containing 1) et LC3, jouerait un rôle important dans l'ancrage des autophagosomes aux microtubules et dans leur déplacement[93].

2.1.7. Les voies d'induction et de régulation de l'autophagie

De par son importance dans la régulation des voies métaboliques, la formation et la maturation des autophagosomes sont finement régulées par des senseurs cytoplasmiques de l'état énergétique de la cellule et par certains facteurs de transcription.

2.1.7.1. En amont de mTOR

De nombreux signaux, comme la présence de facteurs de croissance, d'acides aminés, de glucose ou d'ATP sont intégrés par la voie mTOR dans la cellule[94]. De fait, la régulation de l'autophagie par cette voie (cf. partie I -A -2.1.3) est très conservée.

Des observations chez la drosophile et dans des cellules de mammifères suggèrent un rôle des GTPases Rag (Ras-related GTPases) et des protéines Rheb/Arf1 (Ras homolog enriched in brain) dans l'activation du complexe mTORC1 en réponse aux acides aminés[95–97]. En effet, en présence d'acides aminés, mTOR se déplace sur les membranes de compartiments endosomaux tardifs (Rab7+) et lysosomaux où se trouve Rheb, qui l'active alors par phosphorylation[96]. Cette relocalisation est dépendante de la GTPase Rag. De façon intéressante, les acides aminés issus de protéines dégradées dans la lumière du lysosome (après induction de l'autophagie par exemple) exerceraient un contrôle sur le recrutement des GTPases sur la membrane lysosomale pour l'activation de mTOR[98]. Ce mécanisme pourrait exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activation de l'autophagie lors d'une carence prolongée[99].

Par ailleurs, la L-glutamine jouerait également un rôle de facteur limitant dans l'activation du complexe mTORC1[100]. Les niveaux de L-glutamine dans la cellule sont régulés par deux systèmes de transporteurs de la famille SLC (solute carrier family) : SLC1A5, qui fait rentrer la glutamine dans la cellule, et SLC7A5/SLC3A2, un transporteur bidirectionnel qui fait sortir une L-glutamine en échange de L-Leucine. La leucine facilite

alors l'activation de mTOR dépendante de Rheb, inhibant *in fine* l'induction de l'autophagie[100,101]. La perte de fonction de SLC1A5 induit l'activation de l'autophagie et inhibe la croissance cellulaire[100].

En outre, l'activation de mTOR peut être induite par la fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire[102] ou par la présence d'acides aminés[103] via la voie PI3K de type I/AKT aboutissant à la phosphorylation de mTOR par Rheb. mTOR joue donc également un rôle dans la régulation de l'autophagie en fonction de la glycémie.

Lors d'un stress énergétique, la baisse d'ATP dans la cellule participe à l'induction de l'autophagie en inhibant mTOR via la voie AMP/AMPK qui rejoint la voie PI3K de type I / AKT[104].

De façon intéressante, il existe des mécanismes de contrôle de l'inhibition de l'autophagie médiée par mTOR. Lorsque mTORC1 est activée et l'autophagie inhibée, le complexe phosphoryle la p70S6K et l'active, favorisant d'une part la croissance cellulaire et d'autre part l'activation de l'autophagie, en inhibant la voie de transduction PI3K de type I / AKT[105]. Cette boucle de rétrocontrôle régulerait l'inhibition de l'autophagie médiée par la rapamycine et pourrait être en partie responsable de l'autophagie basale.

2.1.7.2. Induction mTOR indépendante

La régulation de l'autophagie passe également par le complexe PI3K de type III. Dans les conditions basales, Bcl-2 interagit via son domaine BH3 avec Beclin 1, ce qui empêche son recrutement dans le complexe PI3K III et induit l'inhibition de l'autophagie[106–109]. Ainsi, Bcl-2 fonctionne non seulement comme une protéine anti-apoptotique, mais aussi comme une protéine anti-autophagie via son interaction inhibitrice avec Beclin 1. Cette fonction anti-autophagique de Bcl-2 peut aider à maintenir le flux autophagique basal à des niveaux qui sont compatibles avec la survie des cellules. D'un autre côté, Bcl-2 permet ainsi l'intégration des signaux de survie et de mort cellulaire, en lien étroit avec la régulation de l'autophagie.

D'autres mécanismes de régulation de l'autophagie, indépendants de mTOR, ont été décrits : l'un d'eux fait intervenir le niveau d'IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate). L'autophagie est activée dans des cellules traitées avec du lithium, une drogue qui perturbe le métabolisme de l'IP3 en inhibant l'inositol monophosphatase[110]. De la même façon, l'inhibition des canaux calciques récepteurs à l'IP3 stimule l'autophagie sur des sites proches du RE[111]. Le mécanisme fin de cette régulation reste cependant à découvrir, le rôle du Ca2+ dans la modulation de l'autophagie par cette voie étant controversé.

2.1.7.3. Régulation nucléaire/transcriptionnelle de l'autophagie

De nombreux facteurs de transcription sont décrits comme importants dans la régulation de l'autophagie. C'est le cas des facteurs JNK/c-Jun, NF-κB, HIF-1 ou encore p53.

Le facteur JNK/c-Jun (c-Jun N-terminal kinase) augmente la transcription de Beclin 1. Par ailleurs, JNK de par son activité kinase phosphoryle Bcl-2, déclenchant sa dissociation de Beclin 1 et induisant l'autophagie[107].

Le facteur NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) est impliqué dans la réponse immunitaire, la réponse au stress et la survie cellulaire. Il induit l'autophagie en augmentant la transcription de Beclin 1[112] sauf dans les macrophages où il inhibe l'expression de Beclin 1 et d'Atg5[113]. Par ailleurs, NF-κB interfère avec la voie d'induction de l'autophagie médiée par le TNFα ; son rôle dans la modulation de l'autophagie est donc complexe et varie suivant les types cellulaires et la voie d'activation engagée[114].

HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) régule l'induction de l'autophagie en réponse à l'hypoxie[115]. Ce facteur semble particulièrement important dans l'induction de la mitophagie[116].

Lors d'un stress, p53 s'accumule dans le noyau où elle induit la transcription de nombreux facteurs. L'expression de la protéine lysosomale DRAM (damage-regulated autophagy modulator) est régulée ainsi par la p53[117,118]. Cette protéine est impliquée à la fois dans l'induction de la maturation de l'autophagosome, de l'initiation au site du phagophore et de la mort cellulaire induite par p53. Cependant, son mécanisme d'action sur l'induction de l'autophagie reste à élucider.

2.2. L'autophagie sélective

Le processus d'autophagie est apparu au cours de l'évolution comme une adaptation des cellules eucaryotes à la carence en nutriments, permettant le recyclage et la mobilisation de composants cellulaires en dégradant des portions du cytoplasme. Ce mécanisme a été ensuite adapté à la dégradation de structures toxiques pour la cellule ou en quantité excessive telles que des protéines agrégées, des organelles entières ou même des pathogènes intracellulaires. À la différence de l'autophagie canonique non sélective, qui se manifeste par une séquestration aléatoire des composants cytoplasmiques, l'autophagie sélective peut survenir en absence de carences nutritionnelles. Elle est caractérisée par la présence d'autophagosomes qui confinent leurs substrats de façon sélective, où les autres composants cytoplasmiques sont souvent absents.

La caractérisation de récepteurs/adaptateurs spécifiques pour l'autophagie sélective et la compréhension des mécanismes de formation des agrégats protéiques dans la cellule ont permis de mieux comprendre le processus de sélection des cargos ciblés.

2.2.1. Formation des agrégats protéiques : interconnexions entre le protéasome et la voie autophagique

Chez les eucaryotes, la majeure partie des protéines à dégrader est marquée par une protéine de 76 acides aminés appelée ubiquitine.

L'ubiquitination fait intervenir une cascade d'enzymes (E1, E2 et E3) qui catalysent la fixation covalente et spécifique entre l'ubiquitine et une lysine sur la protéine substrat[119]. Les protéines polyubiquitinées sont adressées à différentes voies de dégradation suivant la nature de la chaîne d'ubiquitine fixée[119]. Deux mécanismes cellulaires permettent la dégradation des protéines polyubiquitinées[120,121] : le premier fait intervenir la dégradation par le système

ubiquitine/protéasome (UPS). Les protéines cibles de cette voie sont le plus souvent solubles à courte durée de vie. Le second fait intervenir l'autophagie et la voie lysosomale, et est impliqué dans la dégradation de gros agrégats et des protéines à longue durée de vie.

La formation d'agrégats protéiques dans une cellule est multifactorielle. Elle peut être due à un mauvais repliement des protéines, causé par un stress (choc thermique), des mutations génétiques ou encore un assemblage imparfait au sein d'un complexe polyprotéique. De plus, des erreurs lors de la traduction génèrent une quantité importante de polypeptides modifiés ou tronqués qui peuvent s'agglutiner. On estime ainsi qu'environ 30% des protéines nouvellement synthétisées sont non-fonctionnelles[122]. Lors d'un défaut d'assemblage ou de repliement, ces protéines sont prises en charge par des chaperonnes (HSP, pour Heat shock proteins) qui contrôlent la conformation des protéines dénaturées et les restructurent. En cas d'échec ou lors de modification de la séquence protéique, les protéines non fonctionnelles sont polyubiquitinées. Cependant, les complexes protéiques et les agrégats ne sont digérés par le protéasome qu'après leur désassemblage, ce qui fait d'eux de mauvais substrats pour le système UPS[123]. L'autophagie prendrait alors le relais, soulignant l'interconnexion entre ces deux mécanismes[124].

De façon remarquable, l'inhibition du protéasome par des drogues comme le bortézomid va induire l'autophagie[125,126] qui agit comme un mécanisme de compensation suite à l'accumulation d'agrégats protéiques[127–129]. Cette induction est en partie dépendante de l'UPR (unfolded protein response) : le facteur de transcription ATF4 (Activating transcription factor 4) est stabilisé[125] et son expression augmentée[126], conduisant à l'augmentation de la synthèse des protéines LC3[125], Atg5 et Atg7[126]. D'autres facteurs, comme IRE1[130] et p53[131], seraient également impliqués dans l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition de la voie UPS.

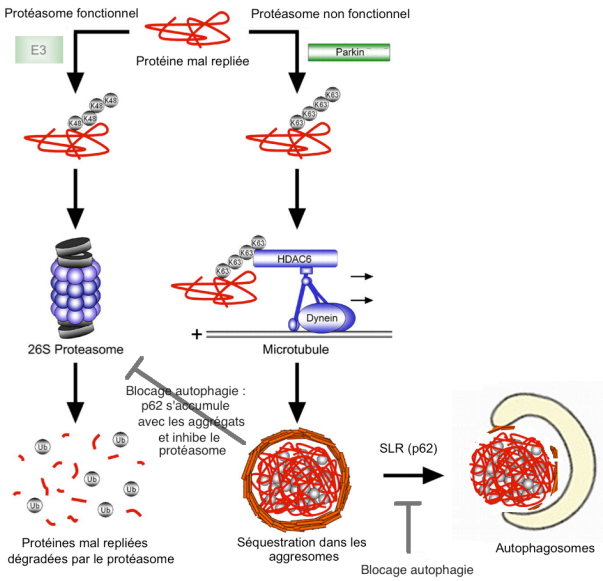


Figure 7 – Dégradation des agrégats et relations protéasome/autophagie
Adapté de Olzmann, J.A., JCB 2007

Les agrégats protéiques peuvent être toxiques pour la cellule. Des dérégulations de leur dégradation sont associées à de nombreuses maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, ou encore les maladies à prions. La protéine HDAC6 (histone deacetylase 6) fixe la dynéine et contient un domaine d'interaction à l'ubiquitine (UBD) : elle joue un rôle majeur dans le transport via les microtubules des agrégats polyubiquitinés[132]. Elle permet leur concentration dans une structure proche du noyau appelée agrésome où ils sont enchevêtrés dans des filaments intermédiaires et rapidement dégradés par l'autophagie sélective[125,127,128,133,134]. Ce mécanisme fait intervenir la protéine réceptrice des cargos p62/SQSTM1[135,136] (cf. ci-dessous).

D'autre part, les agrégats de protéines ubiquitinées s'accumulent lorsque la voie autophagique est bloquée chez des souris KO pour Atg5/7[137,138]. Etonnamment, le blocage de l'autophagie semble conduire à une altération du système UPS, due à l'accumulation de p62 [139,140].

2.2.2. Les protéines réceptrices des cargos

L'autophagie sélective nécessite un ensemble de protéines adaptatrices, des récepteurs qui recrutent les cargos cytoplasmiques ciblés à la membrane de l'autophagosome.

Les principaux récepteurs décrits sont les protéines p62/SQSTM1 (sequestosome), NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) et NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa)

Tous ces récepteurs contiennent dans leur séquence un motif spécifique composé de quatre acides aminés. Cette séquence, de type W/YXXL/I, est appelée motif LIR (LC3-interacting motif, ou AIM, cf. partie I -A -2.1.5.2). Elle permet l'interaction directe de la protéine adaptatrice avec les protéines LC3/GABARAP. Cette séquence est retrouvée dans de nombreuses protéines. Cependant, l'interaction LC3/adaptateur dépend également des acides aminés environnants. La séquence consensus décrite est de type D/E-D-W/F/Y-x-x-L/I/V[141–143]. Dans certains cas, la phosphorylation d'acides aminés proches du / sur le domaine LIR modulerait la fixation de LC3 sur la protéine adaptatrice, introduisant une forme de régulation de l'autophagie sélective[144,145].

Par ailleurs, les récepteurs adaptateurs contiennent également un domaine UBD qui permet leur interaction avec leur substrat ubiquitiné. De par cette interaction, ces adaptateurs sont généralement dégradés en même temps que leur cargo, une fois l'autophagosome maturé.

- **p62/SQSTM1 :**

Cette protéine adaptatrice contient un domaine UBD en C-terminal, un domaine N-terminal PB1 impliqué dans son auto-oligomérisation, et un domaine LIR (DDDWTHL) qui fixe LC3 et GABARAP[143,146,147] (cf. Figure 8). Chez l'Homme, des mutations dans le domaine UBD sont associées au développement de la maladie de Paget (une hypertrophie osseuse chronique), [148–150] démontrant l'importance de p62 *in vivo* dans la dégradation des protéines agrégées. Par ailleurs, une accumulation de p62, associée à des agrégats protéiques, est observée dans des neurones de souris déficientes pour Atg7, dans lesquelles l'autophagie

est défectueuse[151]. L'accumulation de p62 colocalisant avec des protéines ubiquitinées est observable dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington. Cela suggère son implication dans la dégradation dépendante de l'autophagie des protéines ubiquitinées huntingtines mutées[146].

De façon intéressante, p62 fixe les protéines mono-ubiquitinées mais possède une affinité marquée pour certaines chaînes d'ubiquitine[152] (affinité modulée par phosphorylation[153]). Le domaine PB1 d'auto-oligomérisation permet à p62 de former des structures en agrégats[154]. Elle forme avec les agrégats protéiques ubiquitinés ciblés des structures de types agrésomes appelé ALIS[155] (aggresome-like induced structure) qui peuvent être dégradées par autophagie[146,156,157].

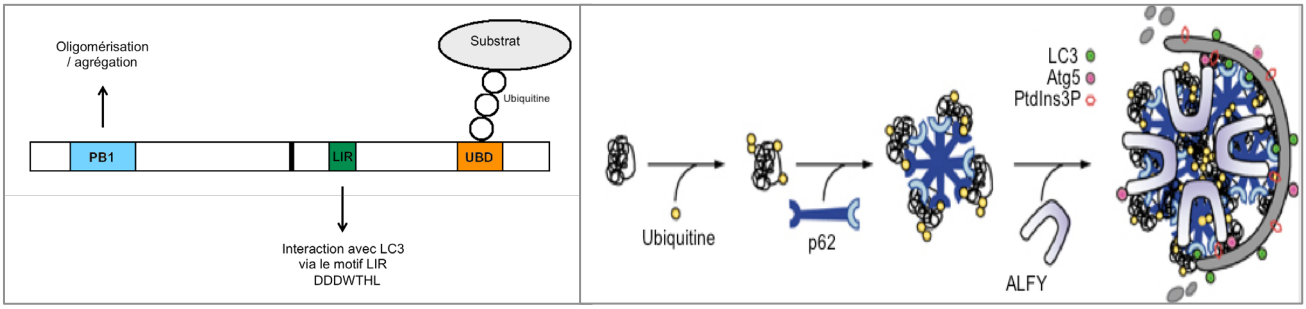


Figure 8 – p62, structure et fonction

Adapté de Isakson et coll. , Cell Death and Differentiation, 2013

La protéine ALFY (autophagy-linked FYVE protein), localisée à la membrane des autophagosomes de par sa fixation au PtdIns3p, lie également p62 et Atg5[16,158,159]. Sa déplétion induit une diminution sévère de la dégradation des structures agrésome-like[158,159]. Elle pourrait participer avec LC3 au recrutement de p62 à la membrane de l'autophagosome.

A noter que la dégradation continue de p62 par la machinerie autophagique en fait un marqueur du flux autophagique[73] : elle s'accumule lorsque l'autophagie est bloquée dans les étapes tardives de maturation ou est inhibée dans ses étapes d'initiation, et elle est dégradée lorsque l'initiation de l'autophagie est induite dans la cellule.

- **NBR1 et NDP52 :**

Tout comme p62, NBR1 est impliquée dans la dégradation des protéines ubiquitinées[160,161]. Elle est capable de lier p62 mais les deux protéines peuvent être dégradées séparément l'une de l'autre[160]. Elle contient 2 motifs LIR permettant sa fixation au LC3, oligomérise grâce à son domaine bispiralé (coiled-coil domain) et possède également un domaine UBD fixant les chaînes de poly-ubiquitine[160]. Il semblerait qu'un changement dans la conformation de la protéine soit nécessaire à la fixation UBD/ubiquitine[160]. Tout comme p62, NBR1 est retrouvée dans des structures agrésomes-like qui s'accumulent lors du blocage du flux autophagique[162].

NDP52 possède un motif LIR non canonique qui fixe uniquement l'isoforme C de la protéine LC3. Cette protéine adaptatrice fixe des protéines de la paroi de bactérie, induisant la

xénophagie. Le rôle des protéines adaptatrices/SLR dans le ciblage de pathogènes intracellulaires sera décrit plus en détail dans la partie I -C -1.1.1.

2.2.3. Formes spécifiques d'autophagie sélective

L'autophagie sélective est impliquée dans la dégradation d'organelles défectueuses ou en excès dans la cellule comme les mitochondries (mitophagie), les peroxysomes (pexophagie), les ribosomes (ribophagie) ou des pathogènes intracellulaires (xénophagie, cf. partie I -C -1.1). À l'exception de la mitophagie et de la xénophagie, les autres formes d'autophagie spécifique d'organelles sont très peu étudiées chez les mammifères.

La mitophagie semble être un processus important pour la dégradation des mitochondries abîmées, évitant ainsi la libération de radicaux libres dans le cytoplasme. Les protéines adaptatrices sont impliquées dans ce processus. Ainsi, la protéine PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) peut fixer la membrane des mitochondries dépolarisées et induit le recrutement de l'enzyme E3 PARKIN, qui va permettre l'ubiquitination des mitochondries, reconnues ensuite par p62[163]. De façon intéressante, des mutations dans PINK1 et PARKIN sont fortement impliquées dans la maladie de Parkinson. D'autres mécanismes participent à la mitophagie, comme la protéine Nix de la membrane mitochondriale qui possède un motif LIR interagissant avec LC3[164]. NBR1, quant à lui, est impliqué dans la reconnaissance et le ciblage des peroxysomes pour la pexophagie[165].

3. L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR LES CHAPERONNES

La CMA est une forme d'autophagie sélective et spécifique qui n'implique pas de transport vésiculaire. Elle a été décrite à la fin des années 90 par AM Cuervo et JF Dice[166] dans les cellules de mammifères et n'est pas retrouvée chez la levure. Elle permet la translocation de substrats protéiques du cytosol dans le lysosome et pourrait être responsable de la dégradation de jusqu'à 30%[167] des protéines cytosoliques mal repliées dans des conditions de stress nutritionnel prolongé.

3.1. Mécanismes moléculaires

De façon simplifiée, on peut découper le processus de la CMA en 3 grandes parties : (i) la reconnaissance individuelle d'une seule protéine par des protéines chaperonnes, (ii) le dépliement de la protéine et (iii) la translocation dans la matrice lysosomale où elle est dégradée.

Toutes les protéines substrats de la CMA possèdent dans leur séquence un motif hautement dégénéré composé de 5 acides aminés, nécessaire et suffisant pour la translocation dans le lysosome[167,168]. Historiquement, le premier substrat de la CMA découvert était la ribonucléase A[169]. Cette protéine possède une séquence KFERQ dont la suppression abolit entièrement la dégradation lysosomale de la protéine[169]. Son ajout sur une autre protéine induit sa dégradation par la voie lysosomale[170]. Le motif consensus dégénéré décrit par la suite est le suivant[168] : un ou deux résidus K ou R (chargé(s) positivement) ; un ou deux

résidus I,L,V ou F (acides aminés hydrophobes) ; un résidu D ou E (chargé négativement). Le penta-peptide est flanqué de chaque côté par un résidu Glutamine (Q).

Ce motif est reconnu spécifiquement par une protéine chaperonne cytosolique, HSC70 (Heat Shock Cognate protein de 70kDa)[171]. HSC70 joue donc un rôle primordial dans le ciblage du substrat[171] mais aussi dans son dépliement et sa translocation[172]. Le dépliement de la protéine substrat précède sa translocation[173]. De fait, d'autres protéines chaperonnes/co-chaperonnes comme CHIP, HSP90 ou HSP40 participeraient au ciblage du substrat[172] probablement en changeant sa conformation pour faciliter l'étape de translocation.

La translocation débute par la reconnaissance par complexe HSC70/substrat de l'extrémité C-terminale cytoplasmique de la protéine LAMP-2A, présente à la membrane lysosomale[166]. Cette protéine correspond à l'un des trois variants d'épissage du gène *lamp2* (LAMP2-A, B et C)[174]. Ces trois variants diffèrent au niveau de leur partie transmembranaire et cytosolique, et seule LAMP2-A est impliquée dans la CMA. La fixation d'HSC70/substrat provoque la multimérisation de LAMP-2A[175]. Le complexe multimérisé est stabilisé par l'interaction avec HSP90[175]. Il joue alors son rôle de translocateur : la protéine substrat est dépliée, passe dans le lysosome pour y être dégradée. La translocation du substrat requiert la présence de Lys-HSC70, un variant d'HSC70 présent dans la matrice lysosomale[176]. En effet, la quantité de Lys-HSC70 augmente en proportion de l'activation de la CMA[176,177]. Le blocage de Lys-HSC70 par un anticorps spécifique n'empêche pas la fixation du substrat sur LAMP-2A mais inhibe son internalisation[176]. Le marquage des lysosomes avec Lys-HSC70 permet d'évaluer la proportion de lysosomes effectuant la CMA. Ainsi au cours d'un stress nutritionnel, la proportion des lysosomes actifs pour la CMA passe de 20% à plus de 80%[177].

Une fois la translocation achevée, le multimère LAMP-2A se désassemble rapidement et ce processus est dépendant d'HSC70[175].

3.2. Régulation

L'interaction d'HSC70 avec le motif KFERQ-like d'une protéine est nécessaire et suffisante au ciblage de la protéine substrat dans le lysosome. La question de la régulation de cette prise en charge se pose donc mais est encore peu étudiée. Elle pourrait dépendre de l'accès au motif par la protéine chaperonne : une protéine bien repliée ne serait pas ciblée tandis que la même protéine mal conformée pourrait dévoiler le motif et être ciblée. De façon intéressante, la pyruvate kinase PKM2 est dégradée par la voie CMA uniquement après acétylation[178]. Ainsi, des modifications post-traductionnelles pourraient être responsables du ciblage par la CMA de protéines qui ne possèdent qu'une partie du motif (dont un résidu serait manquant par exemple)[178,179]. Ainsi l'acétylation d'un résidu lysine (K) le rend comparable à une glutamine (Q) et une phosphorylation pourrait contribuer au remplacement d'un résidu chargé négativement.

Concernant l'accès du complexe HSC70/substrat au translocateur LAMP-2A, il a été montré *in vitro* que l'activité CMA est directement proportionnelle à la quantité de complexes

LAMP2-A présents à la surface des lysosomes. La stabilité du multimère est régulée par deux protéines : EF1α (Elongation Factor 1A) et GFAP (Glial fibrillary acidic protein) [180]. HSC70 régulant le désassemblage du multimère LAMP-2A régule lui aussi la translocation[175,180].

Les lipides des membranes lysosomales peuvent également contrôler l'activation de la CMA en empêchant la multimérisation des protéines LAMP-2A et en induisant leur recrutement sur des micro-domaines lipidiques favorisant leur dégradation[181,182].

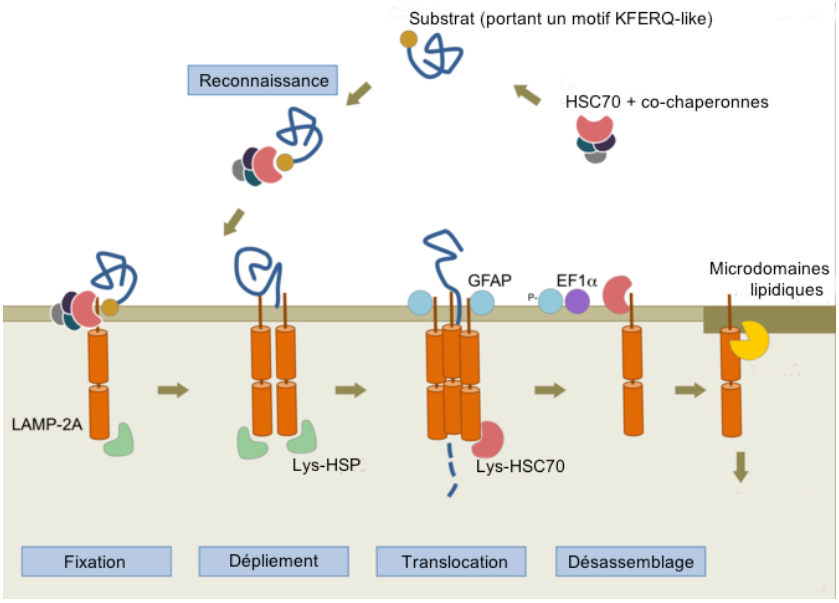


Figure 9 – La CMA : mécanismes et régulations

3.3. Relevance physiologique

La CMA partage des points communs avec la macroautophagie dans son rôle pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Dans tous les types cellulaires, la CMA est fortement activée par une carence en nutriments, et servirait au recyclage des acides aminés[183,184]. Par ailleurs, des études de cinétique montrent qu'en cas de carences nutritionnelles, elle prend le relais de la macroautophagie : dans les cellules du foie, la macroautophagie est activée très rapidement (30min environ) et atteint son plateau après 10h, au moment où l'activité CMA débute pour atteindre un plateau en 36h. Elle reste alors active pendant trois jours[184]. De plus, le blocage de la CMA conduit à l'accumulation de protéines à longue durée de vie et induit en retour l'augmentation de l'autophagie[185].

De façon remarquable, des cellules déficientes pour la CMA ont des niveaux d'ATP réduits, ce qui témoignerait d'un rôle de la CMA dans la production d'énergie par la cellule[185].

La CMA joue également des rôles spécifiques dans le contrôle de certaines voies de transcription après une carence en nutriments, par exemple en activant la voie NF-κB par le ciblage de son composant inhibiteur IκBα[186].

Enfin, tout comme la macroautophagie, la CMA est impliquée dans la dégradation de protéines impliquées dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie

d'Alzheimer[187] ou la maladie de Parkinson[188]. Cependant, ces protéines mutantes échappent généralement à la dégradation[187,189,190] et utilisent la CMA pour exercer leur effet cytotoxique[187]. La dérégulation de la CMA pourrait, quant à elle, être impliquée dans d'autres pathologies. Elle joue un rôle dans la survie des cellules cancéreuses (où elle est activée pour permettre le maintien de la glycolyse)[191]. En outre, la CMA diminue avec l'âge de par la diminution de l'expression de LAMP-2A[192,193]. De plus, la composition lipidique des membranes varie avec l'âge et contribuerait à la déstabilisation des multimères de LAMP-2A[181,182].

B - CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNITE

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules phagocytaires du système immunitaire identifiées originellement par RM Steinman dans les années 70 sur la base d'un profil morphologique spécifique : la présence de dendrites (prolongements cytoplasmiques)[194]. Dérivées de précurseurs hématopoïétiques présents dans la moelle, elles sont retrouvées dans le sang, les épithéliums, les muqueuses et les organes lymphoïdes des vertébrés. Elles assurent un rôle double de sentinelles mais aussi de chef d'orchestre du système immunitaire. Elles sont impliquées à la fois dans la réponse immunitaire innée et dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative spécifique[195,196]. À l'état basal, les DC sont dites immatures et expriment une batterie de senseurs membranaires ou cytosoliques qui leur confèrent des capacités d'intégration des signaux de danger et de reconnaissance des pathogènes intra et extracellulaires. Ces senseurs vont aider *in fine* à la dégradation de ces micro-organismes et à l'induction de l'inflammation. Les DC deviennent alors matures et se spécialisent dans la présentation des antigènes (issus des pathogènes dégradés) aux lymphocytes T (LT), point de départ de l'activation de la réponse immune spécifique.

1. ROLE DES DC DANS L'IMMUNITE INNEE

Les DC immatures sont caractérisées phénotypiquement et fonctionnellement par leur capacité à reconnaître et capturer les micro-organismes entrants (non soi), pour les dégrader, du moins partiellement. Ces processus impliquent des récepteurs de l'immunité innée.

1.1. Reconnaissance des pathogènes

Les pathogènes possèdent des caractéristiques conservées qui leur sont propres, comme la présence de motifs répétés à la surface des parois bactériennes. Des composants bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide, présent dans la paroi des bactéries Gram négatif), les protéines des flagelles ou certains glucides peuvent être détectés par les DC[197]. Les DC reconnaissent également les ARN ou les ADN constitutifs du génomes de certains virus [198], et des répétitions de dinucléotides non méthylés, les sites CpG, retrouvés dans l'ADN des bactéries[199]. Toutes ces structures sont appelées « motifs moléculaires liés aux pathogènes », ou PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et les récepteurs qui les reconnaissent sont nommés PRR (pour Pattern Recognition Receptors). Les PRR sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires mais sont exprimés majoritairement par des cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les monocytes et les DC[200,201]. Les cellules épithéliales, en contact fréquent avec les pathogènes, en expriment également.

Plusieurs familles de PRR sont impliquées dans la reconnaissance de pathogènes et l'établissement de la réponse inflammatoire : les TLR (Toll Like Receptor), les NLR (NOD Like Receptor), les RLR (RIG-1-Like Receptors) et les CLR (C-Lectin Receptor).

- **Les TLR :**

Les TLR sont une famille de récepteurs très conservés au cours de l'évolution, des invertébrés jusqu'aux mammifères. Ce sont des protéines transmembranaires comportant un domaine extracellulaire riche en Leucine (LRR, leucine-rich repeat) impliqué dans la reconnaissance des PAMP, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (toll-IL1 receptor domain) impliqué dans la transduction du signal[202]. La fixation d'un ligand à son TLR induit le recrutement au domaine TIR des molécules adaptatrices MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) et/ou TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon) en fonction du TLR. MyD88 et TRIF induisent une cascade de phosphorylation activant respectivement la voie NF-κB et la voie IRF (Interferon regulatory factors)[202]. Ces voies conduisent entre autres à la production par les DC d'interférons (IFN) de type I, de cytokines pro-inflammatoires, et l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation[203]. Les IFN de type I sont impliqués dans l'immunité innée antivirale en induisant l'expression des gènes ISG, codant pour des facteurs de restriction de la réplication des virus comme APOBEC3G, la Tetherine, ou encore TRIM5α (cf. partie I -D -2.2.1). Par ailleurs, l'activation des voies TLR peut conduire à l'induction de l'autophagie et contribuer ainsi à la réponse immune innée (cf. partie I -C -1.1.2.1).

Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont situés sur la membrane plasmique et sont impliqués dans la reconnaissance des composants bactériens[197]. Les complexes TLR1/2 et TLR2/6 reconnaissent entre autres le peptidoglycane de la paroi bactérienne[204,205]. Le TLR4, en combinaison avec MD-2 et CD14, reconnaît le LPS[206,207] et le TLR5 est impliqué dans la reconnaissance de la flagelline[208].

Les TLR3, 7, 8 et 9 sont présents à la membrane des endosomes et sont impliqués dans la reconnaissance de virus et de bactéries intravésiculaires. Les TLR3 et 7 reconnaissent respectivement les ARN double brin (ARNds)[209] et les ARN simple brin viraux (ARNss)[210,211]. Le TLR8 lie des séquences nucléotidiques riches en G et le TLR9 reconnaît les sites CpG non méthylés des ADN bactériens[199]. Les TLR7 et 8 seraient entre autres impliqués dans la reconnaissance du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) par les DC [198,212,213].

Le rôle du TLR10 est peu connu et son ligand n'a pas été décrit, mais il serait impliqué dans la reconnaissance des virus[214].

- **Les NLR :**

Les récepteurs NLR sont une famille de protéines cytosoliques impliquées dans la reconnaissance de pathogènes intracellulaires cytoplasmiques. On distingue en particulier les récepteurs NOD1 et NOD2. NOD2 est principalement exprimée dans les DC, les macrophages et les cellules de Paneth, tandis que NOD1 a une expression plus ubiquitaire et est fortement exprimée dans les cellules épithéliales intestinales. Ces deux protéines fixent via leur domaine LRR des fragments de protéoglycanes [215,216] et permettent ainsi la détection des bactéries GRAM négatif/positif intracellulaires. Elles participent à la clairance de ces bactéries via l'activation de la voie RIP2/NF-κB[217] induisant la réponse inflammatoire et via

l'autophagie[218–220]. Le rôle des récepteurs NOD dans la modulation de l'autophagie et le maintien de l'équilibre de la flore intestinale sera abordé partie I -C -1.1.2.2.

- **Les RLR :**

Les DC expriment également des récepteurs cytoplasmiques RLR[221] comme RIG-1(retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) et LGP2. Les RLR sont des ARN hélicases impliquées dans la reconnaissance de composants viraux (ARNds[222] et ARNss[223]) dans le cytoplasme des cellules. RIG-1 est un senseur de différents virus comme les flavivirus, le virus Sendai, le VSV ou le virus de la grippe. Lors d'une infection, RIG-1 et MDA5 interagissent via leur domaine CARD (Caspase activation and recruitment domains) avec la protéine IPS-1[224], qui active les voies NF-κB et IRF et induit alors la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. La protéine STING est impliquée dans la voie de transduction de RIG-1 dans les DC suite à une infection par un virus ARN et est également un senseur (direct ou indirect) de la présence d'ADNds dans le cytoplasme de la cellule[225].

- **Les lectines de type C (CLR) :**

Les CLR englobent une grande famille de protéines qui fixent les carbohydrates grâce à leur domaine CRD (calcium dependent carbohydrate recognition domain)[226]. Ces carbohydrates sont retrouvés sur des glycoprotéines présentes à la surface des fungi (*C. Albicans*), mais également sur des bactéries (*Mycobacteria*) et des virus (HIV, HCV, virus de la Dengue). Les DC peuvent exprimer divers CLR (comme DC-SIGN, le récepteur au mannose et les dectines 1/2) qui ont des fonctions extrêmement variées dans la réponse immune innée: ils sont impliqués dans la capture et la phagocytose des pathogènes (cf. ci-dessous), la modulation de la réponse TLR, et l'induction de l'inflammation via les voies MAPK, NF-κB, NFAT et la voie du complément [226].

1.2. Capture des antigènes

Il existe deux mécanismes d'endocytose responsables de la capture des antigènes extracellulaires : la pinocytose et la phagocytose. Les pathogènes intracellulaires, eux, peuvent être dégradés par la voie autophagique (cf. partie I -C -1.1).

La pinocytose est généralement non spécifique et intervient dans l'internalisation des liquides extracellulaires et d'antigènes solubles de petite taille. Ce mécanisme est retrouvé dans toutes les cellules. La phagocytose permet la capture d'antigènes particulaires et de pathogènes entiers. Elle est réalisée essentiellement par les phagocytes : macrophages, DC, monocytes et neutrophiles. La réorganisation du cytosquelette d'actine et des modifications à la membrane plasmique induisent la formation de pseudopodes qui entourent le pathogène pour former le phagosome[227].

La capture par phagocytose et la reconnaissance par les PRR des pathogènes sont deux processus étroitement liés[228]. L'activation des voies PRR/TLR pourrait induire la

phagocytose et la maturation des phagosomes [229–231]. Par ailleurs, des TLR sont recrutés à la membrane des phagosomes[232] et la dégradation des pathogènes par phagocytose serait impliquée dans la potentialisation de l'activation TLR[233]. Enfin, des PRR et d'autres récepteurs participent directement à la capture des pathogènes :

- **Les lectines de type C**. Exemples : dans les DC, DC-SIGN, est impliquée dans la capture du VIH[234], de Mycobacteria et de Leishmania[226]. Les dectines 1, 2 et le récepteur au mannose (MR) reconnaissent C. Albicans et les Mycobacteria[226].
- **Les récepteurs « scavengers »** (éboueurs) qui se lient aux lipoprotéines modifiées. Exemples : MARCO fixe ainsi les bactéries Gram négatif/positif, et SR-BI le virus HCV.
- **Les récepteurs pour la phagocytose des cellules mortes** et des corps apoptotiques, importants pour la régulation de l'inflammation. Exemples : la lectine CLEC9A est exprimée par certaines DC (cf. partie I -B -3.2, page 40) et fixe l'actine libérée à la surface des cellules mortes [235]. Des intégrines fixent la phosphatidylserine exposée à la membrane des cellules apoptotiques. Certains récepteurs scavengers comme CD36 participent aussi à la capture des cellules apoptotiques[236].
- **Les récepteurs aux opsonines**. Exemples : les phagocytes expriment des récepteurs pour le fragment constant des IgG (FcγRI) ou des IgE (FcεRII) et des récepteurs du complément (CD11/CD18) permettant la capture et la phagocytose des pathogènes opsonisés[237].

Les pathogènes capturés et phagocytés sont dégradés lors de la maturation des phagosomes qui fusionnent avec les compartiments endo/lysosomaux. La cinétique de maturation des phagosomes est dépendante des cellules phagocytaires étudiés (les DC dégradant plus lentement les pathogènes que les macrophages, probablement pour favoriser la présentation des antigènes[238,239]). Notons que de nombreux pathogènes ont développé des stratégies d'échappement[240]. Par exemple, les virus HIV, HCV et le virus de la Dengue utilisent DC-SIGN pour faciliter leur entrée dans les cellules[234,241] et empêcher leur dégradation [242].

1.3. Maturation et migration

Après capture et phagocytose d'un pathogène, les DC vont entrer dans un programme de maturation qui varie selon les signaux transduits après reconnaissance des PAMP par les PRR, les interactions cellulaires, et le microenvironnement cytokinique inflammatoire. Les DC migrent alors dans le ganglion lymphatique drainant où elles présentent aux LT les peptides antigéniques issus de la dégradation du pathogène.

Le processus de maturation comprend plusieurs événements coordonnés :

- Des changements de morphologie, de cytosquelette et de mobilité. Les DC mature sur-expriment le récepteur CCR7 qui fixe CCL19/CCL21, deux chimiokines sécrétées dans les zones riches en LT, induisant la migration des DC dans les organes lymphoïdes secondaires[243,244].
- La perte des capacités de phagocytose/endocytose par diminution de l'expression des récepteurs associés.
- La surexpression des molécules de costimulation (CD80/83/86 et CD40) [245] et d'adhérence.
- La translocation et la stabilisation des complexes peptide antigénique/CMH (complexe majeur d'histocompatibilité, HLA pour Human Leucocyte Antigen chez l'Homme) à la surface de la cellule pour l'activation des LT spécifiques[246–250] (cf. ci-dessous).
- La sécrétion de cytokines qui polarisent la réponse immune adaptative (IL12 et IFN pour la réponse Th1 et IL4/IL10 pour la réponse Th2)[251].

Toutes ces modifications phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles, sont indispensables à l'initiation d'une réponse adaptative efficace.

2. ROLE DES DC DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE ET LA PRESENTATION DES ANTIGENES

Les DC matures sont des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes (APC). Lors de la dégradation des pathogènes, les antigènes sont apprêtés dans la DC sous forme de peptides antigéniques (épitopes) qui sont chargés sur les molécules du CMH. La reconnaissance d'un complexe CMH/peptide par le récepteur T (TCR) d'un LT spécifique de l'antigène déclenche un programme transcriptionnel conduisant à l'activation du lymphocyte (production de molécules effectrices et de cytokines) et sa multiplication clonale. Les LT CD8, qui reconnaissent les peptides présentés par les molécules du CMH-I, se différencient en cellules cytotoxiques capables ensuite de tuer les cellules infectées. Les LT CD4, qui reconnaissent les peptides présentés par les molécules du CMH-II, se différencient en cellules T auxiliaires (Th pour T-helper) qui orchestrent les réponses CTL et les réponses humorales B (production d'anticorps). La qualité de l'activation et l'orientation de la réponse T dépendent de l'état de maturation de la DC ayant capturé l'antigène [252] et de l'intensité de l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide.[253,254]

2.1. Les molécules du CMH pour la présentation des antigènes

2.1.1. Molécules du CMH-I

La molécule du CMH-I est un complexe protéique de type immunoglobuline résultant de l'association d'une sous-unité microglobuline β2m invariante et d'une chaîne lourde α sur laquelle va s'ancrer un court peptide de 8 à 10 acides aminés[255] (cf. Figure 10). La sous-unité β2m et la fixation du peptide sont nécessaires à la stabilisation de la molécule pour sa

migration à la membrane plasmique. La chaîne α est constituée d'une partie constante, comprenant la partie C-terminale transmembranaire de la protéine et le sous-domaine α3. La partie variable N-terminale est composée des sous-domaines α1 et α2 qui forment un plateau, constitué par le rapprochement de 8 feuillets β anti-parallèles et surmonté de deux hélices α. Le plateau et les hélices forment un sillon, au niveau duquel se fixent les peptides qui seront présentés aux LT CD8. La partie variable du TCR d'un LT CD8 spécifique interagit avec le complexe CMH-I/peptide au niveau du sillon peptidique. Cette interaction est renforcée par la fixation de la molécule CD8 sur la sous-unité constante α3 du CMH-I.

Chez l'homme, il y a trois types de chaînes lourdes α, codées par les gènes HLA-A, -B et -C. Ces gènes sont polymorphes au niveau de la séquence codante pour les résidus qui constituent le sillon peptidique. Il en résulte une forte variabilité des molécules du CMH-I inter et intra-individuelle. La fixation d'un peptide est déterminée par la présence dans sa séquence de motifs d'ancrage spécifiques[255]. Plusieurs peptides avec un même site d'ancrage fixeront la même molécule du CMH-I et des peptides possédant des sites d'ancrages différents auront des affinités variables avec chaque molécule du CMH-I. Le répertoire des peptides présentés (et la réponse T CD8 associée) varie donc entre les individus.

Toutes les cellules nucléées, APC incluses, expriment les molécules du CMH-I.

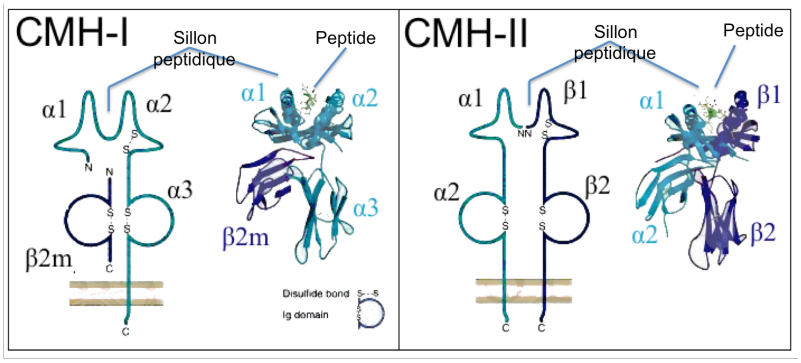


Figure 10 – Les molécules de CMH

2.1.2. Molécules du CMH-II

La molécule de CMH-II (complexe de type immunoglobuline également) est un hétérodimère constitué de deux chaînes homologues, α et β, ancrées à la membrane par leurs extrémités C-terminales (cf. Figure 10). Les sous-domaines α1 et β1 forment le sillon où se loge le peptide présenté. Ce sillon possède une conformation plus ouverte que celui de la molécule de CMH-I, permettant la fixation de peptides de plus grande taille, de 15 à 25 acides aminés environ, présentés aux LT CD4. Le TCR d'un LT CD4 spécifique interagit avec le complexe CMH-II/peptide au niveau du sillon peptidique, et cette interaction est renforcée par la liaison de la molécule CD4 sur le sous-domaine β2.

Tout comme les molécules de CMH-I, plusieurs gènes (HLA DP, DQ et DR) codent pour les différentes sous-unités. Celles-ci présentent des polymorphismes importants au

niveau des résidus du site d'ancrage du peptide, conduisant à un répertoire des peptides présentés (et la réponse T CD4 associée) variable entre les individus.

Seules les APC expriment constitutivement les molécules du CMH-II. Leur expression est finement régulée par le facteur de transcription CIITA[256] (MHC class II transactivator), lui même régulé par un ensemble de facteurs agissant les uns sur les autres par des mécanismes de rétrocontrôle[257,258]. Dans d'autres types cellulaires, l'expression des CMH-II peut être induite par l'IFNγ [259,260].

2.2. Présentation sur les molécules du CMH-I

2.2.1. Présentation des antigènes endogènes sur les CMH-I

Toutes les cellules nucléées sont capables de présenter des antigènes endogènes sur leurs molécules du CMH-I (voie « classique »). Ce mécanisme (cf. Figure 11) permet la reconnaissance rapide par les CTL des cellules infectées ou tumorales.

2.2.1.1. Rôle du protéasome

Historiquement, les molécules du CMH-I ont été décrites comme présentant aux LT CD8 des peptides issus de protéines antigéniques endogènes, cytosoliques ou nucléaires. La présentation des peptides endogènes par les CMH-I débute lorsque les protéines sont reconnues et dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS)[261]. On distingue le protéasome constitutif exprimé dans tous les types cellulaires et l'immunoprotéasome, retrouvé dans les APC et induit par l'IFNγ et le TNF[262]. Le protéasome constitutif possède deux sous-complexes distincts : le 20S protéasome et le 19S protéasome[263]. La combinaison de ces sous-complexes génère le 26S protéasome. Le 20S protéasome porte les activités protéolytiques tandis que le 19S protéasome est impliqué dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées, leur dépliement et leur translocation vers la sous-unité 20S. Le 19S protéasome contient deux sous-structures : la base (ATPases) et le couvercle. Le 20S protéasome est constitué de 28 sous-unités (14 différentes) organisées en quatre anneaux heptamériques. Les deux anneaux extérieurs sont composés des sous-unités α (1 à 7) et les deux anneaux internes des sous-unités β (1 à 7). Les sous-unités catalytiques sont les β1, 2 et 5. L'activité protéolytique des sous-unités β du protéasome constitutif génère des peptides à l'extrémité C-terminale acide, qui ne sont pas en mesure de lier correctement les molécules du CMH-I[264]. Dans l'immunoprotéasome, des sous-unités β du protéasome constitutif sont remplacées par les sous-unités LMP2, LMP7 et LMP10 qui génèrent des peptides à l'extrémité C-terminale hydrophobe ou basique, plus affins pour les molécules du CMH-I[262]. L'immunoprotéasome jouerait un rôle dans la génération du répertoire des peptides fixant les molécules de CMH-I[265] pour l'induction des réponses T CD8 antivirales in vivo[266,267].

2.2.1.2. Les protéines substrats du protéasome

La génération des peptides chargés sur les molécules du CMH-I est dépendante d'une part de la dégradation des protéines par le système UPS mais aussi de la traduction

ribosomale (synthèse protéique)[261,268]. L'inhibition de la synthèse protéique (avec la cycloheximide)[269] ou l'inhibition de la dégradation par le protéasome (avec l'époxomicine)[270,271] diminue drastiquement la présentation classe I. Les peptides présentés par les molécules de CMH-I semblent provenir préférentiellement des protéines synthétisées rapidement dégradées (en moins de 10 min) par rapport aux protéines à longue durée de vie (plus de 2000 minutes)[272–276]. Les protéines à courte durée de vie sont divisées en deux catégories : les protéines matures fonctionnelles possédant un temps de demi-vie très court et les protéines instables et non fonctionnelles, issues d'erreurs de transcription ou de traduction, d'incorporation de mauvais acides aminés ou encore d'un mauvais repliement dans l'espace. Ces polypeptides sont appelés DRiPs (pour Defective Ribosomal Products)[272,274–276]. Ils représenteraient environ 30% des protéines nouvellement synthétisées et sont rapidement pris en charge par le protéasome[274]. Cependant, les protéines à longue durée de vie représenteraient également une source de peptides antigéniques[277] mais en proportion minoritaire [278]. La génération rapide des DRiPs permet d'expliquer comment les antigènes viraux sont très vite présentés aux LT CD8 par les molécules de CMH-I des molécules infectées, parfois bien avant l'expression des protéines virales stables[279–281]. Des protéines provenant de phases alternatives de lecture seraient également une source de peptides endogènes dit cryptiques[282–284] chargés sur les molécules de CMH-I et importants pour l'élaboration de la réponse T CD8[285,286].

L'inflammation a tendance à augmenter la proportion de DRiPs à l'intérieur des DC[155]. On peut les retrouver sous forme d'agrégats (cf. partie I -A -2.2.1) dans des structures appelées DALIS[287] (DC aggresome-like induced structure). La synthèse protéique et la dégradation des DALIS contenant des DRiPs par le protéasome sont finement régulées pendant la maturation des DC, probablement pour favoriser la présentation des antigènes [288,289]. Cependant, cette hypothèse reste à démontrer.

2.2.1.3. Rôle des aminopeptidases cytosoliques

Les peptides coupés en C-terminal par le protéasome ont une longueur variant entre 3 et 20 acides aminés[290]. Ils peuvent être découpés à leur partie N-terminale par différentes protéases cytosoliques comme l'aminopeptidase TPPII (tripeptydyl peptidase II)[291] ou encore la peptidase TOP[292] (thimet oligopeptidase). Ces aminopeptidases auraient deux fonctions : (i) générer un nouveau répertoire de peptides (de 9 acides aminés ou plus) préférentiellement chargés sur les molécules du CMH-I[291,293] et (ii) limiter l'accumulation trop importante des peptides (par dégradation partielle), inhibant in fine la présentation classe I[292]. Certaines chaperonnes cytosoliques (HSP70 et HSP90) pourraient néanmoins protéger les peptides de la dégradation par les aminopeptidases[294].

2.2.1.4. Transport des peptides endogènes vers le RE et chargement sur les molécules du CMH-I

Les peptides rentrent par l'intermédiaire des transporteurs TAP[275,295] (composés des sous-unités homologues TAP1 et TAP2 dépendantes de l'ATP) dans la lumière du RE où se trouvent les molécules de CMH-I. Les TAP permettent la translocation des peptides de 8 à 40 acides aminés mais favorisent les peptides de 8 à 12 acides aminés[296]. L'aminopeptidase ERAAP du RE (ER aminopeptidase associated with antigen processing) raccourcit (en N-terminal) les peptides trop longs à une taille optimale pour la fixation des molécules du CMH-I[297]. ERAAP jouerait donc un rôle crucial pour la génération de complexes peptides/CMH-I stables et influencerait ainsi le répertoire des cellules T CD8 [298].

La chaîne lourde du CMH-I est ancrée dans la membrane du RE pendant sa traduction, puis elle est stabilisée par la protéine chaperonne BIP et la calnexine avant l'incorporation de la β2m. Une fois la β2m associée à la chaîne lourde, la calréticuline remplace la calnexine[299]. ERp57 lie alors les molécules du CMH-I et participe à leur stabilisation. Le tapasine est une protéine qui s'associe avec ERp57[300], les molécules du CMH-I et le transporteur TAP[301] pour former le complexe appelé complexe de chargement des peptides (PLC). Via son interaction avec TAP, la tapasine facilite le chargement des peptides sur les molécules de CMH-I. De plus, elle participe (avec ERp57) à la stabilisation des complexes CMH-I/peptide pour favoriser le chargement des peptides optimaux [302–304]. Les peptides qui ne fixent pas de molécules du CMH-I pourraient retourner dans le cytoplasme via le système de transport ERAD (impliqué dans la retranslocation dans le RE des protéines mal repliées) pour être dégradés ou réédités par les peptidases et renvoyés dans le RE via TAP[305]. Les complexes CMH-I/peptide stables quittent ensuite le PLC et sont transportés vers l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire par la voie constitutive de sécrétion cellulaire.

Une fois le complexe CMH-I/peptide exprimé sur la membrane plasmique, celui-ci est relativement stable. Cependant la présence de sous-unités α seules à la surface de la cellule laisse penser que le complexe se dissocie après un certain temps. Les protéines de la famille MARCH semblent être impliquées dans la dégradation des CMH-I par un mécanisme d'ubiquitination[306,307].

2.2.1.5. Efficacité de l'apprêtement des antigènes sur les CMH-I

Le chargement de peptides sur les molécules du CMH-I est un processus inefficace au vu de la quantité de protéines dégradées par minutes (plusieurs millions) par une cellule, de la demi-vie moyenne des peptides dans le cytoplasme (6 secondes), et de la quantité de complexes CMH-I/peptide exprimés à la membrane (entre 50000 et 100000)[261]. 99% des peptides seraient dégradés par les peptidases avant de pouvoir être chargés sur les molécules du CMH-I[261] et un peptide doit donc être généré statistiquement plus de 10000 fois pour avoir une chance d'être présenté. L'hypothèse permettant d'expliquer ce paradoxe serait que la compartimentalisation des peptides provenant des DRiPs leur permet d'être beaucoup plus

compétitifs par rapport à des peptides cytosoliques plus abondants[308]. Ces mécanismes de compartimentalisation ne sont pas encore décrits.

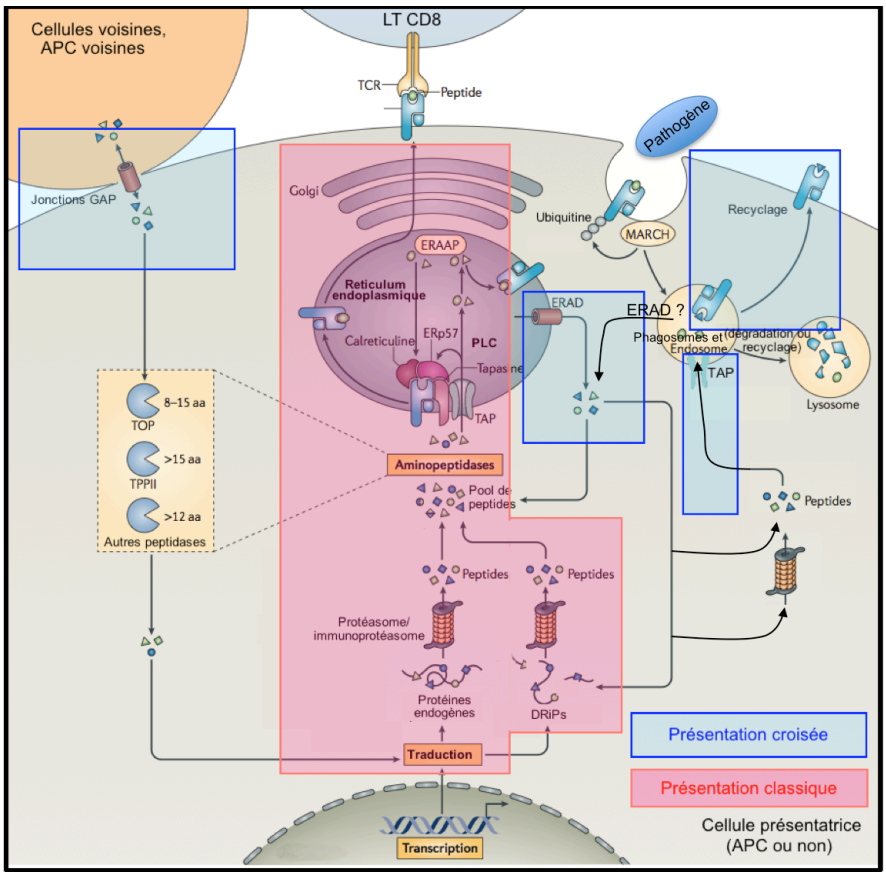


Figure 11 – Voies de présentation CMH-I

Adapté de Jacques Neefjes et coll. , Nature Immunology Review, 2011

2.2.2. Présentation croisée d'antigènes exogènes sur les CMH-I

Les APC sont capables d'apprêter et de présenter sur les molécules du CMH-I des peptides antigéniques issus de la dégradation des antigènes phagocytés provenant de l'environnement extracellulaire (cellules infectées, pathogènes et cellules tumorales). Cette voie de présentation, appelée « présentation croisée » (cf. Figure 11), est importante pour l'initiation de la réponse T CD8 cytotoxique[309]. Les DC sont les APC les plus aptes pour effectuer la présentation croisée, principalement certaines populations de DC spécifiques[310] (cf. partie I -B -3.2, page 40). Il existe deux mécanismes principaux pour la présentation croisée : (i) la voie cytosolique et (ii) la voie vacuolaire.

2.2.2.1. Voie cytosolique

Les antigènes internalisés dans les APC par la voie phagosomale/endosomale peuvent être envoyés dans le cytoplasme[311]. En effet, le transfert du contenu antigénique de la lumière du phagosome vers le cytosol a été montré en microscopie et par fractionnement cellulaire dans les DC [312–314]. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de ce transfert sont encore mal décrits. Le complexe ERAD, retrouvé à la membrane des phagosomes, pourrait

jouer le rôle de transporteur vers le cytoplasme des antigènes phagocytés[314,315]. De plus, la protéine HSP90 peut s'associer avec le complexe ERAD[316] et participerait au dépliement des protéines antigéniques cross-présentées[317,318], pour leur translocation dans le cytoplasme.

Les antigènes qui ont rejoint le cytoplasme sont alors apprêtés et chargés sur les molécules du CMH-I de façon dépendante du protéasome et des transporteurs TAP [311]. Le chargement des peptides générés s'effectuerait dans le RE bien qu'il n'y en ait pas de preuve directe. En effet, les transporteurs TAP et les molécules du CMH-I présentes dans le RE peuvent également être recrutés (de façon dépendante de la protéine SNARE SEC22B et de CD74[314,319]) à la membrane des compartiments phagosomaux[320–323]. De plus, des études en TEM montrent que la membrane du RE pourrait contribuer à la formation des phagosomes[324,325]. Au contraire, d'autres études suggèrent que la contribution du RE pour la formation des phagosomes serait faible [326,327]. Pour résumer, le chargement des peptides antigéniques cytoplasmiques cross-présentés pourrait se faire à la fois dans le RE et dans les compartiments d'endocytose/phagocytose. De fait, les aminopeptidases ERAP du RE et IRAP de la voie endosomales semblent toutes les deux impliquées dans l'apprêtement des antigènes cross-présentés[328,329].

2.2.2.2. Voie vacuolaire

Après phagocytose d'un pathogène ou d'antigènes modèles, des peptides antigéniques peuvent être directement générés à l'intérieur du phagosome par l'action des protéases cathepsine S et L[330,331]. Les protéines du CMH-I et du complexe PLC étant retrouvées dans les phagosomes[323] (cf. partie précédente), les peptides générés dans ces compartiments peuvent être chargés directement sur les CMH-I. Les molécules du CMH-I peuvent aussi être recyclées de la membrane aux endosomes[332] et ce mécanisme participerait à la présentation croisée[333]. Par conséquent, ni le protéasome ni le canal TAP ne jouent de rôle dans la voie vacuolaire [330,331].

Il est difficile d'évaluer la contribution relative des voies cytosolique et vacuolaire dans la présentation croisée, car les molécules du CMH-I sont instables et restent dans le RE en présence d'inhibiteurs du protéasome ou après blocage de la voie TAP[334]. Cependant, la majorité des études montrent une implication de la voie cytosolique.

2.2.2.3. Voies alternatives

Des APC comme les monocytes ou des DC seraient capables de récupérer et charger sur les CMH-I de petits peptides antigéniques linéaires d'environ 10 acides aminés, transférés à travers des jonctions GAP formées après contact avec des cellules infectées[335,336].

Une DC peut aussi transférer sur sa membrane (trogocytose) des complexes CMH-I/peptide présents sur la membrane des cellules infectées en contact.[337,338].

2.2.2.4. Rôle des DC dans la présentation croisée et l'induction de la réponse CTL

La présentation croisée et son rôle dans l'activation de la réponse CTL ont été décrits pour la première fois en 1976 dans des études sur l'alloréactivité : l'immunisation avec des cellules allogéniques d'une souris donneuse induit l'activation des LT CD8 de la souris hôte, spécifiques pour les peptides allogéniques, et restreints pour les molécules du CMH de la souris hôte [339,340].

La contribution relative des voies de présentation classique et croisée pour l'initiation de la réponse T CD8 contre un pathogène dépend largement de la nature et du tropisme du pathogène. Certains pathogènes infectent les DC (comme le virus de la vaccine) : celles-ci peuvent alors utiliser la voie de présentation classique pour initier la réponse CTL[341,342]. Au contraire, la voie de présentation croisée est indispensable pour l'initiation de la réponse CTL lorsque les DC ne sont pas directement infectées. Des portions de cellules infectées (par HIV, influenza, *T. Gondii* ou encore *M. Tuberculosis*) vivantes ou apoptotiques peuvent être capturées par les DC et constituent une source importante d'antigènes cross-présentés[343–348]. C'est également le cas pour des antigènes modèles[349] ou tumoraux[350]. Par ailleurs, les DC peuvent cross-présenter des antigènes issus des pathogènes qu'elles ont directement capturés[351]. De plus, des DC migratoires présentes dans les tissus peuvent transférer les antigènes qu'elles ont capturés aux DC spécialisées dans la présentation croisée, résidentes dans les ganglions (DC CD8+ chez la souris) [352]. Ainsi, *in vivo*, la déplétion de ces DC CD8+ (et CD103+) murines diminue drastiquement la réponse CTL anti-virale [353,354]. Les population de DC humaines spécialisées dans la présentation croisée sont décrites partie I -B -3.2, page 40.

2.3. Présentation sur les molécules du CMH-II

2.3.1. Présentation des antigènes exogènes sur les CMH-II

2.3.1.1. Provenance des peptides antigéniques chargés sur les CMH-II

Tout comme pour la présentation croisée, les peptides antigéniques chargés sur les molécules du CMH-II dans les APC sont dérivés de la dégradation contrôlée[238] des pathogènes/antigènes extracellulaires, capturés par phagocytose et dirigés dans les endosomes et les lysosomes[238,355]. Les APC jouent donc un rôle essentiel dans l'activation des LT CD4 auxiliaires qui orientent la réponse adaptative.

2.3.1.2. Transport des CMH-II du RE au MIIC

Les molécules de CMH-II nouvellement synthétisées au niveau du RE sont transportées vers un compartiment endosomal tardif spécifique, le compartiment CMH-II , ou « MIIC » [356]. Li (chaine invariante), une protéine chaperonne ancrée à la membrane du RE, exerce plusieurs fonctions dans le transport des molécules de CMH-II[357]. Elle empêche la fixation des peptides présents dans le RE en interagissant directement avec le sillon peptidique via son domaine CLIP[358,359]. Ainsi, les molécules du CMH-II ne fixent des peptides antigéniques qu'une fois arrivées dans les compartiments endosomaux tardifs/MIIC

(cf. ci-dessous). Par ailleurs, Li favorise l'assemblage des chaînes α et β nouvellement synthétisées et assure leur stabilisation en formant un complexe trimérique fixant trois CMH-II[360,361]. Le complexe multiprotéique Li/CMH-II quitte le RE où il était retenu par la calnexine avant sa formation complète [362]. La queue cytoplasmique de Li contient deux motifs qui fixent les adaptateurs pour la clathrine AP1 et AP2[363,364]. AP1 est un adaptateur du réseau trans-golgien, et AP2 un adaptateur de la membrane plasmique. Suivant les types cellulaires, les molécules du CMH-II sont orientées par Li directement du Golgi au MIIC de façon dépendante d'AP1 ou passent par une expression à la membrane plasmique où elles sont ré-internalisées vers le MIIC par AP2. L'endocytose AP2 dépendante est préférentiellement observée dans les cellules de lignée HeLa, les B, et les DC immatures [363,365,366]. Dans la DC mature, le tri direct des CMH-II par AP1 aux membranes du Golgi serait le mécanisme dominant[367].

2.3.1.3. Mécanisme de chargement des peptides antigéniques dans le MIIC

Le MIIC est un compartiment acide endosomal tardif à morphologie multi-lamellaire/multi-vésiculaire[368] (MVB). Il concentre les molécules de CMH-II, la protéine HLA-DM (protéine transmembranaire de la famille des CMH) et les protéases lysosomales cathepsine S, L et F[368]. Une fois le complexe CMH-II/Li arrivé dans le MIIC, Li est clivée de façon successive par les trois cathepsines, et seul reste associé au CMH-II le peptide CLIP présent dans le sillon peptidique[369]. HLA-DM joue le rôle d'une protéine chaperonne qui, en modifiant légèrement la conformation du sillon, va permettre l'échange du peptide CLIP par un peptide antigénique de plus haute affinité[370,371]. En outre, elle stabilise les molécules du CMH-II lors de ce processus et empêche leur agrégation. Par ailleurs, le MIIC est riche en tétraspanines CD63 et CD82 [372] qui faciliteraient l'interaction entre la protéine HLA-DM et la molécule de CMH-II, formant des réseaux protéiques complexes probablement impliqués dans le chargement des peptides et la localisation des molécules de CMH-II [373]. Chez l'Homme, les lymphocytes B et certains sous-types de DC[374] expriment la molécule HLA-DO qui rentre en compétition avec les molécules du CMH-II pour l'interaction avec HLA-DM. Son rôle est multiple: d'une part HLA-DO peut inhiber (de façon pH dépendante) l'efficacité de chargement des peptides sur les CMH-II, d'autre part il peut favoriser le chargement de certains peptides sur des CMH-II donnés, et modifier ainsi le répertoire des peptides présentés[375]. **En résumé**, la protéine HLA-DM permet la sélection de peptides de haute affinité en remplacement de CLIP sur les molécules du CMH-II dans le MIIC. Cette sélection serait favorisée par les tétraspanines et modulée par HLA-DO dans certains types cellulaires, en fonction de l'état de maturation des cellules.

2.3.1.4. Expression des CMH-II à la membrane plasmique

Après dégradation de Li, les molécules du CMH-II associées à CLIP ou à un peptide antigénique se retrouvent sous forme de dimère αβ dans les compartiments MIIC endosomaux tardifs qui migrent vers le centre de la cellule[376]. Elles peuvent alors soit être envoyées dans

des compartiments lysosomaux pour être dégradées ou être dirigées à la membrane plasmique par tubulation et fusion des membranes endosomales, deux mécanismes induits pendant la maturation des DC[249,377–379]. Une fois à la surface de la cellule, les complexes CMH-II/peptide peuvent être ré-endocytés dans des endosomes précoces, et très rapidement recyclés à la membrane plasmique[380] par un mécanisme moléculaire encore mal compris. Ce processus permettrait d'échanger les peptides déjà chargés par des peptides présents dans les endosomes précoces[381] pour diversifier le répertoire de peptides présentés[382](indépendamment de HLA-DM[383]).

2.3.1.5. Tri des complexes CMH-II/peptide au niveau des MIIC/MVB dans les DC immatures/matures

Dans les DC immatures (en absence de signaux de danger), les complexes CMH-II/peptide à la surface de la cellule présentent principalement des peptides issus de la dégradation de protéines du soi. Cependant, leur expression sur la membrane plasmique est limitée par un mécanisme qui assure la dégradation lysosomale des molécules de CMH-II. Les compartiments endosomaux MVB/MIIC sont remplis de petites vésicules intraluminales (ILV) entourées par la membrane délimitant le MVB. Les molécules de CMH-I et d'HLA-DM sont retrouvées sur la membrane de délimitation et sur les membranes des ILV[384]. Les molécules du CMH-I qui sont chargées avec un peptide, puis présentées à la surface, seraient celles présentes sur la membrane de délimitation du MVB[379,385,386], bien que cette hypothèse soit controversée[384,387]. Les études récentes suggèrent le mécanisme suivant : dans les DC immatures, le complexe CMH-II/peptide va être ubiquitiné par MARCH1 fortement exprimé dans ces cellules[246,385,388], pour être finalement dirigé (probablement par le système ESCRT[389–391]) sur les vésicules intraluminales (ILV) du MIIC/MVB. Ce pool de molécules CMH-II/peptide ubiquitinées sur les ILV serait dégradé après fusion MVB/lysosome[392,393]. Ainsi, seule une faible proportion des complexes CMH-II/peptide est présentée à la surface, et correspondrait aux complexes qui n'ont pas été ubiquitinés et qui restent à la membrane externe du MVB. Ce mécanisme pourrait permettre de réduire la présentation des antigènes du soi aux LT CD4 ou d'orienter la réponse T régulatrice[394,395]. A noter que la cytokine anti-inflammatoire IL10 augmente l'expression de MARCH1 dans les APC et contribue ainsi à la dégradation des molécules de CMH-II et des molécules de costimulation (CD83/86)[396,397].

Dans les DC matures, l'activité MARCH1 est diminuée ainsi que l'ubiquitination des complexes CMH-II/peptide. Les complexes déjà présents dans les ILV continuent d'être dégradés par la voie lysosomale et seuls les complexes CMH-II/peptide nouvellement synthétisés restent à la membrane externe du MIIC[392]. Ils sont alors transportés par une extension tubulaire du MIIC à la membrane plasmique[249,377–379]. En outre, pendant la maturation, la synthèse des molécules CMH-II est augmentée transitoirement avant d'être très fortement réduite[392,398]. Ainsi, tous ces mécanismes ont pour conséquence que les complexes CMH-II/peptide présentés à la surface membranaire des DC matures sont principalement

générés après contact avec le pathogène, créant une « capture photo instantanée » des peptides antigéniques à présenter aux LT CD4. Cette hypothèse expliquerait en partie comment les DC matures minimisent la présentation des antigènes du soi aux LT CD4 pour limiter l'activation des LT potentiellement auto-réactifs. En effet, l'expression de molécules de costimulation par les DC matures ne suffit pas à elle seule pour expliquer la distinction entre les antigènes microbiens et les antigènes du soi lorsque les deux sont rencontrés lors d'une infection.

2.3.1.6. Le phagosome : un compartiment autonome pour la présentation CMH-II

Des observations récentes ont montré que les complexes CMH-II/peptide s'accumulent dans des micro-domaines riches en cholestérol[399] retrouvés dans des compartiments lysosomaux/phagosomaux et à la membrane des DC. De plus, dans les DC, la présentation par les CMH-II d'antigènes particulaires phagocytés est fortement augmentée si ces derniers sont recouvert de ligands TLR (TLR4)[400]. De même, le recrutement du TLR4 à la membrane des phagosomes contenant un pathogène favorise la présentation aux LT CD4[401]. Ainsi, dans les DC matures, la transduction d'un signal issu de la liaison d'un PAMP à son PRR dans un phagosome semble stimuler le recrutement sélectif à la membrane plasmique de complexes CMH-II/peptide provenant de ce même phagosome. Le transfert des complexes CMH-II/peptide ainsi formés pourrait s'effectuer de manière unidirectionnelle vers la synapse entre la DC et la cellule T[379], ajoutant un niveau supplémentaire dans le contrôle qualité des peptides présentés.

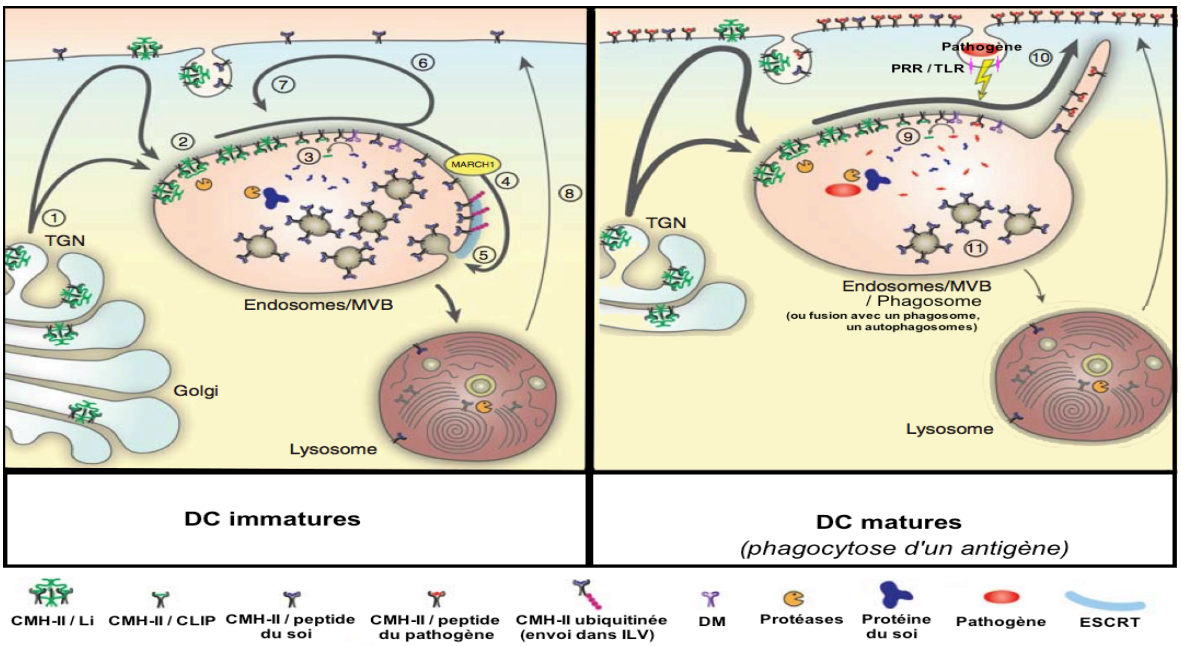


Figure 12 – Présentation CMH-II d'antigène exogènes par les DC / Régulation

Adapté de Broeke T.T. et coll. , Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol., 2013

2.3.2. Présentation des antigènes endogènes sur les CMH-II

Il est encore généralement admis que les peptides présentés par les molécules du CMH-II sont exclusivement issus de la dégradation d'antigènes extracellulaires. Pourtant, dès la fin des années 80, de nombreuses études précurseurs ont montré que des antigènes du soi[402] et viraux (MeV[403], HIV[404], influenza[405], vaccine[406] et EBV[407]) intracellulaires/endogènes sont apprêtés sur les molécules du CMH-II pour induire l'activation des lymphocytes T CD4. De plus, des expériences d'élution peptidique ont permis l'analyse du répertoire de peptides présentés à la surface des cellules sur les molécules du CMH[264,408,409], montrant que des peptides issus de protéines du soi intracellulaires pouvaient être présentés par les molécules du CMH-II. En moyenne, 20% des peptides présentés sur les molécules du CMH-II des lymphocytes B sont dérivés de protéines cytosoliques et nucléaires, incluant des protéines du cytosquelette, de choc thermique et des histones [410,411].

Plusieurs mécanismes sont responsables de l'apprêtement et du chargement d'antigènes endogènes sur les molécules du CMH-II.

2.3.2.1. Rôle de l'autophagie et de la CMA

Dans divers types cellulaires dont les APC, ces deux mécanismes joue un rôle primordial dans la présentation par les molécules de CMH-II d'antigènes intracellulaires modèles, viraux, bactériens, tumoraux et du soi (cf partie I -C -2.1.2).

Note : l'autophagie participe également à la présentation classique et croisée d'antigènes par le CMH-I (cf. partie I -C -2.2), ainsi qu'à la présentation d'antigènes exogènes par le CMH-II (cf. partie I -C -2.1.3).

2.3.2.2. Rôle du protéasome, du transporteur TAP et de la chaperonne HSP90

Des antigènes modèles comme l'ovalbumine sont apprêtés sur les molécules du CMH-II après avoir été injectés dans le cytoplasme de cellules de lignées macrophagiques ou B et présentés aux LT CD4 avec la même efficacité que l'ovalbumine extracellulaire[412]. La présentation endogène (au contraire de l'exogène) sur les molécules de CMH-II de ces antigènes modèles est dépendante de l'activité du protéasome et de certaines aminopeptidases, et indépendante de l'acidification lysosomale[412].

La machinerie TAP pouvant se retrouver à la membranes des phagosomes/endosomes (cf. partie I -B -2.2.2, elle pourrait participer au chargement de peptides cytosoliques sur les molécules de CMH-II dans ces compartiments. *In vivo*, l'inactivation par UV du virus de la grippe inhibe la présentation sur les CMH-II de deux épitopes de la matrice virale (mesurée par l'activation des T CD4 spécifiques par les APC infectées) alors que la présentation d'un troisième épitope n'est pas modifiée[413]. Ainsi, lors d'une infection virale, certains antigènes peuvent être présentés sur les molécules du CMH-II par la voie exogène et d'autres par la voie endogène. Les deux épitopes présentés par la voie endogène sont apprêtés via un processus qui implique les transporteurs TAP, le protéasome et le recyclage des molécules de CMH-II entre la surface et les endosomes précoces, mais n'implique pas la machinerie autophagique

[413,414]. Ces résultats suggèrent que ces deux peptides, une fois générés par le protéasome, sont envoyés dans les endosomes précoces via le transporteur TAP pour être chargés sur les molécules du CMH-II recyclées.

La protéine de choc thermique HSP-90 semble jouer un rôle important dans la présentation sur les molécules du CMH-II d'antigènes modèles et tumoraux[415,416]. Dans des cellules de lignées tumorales exprimant un antigène tumoral modèle cytosolique, son apprêtement est indépendant de la CMA, de l'autophagie et des transporteurs TAP mais dépend du protéasome et des protéases endosomales/lysosomales. HSP90 induirait la translocation des peptides antigéniques entre le cytoplasme et les endosomes/lysosomes, dans un processus similaire à la CMA mais n'impliquant pas les protéines LAMP-2/HSC70.

Ainsi le dogme qui associe les molécules de CMH-II exclusivement à la présentation d'antigènes exogènes souffre de nombreuses exceptions[417].

3. BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

3.1. Les DC, une population distincte des monocytes et des macrophages.

Les DC immatures représentent une population cellulaire bien distincte des autres cellules phagocytaires mononuclées (monocytes et macrophages). Cette distinction peut être faite sur des critères phénotypiques observables par microscopie (présence de dendrites), par immunohistochimie[418], ou par marquages en cytométrie[419–422]. En outre, des études transcriptionnelles multidimensionnelles récentes[423–429] ont confirmé l'appartenance des DC humaines (hDC) immatures à une population bien distincte possédant une signature génétique propre. Ces résultats sont en accord avec les études sur l'ontogenèse des DC murines immatures, qui montrent qu'elles sont dérivées d'une population de précurseurs différentes de celle des précurseurs monocytaires[430–432].

Contrairement aux macrophages, les DC qui maturent peuvent migrer à travers les tissus vers les organes lymphoïdes pour activer la réponse lymphocytaire T[433]. Cependant, les multiples changements transcriptomiques et phénotypiques qui se déroulent lors de la maturation confèrent une grande plasticité aux DC[434]. Ainsi, la distinction entre les populations de DC et de monocytes, et la classification des sous-populations de DC dans un contexte inflammatoire et/ou infectieux devient plus difficile[435].

3.2. Les différentes familles de DC chez l'Homme

Après avoir quitté la moelle osseuse, les progéniteurs des hDC migrent par la voie sanguine et se différencient in situ. Il existe deux types d'hDC, définies en fonction de leur lieu de différenciation : résidentes ou migratoires[436]. Les hDC résidentes sont présentes en permanence dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) où elles collectent et présentent aux LT les antigènes drainés par la voie lymphatique. Les hDC migratoires résident à l'état basal dans les tissus périphériques. Après activation, suite à la

phagocytose d'une particule antigénique et/ou la réception de signaux de danger, elles maturent et migrent vers les ganglions via les vaisseaux lymphatiques, où elles participent à l'activation de la réponse cellulaire T.

Dans des **conditions basales** en absence d'activation/maturation, les hDC résidentes ou migratoires peuvent être classées en différentes sous-populations sur la base d'études comparatives phénotypiques et fonctionnelles. Chez l'homme, les premières caractérisations de ces sous-populations ont été effectuées à travers l'étude des hDC circulantes du sang périphérique, du fait de leur facilité d'accès[419,421,422,437]. Des études dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires ont ensuite établi une correspondance phénotypique entre ces hDC retrouvées dans le sang et les hDC résidentes ou migratoires[436,438,439]. Comme les hDC du sang périphériques sont plus immatures que leurs équivalentes tissulaires et lymphoïdes, cela laisse supposer qu'elles sont leurs précurseurs directs[419,422,438]. Cette hypothèse est supportée par des études chez la souris[440].

Parmi les sous-populations d'hDC, on distingue :

- les hDC myéloïdes (hmDC) CD1c ou CD141 (i)
- les cellules de Langerhans (ii)
- les hDC plasmacytoïdes (hpDC) (iii)
- les hDC CD14+ (iv)

Toutes ces sous-populations sont caractérisées par l'expression élevée de molécules du CMH-II, l'expression variable de molécules de co-stimulation (CD80/83/86 et CD40) et l'absence de marqueur de lignée T (CD3), B (CD19/20) et NK (CD56)[420,421].

De façon intéressante, une étude « génome entier » a identifié sur la base de profils d'expression génique des similitudes entre les sous-populations de DC humaines et murines [426]. Ainsi les hmDC CD1c clustérisent avec les DC CD11b murines, les hmDC CD141 avec les DC CD8α murines et les hpDC avec les pDC murines.

(i) Les hmDC ou « hDC conventionnelles » expriment les marqueurs myéloïdes CD11c, CD13, CD33 et CD11b. *A contrario*, elles n'expriment pas les marqueurs monocytaires tels que CD14 ou CD16.

Ces hmDC représentent environ 1% des cellules mononucléées. Elles sont retrouvées dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus périphériques comme la peau, le foie, les reins et les intestins[429,436,438,439]. Après maturation, les hmDC tissulaires augmentent l'expression du récepteur de homing CCR7 pour migrer dans les ganglions[244,441]. Au sein de cette sous-population, on trouve les hmDC CD1c (BDCA1+) et les hmDC CD141 (BDCA3+)[419,422].

• Les hmDC CD1c expriment tous les récepteurs des TLR sauf le TLR9[197,201,442]. Elles possèdent également de nombreux récepteurs de type lectine (cf. partie I -B -1.2) comme Dectin1/2[427,429] et le MR[436]. Après une stimulation TLRs, ces cellules secrètent un large panel de cytokines et chimiokines comme IL1β, IL12, IL8, IL23, IL6, TNFα, CCL3, CCL4 et CCL5, impliquées dans la réponse inflammatoire et l'induction d'une réponse lymphocytaire

T pro-Th1/Th17[197,201,442–444]. Ainsi, supprimer la population de DC conventionnelles chez la souris conduit à un déficit des réponses lymphocytaires Th1, Th2 et Th17[439]. Dans le derme de la peau humaine, on retrouve une population particulière d'hmDC CD1c qui expriment CD1a [445,446] Elles sont capables d'induire la prolifération de LT allogéniques[447,448] et semblent orienter la polarisation Th2[436].

• Les hmDC CD141 (10% des hmDC) sont spécialisées dans la présentation croisée pour l'activation des LT CD8[310] (cf. partie I -B -2.2.2), et ont pour équivalent fonctionnel proche chez la souris les DC CD8α (dans le sang et les organes lymphoïdes) et CD103 (dans les tissus) [438,439,449–451]. Elles expriment les TLR3 et 8[201,438,443,452], XCR1[449,450] (chemokine C motif receptor 1) et le récepteur CLEC9A (C-type lectin domain family 9). CLEC9A favorise la présentation croisée des antigènes issus de la capture des cellules mortes environnantes[453] (cf. partie I -B -2.2.2.4) en les conduisant dans des compartiments positifs pour les molécules du CMH-I et du CMH-II[443,454,455]. XCL1, le ligand de XCR1, est exprimé par les LT CD8 et favorise l'interaction DC/lymphocyte et la présentation croisée[456]. De plus, l'activation du TLR3 favoriserait la présentation croisée après la reconnaissance de virus[457].

Il a été montré in vitro que les hmDC CD1c étaient en fait capables d'effectuer la présentation croisée[458,459], qui serait en grande partie dépendante du stimulus antigénique. Cependant, les hmDC CD141 semblent les plus efficaces pour ce mode de présentation, et ce dans les différentes conditions de stimulation[443,444,449,450,460]. Elles maintiennent un pH plus élevé de leurs phagosomes et endosomes, favorisant la présentation croisée[460,461]. De plus le facteur de transcription IRE-1α (impliqué dans la réponse UPR) est fortement exprimé dans les DC CLEC9A+XCR1+, et serait impliqué dans le contrôle de la présentation croisée[462].

(ii) Dans l'épiderme de la peau et les épithéliums stratifiés, on trouve une population de cellules dendritiques avec un phénotype propre[463,464], **les cellules de Langerhans** (LC). Les LC expriment fortement une lectine appelée Langerin, ainsi que le CD1a [429,465]. Elles forment un réseau dans l'épiderme et sont une des premières barrières immunologiques de la peau. Ces cellules sont capables d'auto-renouvellement partiel en conditions basales et sont renouvelées par des précurseurs présents dans le sang après inflammation[466,467]. Elles peuvent se différencier, après activation, en cellules dendritiques migratoires capables de capturer l'antigène, d'exprimer des molécules de co-stimulation et d'activer la réponse T[468]. Leurs fonctions ne sont pas bien comprises mais elles semblent impliquées dans l'établissement des réponses Th2 et T régulatrices et la tolérance aux bactéries commensales. Cependant les LC gardent la capacité de reconnaître des pathogènes et d'activer la réponse immune en condition inflammatoire[468].

(iii) Les hpDC immatures sont des cellules rondes en absence de stimuli. Elles sont présentes dans le sang mais absentes des tissus périphériques à l'état basal. Elles ne possèdent pas de marqueur myéloïde mais expriment CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA2+), CD304 et des niveaux variables de CD2 et CD7[421,469]. Lorsqu'elles sont immatures, elles expriment de faibles niveaux de molécules de co-stimulation et du CMH-II[437,470]. Cependant elles

expriment fortement les TLR endosomaux 7[210,471,472] et 9[473] et sont spécialisées dans la reconnaissance d'acides nucléiques viraux, bactériens ou issus de cellules mortes[474–477], induisant la réponse T associée[475]. La reconnaissance d'un virus par ces cellules conduit à leur maturation et elles produisent alors de grande quantité d'IFN de type 1[475,478–481]. Au contraire, la fixation d'ADN cellulaire induit un état tolérogène[482,483]. De fait, des dérégulations dans l'activation de ces cellules sont impliquées dans des maladies auto-immunes comme la SLE (Systemic lupus erythematosus)[484,485].

(iv) Les hDC CD14+ sont retrouvées avec les hmDC conventionnelles en quantité modeste dans les tissus en particulier dans le derme [438,446,447,486–489], mais sont absentes du sang et des organes lymphoïdes. *In vitro*, elles peuvent acquérir un phénotype proche des hmDC et des LC[487]. De plus, elles sont capables de migrer d'explants de peau humaine et d'activer une réponse cellulaire T CD4 allogenique[447,486]. Cependant, leur caractérisation en tant que DC est très controversée. En effet, elles expriment DC-SIGN[489] mais aussi certains marqueurs des monocytes/macrophages et n'expriment pas CD1c et CD141[438,439,446,488,489]. Leur remplacement après une transplantation de moelle osseuse est très rapide[446]. Ces propriétés suggèrent que ces hDC CD14+ seraient en fait des monocytes quiescents[438,439,489] rentrés dans les tissus par extravasation. L'expression du récepteur CCR7 sur ces cellules est très faible et leur capacité à migrer dans le ganglion drainant n'est pas démontrée[439,488].

Une question majeure consiste à comprendre les relations qui existent entre les hDC et les monocytes dans des **conditions inflammatoires**. En effet dans ces conditions, la plasticité phénotypique de ces cellules par rapport aux populations décrites à l'état basal[435] rend leur étude complexe.

Chez la souris, des études ont montré que les monocytes pouvaient se différencier en DC inflammatoires (infDC) recrutées sur le site de l'inflammation[490,491]. Les infDC seraient particulièrement importantes pour la clairance des agents pathogènes[490], la mise en place de la réponse T spécifique et sa polarisation[492,493].

Chez l'homme, on retrouve dans les tissus lésés ou infectés une population d'infDC[494–497] infiltrées, exprimant le facteur de transcription zbtb46 communément avec les DC conventionnelles CD1c (humaines et murines)[498,499]. Ces cellules expriment à leur surface CD1c, CD11b, CD1a, le récepteur au mannose et CD14 mais pas CD16 ou DC-SIGN[494]. Elles synthétisent in vitro l'IL-12, l'IL1β, le TNFα l'IL6 et l'IL23 et peuvent induire une réponse de type Th17/Th1[494]. En fait, leur profil transcriptionnel suggère qu'elles proviennent de monocytes différenciés en DC sur le site de l'inflammation[426,494]. De plus, elles partagent de nombreuses caractéristiques fonctionnelles avec les DC dérivées de monocytes in vitro (hMDDC, différenciées avec un cocktail de cytokines IL4/GM-CSF), et un profil transcriptionnel proche[494]. Le modèle des hMDDC[500–503] (très souvent utilisé dans les laboratoires) pourrait donc être un bon modèle d'étude des hDC dans les conditions inflammatoires[494,504].

C - AUTOPHAGIE ET IMMUNITE

En parallèle de ses fonctions homéostatiques, le processus d'autophagie a évolué chez les eucaryotes pour permettre à la cellule de se défendre contre des infections par des micro-organismes, bactéries ou virus.

L'autophagie intervient à différents niveaux dans la relation hôte/pathogène (cf. Figure 13):

- **Dans l'immunité innée** : l'autophagie peut être induite par des cytokines ou lors de la reconnaissance de PAMP par des PRR. Certains PRR peuvent aussi recruter des protéines adaptatrices pour induire l'autophagie sélective et la dégradation des micro-organismes intracellulaires par un processus appelé xénophagie. Parallèlement, l'autophagie contribue à l'activation du système immunitaire inné en acheminant dans des compartiments endosomaux des ligands de ces PRR provenant des pathogènes dégradés. L'autophagie joue également un rôle dans la régulation des processus d'inflammation : elle interagit avec la voie de l'inflammasome et la régule.
- **Dans l'immunité adaptative** : l'autophagie interagit avec les voies de présentation des antigènes dans les APC pour l'activation de la réponse T. De plus, elle est impliquée dans la sélection thymique des lymphocytes T et affecte la polarisation de la réponse immune.

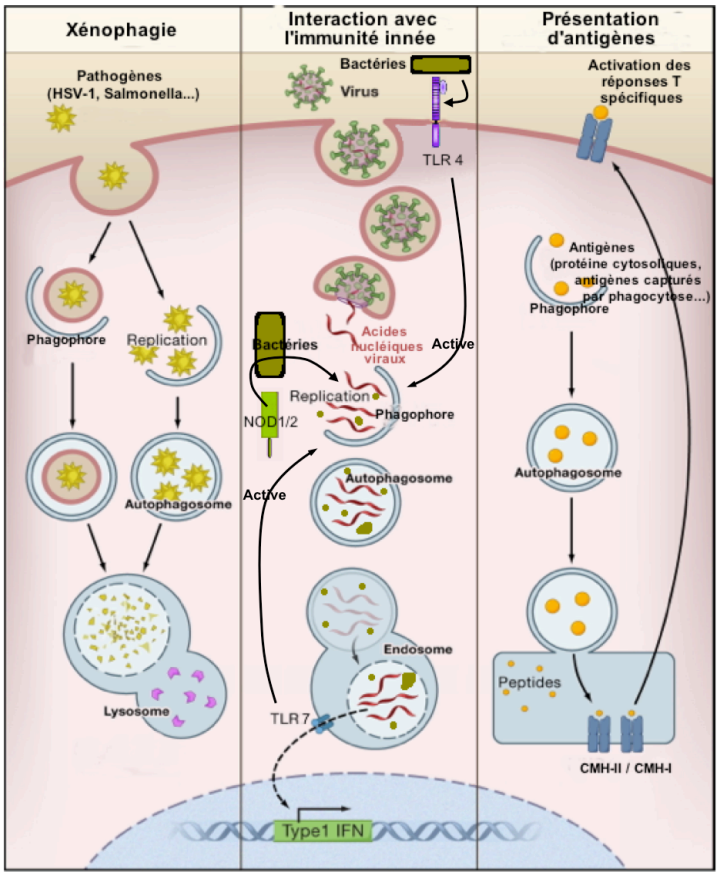


Figure 13 – Autophagie et immunité

Adapté de Levine B. et Kroemer G. , Cell, 2008

1. ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS L'IMMUNITE INNEE

1.1. Détection des pathogènes : induction de l'autophagie et de la xénophagie

Les pathogènes qui rentrent dans la cellule par la voie endosomale et phagosomale peuvent être dirigés dans des compartiments lysosomaux pour y être dégradés. Cependant, des pathogènes ont développé des stratégies d'échappement. Certaines bactéries secrètent des molécules pour déchirer la membrane des phagosomes et rejoindre le cytoplasme[505], d'autres empêchent la maturation de leur vacuole parasitaire[506]. De même, le virus de l'hépatite C[242] et le papillomavirus[507] ont développé des stratégies pour échapper aux compartiments lysosomaux. L'autophagie peut alors être impliquée comme un mécanisme alternatif pour la dégradation de ces pathogènes.

La xénophagie correspond à la capture d'un micro-organisme à l'intérieur de la double membrane formant l'autophagosome. De nombreuses espèces bactériennes (*Mycobacterium, Shigella, Salmonella*), virales (le virus d'Herpes *HSV-1*, le *virus de la mosaïque du tabac*, le *VIH*, le virus *Sindbis*) et parasites (*Toxoplasma Gondi*) sont dégradées sélectivement par les autophagosomes [145,508–520].

Ce mécanisme d'autophagie fait intervenir les récepteurs/adaptateurs de cargos de la famille de p62 (SLR – SQSTM1/p62-like receptor, cf. partie I -A -2.2.2) ainsi que la reconnaissance des pathogènes par des PRR.

1.1.1. Rôles des SLR dans l'induction de la xénophagie

La dégradation des pathogènes présents dans le cytoplasme implique leur détection par des PRR cytoplasmiques (cf. partie I -B -1.2) et leur fixation par divers SLR. Trois récepteurs SLR impliqués dans l'autophagie sélective semblent importants pour la reconnaissance de bactéries intracellulaires : p62, NDP52 et l'optineurine.

Les bactéries dans le cytoplasme sont très vite ubiquitinées. Une étude récente a montré qu'une enzyme E3, LRSAM1, est impliquée dans l'ubiquitination spécifique de la bactérie *Salmonella*[521]. NDP52[522], p62 et l'optineurine[145,515] peuvent alors s'ancrer à la bactérie ubiquitinée via leur domaine UBD, et aux protéines LC3/GABARAP via leur domaine LIR (cf. partie I -A -2.2.2). Ces SLR contribuent ainsi au ciblage des bactéries dans l'autophagosome en formation.

Le ciblage des bactéries dans les autophagosomes semble être un mécanisme finement régulé par de nombreux facteurs recrutés à la membrane de l'autophagosome. Ainsi, l'affinité du domaine LIR de l'optineurine pour LC3 ou du domaine UBD de p62 pour l'ubiquitine est augmentée par la kinase TBK1[145,523] (TANK binding kinase 1) recrutée au niveau des membranes autophagiques via son interaction avec NDP52[524]. La GTPase RAB8B impliquée dans le transport et la fusion de vésicules est ensuite recrutée par TBK1 et serait impliquée dans la maturation des autophagosomes contenant des bactéries[523].

D'autres bactéries intracellulaires sont reconnues par des SLR : *Shigella* et *Listeria* sont reconnues par p62 et NDP52 pour être, *in fine*, dégradées dans les autophagosomes[513,514]. De façon originale, *Shigella* peut être envoyée dans les autophagosomes après interaction directe entre la protéine de surface bactérienne VirG et Atg5[525], sans participation des SLR.

De manière intéressante, p62 est également impliquée dans l'élimination de *Mycobacterium* de manière indépendante de la xénophagie, en induisant la production de peptides antimicrobiens dans les autophagosomes[526] qui fusionnent ensuite avec la vacuole bactérienne.

Les données de la littérature concernant la xénophagie de particules virales sont moins abondantes. Les virus HSV-1[517], VIH[512,527] et Sindbis[516] sont retrouvés dans des autophagosomes et dégradés. En outre, la capside du virus Sindbis est reconnue par p62 de façon indépendante de l'ubiquitine[516]. Le rôle de l'autophagie dans la dégradation du VIH sera abordé spécifiquement dans la partie I -E.

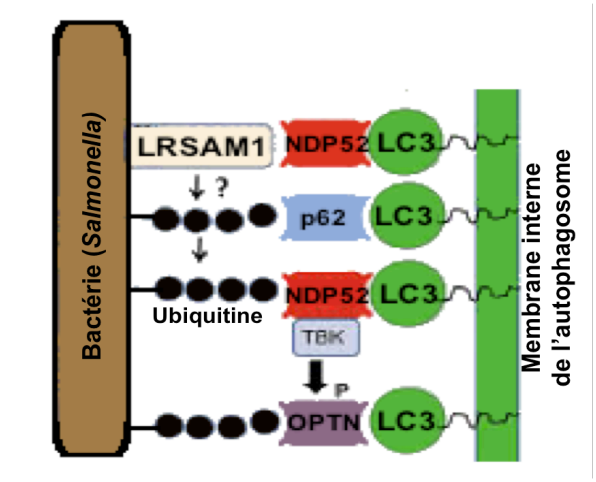


Figure 14 – Capture des pathogènes par les SLR

1.1.2. Modulation de l'autophagie par les PRR et les cytokines

1.1.2.1. Rôle des TLR dans l'induction de l'autophagie

L'activation des voies TLR est impliquée dans de nombreux mécanismes antimicrobiens comme la production de cytokines inflammatoires, la maturation des DC ou encore le burst oxydatif dans les neutrophiles[528]. Des TLR peuvent également induire l'autophagie (cf. Figure 13 et Figure 15). En effet, l'activation du TLR4 par le LPS dans des lignées macrophagiques induit fortement l'autophagie[529]. Cette induction permet le ciblage des bactéries *Mycobacterium* présentes dans la vacuole vers les autophagosomes. Les ARNds et l'ARNss (retrouvés dans les génomes viraux) activent respectivement les voies TLR3 et 7 qui induisent aussi l'autophagie[530,531]. La voie de transduction impliquée dans l'activation de l'autophagie dépendante des TLR fait intervenir les protéines adaptatrices TRIF[529] (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β) et MyD88[530,531]. MyD88 et TRIF permettent le recrutement de Beclin 1 dans le complexe de signalisation du TLR4 et inhibent

son interaction avec Bcl-2, activant ainsi l'autophagie[106]. Cette inhibition serait indirecte et passerait par l'ubiquitination de Beclin 1 dépendante de TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) qui agit en aval de MyD88 et TRIF dans la signalisation TLR[532]. TRAF6 active également ULK1 et contrôle ainsi les deux voies principales qui régulent l'autophagie[533].

Dans les macrophages, une étude récente montre par ailleurs que la stimulation du TLR4 avec du LPS ou *Escherichia Coli* induit la transcription de p62 médiée par MyD88, TRIF, TRAF6 et Nrf2 (Nuclear factor-like 2) et conduit à la formation d'ALIS dégradés par autophagie[534]. I -C -1.1.2.1

En conclusion, l'activation des voies TLR induit l'autophagie. Pourtant le rôle des TLR dans le ciblage et la dégradation de pathogènes par xénophagie reste à confirmer.

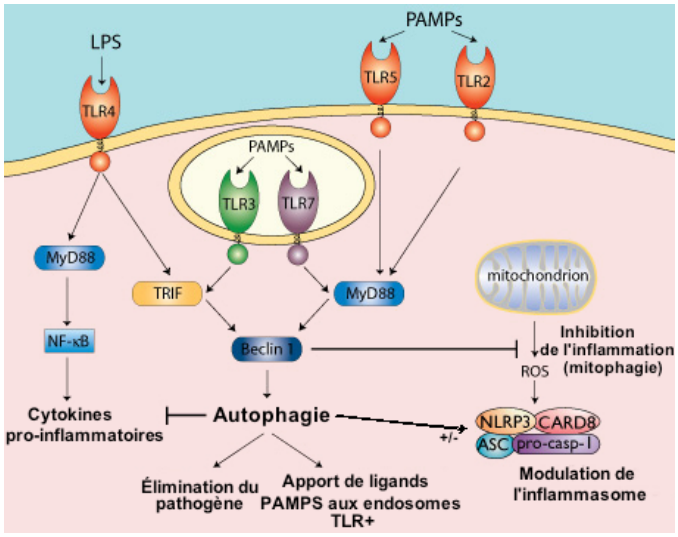


Figure 15 – Autophagie et TLR ; détection des pathogènes et inflammation
Adapté de Invivogen

1.1.2.2. Rôle des NLR dans l'induction de la xénophagie

NOD1 et NOD2 reconnaissent des bactéries cytoplasmiques (cf. partie I -B -1.1 – NLR). Dans les hMDDC et diverses lignées cellulaires, la reconnaissance par NOD1/2 des bactéries *Salmonella* et *Shigella* conduit à l'induction de l'autophagie et leur xénophagie [219,220]. Ces protéines colocalisent avec les bactéries aux sites d'entrée proches de la membrane plasmique, sûrement par interaction avec des composants de la paroi bactérienne. De plus, elles induisent le recrutement d'Atg16L, et conduisent, *in fine*, au ciblage des bactéries dans les autophagosomes marqués par LC3 (cf. Figure 16). Ainsi, dans les hMDDC, l'induction de l'autophagie par la voie NOD2 est dépendante des protéines Atg5,7 et Atg16L[219].

Des polymorphismes sur les loci d'*Atg16L* et *NOD2* sont associés avec la maladie de Crohn [535,536], caractérisée par une inflammation chronique des intestins et la translocation des bactéries de la flore commensale intestinale. De façon intéressante, des cellules de patients homozygotes pour l'allèle à risque d'Atg16L ne sont pas capables d'induire l'autophagie en présence des ligands de NOD2[220]. De plus, Atg16L n'est plus recrutée aux sites d'entrée des

bactéries dans des cellules exprimant la forme tronquée de NOD2 retrouvée chez certains patients. Dans des hMDDC issues de ces mêmes patients, les bactéries *Salmonella* et *Escherichia Coli* ne sont plus dégradées par la voie lysosomale[219]. L'autophagie induite par NOD2 jouerait donc un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale [219,220]

Pour résumer, ces études montrent que NOD1 et 2, en liant directement des composants de la machinerie autophagique, induisent la dégradation par xénophagie des bactéries reconnues.

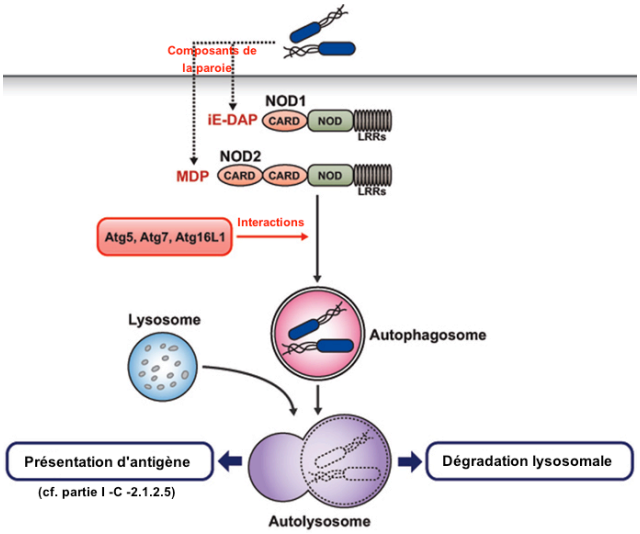


Figure 16 – NOD1/2 : détection des bactéries intracellulaires et xénophagie
Adapté de Ji Eun Oh et coll., Front. Immunol. , 2012

1.1.2.3. Rôle des RLR dans l'induction de l'autophagie

L'autophagie peut être induite par des virus ADN double brin (ADNds) comme le virus HSV-1, de façon dépendante de la protéine STING (décrite partie I -B -1.1 –RLR) [537,538]. Par ailleurs l'activation de l'autophagie via STING suite au relargage vers le cytoplasme d'ADN bactérien de *Mycobacterium* inhibe la réplication de la bactérie *in vitro* et *in vivo*[508]. Notons cependant qu'aucune étude n'a démontré un rôle direct des RLR comme RIG-1, MDA5 ou LGP2 dans l'induction de l'autophagie par des pathogènes.

1.1.2.4. Contrôle de l'autophagie par les cytokines

D'autres voies de signalisation peuvent moduler l'autophagie. De façon simplifiée :

- Les cytokines orientant la réponse Th1 comme l'IFNγ induisent l'autophagie[509,539], probablement par les voies IRGM[540] (Immunity related guanosine triphosphatases) et p38/STAT1[539,541]. Ainsi différents virus à ARN comme l'HCV, le virus de la rougeole (MeV, measles virus) ou encore le VIH ciblent IRGM pour moduler l'autophagie à leur avantage[542]. La vitamine D agirait de concert avec l'IFNγ et la voie TLR pour induire l'autophagie contre Mycobacterium et le VIH dans les macrophages[543,544].

- La cytokine pro-inflammatoire IL1β induit l'autophagie via Beclin 1, ce qui permet aux macrophages de limiter leur infection par Mycobacterium[509].
- Les cytokines pro-Th2 comme l'IL4 ou l'IL13 inhibent, elles, l'autophagie[545].

1.1.3. Phagocytose associée à LC3 (LAP)

Lors de la LAP (LC3 associated phagocytosis), des composants de la machinerie autophagique classique, incluant LC3-II, sont rapidement recrutés sur la membrane d'un phagosome, pour accélérer sa maturation.

Originellement, la LAP a été caractérisée dans des lignées macrophagiques après internalisation très rapide dans des phagosomes marqués LC3 de billes recouvertes de ligands TLR1/2 et 4, sans formation apparente d'autophagosomes conventionnels[229]. La voie TLR est donc capable d'induire la formation des LAP et leur maturation.

Des études plus récentes ont montré ensuite son rôle dans la phagocytose de corps apoptotiques[546,547] et de bactéries comme *Burkholderia*[548], *Mycobacterium*[549] ou *Salmonella*[550]. Cependant, il est difficile de déterminer si le recrutement du LC3 se fait directement à la surface du phagosome ou par fusion rapide avec les autophagosomes[551]. La confirmation en TEM de l'absence de double membrane sur les vésicules positives pour LC3 est donc une condition nécessaire (mais non suffisante) pour pouvoir parler de LAP. À l'heure actuelle, les mécanismes exacts qui décrivent la LAP ne sont pas bien connus. Son induction fait intervenir la voie PI3K mais contrairement à l'autophagie canonique, les protéines ULK1 et FIP200 de la voie ULK ne semblent pas nécessaires[546]. Des études sont nécessaires pour caractériser finement les mécanismes moléculaires de la LAP et son rôle dans la dégradation des pathogènes.

1.2. Rôle de l'autophagie dans le contrôle de l'inflammation

1.2.1. Induction des voies TLR par l'autophagie

L'autophagie contribue à l'induction des voies TLR en acheminant dans des compartiments endosomaux des ligands provenant des pathogènes dégradés (cf. Figure 15).

Dans des pDC murines où se répliquent des virus ARNss comme le VSV ou le virus Sindbis, la sécrétion d'IFNα est dépendante du TLR7 et d'une machinerie autophagique fonctionnelle : l'inhibition de l'autophagie *in vitro* (avec du 3-MA) ou *in vivo* (KO Atg5) diminue l'activation des pDC suite à l'infection[472]. Ces résultats suggèrent que l'autophagie augmente l'apport des ligands PAMP dans les compartiments TLR7 permettant ainsi la reconnaissance d'intermédiaires de la réplication virale et, *in fine*, la production d'IFNα par les pDC[472].

Dans des DC myéloïdes murines, l'autophagie est induite après contact avec le virus respiratoire syncytial (RSV, ARNss)[552]. De façon remarquable, la production de cytokines inflammatoires IL6, TNFα et de l'IL12 pro-Th1 dans ces cellules est dépendante de l'autophagie induite par le virus : des DC qui n'expriment pas Beclin 1 ou LC3 ne sont pas

activées [552]. En parallèle, même après induction de l'autophagie, le blocage des voies de signalisation TLR TRIF et MyD88 inhibe complètement la production de cytokines.

L'inhibition de la voie autophagique par des siRNA (ou après contact avec le VIH, cf. partie I -E -5.2.1) diminue l'activation des hmDC (DC myeloïdes humaines) dépendante des TLR4 et TLR8[512]. Par ailleurs, dans les hpDC, le blocage de l'autophagie par un siRNA ou du 3-MA inhibe la production d'IFNα suite à l'activation de la voie TLR7 par des ARNss ou par le VIH [553].

Toutes ces données semblent montrer que dans les DC l'autophagie joue un rôle important pour la potentialisation de l'activation des voies TLR et l'induction de la réponse inflammatoire.

Dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales intestinales, l'autophagie basale est importante pour la production de la cytokine proinflammatoire IL8 après activation des voies TLR1/2, 4 et 5[554]. Ces résultats confirment que l'autophagie est un mécanisme indispensable pour la régulation de l'inflammation au niveau de la barrière intestinale en contact avec la flore commensale, comme le suggéraient déjà les études sur les polymorphismes des protéines NOD dans la maladie de Crohn[219,220,535].

Cependant, l'autophagie en participant à la boucle d'amplification de la réponse PAMP/TLR pourrait conduire à une réponse inflammatoire exacerbée et à l'apparition de maladies auto-immunes. Ainsi la SLE (systemic lupus erythematosus) est caractérisée par l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN des patients. Dans les hpDC, la LAP serait impliquée dans le trafic de complexes immuns anticorps/ADN (Ci-ADN) vers des compartiments positifs pour TLR9, induisant une forte production d'IFNα par ces cellules[555]. De même dans les LB, l'activation du BCR (B-cell receptor) après fixation des complexes Ci-ADN permet leur internalisation dans des compartiments endosomaux. L'autophagie induit alors la fusion de ces compartiments avec des endosomes riches en TLR9, et conduit à la potentialisation de la réponse B[556].

1.2.2. Rôle de l'autophagie dans l'inhibition de l'inflammation

1.2.2.1. Inhibition des voies RLR par l'autophagie

A l'opposé du rôle de l'autophagie sur l'activation des voies TLR, plusieurs études montrent que la voie RLR est inhibée par l'induction de l'autophagie[557–559]. L'activation de l'autophagie après une infection VSV des cellules VERO inhibe l'activation de RIG-1 afin d'empêcher une réponse inflammatoire antivirale disproportionnée[558]. Au niveau moléculaire, le complexe Atg5-Atg12 interagit avec le domaine CARD de RIG-I et IPS-1 (cf. partie I -B -1.1 – RLR) pour inhiber la signalisation RLR après infection VSV[557,560]. De même, la protéine RUBICON inhibe la signalisation RLR et Dectin1 (après infection par différents virus ou fungi) en interagissant avec la protéine CARD9 impliquée dans la voie de transduction du signal[559].

Enfin, il semblerait que l'autophagie exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activation de la réponse IFN de type 1 induite par STING[561]. En effet, l'activation de STING après l'infection par un virus ADNds requiert sa relocalisation du RE vers des structures ponctuées positives pour la kinase TBK1[562]. Cependant, une partie des protéines STING relocalise avec les protéines LC3 et Atg9. La perte de mAtg9 augmente fortement l'interaction entre STING et TBK1, provoquant une activation aberrante de la production d'IFN de type 1[561]. **En conclusion**, l'autophagie semble importante dans la régulation de la réponse inflammatoire antivirale. Certains virus induisent l'autophagie pour augmenter leur réplication (cf. partie I -C -3.2) et pourraient donc inhiber ainsi la réponse inflammatoire.

1.2.2.2. Régulation de l'inflammasome par l'autophagie.

L'IL1β est une cytokine inflammatoire produite par les macrophages, les monocytes et les DC activés. Elle est impliquée entre autres dans l'induction de la fièvre, la transmigration leucocytaire et la prolifération cellulaire. Son action est donc très contrôlée (sa synthèse, son activation et sa sécrétion). Elle peut induire l'autophagie (cf. partie I -C -1.1.2.4) qui en retour exerce un rétrocontrôle négatif sur son activation, via différents mécanismes (cf. Figure 17).

Tout d'abord, l'autophagie inhibe la maturation des pro-cytokines d'IL1β/IL18 en cytokines effectrices. Cette étape de maturation est permise par l'inflammasome, un complexe cytoplasmique activé en réponse à l'activation des voies PRR. Ce complexe permet l'activation de la caspase 1, qui clive les formes pro-IL1β et pro-IL18 en formes actives. Le rôle de l'autophagie dans le contrôle de l'inflammasome a été suggéré au départ par l'étude de souris KO pour Atg16L utilisées comme modèle de la maladie de Crohn. Les macrophages de ces souris produisaient des quantités exacerbées d'IL1β et d'IL18 en réponse au LPS[563]. D'autres études ont ensuite confirmé le rôle de l'autophagie dans l'inhibition de l'inflammasome[564–566]. Dans les macrophages humains[564], l'activation de l'inflammasome avec des drogues ou des ligands PRR induit l'autophagie de façon indépendante des caspases mais probablement dépendante d'un senseur NLR de l'inflammasome comme NLRP3. Si l'autophagie est bloquée ou activée dans ces cellules, l'activité de l'inflammasome est respectivement augmentée ou inhibée. En fait, p62 fixerait la caspase 1 ubiquitinée pour induire sa dégradation dans les autophagosomes[564]. Son activité est donc inhibée et la production des formes actives d'IL1β et d'IL18 diminuée. De plus, la pro-IL1β est en elle-même dégradée par autophagie, ce qui contribue à la diminution de la production de sa forme active[567].

L'autophagie peut inhiber indirectement l'inflammasome par un autre mécanisme. Dans des lignées macrophagiques humaines où l'autophagie est inhibée [566], les mitochondries s'accumulent et génèrent des ROS qui activent l'inflammasome. Ces résultats ont été confirmés in-vivo [565] : l'inhibition des voies NLR diminue la mitophagie, induit l'augmentation des ROS, l'activation subséquente de l'inflammasome et de la production d'IL18.

De façon intéressante, l'autophagie favorise la sécrétion « non-conventionnelle » d'IL1β, ce qui est contradiction apparente avec le rôle de l'autophagie dans l'inhibition de sa production[568]. Une explication possible serait que la formation d'autophagosomes contenant la pro-IL1β soit un prérequis pour son clivage et sa sécrétion sous forme active. L'autophagie pourrait alors conduire la cytokine vers une voie d'exocytose ou conduire à sa dégradation par la voie lysosomale. Une forte inflammation (ou activation PRR) induirait la voie de dégradation par autophagie de l'IL1β comme boucle de rétrocontrôle négatif tandis qu'une inflammation/activation PRR faible induirait plutôt la voie sécrétrice, et l'autophagie jouerait alors un rôle potentialisateur de l'inflammation.

Notes : L'autophagie régule négativement la production d'autres cytokines impliquées dans l'inflammation. Dans des souris infectées *Mycobacterium* et Knock-In pour Atg5 dans les cellules hématopoïétiques, la réponse inflammatoire est disproportionnée avec une production élevée d'IL1α, d'IL12, d'IL17, et de CXCL1[569]. De plus, dans des macrophages et DC humains et murins activés avec des ligands TLR, l'inhibition de l'autophagie par des drogues ou des siRNA augmente également la production d'IL1α/β et d'IL23 qui, à leur tour, augmentent la sécrétion d'IL17, d'IL22 et d'IFNγ par les Tγδ[570]. Des dérégulations de l'autophagie sont donc associées à des dérégulations importantes de la réponse inflammatoire.

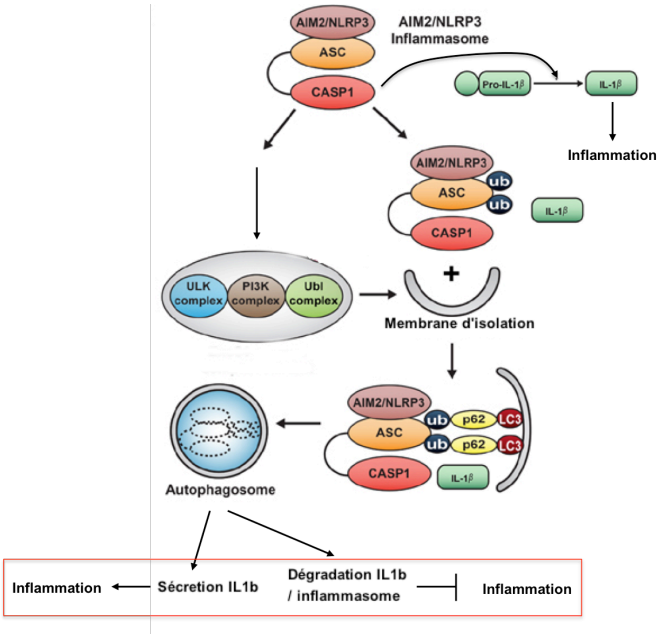


Figure 17 – Interactions autophagie et infllammasome : contrôle de l'inflammation
Adapté de Ji Eun Oh et coll. , Immune Netw. , 2013

En conclusion, l'autophagie est un mécanisme important dans l'établissement d'une réponse immune innée contrôlée. Elle est induite par divers PRR et permet la dégradation directe des pathogènes par xénophagie via les SLR. En retour, elle régule positivement ou négativement les voies PRR, conduisant à une meilleure reconnaissance du pathogène et empêchant les réponses inflammatoires disproportionnées. De fait, des dérégulations dans

l'induction de l'autophagie semblent en partie responsables de l'apparition de maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques [571].

2. ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE : PRESENTATION DES ANTIGENES

La dégradation de pathogènes par xénophagie pose la question du devenir des produits issus de cette dégradation. Des peptides antigéniques sont susceptibles d'être générés et envoyés dans des compartiments riches en molécules du CMH-II et/ou CMH-I pour être présentés aux lymphocytes T CD4 et T CD8 (Cf. Figure 18). L'autophagie interviendrait donc dans l'élaboration des réponses immunitaires adaptatives.

2.1. Autophagie et présentation des antigènes par les CMH-II

2.1.1. Connexions moléculaires entre l'autophagie et les voies de présentation CMH-II

Dans les APC, les autophagosomes fusionnent fréquemment avec les compartiments MIIC[410]. Les vésicules ainsi fusionnées ont une structure proche des MVB et expriment à leurs membranes des molécules du CMH-II, HLA-DM et des marqueurs lysosomaux (LAMP). Un antigène du virus de la grippe (MP, protéine de la matrice) fusionné à la protéine LC3 est dirigé dans les autophagosomes et conduit à l'activation des LT CD4 spécifiques[410]. Ces données suggèrent un rôle de l'autophagie dans l'apprêtement sur les molécules du CMH-II des antigènes capturés. Par ailleurs, des autophagosomes non conventionnels peuvent se former à partir des compartiments MIIC après activation de la voie TLR4 dans les DC[572]. Leur double membrane contient des marqueurs classiques de l'autophagie et de la machinerie de présentation par les molécules du CMH-II[572]. Ces autophagosomes peuvent séquestrer des agrégats protéiques (DALIS)[572] mais leur rôle dans la présentation des antigènes n'a pas été évalué.

De façon intéressante, des protéines de la machinerie autophagique sont impliquées dans la stabilisation des phagosomes contenant des pathogènes pour faciliter l'apprêtement d'antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II[573] (Cf. Figure 18).

2.1.2. Autophagie et présentation des antigènes endogènes par les CMH-II

En absence d'infection, l'autophagie participe à l'apprêtement des **antigènes du soi** intracellulaires sur les molécules du CMH-II (Cf. Figure 18).

2.1.2.1. Évidences biochimiques

Des expériences d'élution peptidiques montrent que le répertoire des peptides du soi présentés par les molécules du CMH-II (cf. partie I -B -2.3.2) est modifié après une carence nutritionnelle corrélée avec l'induction de l'autophagie[574]. Le nombre de peptides générés par l'apprêtement de certains antigènes cytosoliques et nucléaires augmente drastiquement (d'en moyenne 50%)[574]. Parmi eux, on retrouve des peptides issus des protéines LC3, GABARAP

et Hsp70 [574,575] : ces données confirment que ces protéines ont accès à des compartiments vésiculaires riches en molécules de CHM-II[410,572].

2.1.2.2. Évidences in vivo dans la sélection thymique

L'éducation thymique des lymphocytes T est un prérequis indispensable pour la suppression des LT auto-réactifs. Les lymphocytes, qui reconnaissent des peptides issus de protéines du soi présentées par les cellules épithéliales thymiques (TEC), entrent en apoptose.

L'autophagie est importante dans le processus de sélection thymique des LT CD4 mais pas des LT CD8[576–578]. Dans des modèles murins où la machinerie autophagique dans le thymus est défectueuse, la déplétion des LT CD4 auto-réactifs est fortement perturbée[576]. Des infiltrations de lymphocytes auto-réactifs sont observées dans divers tissus, induisant l'apparition de coliques auto-immunes. Ces effets sont dûs à une mauvaise présentation des antigènes cytoplasmiques par les TEC déficientes pour l'autophagie[576]. De fait, LC3 colocalise dans les TEC avec les compartiments CMH-II [577]. L'expression dans ces cellules d'un antigène modèle fusionné à la protéine LC3 (dirigé dans les autophagosomes) conduit à la déplétion efficace des lymphocytes T spécifiques de cet antigène, et bloquer son acheminement dans les autophagosomes empêche cette sélection négative[578].

L'autophagie participe également à l'apprêtement **d'antigènes de tumeurs et d'antigènes modèles** sur les molécules du CMH-II.

2.1.2.3. Antigènes de tumeurs

Après transfection de l'antigène tumorale MUC1 dans des hMDDC, le blocage de l'autophagie par des drogues inhibe l'activation des LT CD4 spécifiques de cette protéine[579]. Dans ce modèle *in vitro,* l'autophagie semble pouvoir jouer un rôle dans la présentation des antigènes endogènes de tumeurs.

2.1.2.4. Antigènes modèles

Des lymphocytes B et des cellules de lignées tumorales exprimant la protéine de résistance à la Néomycine (NeoR) sont capables d'activer des clones T CD4 spécifiques de cette protéine, de façon indépendante des voies de présentation exogène et de la machinerie du protéasome mais dépendante de la voie endo/lysosomale[580]. L'inhibition de l'autophagie avec le 3-MA empêche la dégradation de la protéine et diminuerait son apprêtement sur les molécules du CMH-II, mesuré par l'activation des clones[580]. Par ailleurs, forcer l'agrégation de l'ovalbumine (OVA) dans des cellules de mélanomes murines induit son internalisation dans les autophagosomes, potentialisant in vivo la réponse T CD4 spécifique de cet antigène[581]. De plus, activer (via une carence) ou inhiber (via des drogues ou des siRNA) l'autophagie dans les DC murines augmente ou diminue respectivement la présentation des antigènes issus de la protéine HEL (Hen Eggs Lysozyme) aux LT CD4[582]. Cet antigène modèle se retrouve alors citrulliné (déamination d'une arginine) lorsqu'il est apprêté par la

voie autophagique[582] : l'autophagie pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition de certaines maladies auto-immunes ou la réponse anticorps est dirigée contre des antigènes du soi citrullinés (la polyarthrite rhumatoïde).

2.1.2.5. Antigènes de pathogènes intracellulaires

L'autophagie, en dégradant des **antigènes viraux et bactériens intracellulaires**, conduit à leur apprêtement et leur chargement sur les molécules du CMH-II.

- **Antigènes viraux**

Dans des lignées B infectées par l'EBV (Epstein Bar Virus), l'antigène EBNA1 s'accumule dans les autophagosomes[583]. En bloquant l'autophagie avec des siRNA ou des drogues, l'activation de clones T CD4 spécifiques d'épitopes d'EBNA1 est diminuée. Ainsi, un antigène nucléaire viral peut être apprêté sur les molécules du CMH-II via la machinerie autophagique[583]. Cependant, d'autres épitopes d'EBNA1 sont présentés par les molécules du CMH-II de façon indépendante de l'autophagie[584]. En effet, la localisation nucléaire d'EBNA1 restreint la réponse T CD4 dépendante de l'autophagie à certains épitopes : lorsque la protéine virale est envoyée dans le cytoplasme en bloquant son accès dans le noyau par mutation de son domaine de relocalisation nucléaire, les différents épitopes d'EBNA1 sont alors chargés efficacement sur les molécules du CMH-II via la voie autophagique [584].

A contrario, dans certains modèles infectieux, l'autophagie ne joue pas de rôle dans la présentation endogène par les molécules du CMH-II. Dans un modèle d'infection de souris par le virus de la grippe, l'inhibition de l'autophagie par des siRNA dans les APC murines n'a pas d'impact *in vitro* sur l'activation des T CD4 spécifiques d'épitopes de la matrice virale[414]. L'apprêtement de l'antigène semble être partiellement dépendant du protéasome. Une explication serait que le virus de la grippe inhibe la maturation des autophagosomes dans les cellules infectées[585]. Ainsi, l'impact de l'autophagie sur l'activation de la réponse T CD4 antivirale varie en fonction du contexte infectieux et des éventuels mécanismes d'échappement développés par les virus (cf. partie I -C -3).

- **Antigènes bactériens**

De nombreuses bactéries phagocytées secrètent des facteurs de virulence à travers la membrane du phagophore vers le cytosol. De tels facteurs sont souvent importants pour la survie de la bactérie dans sa vacuole de phagocytose et son échappement à la dégradation lysosomale, mais ils fournissent également une source d'antigènes apprêtés sur les molécules du CMH-II via l'autophagie. Par exemple, la bactérie *Yersinia* inhibe les voies de présentation CMH-II exogène « classiques », mais des macrophages infectés restent capables de stimuler des LT CD4 spécifiques du facteur de virulence YopE, libéré dans le cytosol [586]. La présentation par les molécules du CMH-II d'épitopes de YopE est inhibée par des drogues bloquant l'autophagie et la dégradation lysosomale.

L'infection *BCG* conduit également au chargement de l'antigène Ag85B du bacille sur les molécules du CMH-II des DC et macrophages murins. En induisant l'autophagie dans

ces cellules avec la rapamycine, le bacille colocalise dans les autophagosomes/lysosomes et les DC infectées *in vitro* ont une meilleure capacité pour activer la réponse T CD4[587].

L'autophagie joue également un rôle dans la dégradation de bactéries comme *Salmonella* qui échappent à la dégradation par phagocytose et rentrent dans le cytosol. De façon remarquable, la présentation par les molécules du CMH-II d'antigènes de *Salmonella* est dépendante de l'autophagie induite par NOD (cf. partie I -C -1.1.2.2): des hmDC infectées exprimant les variants NOD2 et Atg16L impliqués dans la maladie de Crohn ne sont pas capables d'induire la prolifération des T CD4 [219]. Une étude de cohorte chez des enfants susceptibles pour la maladie de Crohn confirme ces résultats, montrant que les hmDC dérivées de monocytes chez ces patients sont inaptes à présenter divers antigènes modèles aux LT CD4 spécifiques[588].

2.1.3. Autophagie et présentation des antigènes exogènes par les CMH-II

2.1.3.1. Rôle de l'autophagie

La contribution de l'autophagie au chargement des molécules du CMH-II n'est pas restreinte aux protéines endogènes mais s'étend également à la présentation exogène « classique » (Cf. Figure 18).

L'autophagie jouerait un rôle dans la présentation exogène d'antigènes des virus HSV-1 et HSV-2 par les molécules du CMH-II. La réponse T CD4 spécifique pour HSV-1 est diminuée de plus de moitié chez des souris infectées déficientes pour Atg5 dans la lignée hématopoïétique, [589] et ces mêmes souris meurent rapidement suite à une infection HSV-2. Alors que les capacités de migration, de maturation et de capture de l'antigène par les DC de ces souris restent intactes, leur capacité à présenter par les molécules du CMH-II des antigènes modèles phagocytés pour l'activation des lymphocytes T CD4 est diminuée *in vitro*[589]. La fusion phagosomes/lysosomes semble affectée dans ces DC. L'hypothèse serait que les autophagosomes participent à l'apprêtement des antigènes phagocytés en induisant la maturation des phagosomes et la dégradation de l'antigène (ou du pathogène).

L'autophagie serait également impliquée dans la présentation des antigènes exogènes du VIH par les CMH-II dans les DC en absence de réplication virale (cf. partie I -E -5.2.3).

2.1.3.2. Rôle de la LAP

La LAP activée par la voie de signalisation TLR2 pourrait être impliquée dans l'apprêtement et la présentation exogène d'antigènes fongiques de *Candida Albicans*[573]. Les phagosomes contenant le pathogène sont stabilisés suite au recrutement (indépendant de Beclin1 et p62) du LC3 sur leurs membranes, permettant ainsi une présentation antigénique prolongée[573]. De plus, la fixation par le récepteur de phagocytose Dectin 1 de sucres β-Glucanes présents sur la membrane de certains parasites comme *Saccharomyces Cerevisiae* ou *Candida Albicans* (tués par la chaleur) induit la LAP et conduit à une meilleure présentation exogène CMH-II d'antigènes issus de ces pathogènes[590].

2.2. Autophagie et présentation des antigènes par les CMH-I

2.2.1. Autophagie et présentation des antigènes endogènes par les CMH-I

Le rôle de l'autophagie et de la LAP dans la présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I est bien moins décrit. Les études du rôle de la machinerie autophagique pour la présentation antigénique par les TEC du thymus ne montrent pas d'effet sur la sélection et le répertoire des LT CD8[576,578]. De même, dans des souris déficientes pour Atg5, l'activation des LT CD8 n'est pas modifiée[589] et le ciblage spécifique d'antigènes dans les autophagosomes ne conduit pas, *in vitro*, à une augmentation de la présentation par les molécules du CMH-I[410].

Cependant, certains DRiPs (cf. partie I -B -2.2.1.2) sont substrat à la fois du système UPS et de l'autophagie[591]. Inhiber l'autophagie dans les DC favorise la dégradation des DRiPs par le protéasome, ce qui semble favoriser le chargement des molécules du CMH-I[591]. Ces résultats suggèrent que l'autophagie, en entrant en compétition avec le système UPS, inhiberait la présentation par les molécules de CMH-I.

Dans divers contextes infectieux, l'autophagie contribuerait à la capture et/ou à l'apprêtement d'antigènes bactériens [592] et viraux [581,593,594] sur les molécules de CMH-I, mais les mécanismes restent encore très mal compris. Dans les macrophages déficients pour Atg5, la présentation par les CMH-I d'un antigène de la capside d'HSV-1 (gB) est altérée. Cependant, si les autophagosomes sont impliqués dans la capture et l'apport aux lysosomes de gB[594], l'apprêtement de cet antigène est dépendant du protéasome et de la machinerie TAP. Ces données suggèrent qu'un mécanisme inconnu est responsable de la retro-translocation de l'antigène des compartiments autophagiques vers le cytoplasme. Par ailleurs, trois antigènes du virus HCMV (dérivé de pUL138 et pp65) qui sont apprêtés par la voie UPS/TAP sont également partiellement présentés sur les molécules du CMH-I via une voie impliquant l'autophagie, des protéases lysosomales et le recyclage des molécules HLA[593]. HCMV ayant développé plusieurs mécanismes bloquant la présentation CMH-I classique, cette voie dépendante de l'autophagie pourrait aider à l'élaboration de la réponse immune.

2.2.2. Autophagie et présentation croisée par les CMH-I

Le rôle de l'autophagie sur la présentation croisée est sujet à controverse et dépend des antigènes étudiés. De plus, il faut distinguer l'impact de l'autophagie dans les cellules donneuses d'antigènes (cellules mortes ou cellules tumorales), de son impact dans les DC et les APC qui les capturent (Cf. Figure 18).

2.2.2.1. Autophagie dans les APC qui capturent les antigènes

Après capture par des DC murines d'ovalbumine soluble ou présente dans des corps apoptotiques, la réponse T CD8 spécifique de l'ovalbumine n'est pas altérée dans des souris déficientes pour Atg5[589].Par ailleurs, un traitement au 3-MA n'a pas d'effet sur la présentation croisée d'antigènes du VIH aux clones T CD8+ spécifiques[512].

Dans d'autres modèles, l'autophagie dans les APC pourrait jouer un rôle dans la présentation croisée. Ainsi la présentation exogène CMH-I de la protéine F de la membrane du virus RSV est dépendante de l'autophagie et de la voie lysosomale mais indépendante de la machinerie TAP[595]. Une autre étude suggère que l'autophagie est impliquée dans la présentation croisée d'antigènes bactériens de *Chlamydia*, bien que les voies TAP/protéasomes soient également nécessaires et que l'inhibition de l'autophagie ne soit effectuée qu'à l'aide de drogues[592]. Des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre l'impact de l'autophagie dans les APC pour la présentation croisée.

2.2.2.2. Autophagie dans les cellules donneuses d'antigènes

Dans les cellules tumorales [596–598] ou apoptotiques[599], l'autophagie serait importante pour une présentation croisée efficace par les DC qui les capturent. Ainsi, certains antigènes tumoraux ne sont efficacement cross-présentés par les DC infiltrées dans la tumeur que si les cellules tumorales donneuses sont compétentes pour l'autophagie[596–598]. Le flux autophagique dans les cellules donneuses pourrait être important pour générer des antigènes qui, une fois capturés, seraient facilement cross-présentés.

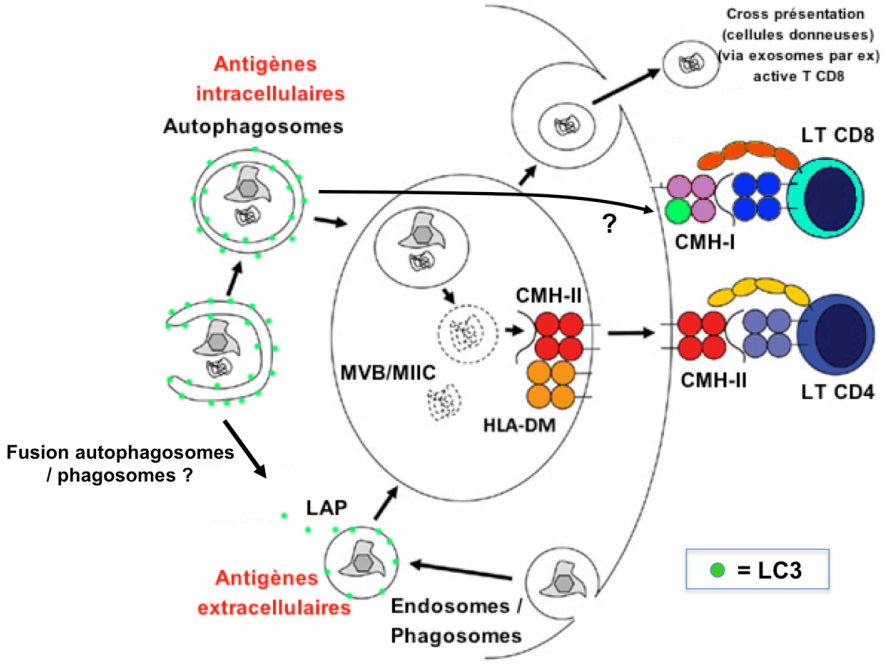


Figure 18 – Autophagie et présentation des antigènes
Adapté de Christian Munz, Front. Immunol. , 2011

2.3. Autophagie et vaccin

L'autophagie est actuellement considérée comme un mécanisme augmentant l'immunogénicité des vaccins. En effet, l'efficacité vaccinale du *BCG* chez la souris est augmentée *in vivo* après un traitement rapamycine induisant l'autophagie[587] : la charge bactérienne suite à l'infection par *Mycobacterium* est diminuée[587]. Dans le contexte de la vaccination contre le virus de la fièvre jaune, l'induction de l'autophagie dans les DC

humaines et murines via GCN2, un senseur des carences en acides aminés, est nécessaire pour l'élaboration de réponses cellulaires T (CD4 et CD8) protectrices [600].

En outre, fusionner des protéines antigéniques (Gag du virus de l'immunodéficience simienne –VIS [601], ou MP du virus de la grippe[410]) avec la protéine LC3, pour forcer leur acheminement dans les autophagosomes, augmente les réponses lymphocytaires T spécifiques de ces antigènes *in vitro* et *in vivo*. Des études supplémentaires seront nécessaires et pourraient conduire au développement de stratégies vaccinales innovantes.

En conclusion, lorsque l'autophagie est induite suite à l'infection par un pathogène via l'activation de voies métaboliques ou la reconnaissance par des PRR, elle semble participer à l'établissement de la réponse immune adaptative en favorisant le chargement sur les molécules du CMH-I et CMH-II de peptides issus des pathogènes/antigènes dégradés. Ainsi, dans certains contextes infectieux, l'autophagie peut jouer un rôle dans l'élaboration des réponses lymphocytaires T CD4 et CD8. Induire l'autophagie ou forcer l'acheminement des pathogènes et des antigènes dans les autophagosomes potentialiserait les réponses lymphocytaires T et pourrait constituer une stratégie efficace pour augmenter l'immunogénicité des vaccins (cf. partie I -E -5.2.3.2).

2.4. Rôle de la CMA dans la présentation des antigènes

Dans une lignée de cellules humaines B lymphoblastiques (B-LCL) exprimant un antigène cytosolique modèle (GAD pour glutamate decarboxylase), des peptides issus de la dégradation de la protéine sont acheminés et chargés sur les molécules du CMH-II de façon dépendante de LAMP-2A[602]. En surexprimant LAMP-2A ou HSC70 dans ces cellules, le chargement sur les molécules du CMH-II d'un épitope du GAD cytosolique est augmenté. Par ailleurs, l'activation des LT CD4 spécifiques de l'épitope est potentialisée. *A contrario*, la présentation par les CMH-II de GAD extracellulaire n'est pas modifiée. Seul LAMP-2A est impliqué dans ce processus : la surexpression de LAMP-2B n'a aucun effet sur l'activation des LT CD4 spécifiques.

Des patients atteints par la maladie de Danon ont un déficit cellulaire pour les protéines LAMP-2. Dans des B-LCL issus de ces patients, la présentation antigénique de divers antigènes exogènes ajoutés dans le milieu de culture est altérée (mesurée par l'activation de LT CD4 spécifiques)[603]. Ainsi, la CMA pourrait également jouer un rôle dans la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II. Cependant, le rôle spécifique de LAMP-2A n'a pas été évalué dans cette étude. De plus, l'acidification du milieu de culture restaure les capacités de présentations des B-LCL déficientes pour LAMP-2, ce qui suggère un rôle de ces protéines dans l'acidification lysosomale nécessaire à l'apprêtement des antigènes sur les molécules du CMH-II.

Dans des BMDC et des lignées macrophagiques murines en phase de maturation, les protéines chaperonnes HSC/HSP70 reconnaissent et fixent les DRIPs nouvellement formés

pour permettre la formation de DALIS après ubiquitination[604]. Dans les étapes tardives de maturation, les DALIS accumulés sont envoyés vers le protéasome ou vers les autophagosomes par un mécanisme dépendant des protéines chaperonnes BAG1 et BAG3 respectivement, qui coopèrent avec la protéine p62. Ainsi HSC/HSP70 peut réguler la présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I via la voie autophagique[604]. Le rôle de la CMA dans cette étude n'est pas évalué, mais l'implication des protéines HSC/HSP70 suggère que cette forme d'autophagie sélective pourrait, elle aussi, jouer un rôle dans la présentation des antigènes issus de la dégradation des DALIS par les molécules du CMH-I.

3. MANIPULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR LES VIRUS

Au cours de la co-évolution avec leurs hôtes, de nombreux pathogènes ont développé des mécanismes de défense et d'échappement au processus d'autophagie pour éviter d'induire l'inflammation et de déclencher la réponse adaptative spécifique. Malgré un génome restreint en taille, les virus sont capables de s'adapter rapidement et ont développé plusieurs stratégies: certains déjouent leur adressage dans les autophagosomes ou inhibent très tôt l'induction de l'autophagie, d'autres bloquent la maturation des autophagosomes au autophagolysosomes. Par ailleurs, des virus peuvent détourner les composants de la machinerie autophagique afin de l'exploiter pour leur propre réplication. Chaque stratégie d'échappement sera décrite à partir d'un exemple.

Les virus ADN semblent principalement déréguler la formation des autophagosomes tandis que de nombreux virus ARN bloquent l'autophagie dans ses étapes tardives de maturation.

3.1. Des virus ADN inhibent l'induction de l'autophagie

Les virus ADN de la famille des herpès (ADNds) codent pour diverses protéines inhibant l'initiation de l'autophagie, afin d'éviter leur dégradation dans les autophagosomes. Parmi les herpès virus de type α, HSV-1 exprime la protéine de phase précoce de l'infection ICP34.5. Cette protéine inhibe l'autophagie en interférant avec la voie de signalisation de la kinase PKR (PKR, dsRNA-dependent protein kinase). PKR est un senseur de l'immunité innée interagissant avec l'ADNds : elle phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2α pour bloquer la traduction[605] et activer l'autophagie[606]. ICP34.5 recrute la PP1α (protein phosphatase 1 alpha) qui déphosphoryle eIF2α conduisant à l'inhibition de l'autophagie et l'activation de la traduction[517,606]. Par ailleurs, ICP34.5 peut fixer la protéine Beclin 1 pour inhiber l'autophagie dans les cellules infectées[607]. L'infection de cellules neuronales avec un virus délété de la protéine ICP34.5 conduit à un défaut de la croissance virale et à l'augmentation du nombre de virions dans les autophagosomes[517,606]. Durant les phases tardives de l'infection, HSV-1 code pour la protéine Us11 qui se lie à la PKR pour inhiber l'induction de l'autophagie via la voie PKR/eIF2α[608].

Parmi les herpès virus de type β, HCMV inhibe l'autophagie[609] via l'expression de la protéine TRS1 qui se fixe sur Beclin 1[610].

Parmi les herpès virus de type γ, le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) code pour deux protéines qui inhibent la formation des autophagosomes : la protéine virale vBcl-2 qui, tout comme son homologue cellulaire, interagit avec le domaine BH3 de Beclin 1 pour inhiber l'autophagie[106], et la protéine v-FLIP (viral FLICE inhibitory protein) qui interagit avec Atg3 pour empêcher la lipidation du LC3 et sa conjugaison au phagophore[611]. D'autres virus comme l'EBV expriment également des homologues de Bcl-2[612] susceptibles d'inhiber l'induction de l'autophagie. De façon intéressante, alors que la fixation du Bcl-2 cellulaire à Beclin 1 est inhibée par phosphorylation lors d'une carence, la protéine vBcl-2 ne l'est pas[130], permettant l'inhibition de l'autophagie indépendamment des mécanismes de régulation physiologique.

Le virus HBV (ADNds circulaire) n'inhibe pas l'autophagie dans les cellules infectées mais l'utiliserait pour augmenter sa réplication et permettre l'acquisition de son enveloppe virale via l'interaction de la protéine d'enveloppe virale avec LC3 [613,614].

3.2. Des virus ARN bloquent la maturation des autophagosomes et induisent l'autophagie pour augmenter leur réplication

La fusion des autophagosomes avec les lysosomes est inhibée suite à l'infection par certains virus ARN. L'infection par le virus de la grippe entraîne l'accumulation des autophagosomes dans de nombreux types cellulaires. Cette accumulation est médiée par la protéine de la matrice M2 qui inhibe la formation des autolysosomes mais le mécanisme exact n'est pas connu[585]. Ce mécanisme ne semble pas primordial pour la réplication virale dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines mais serait impliqué dans l'induction de la mort cellulaire des cellules infectées[585].

De nombreux virus ARN sont capables d'augmenter leur réplication en induisant les phases précoces d'initiation de l'autophagie et/ou en inhibant les phases dégradatives.

C'est le cas du virus HCV qui induit les étapes précoces de l'autophagie (via l'activation de la réponse UPR) pour initier la réplication dans les cellules infectées mais inhibe ensuite la maturation des autophagosomes[615,616]. Les protéines du virus ne colocalisent pas avec les autophagosomes, ce qui laisse penser que le virus peut échapper à sa séquestration par autophagie[616,617]. Dans les macrophages, le VIH utilise la machinerie autophagique pour sa propre réplication par un mécanisme encore mal compris et bloque sa dégradation par les autophagosomes en inhibant leur maturation (cf. partie I -E -4.2).

D'autres familles de virus ARN vont induire la formation de structures « autophagosome-like » qui servent de plate-forme pour la réplication[618]. C'est le cas des picornavirus (ARNds) comme le poliovirus : les protéines 2BC et 3A exprimées dans les cellules infectées induisent la formation de doubles membranes. Elles colocalisent avec des marqueurs des autophagosomes et des lysosomes et 2BC favorise alors la conversion du LC3

de sa forme I vers sa forme II lipidée[619,620]. Ce virus utilise l'autophagie pour répliquer son génome et augmenter la libération de nouveaux virions par les cellules infectées[619]. Il a également été montré que la protéine NSP4 du rotavirus (ARNss) colocalise avec LC3 dans des sites de réplication de l'ARN viral[621].

Le virus de la rougeole (MeV, ARNss) interfère avec l'autophagie de façon multiple. L'engagement du récepteur CD46 utilisé par le virus vaccinal atténué induit l'autophagie par un mécanisme impliquant GOPC, une protéine d'échafaudage qui connecte CD46 au complexe d'initiation PI3K de type III / Beclin 1[622]. CD46 est responsable de la première vague d'induction de l'autophagie, qui s'opère rapidement après l'infection, de façon transitoire[623]. Une deuxième vague d'induction de l'autophagie est observable après 9h d'infection : l'autophagie est alors induite par la protéine MeV-C puis maintenue par la formation de syncitia entre les cellules infectées[623]. MeV-C, en interagissant avec la protéine IRGM (comme de nombreux autres virus – cf. partie I -C -1.1.2.4), est nécessaire et suffisante pour induire l'autophagie[542]. Cette induction est importante pour maximiser la réplication virale, bien que le mécanisme exact ne soit pas connu. D'autre part, l'induction de l'autophagie via la formation de syncitia retarde la mort des cellules infectées pour optimiser la réplication du virus[623].

En conclusion, échapper à l'autophagie ou détourner son mécanisme semble être une étape indispensable à la réplication de nombreux virus. Ceux-ci ciblent de nombreuses voies d'induction et de maturation des autophagosomes, en particulier la protéine Beclin 1, régulateur central de l'autophagie dans la cellule. L'importance de l'échappement à l'autophagie est illustrée par le fait que des virus déficients pour leur mécanisme d'échappement sont beaucoup moins virulents.

D - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) : INFECTION ET IMMUNITE

1. LE VIH : GENERALITES

1.1. Découverte et Epidémiologie

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est un rétrovirus de la sous-famille des lentivirus, responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise, ou SIDA. Il est transmis par des fluides corporels comme le sang, le sperme, les sécrétions vaginales ou le lait maternel. Le VIH et le Virus de l'Immunodéficience Simien (VIS) sont phylogénétiquement très proches et l'on suppose que l'apparition du VIH chez l'homme provient de l'adaptation du VIS par zoonose dans des populations d'Afrique centrale. L'épidémie est décelée au début des années 80, principalement chez les populations homosexuelles aux États-Unis. En 1983, le virus est isolé pour la première fois en France à l'institut Pasteur[624] par Françoise Barré-Sinoussi et coll. puis aux Etats-Unis par Robert Gallo. La mise en culture avec des LT CD4 confirme les observations chez les patients de l'infection préférentielle de ces cellules, qui rentrent alors très vite en apoptose. Deux types de virus sont identifiés dès 1986 : le VIH-1 (étudié ici et dénommé « VIH ») responsable de la pandémie, et le VIH-2 moins infectieux, retrouvé principalement en Afrique de l'Ouest. Le VIH possède une variabilité génétique extrême du fait d'une multiplication rapide associée à un taux de mutation élevé. Il existe donc, au sein de chaque type, des groupes de multiples sous-types soulignant la diversité du virus.

Depuis le début de la pandémie, le VIH a fait plus de 36 millions de morts selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), et reste donc un problème majeur de santé publique. En 2012, plus de 35 millions de personnes vivent avec le VIH (cf. Figure 19) avec plus d'un adulte sur 20 en Afrique Subsaharienne, la région la plus touchée. S'il n'existe pas de moyen de guérir de cette infection, les traitements à base de médicaments antirétroviraux bloquant des étapes du cycle viral peuvent juguler le virus et permettent l'allongement significatif de l'espérance de vie des patients, mais leur accès dans les pays en voie de développement reste limité. Ainsi, l'OMS recense 1,6 million de décès dans l'année 2012 dus au VIH, avec 2,3 millions de nouvelles infections (6300 nouvelles infections chaque jour dans le monde, dont 95% dans les pays en voie de développement).

Les efforts de prévention et la généralisation des traitements antirétroviraux de ces dernières années, principalement dans les pays riches occidentaux, ont contribué à la diminution du nombre de nouvelles infections. On observe ainsi un recul de l'épidémie mondiale : le nombre de nouvelles infections a diminué de 33% par rapport en 2001 et le nombre de décès de 30% depuis le pic en 2005. Néanmoins, le nombre d'infections reste supérieur à celui des décès, et dans certaines populations et certains pays, il a été observé une recrudescence de l'infection ces dernières années (sources OMS).

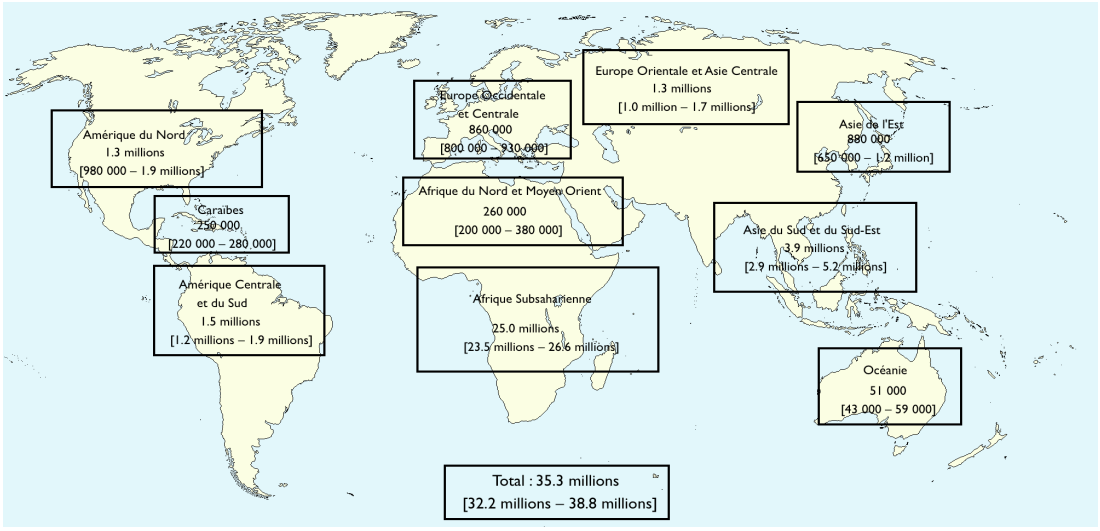


Figure 19 – Estimation du nombre d'individus vivants avec le VIH en 2012
Sources: OMS/UNAIDS

1.2. Physiopathologie

L'évolution de l'infection par le VIH est complexe (cf. Figure 20). Elle comprend une **phase de primo-infection** aiguë qui dure de trois à six semaines, et se traduit généralement au niveau clinique par un symptôme mononucléosique bénin. Lors de cette phase, le virus se réplique activement et on en retrouve en grande quantité dans le sang. Elle est suivie d'une **incubation prolongée asymptomatique,** après l'établissement d'une réponse immunitaire (humorale et cellulaire) spécifique contre le virus. Cette phase est caractérisée par l'alternance entre des phases de latence et de réactivation chronique du virus et peut durer plusieurs années suivant les individus.

Le virus infecte principalement les LT CD4, mais plus généralement toutes les cellules (macrophages, DC, microglies) portant le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4, suivant le tropisme viral. Lors de la primo-infection, le nombre de LT CD4 s'effondre brutalement puis revient à la normale au début de la phase asymptomatique. Toutefois, durant cette période, on observe un déclin continu et progressif du nombre des LT CD4. Le virus induit en fait une dérégulation et un épuisement progressif du système immunitaire de l'hôte, conduisant au **syndrome SIDA** avec l'apparition de multiples infections opportunistes. L'hôte n'est alors plus capable de contrôler l'infection et une réplication intense a lieu. La charge virale est inversement proportionnelle à la quantité de LT CD4.

La primo-infection démarre avec l'entrée du virion par les muqueuses sexuelles. Il peut diffuser librement ou va être capturé par les cellules immunitaires innées (DC, cellules de Langerhans, macrophages). Le virus usurperait les capacités migratoires de ces cellules pour se propager dans les ganglions[625], sites de réplication accrue du VIH. Les LT CD4 activés sont la principale cible du virus, comme le montre la déplétion massive de ces cellules dans les GALT[626,627] (tissus lymphoïdes associés aux intestins), ce qui contribue à

l'inflammation générale. De plus, les LT CD4 spécifiques du virus semblent préférentiellement infectés[628]. Par ailleurs, la déplétion des T CD4 n'est pas seulement due à l'infection active de ces cellules[629] et certaines protéines virales, notamment les protéines d'enveloppe et la protéine Tat, peuvent induire la mort cellulaire en l'absence d'infection[630]. Le virus conduit finalement à l'épuisement des ressources immunitaires qui ne sont plus renouvelées, avec un répertoire immun comparable phénotypiquement à un répertoire immunosénescent[631].

Dans certaines cellules (macrophages, cellules souches hématopoïétiques, LT CD4 quiescents non activés et mémoires), le virus se réplique très faiblement et peut rester «dormant» pendant des années avant réactivation. Ces cellules constituent un réservoir pour le virus et freinent son éradication sous thérapie antivirale.

Les virus de type R5 infectent les cellules présentant le récepteur CCR5 à leur surface, soit les macrophages, les DC (préférentiellement immatures) et les LT activés. Ils sont généralement responsables de la primo-infection et sont retrouvés de façon prédominante chez les patients asymptomatiques. Les virus de type X4 infectent quant à eux les cellules présentant CXCR4 à leur surface, soit les LT naïfs, activés et mémoires. Ils peuvent émerger au cours de l'évolution de la maladie et sont associés à une cytotoxicité importante des T CD4 et une progression rapide vers la phase SIDA.

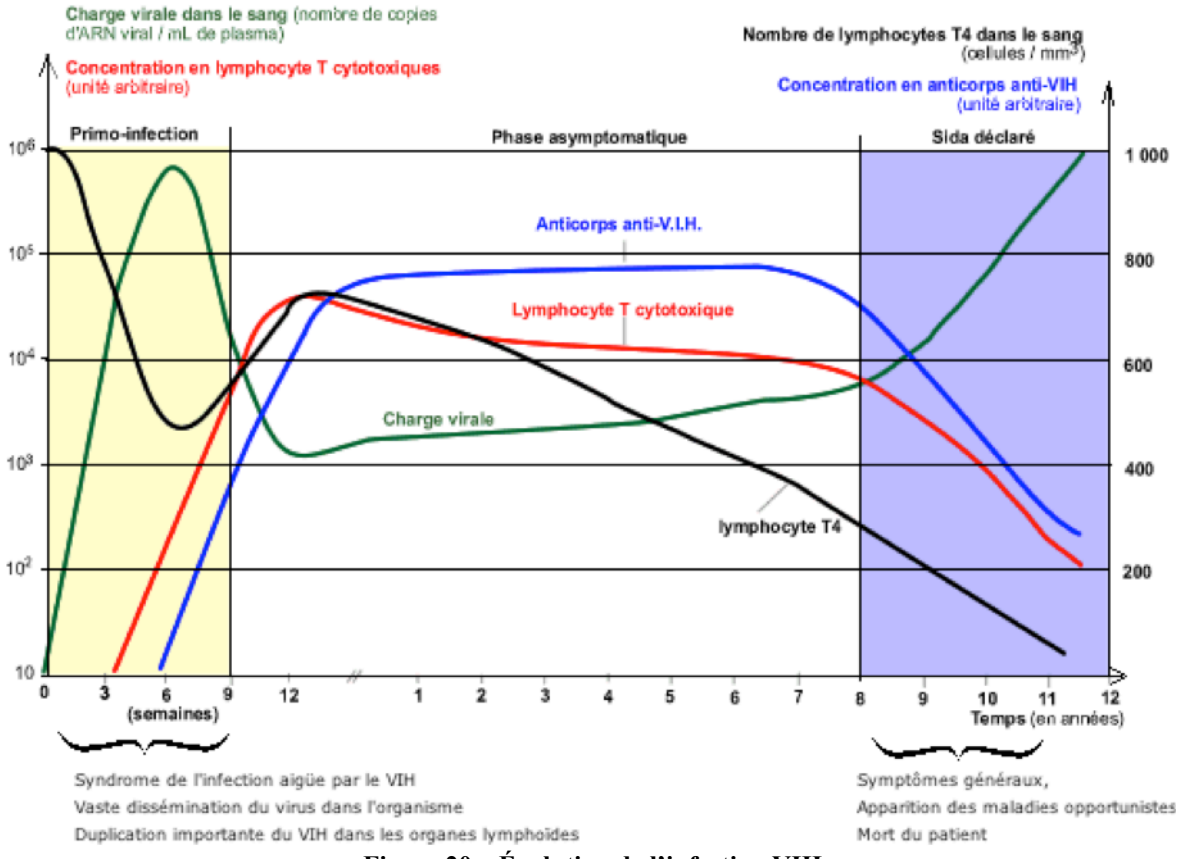


Figure 20 – Évolution de l'infection VIH

1.3. La structure du virus

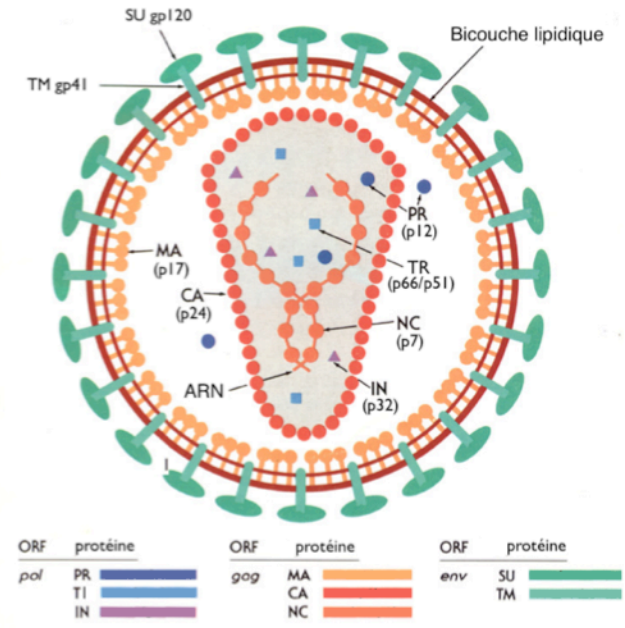


Figure 21 – Structure du VIH

Le VIH est un virus enveloppé sphérique de 100 à 150nm de diamètre (cf. Figure 21). L'enveloppe est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle est ancrée la glycoprotéine transmembranaire gp41 (TM), liée de façon non covalente à la glycoprotéine de surface gp120 (SU). Les hétérodimères gp120/gp41 trimérisent à la surface de l'enveloppe virale. Celle-ci étant formée par bourgeonnement du virus au niveau des membranes cellulaires, on peut également y retrouver des protéines cellulaires (molécules du CMH, ICAM-1…).

L'enveloppe virale recouvre la matrice virale (MA), composée de la protéine p17 ancrée à la bicouche lipidique par des groupements myristil. Au centre de la particule virale se trouve une capside en forme de trapèze constituée de la protéine p24 (CA). Au cœur de la capside se trouve un génome ARN diploïde : deux brins monocaténaires d'ARN reliés à leur extrémité 5' par des ponts hydrogènes. Ils sont complexés à la nucléocapside (p7) et à des molécules d'origine cellulaire. Trois enzymes virales essentielles pour la réplication sont contenues dans le virion : l'ADN polymérase transcriptase inverse p66/p51 (TI), qui transcrit l'ARNss viral en ADNds (pro-viral), l'intégrase p32 (IN), qui permet l'intégration de l'ADN pro-viral retro-transcrit dans le génome de la cellule infectée, et la protéase p12 (PR), qui participe à l'assemblage et à la maturation des particules virales. Les virions contiennent également des protéines dites accessoires : Nef, Vif et Vpr.

Trois autres protéines accessoires additionnelles ayant des rôles durant l'infection de la cellule hôte, Rev, Tat et Vpu, ne sont pas retrouvées dans le virion.

Le génome du VIH est composé de neuf gènes codant pour 15 protéines. Les trois principaux gènes sont *gag, pol, env* qui sont retrouvés dans tous les rétrovirus et codent pour les éléments structuraux du virus (cf. Figure 22). Le rôle des protéines accessoires est décrit par la suite et leurs

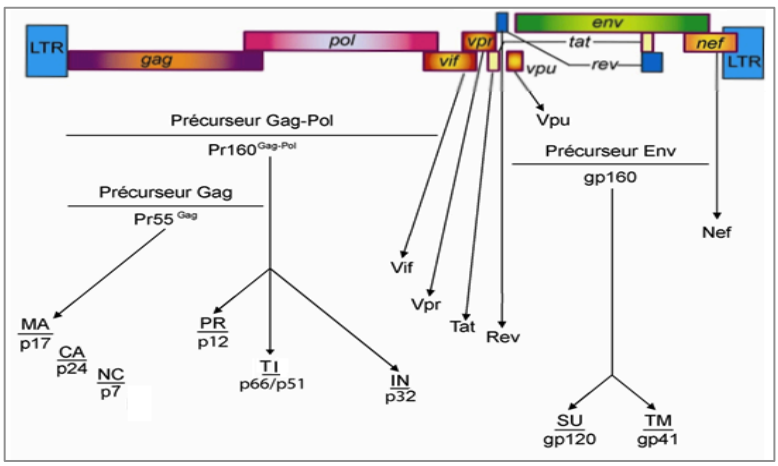


Figure 22 – Organisation du génome viral

fonctions principales sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 – Les protéines accessoires du VIH

Protéines accessoires	Fonctions principales (connues)
Tat (Transactivator)	Régulateur positif de la transcription
Rev (Regulator of viral expression)	Export des transcrit d'ARNm non épissés hors du noyau
Vpr (Viral protéin R)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle l'arrêt du cycle cellulaire.
Vpu (Viral protein U)	Augmente le bourgeonnement (bloque BST-2)
Vif (Viral infectivity)	Bloque l'action désaminase d'APOBEC3G en induisant sa dégradation, inhibant son incorporation dans les virions et empêchant sa traduction
Nef (Negative-regulation factor)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4, du CMH-I et du CMH-II
Vpx (VIH-2/VIS seulement)	Inhibe l'action de SAMHD1 et augmente ainsi la transcription inverse

1.4. Le cycle viral

Le cycle viral se décline en plusieurs étapes qui seront brièvement décrites dans cette partie. Il dure dans la cellule environ 24 heures.

- **Attachement et entrée :**

L'infection VIH débute par l'attachement du virus à la cellule cible et l'interaction entre la gp120 et CD4[632]. S'ensuit un changement de conformation de la gp120, qui peut alors fixer le corécepteur (CXCR4/CCR5), et expose la gp41 à la surface. La gp41 contient un peptide de fusion qui s'insère dans la membrane plasmique et provoque la fusion des membranes, conduisant au relargage dans le cytoplasme de la capside.

- **Décapsidation :**

La capside virale migre alors vers la membrane nucléaire via le réseau des microtubules. La décapsidation s'effectuerait en partie proche de la membrane nucléaire par un mécanisme complexe[633] faisant intervenir des protéines de la cellule comme la Cyclophiline A (CypA), qui stabiliseraient la capside pour faciliter l'import nucléaire.

- **Transcription inverse* et import nucléaire :**

La capside contient le génome simple brin (diploïde) ARN (+) complexé à la NC et l'ADN polymérase TI, pour former le complexe de pré-initiation de la transcription inverse (avec un ARNt qui sert d'amorce). La transcription inverse débute après l'entrée du virus dans la cellule lorsque le pool de nucléotides disponibles est suffisant[634,635] (souvent dans les cellules activées). Cette étape est ensuite complétée près du port nucléaire dans la capside quasi intacte et aboutit à la transformation de l'ARNss en ADNds pro-viral. Cet ADN, associé à la TI, la MA, l'IN et Vpr, forme le complexe de pré-intégration, qui est capable de se transférer vers le noyau à travers le port nucléaire. Cette étape différencie les lentivirus des autres rétrovirus, par leur capacité à infecter des cellules qui ne sont pas en cours de division.

- **Intégration :**

L'ADN proviral s'intégre dans le génome cellulaire de façon plus ou moins aléatoire (dans des régions riches en GC, et principalement dans des gènes activées dans la cellule).

* La TI, contrairement à l'ADN polymérase cellulaire, est caractérisée par une faible fidélité et une faible processivité, et engendre donc de nombreuses mutations par mésappariements des nucléotides. Ces mutations sont responsables de l'échappement rapide du virus à sa reconnaissance par le système immunitaire. De nombreux virus perdent leur capacité à se multiplier mais parmi les virus fonctionnel générés, certains échappent à la réponse immunitaire établie contre le virus d'origine. Par ailleurs, l'évolution du tropisme viral est également une conséquence de ces mutations.

Cette réaction est catalysée par l'intégrase[636] qui (1) fixe les LTR du génome viral (séquences terminales longues répétées – cf. Figure 22– qui recombinent avec l'ADN génomique de la cellule hôte) et (2) clive l'ADN cellulaire.

- **Transcription et traduction :**

Ensuite, l'ARN polymérase cellulaire II transcrit l'ADN pro-viral intégré, transcription très régulée par des facteurs cellulaires (les histones inhibent la transcription dans les cellules quiescentes, mais elle est induite par les facteurs NFkB, NFAT-1 dans les cellules activées) et viraux (Tat, Rev). La production des nombreuses protéines virales sur ce petit génome est permise à la fois par l'épissage alternatif des ARNm viraux mais aussi par le décalage du cadre de la traduction ribosomique (cf. Figure 22).

L'expression des protéines virales se découpe en deux grandes phases. La première concerne la synthèse des protéines précoces Nef, Tat et Rev. Nef va complètement perturber le transport vésiculaire de la cellule infectée, et conduire, entre autres, à la diminution des molécules de CMH-I[637] et des complexes CMH-II/peptide[638] en surface ainsi qu'à l'internalisation du CD4[639]. Cette protéine jouerait donc un rôle important dans l'échappement du virus à la réponse T CD8 et T CD4, ainsi que dans sa pathogénie. Tat, qui stabilise le complexe de transcription, et Rev, qui facilite l'export nucléaire des ARNm viraux et de l'ARN génomique, vont permettre l'expression des protéines de la phase tardive. Cette phase est caractérisée par la synthèse des protéines de structure Gag, Pol et Env. Les protéines Vpr, Vif et Vpu appelées (avec Nef) protéines auxiliaires, sont également produites lors de cette phase. Elles augmentent la fitness du virus (cf. Tableau 1) en interagissant, entre autres fonctions, avec des facteurs antiviraux retrouvés dans certaines cellules (APOBEC3G, tétherine, etc).

- **Assemblage, bourgeonnement et maturation :**

Le gène *gag* code pour la p55 un précurseur protéique qui, une fois produit, rejoint le cytoplasme et interagit avec la membrane cytoplasmique (proche de laquelle il s'accumule) à travers son motif myristylé[640]. p55 possède trois domaines : de matrice (p17), de capside (p24) et de nucléocapside (p7 et p6) (cf. Figure 21 et Figure 22). Le domaine nucléocapside p7 de la p55 interagit avec l'ARN génomique viral pour permettre son encapsidation[640]. La p6 est impliqué dans le bourgeonnement pour la fermeture de l'enveloppe virale. La protéase (p12), la transcriptase inverse (p66/51) et l'intégrase (p32) (codées par le gène *gag-pol*), interagissent aussi avec p55 pour être incorporées dans la particule virale[640]. Le gène *env* code pour la gp160 transmembranaire, qui transite par le golgi et est clivée en gp120 et gp41, qui s'accumulent avec la p55 au niveau de radeaux lipidiques des sites de bourgeonnement (la membrane cytoplasmique, ou les MVB dans les macrophages). Lorsque les particules virales bourgeonnent, elles sont dans un état immature (provirion). La maturation des provirions s'effectue par le clivage des protéines précurseurs par la protéase virale (clivage de la p55 en p24, p17, P7/6)[640]. Cette étape est indispensable : son absence conduit au relargage de provirions non matures, incapables d'infecter d'autres cellules.

2. INTERACTIONS DC/VIH

Les DC jouent un rôle important dans la surveillance des sites d'entrée du virus dans les muqueuses et la modulation de la réponse innée anti-VIH. Par ailleurs, elles peuvent présenter les antigènes viraux capturés sur leurs molécules du CMH-I/II, induisant l'initiation des réponses adaptatives spécifiques (T CD8 et T CD4). Cependant, elles participent également à la propagation du virus, par leur capacité à être infectées tout en gardant un phénotype immature, et à transmettre le virus aux LT CD4. Les DC auraient donc deux fonctions opposées : en plus d'initier la réponse anti-virale, elles sont également impliquées dans la progression de la maladie.

2.1. Infection des DC et transmission du virus aux LT CD4

2.1.1. Evidences de l'infection des DC par le VIH

Les DC expriment le CD4 à leur surface et sont donc susceptibles d'être infectées par le VIH. Ainsi, le virus se réplique dans les DC *in vitro*[641], et des DC infectées sont retrouvées *in vivo* (à une fréquence relativement faible) dans les tissus des patients[642,643].

Globalement, de nombreux facteurs cellulaires limitent l'infection par le VIH dans les DC[644,645] (cf. partie I -D -2.2.1), et le taux de réplication reste modéré *in vitro* et *in vivo* par rapport à celui retrouvé dans les LT CD4 activés[646]. Les différents sous-types de DC peuvent être infectées : les hmDC[647], les hpDC[648] et les LC[649]. Les virus R5 infectent mieux ces cellules, probablement parce qu'elles expriment plus fortement le CCR5 que le CXCR4. *In vitro*, les hmDC semblent plus susceptibles à l'infection que les hpDC issues d'un même donneur[647]. En outre, la maturation des DC inhibe fortement leur infection[650], après leur activation par le LPS par exemple[651]. Les mécanismes de blocages de l'infection dans les DC matures sont mal compris et varieraient en fonction du stimulus de maturation utilisé ; la maturation peut conduire à l'inhibition de la fusion virale[652] ou également au blocage des étapes post-intégrations[650].

2.1.2. Capture du VIH par les DC

Comme les populations de DC sont présentes dans le sang à des fréquences relativement basses, la majorité des études *in vitro* décrivant les interactions DC/VIH sont effectuées avec des hMDDC (cf. partie I -B -3.2, page 41). La capture du virus par ces cellules s'effectue par macropinocytose, phagocytose et par interaction du VIH avec des récepteurs CLR qui interagissent avec l'enveloppe virale tels que DC-SIGN[234,653], DCIR (DC immunoreceptor)[654] ou encore le récepteur au mannose (MR).La maturation des hMDDC (par le LPS) conduit à une capture du virus plus efficace[655] (sans pour autant conduire à une infection productive[651]). L'expression de DC-SIGN étant partiellement inhibée dans les DC matures, d'autres mécanismes doivent être conjointement responsables de la capture du virus dans ces cellules[655].

Note : Il existe des différences entre les hMDDC et les DC primaires. Des évidences récentes montrent que la capture du virus peut s'effectuer dans les hmDC matures et immatures primaires de façon indépendante de l'interaction entre Env et les CLR[656]. La capture du virus s'effectuerait dans ces cellules via l'interaction avec les GSL (glycosphyngolipides) à la surface du virus[657] ou via des récepteurs comme Siglec-1 (qui interagit avec des acides sialiques de la membrane virale)[658,659]. Dans les cellules de Langerhans, le virus pourrait également être capturé par la langérine[660]. Cependant, les hMDDC seraient un bon modèle d'études des DC primaires en condition inflammatoire (cf. partie I -B -3.2), lors d'une infection chronique par exemple.

2.1.3. Transfert du VIH aux LT CD4 par *trans*-infection

Le VIH utilise les contacts cellules/cellules pour favoriser sa propagation. En effet, ce transfert permet une infection plus efficace et plus rapide que l'infection par un virus libre[661]. Ce processus favorise la rencontre des cellules permissives à l'infection et engendre un réarrangement et une concentration des protéines de surface au site de contact favorisant l'attachement et l'infection par le virus[662]. Par ailleurs, ce mécanisme pourrait permettre au virus d'échapper aux anticorps neutralisants[663].

Dans les hMDDC immatures, le virus capturé par DC-SIGN est rapidement dégradé dans des compartiments lysosomaux ou via le protéasome[351,664]. Cependant, une partie du virus échappe à la dégradation[665] et va pouvoir être transmis aux LT CD4 après contact cellule/cellule par *trans*-infection[234,653], c'est à dire avant de se répliquer dans la DC. Le récepteur DCIR participerait également au transfert en *trans* du virus des hMDDC immatures vers les LT CD4[654] (cf. Figure 23).

Les GSL et Siglec-1 sont impliqués dans la *trans*-infection du VIH des hmDC matures aux LT CD4[657,658]. Dans les DC matures, susceptibles de rencontrer les LT CD4 *in vivo* après migration dans les ganglions, les virus, après avoir fixé la membrane plasmique de la cellule, se déplacent le long de la membrane vers une région polarisée. Ils sont alors concentrés dans des invaginations membranaires profondes (riches en tétraspanines[655,666]) qui les protègent de la dégradation[667,668]. Une étude de visualisation 3D (tomographie) du transfert en *trans* montre que les LT CD4 forment des filopodes, qui rentrent en contact avec les virions séquestrés dans les invaginations des DC, favorisant leur transfert [669] : on parle de synapse virologique. Ainsi, la capture et le transfert du virus des DC matures aux LT CD4 est plus efficace encore que le transfert médié par les DC immatures[670].

De façon remarquable, la trans-infection a été observée de façon concomitante avec la présentation d'antigènes par les DC (chargées avec du virus capturé par DC-SIGN) aux LT CD4 spécifiques d'antigènes viraux[653]. L'infection en *trans* de ces lymphocytes est plus efficace que l'infection par un virus libre. Ce processus pourrait expliquer l'infection préférentielle des LT CD4 spécifiques du VIH observée *in vivo*[628].

La *trans*-infection est régulée par de nombreux mécanismes faisant intervenir les récepteurs de capture du VIH (décrit ci-dessus)[671], l'activation des TLR[671], ou encore l'autophagie (cf. partie I -E -5.2.1). Par ailleurs, des facteurs viraux sont également impliqués[671], notamment Nef, qui diminue l'expression du CD4 en surface et augmente l'expression de DC-SIGN, ou Env dont l'interaction avec DC-SIGN est modulée par des glycosylations qui impactent sur le devenir du virus capturé.

2.1.4. Infection des DC et transfert du VIH par cis-infection.

Après capture du virus par les DC, ceux qui échappent à la dégradation peuvent également se répliquer dans ces cellules (cf. partie I -D -1.4). Dans les DC infectées, on a alors relargage (dès 24h) de nouveaux virions après néosynthèse des protéines virales (infection productive). Les cellules infectées peuvent migrer vers le ganglion lymphatique drainant, et contribueraient à la transmission tardive du virus aux LT CD4 par *cis*-infection[672] (cf Figure 23). Lors de ce processus, l'interaction entre la cellule infectée et la cellule cible induit une polarisation du bourgeonnement des virus à l'interface de contact cellule/cellule pour former une synapse virologique [673,674]. Ce bourgeonnement polarisé est dépendant de l'interaction entre les protéines virales (notamment Env) et le cytosquelette[675,676].

Le mécanisme de *cis*-infection semble être médié indépendamment de l'interaction du virus avec DC-SIGN lors de son entrée dans la DC[677]. DC-SIGN inhibe la fusion virale par compétition avec CD4 pour la fixation de Env[678] D'autres récepteurs, comme DCIR, semblent jouer un rôle[654].

Notons que le transfert en cis est impliqué dans l'infection des DC matures après capture du virus produit par les LT CD4 infectés et ce plus efficacement que le virus libre[668].

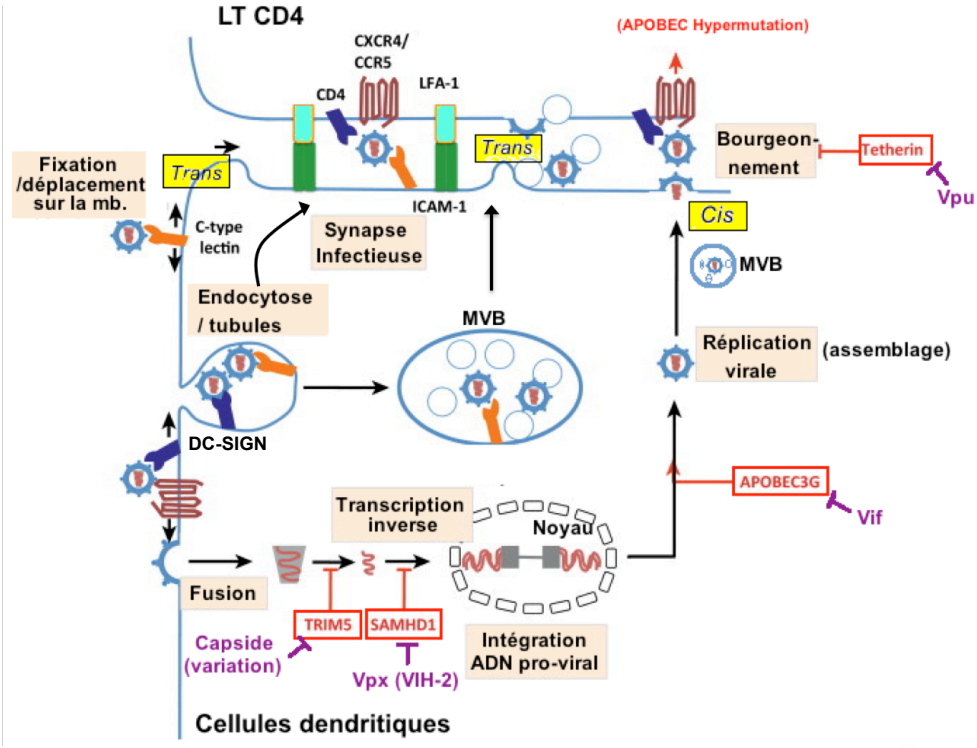


Figure 23 – Intéractions DC/VIH : (capture – transmission trans)
(infection – transmission cis)

En conclusion, pour se multiplier et se propager plus rapidement, le VIH exploite les capacités qu'ont les DC de le capturer sans parvenir à le dégrader entièrement, puis de migrer dans les ganglions où elles interagissent avec les LT CD4. Les DC s'infectent faiblement et le transfert en *trans* semble prédominant[654], mais l'efficacité relative entre ce processus et le transfert en *cis* est surtout dépendante de la cinétique d'infection des DC[672].

2.2. Rôle des DC dans l'immunité innée anti-VIH

Les DC qui capturent le VIH au site d'infection sont impliquées dans l'élaboration de la réponse immune innée anti-virale. Plusieurs mécanismes sont à l'œuvre (cf. Tableau 2) :

- Tout d'abord, les DC (et les macrophages) expriment de nombreux facteurs de restriction qui bloquent différentes étapes de la réplication virale dans ces cellules (pré- ou post-intégration, cf. Figure 23).
- Par ailleurs, les DC peuvent reconnaître des PAMP du VIH via certains senseurs PRR couramment impliqués dans l'élaboration de la réponse immune innée. La reconnaissance par ces PRR/senseurs peut se dérouler (1) avant l'entrée du virus dans la DC à la membrane ou dans des compartiments d'endocytose (2), après fusion de l'enveloppe virale et relargage du virion dans le cytoplasme de la cellule et (3) après intégration du génome viral et production de nouveaux virions.

De façon intéressante, le VIH a développé des mécanismes d'échappement aux facteurs de restriction, et est capable d'utiliser les PRR impliqués dans sa détection pour favoriser sa réplication.

Tableau 2 – Senseurs/PRR et facteurs de restrictions dans les DC : rôle dans l'immunité innée anti-VIH

Senseurs/PRR	Ligands	Voie de signalisation	Localisation	Type cellulaire	Échappement du virus
TLR7	ARNss	IRF7, NF-κB (activée, conduit à la production d'IFN de type 1)	Endosome (mb.)	pDC	« Orage cytokinique » en primo-infection et activation chronique
TLR8	ARNss	IRF7, NF-κB (non activée)	Endosome (mb.)	pDC/mDC	L'induction des CLR et du TLR8 induit la réplication virale sans induire la maturation des DC
CLR (DC-SIGN)	Enveloppe virale	Rho-GTPase LARG / Raf-1	Mb. plasmique	mDC	
cGAS / IFI16 / autres senseurs ?	ADN (produit de la TI)	cGAMP/STING/IRF3	Cytoplasme	mDC, Macrophage	SAMHD1 et/ou TREX1 et/ou CypA empêchent la détection / Variants de la capside
CypA	Capside	IRF3	Cytoplasme	mDC	SAMHD1 empêche la detection
Facteurs de restriction (fonction)	Cible / Substrat	Impact sur le virus	Localisation	Type cellulaire	Échappement du virus
SAMHD1 (nucléoside-triphosphohydrolase)	dNTPs	Diminution du pool de nucléotides (empêche la transcription inverse)	Cytoplasme	mDC/pDC, macrophages	Vpx(dans VIH-2 ou VIS) (lie SAMHD1, déclenche sa dégradation)
Famille APOBEC (3G/3F/3D/3H) (cytidine desaminase)	ADN (brin anti-sens)	Hypermutation dans le génome viral	Cytoplasme et dans le virion	Macrophages et T CD4 ; induit par l'IFN de type 1 dans les mDC/pDC	Vif (lie APOBEC et déclenche sa dégradation)
Tétherine	Bourgeonnement	Bloque la sortie du virion	Mb.	Induit dans de nombreuses cellules par les IFN de type I (dont les DC)	Vpu et Env (lie la thétherine pour sa dégradation lysosomale) ,
TRIM5α (singe)	Capside	Déstabilise la capside après l'entrée du virus	Cytoplasme	LT CD4, macrophages	Variants de la capside (action limité chez l'Homme)

Inspiré de « Innate Immune Recognition of HIV-1 », Immunity 2012 ; mb. = membranes

2.2.1. Facteurs de restriction de la réplication du VIH dans les DC

Trois facteurs de restriction (SAMHD1, APOBEC et BST-2) inhibent la réplication virale dans les DC humaines. Leurs rôles dans l'immunité innée sont abordés dans cette partie.

- **SAMHD1**

Les cellules myéloïdes comme les DC et les macrophages sont bien plus résistantes à l'infection que les LT CD4. Introduire dans ces cellules Vpx, une protéine accessoire présente dans le VIH-2 et le VIS, mais naturellement absente dans le VIH-1, augmente drastiquement la susceptibilité des DC/macrophages à être infectés et à répliquer le virus[679,680]. Récemment, deux études ont identifié SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) comme étant la protéine cellulaire interagissant avec Vpx[645,681]. Bloquer l'expression de SAMHD1 dans les DC/macrophages par des siRNA augmente leur permissivité à l'infection VIH, au même niveau que l'action de Vpx[645]. SAMHD1 possède une activité phosphohydrolase permettant la catalyse d'un dinucléotide triphosphate (dNTP) en un dinucléoside et un triphosphate[682]. L'hypothèse actuelle serait que SAMHD1, en diminuant le pool de dNTP disponibles dans les DC/macrophages, bloquerait ou ralentirait l'étape de transcription inverse et la synthèse d'ADN pro-viral après l'entrée du virus[635]. Lors de l'infection VIH-2/VIS, Vpx induit l'ubiquitination de SAMHD1 et conduit ainsi à sa dégradation par le protéasome[645,683].

- **Famille APOBEC**

Les protéines de la famille APOBEC (notamment 3G, 3F, 3D et 3H) sont des cytidines desaminases cytoplasmiques reconnaissant l'ADN[684]. Elles sont capables d'introduire des mutations dans le l'ADN pro-viral du VIH avant son intégration, pendant la phase de transcription inverse[685,686]. La protéine APOBEC3G catalyse préférentiellement la désamination des motifs 5'CC qui conduit à l'apparition d'hypermutations de type 5'-GG en 5'-AG[687]. Les protéines APOBEC 3F, 3D et 3H induisent préférentiellement des mutations 5'-GA vers 5'-AA[687]. Ces mutations conduisent *in fine* à l'intégration d'un ADN pro-viral incapable de conduire à la réplication de virus fonctionnels. L'expression des protéines APOBEC est induite par l'IFN de type 1 dans les DC [688], les macrophages et les LT CD4 quiescent[689]. Elles restreignent l'infection dans ces cellules. Par ailleurs, ces protéines sont capables de s'intégrer dans les particules virales bourgeonnantes[687] et pourraient ainsi inhiber l'infection des cellules environnantes. Cependant, la protéine virale Vif interagit avec les 4 protéines APOBEC pour induire leur dégradation par le protéasome[687], inhiber leur traduction/synthèse, et empêcher son intégration dans les virions[690]. Ce mécanisme d'échappement est efficace, et permet au virus d'infecter des cellules qui sont réfractaires à l'infection par un virus muté où Vif est absent.

- **BST-2/Tétherine**

La tétherine (ou BST-2), est une protéine exprimée à la membrane des cellules dont l'expression est induite par l'IFN de type 1[691]. Elle bloque le bourgeonnement des particules

virales, qui s'accumulent à la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires[692]. BST-2 contient un court domaine N-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire simple et un domaine extracellulaire qui longe le côté externe de la membrane cellulaire, ancrée à celle-ci via son extrémité C-terminal glycolipidée. Sa structure même est responsable de sa fonction : grâce à son domaine transmembranaire et son extrémité opposée glycolipidée, elle peut s'associer à la fois à la membrane plasmique et la membrane virale en cours de bourgeonnement, reliant physiquement les virions naissant à la membrane plasmique[693]. Les virons capturés sont ensuite internalisés et dégradés dans les lysosomes[693]. Cependant, les protéines virales Vpu (et Env) induisent sa séquestration dans des compartiments périnucléaires. De plus, Vpu induit sa dégradation dans les compartiments lysosomaux via le système ESCRT[694].

Note : Un quatrième facteur (TRIM5α), est impliqué dans l'inhibition de la réplication du VIH (10 à 100 fois), mais seulement chez le singe (illustrant la notion de barrière d'espèce). Le TRIM5α simien interfère avec la décapsidation en interagissant avec la capside du VIH et en induisant sa dégradation par le protéasome (d'autres protéines comme CypA seraient également impliquées). Le TRIM5α humain n'induit qu'une restriction faible de l'infection par le VIH-1 (avec des souches de laboratoire) car il n'interagit pas avec la capside du virus[695]. Cependant, cette interaction peut être restituée par le changement d'un seul acide aminé dans la séquence du TRIM5α humain[695]. Par ailleurs, la protéine humaine pourrait inhiber la réplication d'autres souches ou isolats viraux[696].

2.2.2. Reconnaissance du VIH par les PRR des DC

La reconnaissance du virion avant son entrée dans la DC s'effectue par des PRR/senseurs membranaires et endosomaux. La détection du virus après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (et pré- ou post-intégration du génome viral) est médiée par des PRR cytosoliques.

Si les PRR sont classiquement impliqués dans l'induction des réponses immunes innées anti-virales, le VIH semble les utiliser à son avantage pour favoriser sa réplication et inhiber la maturation des DC. De plus, des facteurs cellulaires ou certains facteurs de restriction de la réplication virale peuvent également inhiber l'activation des senseurs du VIH.

2.2.2.1. PRR membranaires/endosomaux

- **Rôle des TLR7 et TLR8 :**

Des ARNss dérivés du génome du VIH sont reconnus par les TLR7 et 8 présents dans les endosomes des hMDDC[213]. La reconnaissance par le TLR8 de son ligand conduit généralement à la production d'IFN de type I, l'activation des hMDDC et l'augmentation des molécules de costimulation[213,697]. Cependant, suite à l'infection par le VIH, les hMDDC ne produisent pas d'IFN de type 1 et ne maturent que partiellement[698,699]. Le virus est capable d'inhiber la production d'IFN de type 1 dans ces cellules [700] mais le mécanisme de blocage de la maturation induite via TLR8 est encore inconnu. Paradoxalement, l'induction de la voie

TLR8 (dépendante de MyD88) par le VIH dans les hMDDC conduit à l'induction de la transcription virale des gènes codant pour Tat, Rev et Vpu une fois le virus intégré dans le génome de la DC[701]. Le VIH utiliserait donc le TLR8 dans ces cellules pour favoriser sa réplication.

Les hpDC n'expriment pas le TLR8 mais expriment fortement le TLR7 (cf. partie I -B -3.2). Après une exposition au virus, elles produisent de fortes quantités d'IFN de type 1[702]. Cette production est dépendante de l'endocytose du virus après l'interaction de l'enveloppe virale avec le CD4, et requerrait la reconnaissance de l'ARN viral par le TLR7 dans des endosomes, conduisant à l'activation de la voie IRF7[702,703]. Etonnamment, alors que les hMDDC expriment également le TLR7, le VIH n'induit pas la production d'IFN de type 1 dans ces cellules[698,701], probablement car IRF7 n'y est pas exprimé constitutivement (contrairement aux hpDC)[704].

Notons que l'IFN de type 1 produit par les hpDC exerce un rôle antiviral contre divers virus dont le VIH. Cependant, la chronicité de l'infection par le VIH conduit à une production continue d'IFN de type 1 qui participerait à l'activation aberrante de la réponse immune et l'évolution de la maladie[705,706] .

- **Rôle des CLR (DC-SIGN):**

Les CLR impliqués dans la capture du VIH par les DC sont également impliqués dans la modulation de la réponse innée. Cependant, en plus de favoriser la réplication et le transfert du virus aux LT CD4 (cf. partie I -D -2.1.3) l'activation des voies CLR semble conduire à l'inhibition la maturation des DC en contact avec le virus.

Ainsi la fixation de DC-SIGN par un anticorps spécifique déclenche une voie de transduction qui favoriserait la réplication virale dans une co-culture T/DC et inhiberait la maturation des DC[707]. Par ailleurs, l'activation de DC-SIGN par la fixation de l'enveloppe virale potentialise l'action du TLR8 sur l'induction de la transcription virale[701] (cf. ci-dessus), via l'induction de la voie NF-κB.

Ces données suggèrent que par l'interaction avec un CLR tel que DC-SIGN, le VIH déclenche des voies de transduction favorisant sa réplication dans les DC et renforce la préservation d'un phénotype immature de ces cellules, même après infection.

2.2.2.2. PRR/senseurs cytosoliques

Dans les DC infectées, des senseurs intracytoplasmiques sont capables de reconnaître des éléments de la capside virale présents dans le cytoplasme. D'autres détectent l'ADN viral issu de la transcription inverse. Cependant, ces détections sont masquées par l'action de SAMHD1[698] et TREX1[708] exprimés dans les DC (cf. Figure 24).

- **La cyclophiline A est un senseur de la capside virale dont l'action est masquée par SAMHD1**

Un senseur capable d'induire une forte production d'IFN de type 1 suite à l'infection VIH a été découvert dans les hMDDC, en bloquant la restriction à l'infection médiée par

SAMHD1. Ainsi, dans des DC transduites avec Vpx, l'infection par le VIH conduit à une forte production d'IFN de type 1, qui n'est pas observable dans les DC infectées en absence de Vpx[698]. Cette production est dépendante de la cyclophiline A (CypA)[698], une peptidylprolyle isomerase exprimée dans le cytoplasme des DC. CypA détecte la capside néosynthétisée lors de la réplication du virus dans la DC. Via son interaction avec la capside, CyPA déclenche l'activation de la voie IRF3, la production d'IFN de type 1 et l'expression des molécules de costimulation[698]. La production d'IFN inhibe alors le transfert en *trans* du virus vers les LT CD4. Ces résultats montrent que les hMDDC sont capables d'induire une réponse innée efficace contre le VIH mais la détection du virus serait dépendante de sa capacité à infecter efficacement les DC.

- **IFI16 est un senseur de l'ADN viral, dont l'action est masquée par TREX1**

Lors de l'étape de retro-transcription, de nombreux ADN viraux défectifs sont produits. TREX1 est une exonucléase (du complexe SET de réparation de l'ADN) qui a une affinité marquée pour les ADNss. Elle serait impliquée dans la reconnaissance des ADN viraux défectifs, et empêcherait leur accumulation en les dégradant[709]. Par ce processus, TREX1 favoriserait l'intégration des ADNds viraux fonctionnels et faciliterait ainsi l'infection[709]. Par ailleurs, en dégradant les ADN viraux, TREX1 empêcherait leur détection par des senseurs cytosoliques dans les LT CD4 et les macrophages[710]. Récemment, IFI16 (IFN- inducible protein 16) a été identifiée dans les macrophages comme l'un des senseurs de l'ADN du VIH, dont l'action est inhibée par TREX1[711]. Suite à la détection de l'ADN viral dans ces cellules, IFI16 déclenche l'activation de la voie STING/IRF3 (et IRF7), la production d'IFN de type 1 par les macrophage et semble inhiber la réplication du virus[711]. Son action n'a toutefois pas encore été confirmée dans les DC.

- **cGAS est un senseur de l'ADN viral, dont l'action est masquée par SAMHD1, TREX1 et CypA**

Dans les DC et les macrophages, cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) serait un autre senseur impliqué dans la reconnaissance de l'ADN pro-viral du VIH-1 et du VIH-2[711–713]. La reconnaissance de l'ADN proviral (avant intégration) par cGAS dans ces cellules induit l'accumulation de cyclic CMP-AMP qui conduit à l'activation de la voie STING/IRF3[713] et la production d'IFN de type 1[712,713]. Le blocage de SAMHD1[712] par Vpx et de TREX1 par des siRNA[713] induit une meilleure reconnaissance des ADN viraux par cGAS, probablement parce que ces deux protéines inhibent (respectivement) la synthèse des ADN pro-viraux et leur accumulation. De façon intéressante, l'interaction entre CypA et la capside du VIH-1 pourrait masquer la détection de l'ADN pro-viral par cGAS[712].

Note : RIG-1 (cf. partie I -B -1.1 – RLR) a également été décrit dans la reconnaissance de l'ARNss dérivé du génome du VIH (dans les macrophages et les cellules mononucléées du sang périphérique)[714]. Cette détection conduit à la production de cytokines et plus faiblement d'IFN de type 1. Cependant, dans les DC, le rôle de RIG-1 dans la détection de l'ARNss du virus après infection n'est pas documenté.

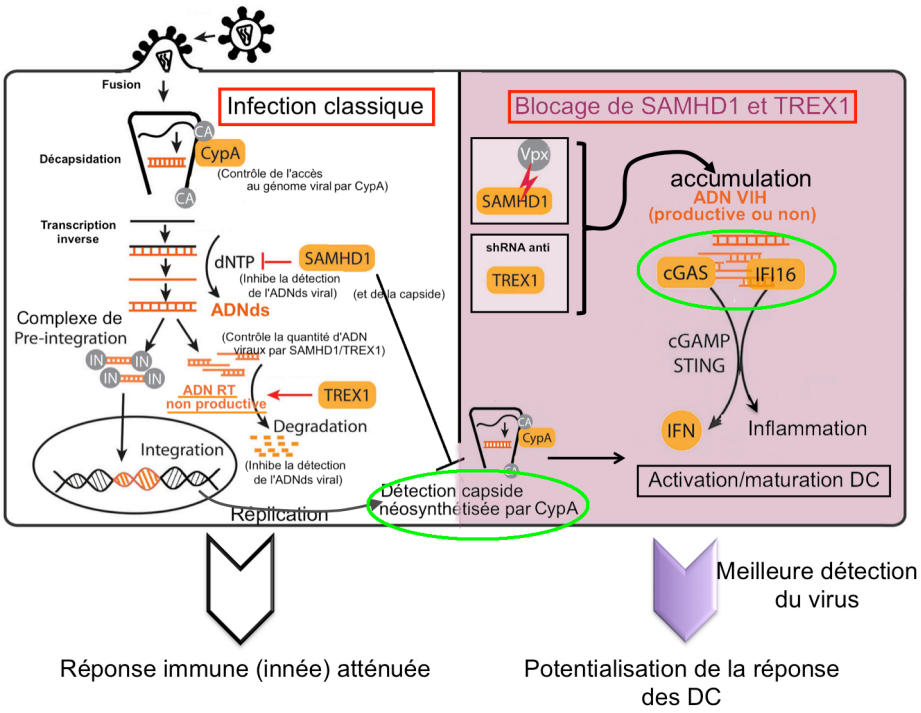


Figure 24 – Les senseurs cytosoliques du VIH dans les DC
(entourés en rouge) Adapté de Hasan M. et Coll., Front Microbiol. , 2014

En conclusion, plusieurs senseurs/PRR viraux sont exprimés par les DC, mais le VIH les utilise pour augmenter sa réplication tout en inhibant l'induction de la réponse innée. De plus, les DC expriment plusieurs facteurs de restriction qui inhibent la réplication du VIH dans ces cellules. Cependant, les rétrovirus évoluent avec leurs hôtes et ont développé des mécanismes d'échappement pour contourner ces restrictions. Le VIH-1, via des variations dans sa capside et l'expression des protéines accessoires Vif et Vpu, contrecarre l'action des protéines TRIM5, APOBEC et BST-2 (respectivement). SAMHD1 est une exception, et seul le VIH-2 et le VIS expriment la protéine Vpx pour induire sa dégradation. Cependant, la forte pathogénicité du VIH-1 (comparée à celle du VIH-2 dont l'évolution vers la phase SIDA est plus lente), pourrait justement s'expliquer par sa capacité à ne pas infecter efficacement les DC (via l'absence de Vpx), afin d'éviter sa reconnaissance par des senseurs cytosoliques (CypA et cGAS) de l'immunité innée [698,715,716]. En outre, de par l'induction de la maturation des DC et la production d'IFN de type 1, ces deux senseurs permettraient la (co)stimulation des LT (activés avec un anticorps anti-CD3) après co-culture avec les DC infectées en présence de Vpx[698,715]. En échappant à la réponse immune innée, le virus pourrait alors limiter la réponse adaptative.

2.3. Rôle des DC dans la présentation des antigènes du VIH pour l'activation de la réponse adaptative anti-virale

2.3.1. Rôle de la réponse immune adaptative dans le contrôle de l'infection

Bien que mis à mal, le système immunitaire via l'induction de la réponse adaptative joue un rôle prédominant dans le contrôle de la charge virale, principalement au travers de la réponse CD8 cytotoxique (CTL). En effet, des LT CD8 polyfonctionnels, de haute affinité et spécifiques d'épitopes du virus sont capables d'une meilleure activité suppressive (*in vitro*)[253].

Par ailleurs, certains HLA de classe I (B27 et B57) permettant une réponse CD8 particulière, sont fortement corrélés avec la non progression à long terme vers la phase SIDA[254,717], probablement parce que les épitopes présentés sont concentrés sur des régions conservées de la protéine Gag[718]. Ainsi, un argument fort du rôle des CTL dans le contrôle de la réplication est que le virus doit, pour y échapper, muter à des positions déterminantes dans les sites d'ancrages des épitopes aux molécules du CMH[285,719,720].

Par ailleurs, l'activation de la réponse LT-CD4 spécifique du VIH semble également importante, principalement pour le contrôle du virus lors de la primo-infection, qui impacte ensuite sur l'évolution de la maladie. Ainsi, le contrôle de la charge virale (lors de l'infection chronique) est corrélé chez les patients infectés par leur capacité à générer une réponse T CD4 spécifique du virus en primo-infection qui soit efficace[721]. De plus la capacité des LT CD4 spécifiques du virus à produire de l'IL21 semble corréler avec le contrôle de l'infection par les CTL[722]. De façon intéressante, certains allèles du CMH-II (HLA DQ-A1 et HLA DQ-B1) sont corrélés avec l'absence de production d'anticorps neutralisants dans une étude de cohorte d'individus vaccinés (RV144)[723].

Les données précédentes suggèrent un rôle important de la présentation des antigènes par les APC/DC pour l'induction d'une réponse immune adaptative cellulaire T CD8 et T CD4 spécifique du virus qui soit efficace et l'activation d'une réponse humorale protectrice (médiée par l'interaction DC/LT CD4($T_{FH\ (folliculaire\ -\ helper)}$)/LB).

2.3.2. Présentation d'antigènes viraux exogènes par les CMH-I et CMH-II

2.3.2.1. Présentation croisée par les molécules du CMH-I

L'injection à des patients de DC autologues chargées avec du virus inactivé (incapable de s'intégrer mais capable de fusionner), conduit à l'activation *in vivo* de la réponse T CD8 spécifique du virus, corrélée à la diminution de la charge virale[724]. Ces données suggèrent que les DC chargées avec du virus sont capables d'effectuer la présentation croisée d'antigènes viraux pour conduire à l'activation des LT CD8 (cf. Figure 25).

En effet, après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des DC, les protéines du VIH libérées dans le cytoplasme vont être dégradées par la voie du protéasome et chargées sur les molécules de CMH-I via la machinerie de présentation dépendante de TAP[351,725,726]. Ainsi, des DC chargées avec le VIH, en absence de réplication virale (blocage de l'intégration par AT-2 ou l'AZT), sont capables d'activer *in vitro* des LT CD8 spécifiques d'un épitope de la protéine Gag[279,351,725]. Cette voie de présentation croisée d'antigènes exogènes du VIH sur les molécules du CMH-I est entièrement dépendante de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la DC[279,351,725].

De plus, la capture du virus libre par des récepteurs tels que DC-SIGN le conduit à s'accumuler à la membrane de la cellule, augmentant la probabilité d'une éventuelle fusion virale[727]. Ainsi, cette capture potentialise la présentation croisée sur les molécules du CMH-I décrite ci-dessus [351]. L'opsonisation du VIH par le complément semble également influencer

l'entrée du virus dans les DC[728]. Simultanément, l'activité du protéasome est augmentée dans les DC chargées avec le virus opsonisé. Ces DC sont capables d'activer la réponse T CD8 spécifique d'un épitope de Gag plus efficacement que les DC chargées avec le virus libre, suggérant un rôle de l'opsonisation dans l'induction de la présentation croisée d'antigènes du VIH par les DC[728].

Par ailleurs, la capture par les DC des LT CD4 infectés VIH et apoptotiques conduit également à une présentation CMH-I croisée des antigènes viraux [344,729]. Les DC ayant capturé ces cellules apoptotiques infectées activent des LT-CD8 spécifiques (d'épitope des protéines Gag, Nef et de la transcriptase inverse) bien plus efficacement que les DC ayant capturé du virus libre[344]. De façon remarquable, les DC seraient également capables de capturer du virus provenant de cellules T CD4 infectées vivantes. Cette capture conduit elle aussi à une présentation croisée efficace, mesurée par l'activation des LT CD8 spécifiques du virus[344].

2.3.2.2. Présentation par les molécules du CMH-II

L'injection à des patients de DC autologues chargées avec le VIH inactivé (cf. partie précédente) induit également *in vivo* une réponse T CD4+ spécifique du virus, suggérant qu'elles sont capables de présenter sur leurs molécules de CMH-II des antigènes viraux capturés [724] (cf. Figure 25).

In vitro, en parallèle du transfert de virus en *trans* des DC vers les LT CD4 spécifiques[653] (cf. partie I -D -2.1.3), la capture du VIH par les DC via DC-SIGN induit l'acheminement du virus dans des compartiments acides d'endocytose[725,727] où il va être majoritairement dégradé. Les peptides antigéniques issus de la dégradation sont alors présentés sur les molécules de CMH-II pour conduire à l'activation des LT CD4 spécifiques du virus[653] (voie exogène classique). Cette activation est en grande partie dépendante de la capture et de l'endocytose du virus médiée par DC-SIGN dans les DC, et est indépendante de la fusion du virus[653].

Par ailleurs, comme il sera décrit en détail dans la partie E -5.2.3.1, l'autophagie participe elle aussi à la présentation (sur les CMH-II) d'antigènes viraux exogènes provenant de l'inoculum viral, sans qu'il y ait nécessité de fusion virale[512].

2.3.3. Présentation d'antigènes viraux endogènes par les CMH-I et CMH-II

Le VIH se réplique mal dans les DC *in vitro*, mais des DC infectées sont tout de même retrouvées (en faible quantité) dans les tissus de patients infectés *in vivo* (cf. partie I -D -2.1.1). De façon remarquable, dans un modèle macaque, le VIS entre dans la muqueuse vaginale, et infecte les DC résidentes qui sont retrouvées dans les ganglions drainant 18h après inoculation[730].

Les DC productivement infectées pourraient donc potentiellement présenter des antigènes viraux endogènes néosynthétisés pour conduire à l'activation des lymphocytes T

spécifiques du virus. Cependant, très peu d'études *in vitro* ont cherché à caractériser les capacités des APC/DC infectées à présenter des antigènes viraux.

2.3.3.1. Présentation par les molécules du CMH-I

Une fois l'ADN pro-viral du VIH intégré et la néosynthèse des protéines virales débutée, celles-ci peuvent à leur tour être dégradées par le protéasome et conduire à une présentation d'antigènes endogènes sur les molécules de CMH-I (voie classique, cf. partie I -B -2.2.1). Plusieurs études ont montré le rôle de cette voie de présentation pour l'activation des LT CD8 spécifiques d'antigènes du VIH, mais dans des modèles de cellules transfectées, ou infectées par des vecteurs vaccinaux/viraux recombinant apportant des antigènes du VIH, sans infection des DC par le VIH lui même[729,731]. Une étude dans les macrophages[732] montre qu'après infection, ces cellules sont capables de présenter des antigènes dérivés des protéines Gag, Pol et Rev sur leurs molécules de CMH-I pour conduire à une activation efficace de LT CD8 spécifiques (qui exercent alors leur fonction cytotoxique et restreignent la réplication). Les APC infectées *in vitro* peuvent donc induire efficacement une réponse CTL contre le virus[732].

Dans les DC infectées, des travaux menés par notre laboratoire (par Cardinaud S, Atangana Maze E, Urrutia A – manuscrit en préparation) montrent que ces cellules sont capables d'activer in vitro la réponse CTL spécifique contre des épitopes alternatifs et classiques de la protéine virale Gag.

Cependant, la réplication du virus dans les DC pourrait conduire à un défaut de maturation qui orienterait la réponse lymphocytaire T vers une réponse régulatrice[699].

2.3.3.2. Présentation par les molécules du CMH-II

Il existe des mécanismes d'apprêtement responsables de la présentation d'antigènes endogènes sur le CMH-II par les DC, comme l'autophagie et la CMA (cf. partie I -C -2.1.2 et I -C -2.4) ou certaines voies de présentation dépendantes de la machinerie TAP/protéasome (cf. partie I -B -2.3.2.2).

Des B-LCL (utilisées comme APC modèles) infectées par un vecteur vaccine exprimant Env sont capables de présenter des peptides antigéniques endogènes issus de cette protéine sur leurs molécules de CMH-II, conduisant à l'activation des LT CD4 spécifiques[404]. L'expression d'Env néosynthétisée à la membrane des B-LCL semble nécessaire pour son apprêtement sur les molécules de CMH-II *in fine*, mais le mécanisme exact n'est pas compris[404]. La voie endosomale/lysosomale pourrait être impliquée : forcer l'acheminement d'Env dans les lysosomes augmente fortement la capacité des B-LCL à activer la réponse T CD4 dirigée contre la protéine[733].

Dans un contexte d'infection par le VIH, aucune étude n'a encore montré si les DC (ou d'autres APC) infectées sont capables de présenter des antigènes viraux endogènes sur les molécules du CMH-II pour conduire à l'activation des LT CD4. Étudier le rôle de

l'autophagie dans les DC infectées pour la présentation d'antigènes viraux néosynthétisés par les molécules du CMH-II est l'un des objectifs de ma thèse (cf. Figure 25 et Figure 26).

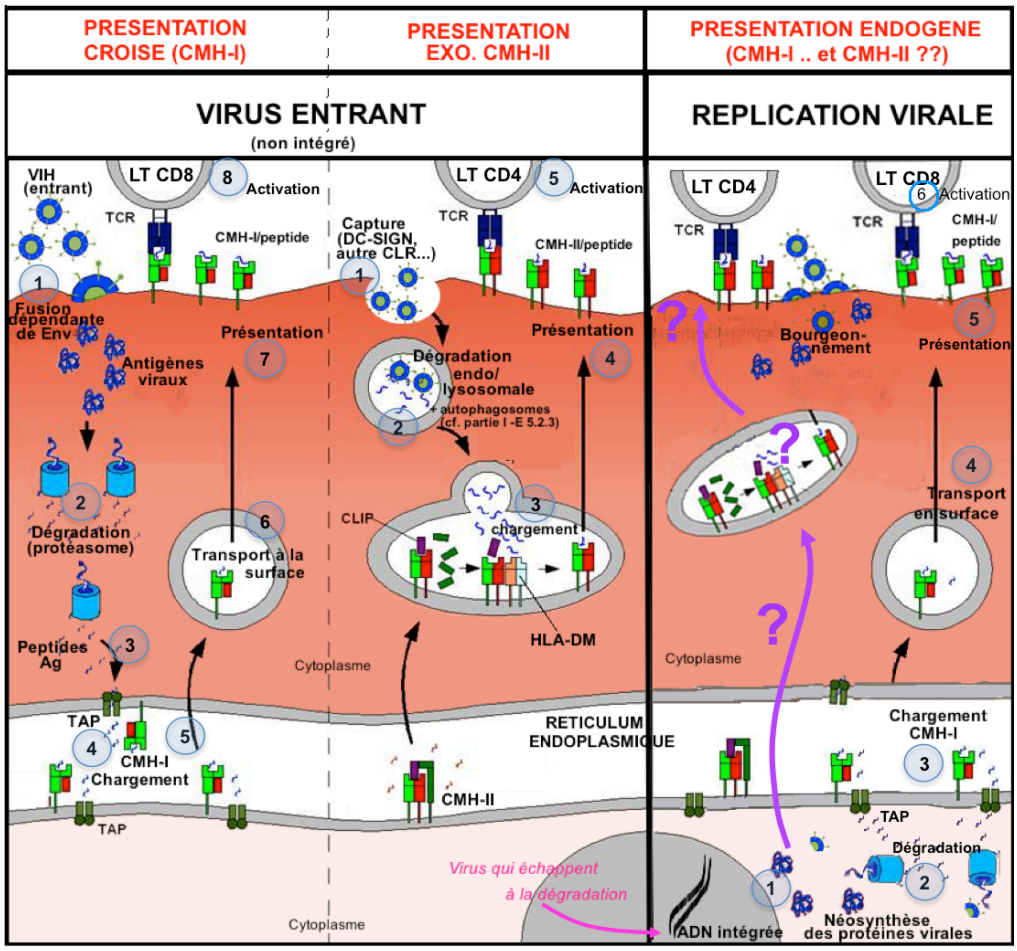


Figure 25 – Voies de présentation des antigènes du VIH

2.4. Dérégulation des fonctions des DC pendant l'infection VIH

- **Rôle de Nef dans l'inhibition de la présentation des antigènes**

Le VIH a développé des mécanismes d'échappement pour empêcher l'induction d'une réponse immunitaire adaptative efficace. La protéine Nef est capable d'inhiber l'expression en surface des molécules de CMH-I en induisant leur internalisation dans des compartiments d'endocytose [637,734]. Ainsi, l'expression de la protéine Nef affecte la capacité des DC à présenter des antigènes sur leurs molécules du CMH-I pour activer les LT CD8[734]. Par ailleurs, il a également été montré que Nef pouvait inhiber la concentration de molécules du CMH-II matures en surface dans des lignées modèles[638]. Ces résultats montrent que le VIH, via l'expression de la protéine Nef, a développé des mécanismes pour échapper aux voies de présentation des antigènes et pourrait inhiber ainsi la réponse adaptative spécifique. Cependant, dans les macrophages infectés (cf. partie I -D -2.3.3.1), Nef ne semble pas empêcher l'activation des LT CD8 spécifiques du virus[732].

- **Dérégulation du phénotype des DC in vivo chez les patients infectées**

Chez les patients infectés, le VIH dérégule directement et indirectement les fonctions des DC pour empêcher l'élaboration d'une réponse adaptative effectrice[735].

Ainsi, le nombre de hmDC et de hpDC est diminué dans le sang des patients infectés VIH et cette diminution est observable dès les premiers stages de la primo-infection[736]. De plus, la fréquence des hmDC et des hpDC chez les patients en phase de primo-infection est inversement corrélée avec la charge virale. Lors de la phase chronique de l'infection, la fréquence des hmDC n'est plus corrélée à la charge virale et ré-augmente légèrement, mais reste plus basse chez les patients infectés en comparaison des donneurs sains.[736]. Malgré la diminution de leur nombre pendant la primo-infection, les hmDC/hpDC des patients infectés sont capables d'induire une réponse allogénique de façon efficace. Cependant, il y a une corrélation négative importante entre la charge virale et la capacité des hpDC à activer la réponse alloreactive, suggérant qu'un taux élevé de virus pourrait inhiber la capacité de ces cellules à stimuler les LT[736]. En outre, celles ci pourraient induire un phénotype T régulateur[737]. Par ailleurs, les hmDC/hpDC des patients primo-infectés stimulés avec des ligands TLR sont hyperactivées et secrètent des quantités plus importantes des cytokines (en comparaison avec des DC de donneurs sains). En phase de primo-infection et en phase chronique, la capacité des pDC à produire des IFN de type 1 est dérégulée. L'ensemble de ces résultats suggère que, dès la phase de primo-infection, via la diminution du nombre de DC et l'induction d'un phénotype hyperactivé dans les DC restantes, le VIH perturbe le système immunitaire.

En conclusion, en absence de réplication virale, des DC chargées avec du VIH (ou capturant du virus issu de cellules apoptotiques/vivantes infectées) sont capables d'induire *in vitro* et *in vivo* l'activation des LT CD8 (via la présentation croisée dépendante de la fusion virale) et des LT CD4 (via la présentation sur les CMH-II des antigènes capturés par endocytose, indépendamment de la fusion virale). DC-SIGN, en permettant une capture efficace du virus, potentialise ces deux voies de présentation d'antigènes exogènes. Dans les APC/DC où le virus se réplique, peu d'études ont caractérisé leur capacité à présenter aux LT CD8 et CD4 les antigènes viraux endogènes sur leurs molécules de CMH-I et CMH-II. En effet, les DC s'infectent mal *in vitro*, et la fréquence de DC infectées in vivo reste assez faible. Cependant ces DC pourraient malgré tout migrer dans le ganglion drainant et participer à l'activation de la réponse adaptative spécifique. *In vitro*, des APC infectées VIH (ou exprimant des antigènes du VIH apportés par différents vecteurs) activent efficacement les LT CD8 / LT CD4 spécifiques. Cependant, le virus a développé des stratégies d'échappement en dérégulant l'expression en surface des molécules de CMH dans les cellules infectées. Par ailleurs, le nombre de DC (mDC et pDC) diminue rapidement dès la primo-infection chez les patients et leur phénotype est altéré. Le virus serait donc capable de perturber (directement ou indirectement) les fonctions des DC pour empêcher une réponse adaptative efficace.

E - AUTOPHAGIE ET VIH

1. INTRODUCTION

Plusieurs travaux ont décrit l'importance de la machinerie autophagique sur la modulation de la réplication du VIH et sur l'induction des réponses immunes innées et adaptatives antivirales. En conséquence, le virus semble avoir développé diverses stratégies d'échappement. Il module (active ou inhibe) certaines étapes de l'autophagie dans les cellules cibles de l'infection pour augmenter sa réplication.

Si les relations et les interactions entre le VIH et la machinerie autophagique sont complexes, c'est en partie parce qu'elles dépendent du type cellulaire étudié. Ainsi, des résultats en apparence contradictoires d'un type cellulaire à l'autre pourraient refléter des différences intrinsèques dans la biologie de ces cellules, aussi bien dans leurs modes d'interaction avec le virus que dans leurs voies de régulation de l'autophagie. Dans le futur, des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre ces différences.

2. ETUDES GENETIQUES

Deux approches génétiques globales dans des lignées cellulaires modèles ont permis l'identification de composants de la machinerie autophagique importants pour la réplication du virus.

La première[738] est un criblage génomique à large échelle dans des lignées cellulaires modèles (HeLa CD4+CCR5+) transfectées avec une librairie de siRNA. Après infection VIH, la réplication du virus a été mesurée dans ces cellules. Plus de 250 facteurs identifiés semblent importants pour la réplication, dont certains composants de la machinerie autophagique comme Atg7, Atg8 (GABARAPL2), Atg12 et Atg16L ainsi que des protéines impliquées dans la fonction lysosomale comme la battenine (gène CLN3) ou LAPTM5 (lysosomal protein transmembrane 5).

Dans la seconde approche[739], les auteurs se sont focalisés sur l'étude de la réplication virale dans des lignées cellulaires T lymphoblastiques (SupT1) infectées, transduites par des shRNA ciblant les protéines Atg. Inhiber l'autophagie par KO des gènes codants pour les protéines *PI3KR4*, *ATG4A*, *ATG5* et *ATG16L* a conduit à une baisse importante de la réplication, mesurée par le relargage de la protéine Gag p24 dans le surnageant, sans effet majeur sur la viabilité des cellules. La diminution du pourcentage de cellules marquées Gag p24 infectées par un virus en un cycle de réplication, sans modification de l'intensité du marquage, suggère que ce sont les phases précoces de l'infection, avant intégration du génome viral, qui seraient dépendantes de la machinerie autophagique[739].

Pour conclure, l'autophagie semble être importante pour la réplication du virus dans des cellules HeLa et des cellules de lignée lymphocytaire T. Cependant des études supplémentaires (génétiques et/ou fonctionnelles) sont nécessaires pour décrire (dans les

cellules primaires) les mécanismes d'action des composants de la machinerie autophagique sur la réplication virale.

3. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES LT CD4

Les LT CD4 sont la cible principale de l'infection par le VIH, aussi bien dans la phase de primo infection que dans les phases chroniques de la maladie. L'étude des interactions entre la machinerie autophagique de ces cellules et le virus a contribué à une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection. Ainsi, la modulation de l'autophagie par le virus serait un des mécanismes responsables de la déplétion des LT CD4.

Il faut distinguer, dans l'étude des interactions du VIH avec la machinerie autophagique, les cellules qui sont infectées productivement, des cellules qui sont en contact avec le virus sans être infectées.

3.1. LT CD4 non infectés

Le VIH exerce des effets directs sur les cellules infectées, ou indirects sur les cellules non infectées. En effet, chez les patients, une large majorité (95%) des LT CD4 qui meurent ne sont pas infectés ou sont résistants à l'infection[740–742]. Cette déplétion des T CD4 semble se faire par apoptose multifactorielle[630,743,744] et la protéine Env jouerait un rôle dans ce processus[630,745–748](cf. Tableau 3).

L'autophagie est induite dans les LT CD4 primaires non infectés co-cultivés (en présence d'AZT, un inhibiteur de la transcriptase inverse) avec des cellules infectées (de lignées fibroblastiques ou lymphocytaires) [630,749]. Après trois jours de co-culture, l'accumulation des autophagosomes dans les LT CD4 non infectés est observée en microscopie par l'accumulation de puncta GFPLC3 et de vésicules à doubles membranes. L'autophagie est induite après contact entre les cellules non infectées et la protéine Env exprimée à la membrane des cellules infectées[630,749]. L'induction est dépendante du processus de fusion de la gp41 avec la membrane plasmique, après la fixation par Env du récepteur CD4 et de son corécepteur (CXCR4 ou CCR5)[749,750]. Le mécanisme d'induction de l'autophagie par gp41 reste inconnu, mais s'opère indépendamment des voies de transduction en aval de l'engagement du CD4 et de ses corécepteurs. L'accumulation des autophagosomes pourrait être la conséquence d'un stress cellulaire comme la production de ROS suite à la fusion cellule/cellule (formation de syncytia), ou l'hémifusion des membranes cellulaires, induites par la gp41[751].

En bloquant l'induction de l'autophagie avec du 3-MA ou des siRNA dirigés contre les protéines Beclin1 et Atg7, l'apoptose des T CD4 induite par Env est réduite[630]. De même l'ajout de Bafilomycine A1 (Baf A1) qui inhibe la maturation des autophagosomes bloque l'apoptose, suggérant que l'intégralité du processus de dégradation par autophagie est nécessaire. Le facteur Beclin 1 qui s'accumule dans les LT CD4 très rapidement après contact avec la gp41[752] pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose, de par son interaction

avec Bcl-2[106] (cf. partie I -A -2.1.7.2). Notons que les relations entre la machinerie autophagique et l'apoptose sont mal comprises et qu'il est toujours difficile d'évaluer si l'induction de l'autophagie dans des cellules apoptotiques est une conséquence ou une cause de l'apoptose. En effet, dans diverses conditions, l'autophagie peut être induite dans des cellules après un stress induisant l'apoptose et jouerait alors un rôle pour la survie de ces cellules[753–755].

Pour conclure, la protéine Env semble jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'infection virale, en induisant la mort cellulaire des LT CD4 non infectés, notamment via l'induction de l'autophagie. Cependant, d'autres mécanismes sont à l'œuvre dans la déplétion des LT CD4 non infectées : ces cellules pourraient mourir par pyroptose[629,756] (mort cellulaire programmée induite par l'inflammation) suite à une infection abortive (sans intégration du génome viral / réplication). Il est intéressant de noter que la pyroptose est un mécanisme qui fait intervenir l'inflammasome. Des études seront nécessaires pour comprendre le mécanisme conduisant à la dérégulation de cette voie dans les LT CD4 réfractaires à l'infection VIH, mais l'autophagie pourrait jouer un rôle (cf. partie I -C -1.2.2.2).

3.2. LT CD4 infectés

Les groupes de Stephen A. Spector[757] et de Martine Biard-Piechaczyk et coll.[749], ont décrit les premiers les interactions entre la machinerie autophagique et le VIH dans les LT CD4 où le virus se réplique, en montrant une inhibition de l'autophagie dans ces cellules. Paradoxalement, deux études plus récentes par les groupes de Indira Hewlett[758] et de Jérôme Estaquier[118] décrivent le phénomène inverse. Les techniques, les modèles cellulaires et les outils utilisés dans chacune de ces études sont comparés dans le Tableau 3.

– Évidences en faveur d'une inhibition de l'autophagie suite à l'infection VIH

L'étude menée par l'équipe de SA. Spector [757] montre en Western Blot une inhibition de la synthèse de Beclin 1 dans des LT CD4 primaires infectés avec un virus X4 (80% de cellules marquées Gag p24), comparés aux lymphocytes non infectés. L'inhibition est dépendante de l'infection productive, car les mêmes cellules infectées avec du virus inactivé à l'aldrithiol-2 (AT-2) ont des niveaux d'expression de Beclin 1 équivalents à ceux des cellules non infectées. Par ailleurs, le nombre de puncta LC3+ est réduit et la lipidation du LC3 est inhibée uniquement dans les LT CD4 infectés. Ces résultats suggèrent une inhibition de l'autophagie dans ces cellules. Cette inhibition est comparable à celle induite par le 3-MA, et elle est en partie réversible par l'ajout de rapamycine ou lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en nutriments. L'ensemble de ces résultats suggère que dans les LT CD4 infectés, le VIH bloque les étapes d'initiation précoce de l'autophagie en amont de mTOR[757] (cf. partie I -A -2.1.7.1).

L'inactivation avec AT-2 n'empêche pas la fusion de gp41 à la membrane de la cellule[759]. Pourtant, l'autophagie ne semble pas augmentée dans les lymphocytes non infectés mis en contact avec le virus inactivé[757]. Ceci suggère que l'induction de l'autophagie par l'activité fusogène de la gp41 dans les LT CD4 non infectés[750] (cf. partie précédente) ne s'observe que par contact cellule/cellule.

Les résultats décrits dans les LT CD4 primaires ont été confirmés par l'équipe de M. Biard-Piechaczyk et coll. dans des cellules de la lignée lymphocytaire MOLT-4, infectées avec des virus X4 ou R5[749] (respectivement 60 et 50% de cellules Gag p24) produits par des 293T présentes dans la culture. Le nombre d'autophagosomes visibles en TEM est diminué et l'accumulation du LC3-II mesurée par Western Blot est inhibée. *A contrario*, dans les lymphocytes non infectés issus de la même culture, l'autophagie est activée, confirmant l'effet indirect de l'infection. Ainsi, il semble que les mécanismes d'induction de l'autophagie médiée par la gp41 dans les cellules non infectées, soient déjoués dans les cellules productivement infectées, mais le mécanisme exact n'est pas connu.

– Évidences en faveur d'une induction de l'autophagie suite à l'infection VIH

Une étude par Indira Hewlett et coll.[758] montre que l'infection par le VIH-1 ou le VIH-2 induit une augmentation des autophagosomes dans les cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat et dans les LT CD4 primaires (cf. Tableau 3).

Ces résultats sont en contradiction avec les deux études précédentes. Cependant, les pourcentages d'infection ne sont pas évalués dans ces expériences. Il est possible que l'activation de l'autophagie observée dans les LT CD4 primaires (et dans les Jurkats) reflète davantage l'action de l'enveloppe virale sur le flux autophagique dans les lymphocytes non infectés (cf. partie précédente), qu'un réel effet de l'infection productive sur l'autophagie. En accord avec cette dernière hypothèse, les auteurs ont montré une augmentation de l'apoptose dépendante de l'autophagie dans les Jurkats trois et sept jours après « l'infection »[758].

Les auteurs ont également évalué l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la réplication virale en mesurant par RT-PCR quantitative le nombre de copies d'ARN viraux présents dans le surnageant de cellules Jurkats infectées. Ce nombre est fortement diminué dans le surnageant des cellules traitées 3-MA pendant deux jours ou transfectées par un siRNA ciblant Beclin 1, suggérant que l'autophagie est nécessaire à la réplication virale dans ces cellules[758]. Cependant, ni la viabilité des cellules ni leur capacité de renouvellement ne sont mesurées, ce qui rend difficile l'interprétation de ces résultats. Quoi qu'il en soit, ils sont en accord avec les études génétiques décrites dans la partie I -E -2. *A contrario*, l'induction de l'autophagie par la rapamycine dans des HeLa infectées et dans des LT de la lignée H9 n'induit pas d'augmentation de la réplication virale[527]. Cependant, la rapamycine de par son action sur mTOR peut avoir des effets pléiotropiques sur la biologie de la cellule indépendamment de son action sur l'autophagie. Toutefois, ces données montrent les limites de l'utilisation des différentes lignées lymphocytaires T modèles pour l'étude des interactions

entre l'autophagie et le VIH, et les résultats obtenus dans ces cellules pourraient ne pas être représentatifs de la réalité dans les LT CD4 primaires.

L'équipe de J. Estaquier a réalisé récemment une étude des interactions entre le VIH et la machinerie autophagique dans les LT CD4 primaires infectés[118]. Dans les cellules où le VIH se réplique, le facteur de transcription p53 est activé (phosphorylé) et s'accumule dans le noyau. Cette accumulation induit l'expression de DRAM qui conduirait à l'augmentation du flux autophagique (cf. partie I -A -2.1.7.3), mesuré aux jours 4, 5 et 6 post-infection (40% de cellules marquées Gag p24 au jour 5). L'induction de l'autophagie est restreinte aux LT CD4 productivement infectés marqués Gag p24, et le flux autophagique dans les cellules en contact avec le virus ne varie pas significativement en comparaison avec les cellules non infectées. Cette étude est particulièrement convaincante car les auteurs ont utilisé plusieurs techniques pour mesurer le flux autophagique dans les cellules infectées (cf. Tableau 3). Ils ont mesuré en microscopie l'augmentation du nombre d'autophagosomes marqués LC3, et en Western Blot l'accumulation de la forme LC3-II. Cependant, ces observations peuvent aussi bien refléter l'induction de l'initiation de l'autophagie que le blocage des étapes de maturation lysosomale (cf. partie I -A -2.1.6). Dans les LT CD4 infectés, les niveaux d'expression des protéines Beclin 1, DRAM et Atg5 sont augmentés et la fonction lysosomale (mesurée par un marquage LAMP2 en microscopie) est conservée, ce qui confirme l'induction de l'autophagie. Par ailleurs, la quantité de p62 diminue dans ces cellules, confirmant l'augmentation du flux autophagique (cf. partie I -A -2.2.2 –p62/SQSTM1). De plus, l'inhibition de DRAM ou de p53 par des siRNA induit une diminution forte du nombre de cellules autophagiques marquées Gag p24.

En conclusion, ces résultats suggèrent fortement que dans les LT CD4 où le VIH se réplique, l'accumulation de p53 et de DRAM conduit à l'induction du flux autophagique. DRAM et p53 induirait également la mort cellulaire des LT CD4 infectés, mais ce de manière indépendante de l'autophagie[118].

De façon intéressante, les virions observés en TEM ne sont pas retrouvés dans les autophagosomes des LT CD4[118], contrairement aux résultats décrits dans les macrophages infectés[527,760] (cf. partie I -E -4.2).

Tableau 3 – Dans les LT CD4

Cell. primaires ou lignées	Impact de l'autophagie sur le VIH (bleu : réduit la réplication ; rouge : favorise)	Impact du VIH sur l'autophagie (vert : inhibe l'autophagie ; violet : induit)	Outils pour moduler l'autophagie (dans les cell. inf. ou en contact avec le VIH)	Techniques pour mesurer l'autophagie et son flux	Commentaires	Réf
LT CD4 non infectés						
LT CD4 primaires et lignées T A2.01/CD4.403	/	• Env à la mb. des cell. inf. induit l'autophagie dans les LT CD4 Ni de la co-culture • Fusion de la gp41 à la mb. : induit l'autophagie	• **Induction :** RAPA • **Inhibition :** 3-MA / siRNAα Atg7/Beclin 1	• Nb. puncta GFPLC3 (IF) et de vésicules à 2x mb. (TEM) • WB Beclin 1	• Env/gp41 du virus seul dans le surnageant n'induit pas l'autophagie. • Autophagie : cause ou conséquence de l'apoptose des LT CD4 N. inf ?	630,749,750
LT CD4 infectés						
SupT1	siRNAα PI3K (type III), Atg4a, Atg5 et Atg16L : inhibe la réplication virale (relargage de p24 dans le milieu et % de cell. p24+)	/	• **Inhibition :** Librairie de shRNA (Criblage génomique)	• WB LC3-I/II +/- pepstatine +/- carences • qRT-PCR des ARN Atg inhibés par les shRNA	Inhiber l'autophagie diminue la réplication d'un virus en un cycle : l'autophagie régulerait les phases de l'infection pré-intégration	739
MOLT-4	/	Autophagie inhibée dans cell. inf.	/	• Nb. de vésicules 2x mb. (TEM) • WB LC3-I/II	• L'infection induit une diminution de LC3-I **et** LC3-II (WB) : inhibition transcriptionnelle ? • Cell. inf. : identifiées par bourgeonnement du VIH (TEM)	749
LT CD4 primaires	/	• Autophagie inhibée dans cell. inf. • + RAPA : rétablie partiellement le flux autophagique	• **Induction :** RAPA	• Nb. puncta LC3+ (IF) • WB Beclin 1 • WB LC3-I/II	Infection mesurée par marquage p24 intracellulaire (80% de cell. inf. p24+).	757
Jurkats ou LT CD4 primaires	Inhiber l'autophagie diminue la réplication virale (qRT-PCR des ARN viraux dans le milieu de culture)	Autophagie augmentée dans cell. inf.	• **Inhibition :** 3-MA / siRNAα Beclin 1	• Nb. de vésicules 2x mb. (TEM) • WB et PCR Ulk1, Atg4D, Atg5-Atg12, Beclin 1 • Nb. puncta LC3+ (IF)	% de cell. inf. n'est pas évalué : complique l'interprétation des résultats (obtenus principalement dans les Jurkats) : n'observe t-on pas ici l'effet indirect de l'infection décrit par Espert et coll. ?	758
LT CD4 primaires	Pas de virus dans les autophagosomes (TEM)	• Autophagie induite par p53/DRAM dans cell. inf. • L'augmentation de p53/DRAM déclenche la mort des cell. inf. indépendamment de l'autophagie.	• **Inhibition :** siRNAα DRAM/p53 ou siRNAα Atg5/Beclin 1	• WB LC3-I/II (+/- pepstatine), Beclin 1, Atg5 • RT-PCR Beclin 1 • WB p62 • Comparaison Nb. puncta LC3+ (IF) pour différentes conditions d'infection.	Convaincant car : plusieurs outils/techniques utilisés pour évaluer le flux autophagique dans les LT CD4 primaires inf. p24+ vs cell. Ni en contact avec le virus ou cell. sans virus.	118

Abréviations spécifiques : cf. Tableau 5 pour la liste des abréviations utilisées

4. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES

L'étude des interactions VIH/macrophage a mis en lumière le rôle de l'autophagie à la fois comme un mécanisme favorisant et inhibant la réplication virale dans ces cellules. L'autophagie jouerait un rôle dans la dégradation du virus dans les macrophages infectés mais le VIH aurait développé des mécanismes d'échappement : il semble pouvoir moduler l'autophagie dans les cellules infectées comme dans les non infectées (cf. Tableau 4).

4.1. Monocytes/macrophages non infectés

L'autophagie n'est pas induite dans les cellules de la lignée monocytaire THP-1 (différenciée ou non en macrophage) et dans les hMDM, mises en co-culture en présence d'AZT avec des cellules (293T ou MOLT-4) exprimant la protéine d'enveloppe du VIH[749]. Ainsi, l'activité fusogène de la gp41 ne semble pas induire l'autophagie dans les monocytes et les macrophages ce qui pourrait expliquer que l'effet indirect de l'infection sur l'induction de l'apoptose n'est pas observable dans ces cellules. Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre pourquoi l'induction de l'autophagie (et de l'apoptose) par l'enveloppe du VIH est restreinte aux LT CD4. Il existe cependant plusieurs hypothèses.

D'une part, le flux autophagique basal dans les macrophages est plus élevé que dans les lymphocytes, et pourrait masquer l'induction de l'autophagie médiée par Env/gp41. D'autre part, les mécanismes de fusion et d'hémifusion des membranes cellulaires suite à la fusion de la gp41 à la membrane pourraient conduire à des signaux de stress différents dans les deux types cellulaires, notamment pour la production des ROS impliqués dans l'induction de l'autophagie[751]. De plus, les étapes d'entrée du virus et d'interaction avec la protéine Env sont différentes entre les DC/macrophages et les LT CD4 (cf. partie I -D -2.1.2). Enfin, la fixation de la gp120 aux CD4/co-récepteurs transduit un signal dans la cellule qui pourrait, en fonction du type cellulaire, bloquer l'induction de l'autophagie médiée par l'activité fusogène de la gp41.

Deux autres études[541,761] *in vitro* suggèrent un effet indirect de l'infection VIH sur le flux autophagique dans les macrophages. Cet effet serait médié par la protéine virale Tat, qui peut être secrétée[762] par les cellules infectées et est retrouvée dans le plasma de certains patients infectés [763]. Elle perturberait ainsi diverses fonctions cellulaires dans de nombreux types cellulaires[764,765].

Dans les hMDM issus de patients infectés VIH en comparaison avec ceux de donneurs sains, la dégradation du parasite *Toxoplasma Gondii* dépendante de l'autophagie (induite par l'engagement du recepteur CD40) est inhibée *in vitro*[761]. De plus, l'infection *in vitro* des hMDM par le VIH bloque la dégradation du parasite alors que le pourcentage de macrophages productivement infectés par le VIH est très faible, suggérant un effet indirect de l'infection[761]. L'ajout d'AZT en parallèle montre que la néosynthèse virale dans les cellules infectées est nécessaire pour observer l'inhibition de la dégradation des parasites dans les cellules non infectées de la culture. De plus, le flux autophagique n'est plus augmenté par la rapamycine dans des cellules de lignées macrophagiques MonoMac6 co-cultivées avec des hMDM infectées avec diverses souches du VIH (sauvage, ΔNef ou ΔEnv)[761]. De façon remarquable, l'ajout d'anticorps neutralisant anti-Tat dans le milieu de culture restaure l'induction de l'autophagie par la rapamycine et l'activité dégradative des tachyzoïtes dans les macrophages[761]. Ainsi, Tat serait responsable de l'inhibition de l'autophagie dans les macrophages non infectés. Cette inhibition semble être dépendante de l'interaction de Tat avec le récepteur CXCR4 et le récepteur au facteur de croissance VEGFR-1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1), conduisant à l'activation des voies AKT/Src.[761] En parallèle, Tat induit dans les macrophages la production d'IL10 qui active la voie STAT3[761,766]. Bloquer les voies STAT3 et AKT/Src avec des siRNA empêche l'inhibition de l'autophagie par la protéine Tat recombinante présente dans le milieu à des concentrations équivalentes à celles retrouvées dans le plasma de patients infectés[761,763].

L'IFNγ induit l'autophagie dans les macrophages (cf. partie I -C -1.1.2.4). Une autre étude *in vitro*[541] montre qu'un prétraitement des hMDM avec du Tat recombinant inhibe l'effet stimulateur de l'IFNγ sur l'autophagie. Dans ces macrophages, la colocalisation du

BCG avec les vésicules LC3+ induite par l'interféron est diminuée, ce qui suggère une inhibition dépendante de Tat de l'activité antimicrobienne médiée par l'autophagie.

Pour conclure, contrairement aux observations dans les LT CD4, Env/gp41 n'inhibe pas l'autophagie dans les macrophages non infectés. Cependant, la protéine virale Tat sécrétée lors de la réplication virale et retrouvée dans le plasma des patients, serait susceptible d'inhiber l'autophagie dans les macrophages, conduisant à une dérégulation de leurs fonctions antimicrobiennes.

4.2. Monocytes/macrophages infectés

Les interactions entre la machinerie autophagique et le VIH dans les macrophages où le virus se réplique sont complexes (cf. Tableau 4). Le VIH manipulerait l'autophagie dans ces cellules pour favoriser sa réplication. Ainsi, en accord avec les études génétiques (cf. partie I -E -2), l'autophagie semble importante pour la réplication du virus dans les macrophages [527,749].

En effet, le traitement des macrophages infectés (hMDM ou cellules des lignées THP1 et U937) avec la rapamycine (pendant 4h après 10 jours d'infection) induit l'autophagie et augmente le relargage dans le surnageant de culture de la protéine Gag p24[527]. L'inhibition de l'autophagie dans ces cellules après l'ajout de 3-MA[527,749] ou le ciblage des protéines Beclin 1 et Atg7 par des siRNA[527] provoque l'effet inverse. Ces résultats suggèrent que l'autophagie basale est nécessaire à la réplication virale dans les macrophages[527,760]. Pourtant, de façon contre-intuitive, la protéine de la matrice virale Gag p17 colocalise dans ces cellules avec les compartiments autophagiques marqués LC3[527] et des virions néosynthétisés sont retrouvés dans les autophagosomes en microscopie électronique[527]. En outre, des expériences de co-immunoprécipitation et de fractionnement des compartiments cellulaires indiquent que la protéine LC3 interagit avec la protéine Gag dans les macrophages infectés[527].

Ces données suggèrent que dans les macrophages, le VIH peut se retrouver dans les autophagosomes mais échappe à la dégradation, puisque l'induction de l'autophagie augmente la réplication du virus. L'interaction entre Gag et LC3 pourrait alors contribuer à l'assemblage des virions, expliquant pourquoi l'induction de l'autophagie augmente la réplication du VIH, mais cette hypothèse n'est pas démontrée.

- Mécanisme d'échappement : rôle de la protéine virale Nef

L'induction par la rapamycine de l'autophagie dans les macrophages U937 infectés avec un virus délété de Nef ($VIH_{\Delta Nef}$) n'augmente pas mais inhibe le relargage de la p24 dans le surnageant de culture. De même, l'inhibition de l'autophagie basale par le 3-MA ou des siRNA ne provoque pas la diminution de la réplication du $VIH_{\Delta Nef}$. Ainsi, l'augmentation de la réplication virale via l'autophagie serait dépendante de Nef[527].

De façon intéressante, l'infection des hMDM par le virus sauvage induit l'accumulation du LC3-II, mesurée en Western Blot, et cette accumulation n'est pas retrouvée après une infection avec le $VIH_{\Delta Nef}$. Par ailleurs, l'expression de Nef dans les U937 est

suffisante pour induire l'accumulation des vésicules d'autophagie marquées GFPLC3. Ces résultats suggèrent soit l'induction de l'autophagie, soit le blocage de la maturation des autophagosomes par Nef. Plusieurs données montrent que Nef bloquerait en fait la maturation des autophagosomes, inhibant ainsi leur dégradation via la fusion lysosomale[527]. Tout d'abord, Nef exprimée seule bloque la dégradation dépendante de l'autophagie des protéines à longue durée de vie dans les U937. De plus, l'infection des 293T par un virus sauvage diminue le nombre d'autolysosomes (marqués par la mRFP-GFPLC3, cf. I -A -2.1.6) alors que l'infection par virus ΔNef n'exerce pas cet d'effet. Enfin, l'inhibition de la maturation des autophagosomes par la Baf A1 empêche la dégradation du $VIH_{\Delta Nef}$ induite par la rapamycine dans les U937. Nef colocalise et co-précipite avec la protéine Beclin 1 dans les macrophages infectés. Ces deux protéines interagissent donc ensemble via un motif spécifique[767] et cette interaction est nécessaire pour l'inhibition de la maturation des autophagosomes[527].

Par ailleurs Nef interagit avec la protéine IRGM et induirait ainsi l'autophagie dans des HeLa infectés[542] (cf. partie I -C -1.1.2.4) . Ainsi, via Nef, le VIH serait capable d'une part, d'induire les étapes d'initiation de l'autophagie pour sa réplication et, d'autre part, d'inhiber les étapes de fusion lysosomale lors de la maturation des autophagosomes pour empêcher sa dégradation.

Tous ces résultats suggèrent des interactions complexes entre le VIH et la machinerie autophagique dans les macrophages. La protéine Gag, en interagissant avec LC3, et la protéine Nef, en interagissant avec Beclin 1 et IRGM, permettraient au virus d'utiliser l'autophagie à son avantage pour augmenter sa réplication.

- Rôle de la vitamine D

Le laboratoire de SA. Spector a étudié l'impact de la vitamine D sur l'autophagie et sur la réplication virale dans les hMDM[510,760,768].

Dans les hMDM, la vitamine D sous sa forme active (1,25D3) induit la conversion LC3-I/LC3-II[510,760], l'accumulation des vésicules LC3+[510,760] et la diminution de p62[510] dès 4h de traitement (cf. Tableau 4). Ainsi, à des concentrations proches des concentrations physiologiques (50/100pM), la vitamine D induit rapidement l'autophagie dans les hMDM : elle augmente l'expression de Beclin 1, de la PI3K de type III et induit leur interaction[760]. Atg5 est également nécessaire[760]. Le traitement sur plusieurs jours des hMDM par la vitamine D n'a pas d'effet cytotoxique.

Un prétraitement à la vitamine D des macrophages avant l'infection VIH inhibe de façon dose dépendante la réplication virale, mesurée (entre 2 et 10 jours post-infection) par le relargage de Gag p24 dans le surnageant de culture[510,760] et le pourcentage de cellules infectées (marquées Gag p17)[510]. L'inhibition de la réplication virale suite au traitement n'est pas due à des différences dans la capture du virus, ni à son entrée, ni à l'intégration du génome viral ou au bourgeonnement des nouveaux virions. Ces résultats suggèrent que c'est la phase de néosynthèse des virions qui est inhibée[760] par la vitamine D. De façon intéressante, la protéine Gag p17 colocalise avec les autophagosomes marqués LC3+ dans les

hMDM en présence de vitamine D[760]. De plus, la vitamine D n'exerce plus d'effet sur la réplication du VIH après l'inhibition de l'induction de l'autophagie par des siRNA dirigés contre Beclin 1 et Atg5[510,760], ou après l'inhibition de la maturation des autophagosomes et des fonctions lysosomales[510,760]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'induction de l'autophagie par la vitamine D est le mécanisme responsable de l'inhibition de la réplication virale dans les hMDM. Ils semblent en contradiction avec l'effet potentialisateur sur la réplication virale du traitement rapamycine[527]. Cependant, la vitamine D induit probablement l'autophagie par des voies différentes de la rapamycine et pourrait contrecarrer l'échappement du VIH (à la dégradation dans les autolysosomes) médié par la protéine Nef[527]. De plus, la vitamine D induit l'expression de la cathelicidine, un peptide antimicrobien qui active l'autophagie et favoriserait l'activité antivirale de la vitamine D[510]. Notons que l'induction de l'autophagie par la vitamine D diminue également la réplication de *Mycobactérium Tuberculosis* dans les macrophages co-infectés (ou non) VIH. Ainsi, le traitement par la vitamine D semble particulièrement efficace pour inhiber la réplication des pathogènes via l'induction de l'autophagie.

De façon remarquable, les ligands TLR8 induisent l'autophagie dans les hMDM, via l'augmentation de l'expression du récepteur à la vitamine D et de l'enzyme de conversion de la vitamine D sous sa forme active[768]. Dans les hMDM infectés, le TLR8 potentialise ainsi l'effet de la vitamine D sur l'activation de l'autophagie et l'inhibition de la réplication virale[768].

En conclusion, l'autophagie basale est importante pour la réplication du VIH dans les macrophages : le virus utilise l'autophagie pour se répliquer et échappe à la dégradation dans les autophagosomes via l'interaction entre Nef et Beclin 1 qui bloque leur maturation lysosomale. Dans des macrophages où l'autophagie est induite, la réplication virale peut être soit inhibée soit potentialisée. Cette dichotomie est fonction des différentes voies d'induction de l'autophagie utilisées, certaines semblant plus efficaces pour contrecarrer l'échappement du virus à la dégradation dans les autophagolysosomes.

Tableau 4 – Dans les Monocytes/Macrophages

Cell. primaires ou lignées	Impact de l'autophagie sur le VIH (bleu : réduit la réplication ; orange : favorise)	Impact du VIH sur l'autophagie (vert : inhibe l'autophagie ; violet : induit)	Outils pour moduler l'autophagie (cell. Inf. ou en contact avec le VIH)	Techniques pour mesurer l'autophagie et son flux	Commentaires	Réf
Monocytes/macrophages non infectés						
THP-1 et hMDM	/	Env à la mb. de cell. inf. (293T et MOLT-4) ne modifie pas l'autophagie dans les mono/macrophages de la co-culture	/	• Nb. de vésicules 2x mb. (TEM)	À l'inverse des T CD4, la fusion de gp41 n'induit pas l'autophagie dans les macrophages	749
hMDM	/	+ Tat recombinant dans la culture inhibe l'autophagie (et la xénophagie des *BCG*) induite par l'IFN-γ	• **Induction :** traitement IFN-γ	• WB LC3-I/II • Nb. puncta LC3+ (IF)	Pas de virus utilisé dans cette étude, seulement du Tat recombinant.	541
MonoMac6 ou hMDM	/	Tat relargué par des cell. inf. (ou Tat recombinant) inhibe l'autophagie dans les macrophages N.inf., empêche l'induction de l'autophagie par la RAPA et inhibe la xénophagie de *T.Gondi*	• **Induction :** RAPA	• Nb. puncta LC3+ (IF) • WB LC3 II • Dégradation par xénophagie de *T. Gondi*	• Anticorps anti-Tat ajouté dans la culture : restaure l'autophagie/la xénophagie de *T.Gondii* • L'effet de Tat relargué sur l'autophagie : mesuré dans les MonoMac6. Expériences dans les hMDM : avec Tat recombinant	761
Monocytes/macrophages infectés						
THP-1 et hMDM	Inhiber l'initiation de l'autophagie ou bloquer la maturation des autophagosomes inhibe le relargage de p24	Nb. d'autophagosomes augmente dans les mono/macrophages inf. : induction de l'autophagie ou blocage de la maturation ?	• **Inhibition :** 3-MA (inhibe l'induction) et Baf A1 (inhibe la maturation)	• Nb. structures à doubles mb. (TEM)	Les cell. inf. sont identifiées par bourgeonnement du virus (TEM)	749
hMDM, U937, THP-1 (et 239T)	• L'autophagie basale augmente la réplication du VIH (relargage de p24, niveau d'infectiosité des virus relargués et p24 intracellulaire). • Inhiber ou induire l'autophagie diminue ou augmente le relargage de p24. • La protéine p17 colocalise avec LC3. Le VIH est retrouvé (TEM) dans les autophagosomes LC3+ à 2x mb.	• Gag co-précipite et est co-purifié avec LC3 : interaction entre les deux protéines ? • Nef co-localise/co-précipite avec Beclin 1. • L'augmentation du relargage de p24 médiée par l'autophagie est dépendante de l'intéraction Nef/Beclin 1, qui inhibe la maturation des autophagosomes (accumulation des autophagosomes non matures) • Le VIH utiliserait l'initiation de l'autophagie pour sa réplication (via l'interaction LC3/Gag ?) et bloquerait les phases tardives via l'interaction Nef/Beclin 1 pour empêcher sa dégradation.	• **Induction :** RAPA (4h, 54µM, post-infection) • **Inhibition :** 3-MA / siRNAα Atg7/Beclin 1	• IF colocalisation p17/LC3 • Virus observable (TEM) dans des vésicules 2x mb. • Co-précipitation Gag/LC3 dans les hMDM et Nef/Beclin 1 dans des lignées modèles inf. VIH ou transfectées Nef. • WB LC3-I/II (+/- BafA1) • mRFP-GFPLC3 pour mesurer le flux autophagique dans les 293T inf. VIH+/-Nef	• Plusieurs techniques pour décrire les interactions protéines virales / protéines Atg. • Évaluation de l'infectiosité des virus relargués dans le surnageant d'infection. • L'impact de Nef sur le flux autophagique : décrit avec plusieurs outils/techniques pour évaluer le flux autophagique, mais seulement dans les lignées modèles. • Pas de marquage nucléaire pour identifier les syncytia et pas de quantification de la colocalisation LC3/p17 • Dose de RAPA : forte pour un traitement court post-infection, sans évaluation de la mortalité cellulaire.	527
hMDM	• Inhiber l'autophagie **basale** inhibe la réplication. • Induction de l'autophagie par la vit. D (et RAPA) : inhibe la réplication virale (p17 intracellulaire et relargage p24 dans le milieu) sans affecter la survie des cell. • + vit. D : induit colocalisation p17/LC3 • Autophagie induite par la vit. D : importante pour l'inhibition de la réplication du VIH et de *M. Tuberculosis* lors de la co-infection.	L'infection VIH seule ne modifie pas la conversion LC3-I/II . Cependant la conversion induite par *M. Tuberculosis* (qui induit l'autophagie dans les macrophages) est inhibée lors d'une co-infection avec le VIH.	• **Induction :** vit. D (4h, 50/100pM) et RAPA (4h, 100nM) (pré-infection) • **Inhibition** de l'autophagie induite par la vit. D avec les shRNAs anti Beclin 1 et Atg5 dans les cell. inf. ou co-inf. • **Inhibition** de la maturation des autophagosomes avec Baf A1/SID 26681509 dans les cell. co-inf.	• IF p17 & LC3 • Nb. puncta LC3+ (IF) • WB LC3-I/II (+/- pepstatine), PI3K de type III et Beclin 1 • Mesure de la conversion LC3-I/II par FACS	• vit. D : utilisée à des concentrations physiologiques. • Plusieurs outils/techniques pour évaluer l'autophagie. • Évaluation de l'infectiosité des virus relargués dans le surnageant d'infection. • Marquage LC3 (colocalisation avec p17 en IF) très diffus. Pas de quantification de la colocalisation. • Contrairement à l'étude de Kyei et coll., induire l'autophagie (avec la vit. D ou la RAPA) inhibe la réplication virale dans les macrophages. Cependant : concentration de RAPA utilisée plus faible (sans effet sur la mortalité cellulaire) et en pré-infection.	510,760
hMDM	• La voie TLR8 induit l'autophagie et potentialise l'induction de l'autophagie par la vit. D: des shRNAαTLR8 et contre le récepteur de la vit. D inhibe l'autophagie. • Induction de l'autophagie par TLR 8 en présence de vit. D : inhibe la réplication virale (relarguage de la p24)	/	• **Induction :** ssRNA40 et CL097 (ligands TLR8) + la vit. D • **Inhibition :** shRNA anti Beclin 1 et Atg5	• WB LC3-I/II et PI3K de type III • WB p62 • Nb. puncta LC3+ (IF)	• vit. D utilisée à des concentrations physiologiques. • Plusieurs outils/techniques utilisés pour évaluer le flux autophagique	768
hMDM et lignées cellulaires	• Dans les hMDM, inhiber l'autophagie via l'inhibition d'IRGM inhibe la réplication virale (relargage de la p24 après 24h d'infection).	• Nef transfecté dans les HeLa induit l'augmentation du Nb. d'autophagosomes (induction de l'autophagie ?). • Nef et IRGM interagissent : dans des HeLa/293T co-transfectées, IRGM et Nef colocalisent et co-précipitent	• **Inhibition :** (Hela et hMDM): siRNAα Atg5 et IRGM	• WB LC3-I/II dans les hMDM • Nb. puncta GFPLC3 dans les Hela • Interaction IRGM avec Atg5, LC3, Atg10 (Experience double hybride et co-précipitation)	• L'étude n'est pas centrée sur les interactions VIH/autophagie mais sur les interactions des virus ARN avec la voie IRGM induisant l'autophagie. • Mesurer le relargage de p24 dans le milieu 24h après infection semble court pour parler de réplication virale dans les macrophages. L induction par Nef de l'autophagie pourrait être un blocage de la maturation comme décrit par Kyei et coll	542

Abréviations spécifiques : cf. tableau 5 pour la liste des abréviations utilisées

5. INTERACTIONS VIH/AUTOPHAGIE DANS LES DC

Les DC jouent un rôle primordial dans la physiopathologie de l'infection VIH et l'établissement de la réponse immune antivirale (cf. parties I -D -2). Pourtant, les rôles de l'autophagie dans l'infection des DC par le virus, l'établissement de la réponse antivirale et les interactions du virus avec la machinerie autophagique dans ces cellules sont encore peu étudiés.

Ainsi, deux études seulement se sont penchées sur les interactions entre le VIH et la machinerie autophagique dans les DC (cf. Tableau 5). L'une dans les DC plasmacytoïdes[553] et l'autre dans les DC myéloïdes[512]. Elles se focalisent toutes les deux sur la phase d'interaction sans infection productive par le VIH, moins de 24h après l'infection, avant réplication.

5.1. hpDC chargées avec le virus

Les hpDC, triées du sang de donneurs sains, secrètent de grande quantité d'IFNα après une incubation (de 16h) avec le VIH[553]. La sécrétion d'IFNα étant induite par un virus inactivé à l'AT-2, la réplication virale n'est pas nécessaire. Cette sécrétion est dépendante de l'activation de la voie TLR7 par le virus entrant: inhiber à l'aide d'un siRNA l'expression du TLR7 dans les hpDC diminue drastiquement la sécrétion d'IFNα induite par le virus ou un ARNss[39]. Par ailleurs, un siRNA dirigé contre Atg7 inhibe également la production d'IFNα[39]. Or l'activation de la voie TLR7 induit l'autophagie dans le hpDC, mesurée par la conversion LC3-I/II en Western Blot, l'expression accrue d'Atg7 et l'augmentation du nombre de puncta LC3+ visibles en microscopie[39]. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'induction de l'autophagie via la voie TLR7 est nécessaire pour la production d'IFNα suite à la reconnaissance par le TLR7 d'ARNss viraux. De plus, la reconnaissance des virus ARNss par le TLR7 est dépendante de l'autophagie[472]. Une hypothèse serait que le virus entrant serait conduit dans des compartiments autophagiques pour être dégradé et que les produits issus de cette dégradation seraient reconnus par le TLR7, qui activerait en retour l'autophagie.

En conclusion, les voies d'induction de l'autophagie et d'activation du TLR7 semblent étroitement connectées dans les hpDC, pour permettre la reconnaissance du VIH et induire l'immunité innée antivirale.

5.2. hmDC chargées avec le virus

5.2.1. Xénophagie du VIH et échappement viral

La dégradation du VIH s'observe rapidement après son entrée dans les DC[351,672].De façon remarquable, la protéine Gag p24 du VIH colocalise rapidement (dès 15min et jusqu'à 20h, avec un pic de colocalisation à 12h) avec les vésicules LC3+ après l'entrée du virus dans les hMDDC[512]. La protéine virale est également retrouvée dans des compartiments lysosomaux marqués LAMP-1 et LC3, et le virus est observable en TEM dans des structures vésiculaires à doubles membranes[512]. Ces données semblent indiquer que le virus entrant se retrouve rapidement dans les autophagosomes et les amphisomes, pour être dégradé par la

voie lysosomale[512]. En accord avec ces résultats, inhiber l'autophagie avec un siRNA dirigé contre LC3 induit une augmentation de la quantité de Gag p24 présente dans les DC (observable en microscopie et en cytométrie) comparée aux DC transfectées avec un siRNA contrôle[512]. Ces mêmes DC sont co-cultivées avec des LT CD4 pour mesurer l'efficacité du transfert cellules/cellules en *trans* du virus (précédemment décrit[653,672,675]). Les lymphocytes co-cultivés avec les DC dont l'autophagie est inhibée sont plus facilement infectés. Ainsi l'autophagie serait impliquée dans la dégradation du virus entrant, et inhiberait le taux de transfert en *trans* du virus aux LT CD4[512].

L'infection des DC myéloïdes humaines dérivées de monocytes (hMDDC) ou triées du sang de donneurs sains conduit rapidement (dès 1h), en absence de réplication, à une inhibition de l'initiation de l'autophagie. En effet, le virus induit une diminution de la conversion LC3-I/-II, l'accumulation de la p62 et de protéines ubiquitinées et l'augmentation du nombre de puncta LC3+[512]. Le virus déclenche la phosphorylation des protéines Erk, p-S6 et *in fine* de mTOR, impliquée dans les étapes précoces d'induction de l'autophagie (cf. partie I -A -2.1.3)[512]. Un virus délété pour Env n'est pas capable d'induire l'activation de la voie mTOR, et Env seule dans le milieu de culture est suffisante. De plus, la fusion de l'enveloppe virale n'est pas nécessaire et un anticorps anti-CD4 induit la phosphorylation mTOR. Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition du flux autophagique est dépendante de l'interaction de la protéine Env avec son récepteur CD4, déclenchant la phosphorylation activatrice de mTOR via la voie Erk/pS6[512].

En conclusion, le VIH semble avoir développé un mécanisme pour échapper partiellement à la dégradation par autophagie lors de son entrée dans les DC myéloïdes. En inhibant rapidement l'autophagie dans ces cellules, Env pourrait restreindre l'envoi du virus dans les autophagosomes/amphisomes, et augmenterait ainsi le transfert en trans des DC vers les lymphocytes T CD4, cibles principales de l'infection.

5.2.2. Interactions autophagie/TLR/VIH

L'autophagie est impliquée dans la régulation positive de la réponse TLR (cf. partie I -C -1.2.1) : ainsi, l'inhibition de l'autophagie dans les hMDDC suite à une transfection par des siRNA dirigés contre LC3 ou Atg5 conduit à une diminution de la réponse TLR4 et TLR8 (mesurée par la sécrétion de TNFα et l'activation de la voie NF-κB)[512]. De façon remarquable, l'infection par le VIH et l'ajout de la protéine d'enveloppe recombinante inhibent également les réponses TLR4 et 8 dans les hMDDC[512]. *A contrario*, le $VIH_{\Delta Env}$ n'induit pas l'activation de la voie NF-κB après un traitement LPS. Ces données suggèrent que VIH, via l'inhibition par Env de l'autophagie, inhibe les réponses TLR4 et 8 dans les hMDDC[512]. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie l'inhibition de l'activation TLR observée dans les DC de patients en phase chronique d'infection VIH[769,770].

Tableau 5 – Dans les DC

Cell. primaires ou lignées	Impact de l'autophagie sur le VIH (bleu : réduit la réplication ; rouge : favorise)	Impact du VIH sur l'autophagie (vert : inhibe l'autophagie ; violet : induit)	Outils pour moduler l'autophagie (cell. Inf. ou en contact avec le VIH)	Techniques pour mesurer l'autophagie et son flux	Commentaires	Réf
DC chargées avec le virus (sans réplication virale)						
hMDDC et hmDC primaires	VIH entrant dans les hMDDC semble dégradé par autophagie : • p24 colocalise avec LC3 entre 12h et 20h après infection et se retrouve dans des compartiments lysosomaux • VIH retrouvé dans des vésicules 2x mb. (TEM) • Inhiber l'autophagie augmente la quantité de p24 associée aux hMDDC • Inhiber l'autophagie dans les hMDDC augmente le transfert du VIH aux LT CD4 (sans réplication virale) • Inhiber l'autophagie inhibe la présentation CMH-II d'antigènes exogènes du VIH	• Avant réplication virale, Env inhibe l'autophagie dans les hMDDC et les hmDC primaires indépendamment de la fusion : l'interaction Env/CD4 (indépendamment du tropisme viral) conduit à l'activation de mTOR par phosphorylation et l'inhibition du flux autophagique observable après 1h. • L'inhibition de l'autophagie par l'enveloppe du VIH inhibe la réponse TLR4 et 8 à leurs ligands respectifs (mesurée par la production de TNFα)	• **Induction :** RAPA • **Inhibition :** siRNAα LC3, Atg5 ou 3-MA (ou l'infection VIH)	• IF p24/LC3 • Nb. puncta LC3+ (IF) (cinétique) +/- ChQ • WB LC3-I/II (+/-ChQ et/ou RAPA) • WB p62 • Mesure par marquage en IF des protéines ubiquitinées • Activation de la voie mTOR (mesurée en WB par la phosphorylation de la protéine S6 et de mTOR).	• Quantification et cinétique de colocalisation entre p24 et LC3. • Plusieurs outils/techniques pour évaluer le flux autophagique • Confirmation dans les hmDC primaires	512
hpDC primaires	/	• Activation de la voie TLR7 dans les pDC par le VIH ou un ARNss : induit l'autophagie. • Induction nécessaire pour la production d'IFNα par les pDC chargées avec le virus.	• **Induction :** ligands TLR7 (et VIH), RAPA • **Inhibition :** 3-MA	• Nb. puncta LC3+ (IF) • WB Atg7 et LC3-I/II	• Dans les hpDC primaires • Peu de contrôles de l'induction de l'autophagie.	553

Abréviations spécifiques : Ref. : références / N.inf. : non infecté / inf. : infecté / co-inf. : co-infecté / cell. : cellule / mb. : membrane / Nb. : nombre / 2x : double / RAPA : rapamycine / WB : Western Blot IF : immunofluorescence / Gag p24 et Gag p17 : p24 et p17 / siRNAα :siRNA-anti / vs : *versus* / mono : monocytes / coll. : collaborateurs / + : ajout de / vit. D : vitamine D

5.2.3. Autophagie et présentation des antigènes du VIH.

5.2.3.1. In vitro chez l'homme

L'autophagie peut être un régulateur clef de la réponse immune adaptative, dans certains contextes d'infections par divers pathogènes (cf. partie I -C -2). Cependant, malgré les connections entre la voie endocytaire/phagocytaire et l'autophagie (cf. partie I -A -2.1.6.1 et partie I -C -1.1.3), peu d'études ont décrit un rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II (cf. partie I -C -2.1.3). Des DC mises en contact avec le VIH induisent l'activation des clones spécifiques d'épitopes de la protéine Gag[653], mesurée par le pourcentage de lymphocytes sécrétant du TNFα en ICS (intracellular cytokines staining)[512] et de l'IFNγ en ELISPOT[512]. Lorsque l'autophagie est inhibée dans les hMDDC (par des siRNA contre LC3 et Atg5), l'activation des clones T CD4 est fortement diminuée[512]. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie par des drogues comme le 3-MA ou son activation par la rapamycine inhibe et active respectivement la réponse des clones T CD4[512]. Le 3-MA n'a pas d'effet sur l'activation des LT CD8.

En conclusion, inhiber l'autophagie *in vitro* dans des hMDDC qui ont capturé du virus diminue la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II, conduisant à l'inhibition de la réponse LT CD4 spécifique contre le virus. L'autophagie serait donc impliquée dans la présentation par le CMH-II d'antigènes provenant du VIH entrant dans les DC. Les LT CD4 orchestrent les réponses lymphocytaires T CD8 mémoires[771,772] et B[773,774].

5.2.3.2. In vivo chez la souris

Dans des cellules HeLa, la protéine GFPLC3 colocalise en microscopie confocale avec la protéine de fusion entre Gag du VIS et LC3b (VISGagLC3)[601]. De même, VISGagLC3 colocalise avec le marqueur lysosomal LAMP-2 et des compartiments riches en CHM-II dans des cellules de lignées macrophagiques murines (RAW 264.7)[601]. Après un traitement rapamycine, la quantité de VISGagLC3 diminue, suggérant une accélération de sa dégradation par autophagie. Ainsi VISGagLC3 serait acheminée efficacement dans les autophagosomes pour être dégradée dans des compartiments endo/lysosomaux riches en CMH-II.

In vitro, des BMDC murines chargées avec la protéine VISGagLC3 activent de façon plus efficace des lymphocytes T CD4 murins spécifiques de Gag, en comparaison avec les BMDC chargées avec VISGag : la production d'IFNγ par les T CD4 spécifiques de Gag est augmentée jusqu'à dix fois[601]. Ainsi, forcer l'acheminement de VISGag *in vitro* dans les autophagosomes des cellules semble conduire à une meilleure présentation des épitopes de Gag sur les molécules du CMH-II.

In vivo, l'immunisation de souris par transfection de l'ADN codant pour VISGagLC3 puis injection de vecteurs adénoviraux codant pour cette protéine conduit à une meilleure activation de la réponse immune lymphocytaire T CD4, mesurée *ex vivo* en ELISPOT IFNγ, en comparaison avec les souris immunisées par VISGag[601]. Par ailleurs, la poly-fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et CD8 est augmentée, mesurée par la fréquence des lymphocytes qui secrètent l'IL2 et/ou l'IFNγ et/ou le TNFα[601]. Le pourcentage de LT CD4 des souris immunisées SIVGagLC3 secrétant des cytokines est trois à six fois supérieur au pourcentage retrouvé dans les souris immunisées SIVGag, et le pourcentage des LT CD8 est augmenté de deux à trois fois. Enfin, la concentration des anticorps spécifiques de Gag détectés dans le plasma est significativement supérieure dans les souris immunisées VISGagLC3, comparée aux souris immunisées VISGag[601].

Cette étude démontre que l'acheminement d'antigènes (ici Gag du VIS) dans les autophagosomes potentialise *in vivo* les réponses immunes adaptatives cellulaires et humorales. Cette stratégie pourrait conduire à l'élaboration de nouveaux vaccins où des antigènes seraient acheminés dans les autophagosomes et l'autophagie serait activée, pour induire une meilleure protection contre les infections par divers pathogènes.

II - OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

L'autophagie est un mécanisme complexe et régulé aboutissant à la dégradation lysosomale des composants cytoplasmiques (partie I -A -2). Elle joue un rôle important dans l'élaboration des réponses immunes innées (partie I -C -1) et adaptatives (partie I -C -2) contre divers pathogènes. Son importance est illustrée par les multiples mécanismes d'échappement que les bactéries et les virus ont développés au cours de leur évolution (partie I -C -3).

L'impact de l'autophagie sur la réplication du VIH-1 (VIH) et les conséquences (directes ou indirectes) de l'infection sur le flux autophagique ont été décrits dans des lignées cellulaires, dans les LT CD4, et dans les macrophages (partie I -E -). Dans les macrophages infectés, le virus peut-être envoyé dans les autophagosomes pour être dégradé (partie I -E -4.2), mais semble avoir développé des mécanismes d'échappement lui permettant d'utiliser l'autophagie pour promouvoir sa réplication (cf. Tableau 4).

Cependant, peu de données sont disponibles quant aux interactions qui existent entre la machinerie autophagique et le VIH dans les DC (cf. Tableau 5). Pourtant, ces cellules sont parmi les premières à rencontrer le virus dans les muqueuses, et semblent nécessaires pour initier les réponses innées et adaptatives antivirales (parties I -B - ; I -D -2.2 ; I -D -2.3). En collaboration avec notre laboratoire, F. Blanchet a montré *in vitro* que le virus capturé par les hmDC se retrouve rapidement dans des autophagosomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes où ils sont dégradés (partie I -E -5.2). L'inhibition de l'autophagie conduit à un transfert accéléré du virus aux LT CD4. Ainsi, dans les DC, l'autophagie participerait à l'immunité innée antivirale. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules diminue la présentation des antigènes viraux exogènes et l'activation des LT CD4 spécifiques, suggérant que l'autophagie joue aussi un rôle dans l'élaboration de la réponse adaptative contre le VIH.

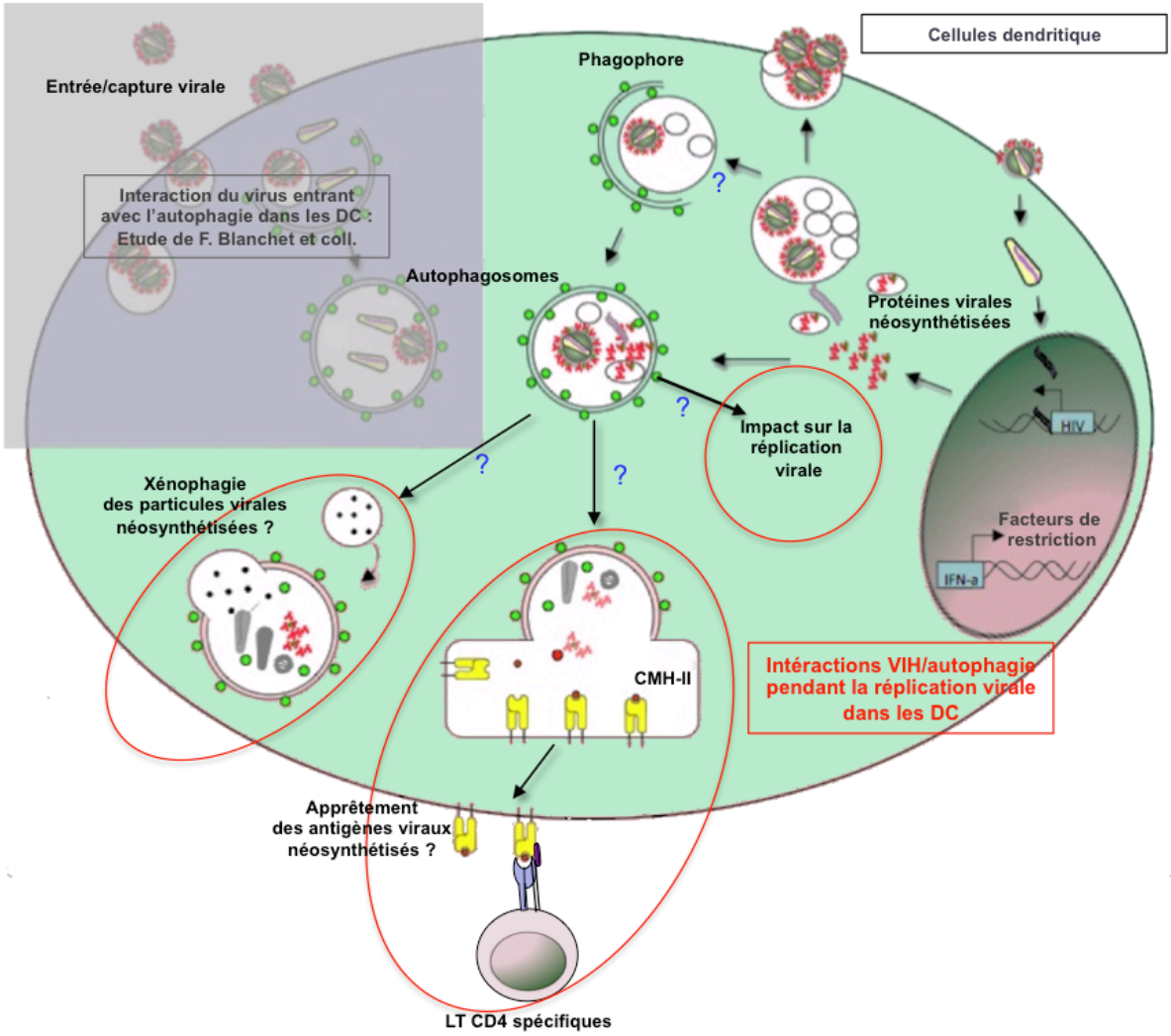
Bien qu'il existe des mécanismes inhibant leur infection, le virus peut se répliquer *in vitro* dans les DC, et des DC infectées sont retrouvées dans les tissus des patients (partie I -D -2). Les DC infectées sont donc susceptibles de participer à l'activation de la réponse lymphocytaire. Cependant, aucune étude n'a encore cherché à déterminer la capacité des DC infectés à présenter les antigènes du VIH néosynthétisés aux lymphocytes T CD4. L'autophagie pourrait jouer un rôle, et avoir un impact sur la réplication virale dans les DC infectées.

Ma thèse s'est donc axée sur les objectifs suivants (cf. Figure 26)

- Déterminer si les DC infectées sont capables de présenter des antigènes viraux néosynthétisés sur les molécules de CMH-II pour activer la réponse LT CD4 spécifique.

- Caractériser le rôle des différentes formes d'autophagie (macroautophagie et CMA) dans l'apprêtement de ces antigènes endogènes sur les molécules de CMH-II, et l'activation des LT CD4 spécifiques.
- Déterminer si augmenter l'apport d'antigènes du VIH dans les autophagosomes des DC peut potentialiser la réponse T CD4 spécifique.
- Déterminer si le VIH peut se retrouver et être dégradé dans les autophagosomes des DC infectées, et si le virus a développé des mécanismes d'échappement. La macroautophagie pourrait dès lors affecter la réplication du VIH dans ces cellules.

Figure 26 – Objectifs de mon projet de thèse



III - RESULTATS

A - PREAMBULE

GENERAL ABSTRACT

HIV-1 manipulates antigen-presenting cells (APC) such as dendritic cells (DC), witch orchestrate innate and adaptive immune responses, in order to propagate in the host and to establish viral reservoirs. We are studying the role of autophagic processes in DC/HIV-1 interactions with a focus on antigen presentation. We have previously shown that macroautophagy in DC participates in the degradation of incoming HIV-1 particles leading to activation of HIV-1-specific (HS) CD4 T cells.

HIV-1 can also productively infect DC. I thus first asked whether neo-synthetized viral proteins might represent an additional source of HIV-1 antigens. Remarkably, I have shown using infected monocyte-derived DC that de novo expression of Gag leads to the activation of HS CD4 T cells, highlighting that this antigen is endogenously processed in order to be presented into MHC-II molecules. Since macroautophagy and chaperon-mediated autophagy (CMA) are known to be involved in this process for other viral antigens and model antigens, I then dissected the role of these two pathways. Using several tools including inhibitors and shRNA, I demonstrated that in HIV-1-infected DC neither macroautophagy nor CMA contribute significantly to the processing of HIV-1-Gag epitopes into MHC-II molecules. I also used a Gag-LC3 fusion protein to specifically channel Gag into LC3+ autophagic vesicles in DC. In this context, inhibiting autophagy dramatically reduced the presentation of HIV-1-Gag epitopes to CD4+ T cells. Strikingly, channelling Gag into autophagosomes generated epitopes that were not processed endogenously in the context of HIV-1 infection. Thus specifically directing HIV-1 proteins toward autophagosomes might influence the repertoire of MHC-II-restricted HIV-1 antigens.

I further analyzed whether autophagy could affect HIV-1 replication in infected DC. In these cells, in contrast to what has been described in macrophages, Gag did not colocalize with LC3 or with the autophagic adaptor p62, suggesting that newly-produced HIV-1 particles are not sequestrated into autophagosomes. The Gag-LC3 fusion protein was used here as a positive control of colocalization. To determine whether my findings might reveal a DC-specific escape mechanism developed by HIV-1, I used various HIV-1 mutants, enhanced autophagic flux using drugs or TLR ligands, and expressed Gag in the absence of other HIV-1 proteins. Overall, my work suggests that HIV-1 does not manipulate autophagy in productively-infected DC. Moreover, modulating autophagy in DC (using shRNA) does not impact HIV-1 replication and propagation.

Finally, my work highlights the complexity of the interactions between the autophagic process and HIV-1 replication in DC. Unlike during viral entry, HIV-1 does not seem to be targeted into autophagosomes after viral replication in infected DC, and autophagy does not contribute significantly to the processing of endogenous viral antigens. Nonetheless HIV-1-infected DC efficiently activates HS CD4 T cells, and targeting HIV antigens into autophagosomes greatly enhances this activation and might broaden the repertoire of MHC-II-restricted antigen. Further dissection of the various routes of endogenous HIV antigen processing would aid in the development of innovative vaccines.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Le VIH-1 manipule les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui orchestrent les réponses immunes innées et adaptatrices, pour se propager dans l'hôte et établir le réservoir viral. Au laboratoire, nous étudions le rôle de l'autophagie dans les interactions entre les cellules dendritiques (DC) et le VIH-1 et la présentation des antigènes viraux. Dans divers modèles, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) semblent en effet être impliquées dans l'apprêtement d'antigènes sur les molécules du CMH. Ainsi, nous avons montré, dans une étude précédente, que la macroautophagie participait à la dégradation du VIH entrant dans les DC, conduisant à l'activation de lymphocytes T (LT) CD4+ spécifiques du VIH-1.

Bien que sa réplication y soit limitée, le VIH-1 peut également infecter productivement les DC. J'ai donc voulu vérifier si les protéines virales néosynthétisées du virus peuvent constituer une source additionnelle d'antigènes. J'ai montré que, de façon remarquable, dans les DC infectées, des antigènes endogènes du VIH-1 peuvent être présentés par les molécules du CMH-II aux LT CD4 spécifiques. En utilisant différents outils, comme des inhibiteurs de l'autophagie ou des shRNA, j'ai montré que ni la macroautophagie ni la CMA ne contribuent significativement à l'apprêtement d'épitopes de la protéine virale Gag néosynthétisée sur les molécules du CMH-II. En parallèle, j'ai utilisé une protéine de fusion, Gag-LC3, pour acheminer spécifiquement Gag dans les autophagosomes (LC3+) des DC. Dans ce contexte, les drogues qui inhibent la macroautophagie réduisent drastiquement la présentation d'épitopes de Gag aux LT CD4. De façon remarquable, la présence de Gag dans les autophagosomes conduit à la génération d'épitopes antigéniques qui, dans le contexte infectieux, ne sont pas apprêtés sur les molécules de CMH-II par la voie endogène. Ainsi, diriger des protéines du VIH dans les autophagosomes conduirait à des variations dans le répertoire des antigènes endogènes présentés sur les molécules de CMH-II.

Pour évaluer l'impact de l'autophagie sur la réplication du VIH dans les DC, j'ai ensuite analysé si la protéine Gag néosynthétisée pouvait être dégradée dans les autophagosomes. Dans les DC infectées, contrairement aux observations déjà décrites dans les macrophages, Gag ne colocalise ni avec les vésicules autophagiques LC3+, ni avec p62, une protéines adaptatrice impliquée dans le ciblage des protéines dans les autophagosomes. Ces résultats suggèrent que, dans ce contexte, les virions nouvellement produits ne sont pas acheminés et dégradés dans les autophagosomes. La protéine de fusion Gag-LC3 est utilisée dans ces expériences comme contrôle positif de colocalisation. Pour déterminer si mes observations pouvaient révéler un mécanisme d'échappement développé par VIH-1, j'ai utilisé différentes souches virales mutantes, modulé le flux autophagique avec des drogues et des ligands TLR, et exprimé Gag dans les DC en l'absence d'autres protéines virales. Dans l'ensemble, mon travail suggère que le VIH-1 ne manipule pas la macroautophagie dans les DC productivement infectées. En outre, la modulation de l'autophagie dans les DC (à l'aide de shRNA) n'a aucune incidence sur la réplication du VIH-1 et sur sa propagation.

Mes travaux mettent en lumière la complexité des interactions entre l'autophagie et le VIH-1 dans les DC. Contrairement à ce qui a été observé lors des étapes d'entrée du virus, le virus ne semble pas être acheminé dans les autophagosomes une fois les DC infectées, et l'autophagie ne participe pas à l'apprêtement des antigènes néosynthétisés sur les molécules de CMH-II. Cependant, les DC infectées activent de façon efficace les LT CD4 spécifiques du virus. Forcer l'acheminement d'antigènes du VIH dans les autophagosomes augmente fortement cette activation, et semble conduire à une diversification du répertoire des épitopes présentés sur les molécules de CMH-II par la voie endogène. Dans le futur, une meilleure compréhension des mécanismes d'apprêtement des antigènes viraux endogènes aidera certainement au développement de vaccins novateurs.

B - ARTICLE

– Soumis à « Journal of Experimental Medicine »

Dendritic cells present newly synthetized HIV antigens through MHC-II molecules to HIV-specific CD4+ T cells - Impact of autophagy.

Pierre-Grégoire Coulon[1,2,3], Stéphanie Graff-Dubois[1,2,3], Angéline Rouers[1,2,3], Fabien Blanchet[4], Alejandra Urrutia[1,2,3], Vincent Piguet[5], Ioannis Theodorou[1,2,3,9], Olivier Schwartz[6], Nicolas Manel[7,8], Sylvain Cardinaud[1,2,3] and Arnaud Moris[1,2,3,9]

Affiliations:

[1] Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Center for Immunology and Microbial Infections - CIMI-Paris, F-75013, Paris, France

[2] INSERM, U1135, Center for Immunology and Microbial Infections - CIMI-Paris, F-75013, Paris, France

[3] CNRS, ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections - CIMI-Paris, F-75013, Paris, France

[4] CNRS, UMR5236, UM1/UM2, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Montpellier, France

[5] Department of Dermatology and Wound Healing, Institute of Infection and Immunity, Cardiff University School of Medicine, Cardiff, Wales, United Kingdom

[6] Institut Pasteur, Unité Virus et Immunité, F-75015, Paris, France

[7] Institut Curie, F-75005 Paris, France

[8] INSERM, U932, F-75005 Paris, France

[9] AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtière, Department of Immunology, F-75013, Paris, France

Present addresses: AU: Institut Pasteur, centre d'Immunologie humaine, F-75015, Paris, France ; SC : INSERM, U955, IMRB, Vaccine Research Institute, F-94010, Creteil, France

Corresponding authors

Arnaud Moris
Center for Immunology and Microbial Infections - CIMI-Paris
INSERM U1135, CNRS ERL8255, UPMC CR7
Faculté de Médecine de l'UPMC
91 Bd de l'Hopital
75013 Paris, France
Email: arnaud.moris@upmc.fr

Running Title: Autophagy targeting diversifies MHC-II epitopes

ABSTRACT

HIV-1 replication in dendritic cells (DC) is limited, which might contribute to pathogenicity by limiting the ability of DC to activate an optimal immune response. The contribution of the covert HIV replication in DC to activation of virus-specific CD4+ T cells is unclear. We examined whether covert HIV replication in DC might produce neosynthesized antigens (Ag) for MHC-II presentation. Using HIV-infected monocyte-derived DC and HIV-specific (HS) CD4+ T cell clones, we demonstrated that *de novo* expression of HIV-1 Gag Ag leads to the activation of Gag-specific CD4+ T cell clones. However, infected DC activate a restricted repertoire of Gag-specific CD4+ T cell clones. Autophagy is thought to play an important role in endogenous pathway of viral Ag presentation to CD4+ T cells. Using drugs affecting autophagy and shRNA, we show that autophagy and chaperone-mediated autophagy do not contribute to the activation of HS CD4+ T cell clones. Nonetheless, ectopic targeting of Gag into autophagosomes revealed that HIV-1 Gag is competent for autophagy-mediated stimulation of specific CD4+ T cells. Remarkably, autophagy-mediated presentation of Gag Ags is very potent and induces the activation of Gag-specific CD4+ T cell clones that are not normally activated by HIV-1-infected DC. Thus, autophagy controls the repertoire of HIV antigens presented by DC to CD4+ T cells. In productively infected DC, HIV-1 Gag is not process by an autophagy-mediated presentation pathway, which has implications for vaccine design.

INTRODUCTION

The recent discovery of broad and potent HIV-1 neutralizing antibodies (bnAbs) renewed optimism for developing a vaccine against HIV-1 (Chiodi and Weiss, 2014). However, bnAbs arise late in the course of HIV-1 (HIV) infection and their generation requires multiple rounds of B cell receptor (BcR) affinity maturation. CD4+ T helper cells control key steps of B cell fate, including BcR maturation and class switch recombination, and B cell differentiation into long-lived Ab secreting plasma cells (Petrovas and Koup, 2014). In addition, during viral infections, CD4+ T cells are critical in the generation and maintenance of potent antiviral cytotoxic CD8+ T cell (CTL) responses (Sun and Bevan, 2003; Sun et al., 2004). In HIV infection, the persistence of HIV-specific (HS) CD4+ T cells secreting IL-21 seems to correlate with enhanced HS CTL activity and control of viral infection (Chevalier et al., 2011). Thereafore, understanding the basis of CD4+ T cell activation is of utmost importance (Porichis and Kaufmann, 2011).

CD4+ T cells recognize their cognate peptide antigen (Ag) presented by Major Histocompatibility Class-II molecules (MHC-II) on the surface of antigen presenting cells (APC), including B cells, macrophages and dendritic cells (DC). It is widely assumed that MHC-II display peptides exclusively derived from extracellular Ag. In this “classical” pathway, extracellular Ag are captured, routed in endosomes where they are progressively processed by an array of proteases to be eventually loaded in late endosomes as short peptides (or epitopes) onto nascent MHC-II (Mantegazza et al., 2013). However, there are numerous exceptions to this rule (Eisenlohr et al., 2011). Polarized secretion of proteases at the B cell immunological synapse leads to Ag processing in extracellular space (Yuseff et al., 2011) and potentially epitope loading on cell surface MHC-II (Moss et al., 2007). Epitopes derived from exogenous virus can also bind, in early endosomes, on recycling MHC-II (Pinet et al., 1995; Sinnathamby and Eisenlohr, 2003). Some influenza Ag can be retro-translocated in the cytosol and processed by the classical MHC-I processing machinery dependent on proteasome cleavages and TAP pumps (Tewari et al., 2005). Using Measles virus infection, early studies also demonstrated that endogenous, meaning neo-synthesized, viral Ag are presented on MHC-II molecules for the activation of CD4+ T cells (Jacobson et al., 1988; Sekaly et al., 1988). In fact, depending on the Ag source, localization and the type of APC, a single epitope might be processed by different routes (Miller et al., 2013; Nuchtern et al., 1990).

Recent evidences suggest that the mechanism of autophagy participates at steady states (Dengjel et al., 2005) and upon infection (Paludan et al., 2005), in the processing of MHC-II Ag. Autophagy allows eukaryotic cells to digest the content of their own cytoplasm through lysosomal routes (Mizushima, 2007). The mechanisms of autophagy include macroautophagy (here referred to as autophagy) and chaperone-mediated autophagy (CMA) that have both been implicated in Ag presentation by MHC-II (Zhou et al., 2005). Autophagy involves *de*

novo formation of a double membrane that sequesters a portion of cytoplasm in an autophagosome that matures into a lytic vesicle (autophagolysosome) (Esclatine et al., 2009). CMA does not involve vesicular trafficking (Majeski and Dice, 2004). In this process, soluble proteins are selected by a complex of cytosolic chaperones and translocated into lysosomes by a membrane receptor (LAMP-2A) (Bandyopadhyay et al., 2008). As for the ubiquitin/proteasome system (UPS), autophagy and CMA participate in quality control of proteins aggregates and thus affects Ag presentation (Wenger et al., 2012). The participation of autophagy in MHC-II Ag presentation has been studied in APC expressing tumor-derived or transfected Ag (Dorfel et al., 2005; Ireland and Unanue, 2011; Schmid et al., 2007) and in the context of infections, with attenuated bacteria (Jagannath et al., 2009) or with herpes viruses, including Epstein Bar virus (EBV) (Leung et al., 2010; Paludan et al., 2005) and Herpes simplex virus (HSV) (Lee et al., 2010). Mice with selective impairment of autophagy in conventional DC, displayed reduced capacity to process MHC-II-restricted HSV-1 Ag (Lee et al., 2010). In contrast, alterations of autophagy in Influenza infected mouse DC or fibroblast had no impact on the activation of anti-flu CD4+ T cells (Comber et al., 2011). Interestingly, autophagy was initially described as involved in the processing of intracellular/endogenous MHC-II Ag (Paludan et al., 2005). However, together with Lee *et al.* (Lee et al., 2010), we provided evidence that it also participates in exogenous MHC-II Ag presentation (Blanchet et al., 2010). Using human DC, we demonstrated that the inhibition of autophagy with drugs or siRNA reduced HIV particle degradation and HIV Ag presentation to HS CD4+ T cell clones (Blanchet et al., 2010). Therefore, the impact of autophagy on antiviral CD4+ T cell activation might vary depending on the antigen source, the infection and/or escape mechanisms developed by viruses.

It has been proposed that HIV subverts the migration properties of DC to get access to CD4+ T cell rich compartments in lymph nodes (Steinman, 2000). However, DC do not provide such a protective environment for the virus. In fact, most HIV particles are rapidly degraded upon DC encounter (Moris et al., 2004; Turville et al., 2004), providing material for MHC-II Ag presentation (Blanchet et al., 2010; Moris et al., 2006; Rodriguez-Plata et al., 2012). We previously reported that lectins such as DC-SIGN promote MHC-II-restricted HIV Ag presentation (Moris et al., 2006), but also that autophagy contributes to the processing of incoming viral particles (Blanchet et al., 2010). In addition, highlighting the diverse fate of viral particles, we showed that the amount of virus captured by DC does not necessarily correlate with better T cell activation (Rodriguez-Plata et al., 2012). Nevertheless, some HIV particles escape degradation and are either directly transmitted to CD4+ T cells by *trans*-infection or initiate *cis*-infection of DC (Blanchet et al., 2010; Coleman et al., 2013; Moris et al., 2006). DC express HIV-1 receptors (CD4, CCR5, CXCR4), allowing productive infection (Granelli-Piperno et al., 1998; Nobile et al., 2005). In these cells, HIV-1 replication is very limited due to the expression of viral restriction factors such as APOBEC3s (Pion et al., 2006)

and SAMHD-1 (Laguette et al., 2011). But residual/covert HIV replication in DC might be sufficient to produce antigens for MHC-II presentation.

In the present study we asked whether HIV-infected DC could activate HS CD4+ T cell clones. Using monocyte-derived DC and model cells lines, we demonstrated that *de novo* expression of HIV-Gag Ag leads to the activation of Gag-specific CD4+ T cell clones. Remarkably, this endogenous presentation of HIV-Gag Ag is epitope dependent, as infected DC activate some but not all Gag-specific CD4+ T cell clones. To our surprise, we show that autophagy and CMA do not contribute to the activation of Gag-specific CD4+ T cell clones by infected cells. Nonetheless, we demonstrate that an engineered specific targeting of HIV-Gag to autophagosomes promotes Gag-specific CD4+ T cell activation and broaden the repertoire of activated T cells. Our work unravels novel pathways of MHC-II-restricted HIV antigen presentation.

RESULTS AND DISCUSSION

HIV-infected cells present newly synthetized endogenous HIV Ag to HS CD4+ T cells

We first analyzed the capacity of HIV-infected DC to activate HS CD4+ T cells. To this end, monocyte-derived DC (MDDC) were infected with an HIV-1-R5 strain (HIV_{Yu2b}) in the presence or absence of antiretroviral drugs (ART) (Fig. 1 A). We used a combination of two reverse transcriptase inhibitors (AZT and NVP) to block HIV DNA synthesis and subsequent expression of newly synthetized HIV proteins. Viral propagation was then monitored by flow cytometry (intracellular Gag staining; Fig. 1 B). As expected, 5 days post infection (p.i.) we observed a limited but significant replication of HIV that was abolished by ART, with 2.1 and 0.1 % Gag+ cells respectively (Fig. 1 B). We compared the ability of HIV-infected and ART-treated DC to activate L11, an HS CD4+ T cell clone. L11 recognizes an immunodominant epitope from Gag p24 (gag2) presented by HLA-DRb1*04, as previously described (Moris et al., 2006). T cell activation was evaluated by IFNg, TNFa, IL-2 and MIP1b intracellular cytokine staining (ICCS) (Fig. S1). Remarkably, HIV-infected DC induced the secretion of multiple cytokine/chemokine upon L11 activation (Fig. 1 C and Fig. S1). In contrast, DC exposed to the same viral dose but not infected (HIV+ART) failed to activate L11. These results suggest that ongoing viral replication is required to achieve HS CD4+ T cell activation. Furthermore, as an additional control, uninfected DC were incubated overnight with the supernatant of HIV-infected cells (in the presence of ART to avoid *de novo* infection) and co-cultured with HS CD4+ T cells (Fig. 1 C, Ni+Sup of (1)). This treatment of DC did not allow L11 activation, suggesting that, in our culture conditions, HIV Ag released by HIV-infected cells are not sufficient to activate HS CD4+ T cells.

The expression of viral envelopes (Env) enhances exogenous viral Ag presentation (Moris et al., 2006; Testa et al., 2010). We, thus, extended these findings using an HIV strain lacking Env expression ($HIV_{\Delta Env}$). To allow HIV entry, $HIV_{\Delta Env}$ was pseudo-typed with the vesicular stomatitis virus G-protein ($HIV_{VSV\Delta Env}$) and used to infect MDDC (Fig. 1 D). 5 days p.i., 2.2 % of DC were infected (Gag+) while, as expected, ART blocked DC infection (Fig. 1 D). $HIV_{VSV\Delta Env}$-infected DC induced a robust activation of L11 (Fig. 1 E). In contrast, ART-treated DC and DC loaded with the supernatant of infected cells induced only a residual background stimulation of L11 (Fig. 1 E). This data strongly suggest that ongoing viral replication and Gag expression by the APC are required to achieve L11 activation, at least 5 days p.i..

To further demonstrate that neosynthetized Gag is the source of Ag, we used Hela-CIITA cell line as a model APC (Stumptner-Cuvelette et al., 2001). The transactivator CIITA drives in Hela cells, the expression of MHC-II and other molecules required for MHC-II trafficking and loading. Of note, while this cell line constitute an interesting model for the study of MHC-II-mediated Ag presentation, Hela-CIITA cells exhibit, however, minimal APC specialization (Bania et al., 2003). Remarkably, the transfection of HIV proviral DNA in

these cells leads to Gag expression (Fig. S2 A and B) and the activation of F12 (Moris et al., 2006), a HS CD4+ T cell specific for gag2 and restricted by HLA-DRb1*01 (expressed by Hela-CIITA cells) (Fig. S2 C).
Collectively, our results demonstrate that productive infection and/or expression of neo-synthetized HIV Gag antigens in APC allow the activation of HS CD4+ T cells. This process is very efficient since a residual replication (2 % of infected DC) is sufficient to induce a robust activation and the secretion, by HS CD4+ T cells, of various lymphokines such as IFNa, TNFa, IL-2 and MIP1b.

Endogenous presentation of HIV-Gag Ag is epitope dependent

We sought to compare the capacity of HIV-infected DC to activate various HS CD4+ T cell clones. To this end, DC were infected (+/- ART) fro 5 days and co-cultured with two distinct HS CD4+ T cell clones, F12 and IV-9 (Fig. 2). The clone F12 which was derived from the same individual as L11 (used in Fig. 1), recognizes gag2 but presented by HLA-DRb1*01 (Fig S2 and (Moris et al., 2006)). The clone IV-9 recognizes a distinct epitope from Gag p24, gag1, also presented by HLA-DRb1*01 (Moris et al., 2006). As expected, productive DC infection was required to activate F12 (Fig. 2 A, right panel), further confirming that neosynthetized gag2 epitope is presented by MHC-II molecules. In contrast, 5 days p.i., the clone IV-9 was neither activated by HIV-infected DC nor by ART-treated DC as evidenced in several independent experiments (Fig. 2 B). The absence of IV-9 activation was not due to inappropriate HLA-DR presentation since DC pulsed with the cognate gag1 peptide, used as a positive control, activated IV-9 (Fig. 2 B, right panel). The results presented in Fig. 2 A and B were generated using MDDC isolated from different blood donors. To eliminate the possibility of intrinsic donor variations, we compared the capacity of HLA-DRb1*01+ MDDC derived from the same individual in activating F12 and IV-9 (Fig. 2 C). As previously, we observed that infected (Gag+) DC were able to activate F12 but failed to activate IV-9 (Fig. 2 C). As an additional control, DC were also incubated in the presence of ART with a high viral inoculum only 16h prior co-culture with HS CD4+ T cell clones (Fig. 2 C). Under these experimental conditions, the source of HIV Ag corresponds to the incoming viral particles (Moris et al., 2006). We previously showed that F12 but also IV-9 can be activated by HIV-pulsed DC (Moris et al., 2006). Indeed, HLA-DRb1*01+ DC loaded with HIV particles for 16h, in the presence of ART, activated both F12 and IV-9 (Fig. 2 C). These results conclusively demonstrated that productively infected DC failed to activate the clone IV-9 while DC loaded with exogenous HIV Ag did.
In sum, we show that a single epitope (gag2) can be processed from the viral inoculum (exogenous route) but also from neosynthetized Gag (endogenous route). In contrast, gag1 appeared to be exclusively processed by the exogenous route, therefore, strongly suggesting that exogenous and endogenous Gag Ag processing routes might rely on distinct cellular pathways.

Autophagy does not contribute to endogenous presentation of HIV-Gag Ag

We previously demonstrated that the presentation of gag2 epitope by HIV-loaded DC to HS CD4+ T cell clones is at least partially dependent on autophagy (Blanchet et al., 2010). In HIV-infected DC, we thus questioned whether autophagy might be involved in endogenous presentation of gag2. To this end, DC were infected for 4 days and treated with drugs affecting autophagy for an additional 16 hour prior co-culture with L11 (Fig. 3 A). Autophagy modulation was assessed by measuring the conversion of LC3-I to LC3-II, an autophagy-related protein critically required for autophagosome formation, via Western blotting (WB) (Mizushima, 2007) (Fig. 3 B). As expected, increasing concentrations of 3-methyladenine (3-MA), an autophagy inhibitor, blocked in a dose dependent manner the conversion of LC3-I to LC3-II in DC lysates (Fig. 3 B, left panel). In contrast, Torin-1 a potent inducer of autophagy induced a strong accumulation of LC3-II (Fig. 3 B, right panel). Drug treatments did not affect the viability of the cells (not shown) and the capacity of peptide pulsed DC to activate L11 (Fig. 3 C right panel). Whatever the treatments, modulating autophagy with drugs did not impact the percentage of Gag+ cells (not shown) and more importantly the capacity of HIV-infected DC to activate L11 (Fig. 3 C).

However, a 16h incubation with the drugs might not be sufficient to allow recycling of HIV-Ag loaded MHC-II molecules. We, therefore, tried to increase the incubation times and the concentration of drugs but we noticed that this various treatments had a major impact on cellular viability (not shown) (Klionsky et al., 2012). We then analyzed the role of autophagy using shRNA-mediated specific inhibition of this pathway. To this end, we screened a pool of shRNA targeting LC3 and selected two shRNA, which were, thereafter, used as a pool. MDDC were transduced with these anti-LC3 shRNA and with an irrelevant control shRNA both encoding GFP (Fig. 4 A). SIV-Vpx was used to enhance the transduction efficiency (Berger et al., 2011), and GFP expression was monitored by flow cytometry (Fig. 4 D, left panel). LC3 down-modulation was evaluated using WB and confocal imaging (IF) (Fig. 4 B and C). Four days post-transduction, DC were then infected with HIV for an additional 4 to 5 days (Fig. 4 A). The percentage of GFP+ and infected Gag+ cells was analyzed by flow cytometry prior co-culture with L11 (Fig. 4 D). Depending on DC preparations, we observed 25 to 50 % of GFP+ cells. We noticed a preferential infection of transduced GFP+ cells (75 % of Gag+ cells were GFP+, Fig. 4 D) most likely due to Vpx-mediated sustained degradation of the viral restriction factor SAMHD1 (Berger et al., 2011; Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011). As expected, DC treated with the control shRNA and productively infected with HIV induced a robust activation of F12 (Fig. 4 E). In contrast, DC loaded with HIV in the presence of ART and incubated with the supernatant of infected cells induced residual background stimulation (Fig. 4 E). In agreement with experiments in which autophagy flux was pharmacologically modulated (Figure 3), reducing LC3 expression in infected cells did

not influence HS CD4+ T cell activation as compared to control shRNA treated cells (Fig. 4 E).

The LC3 family of enzyme includes various members, LC3A-C, GABARAP and GABARAPL1-3 which might have redundant functions (Mizushima, 2007). Although we observed by WB and IF a major inhibition of LC3-I and LC3-II expression using shLC3 and anti-LC3 antibodies specific for LC3A-C, we could not formally exclude that we failed in inhibiting the appropriate LC3 isoform involved in Ag presentation. We thus undertook an alternative approach to ascertain the role of autophagy in HS CD4+ T cell activation. To this end, we used a transdominant mutant of Atg4B (Atg4BC74A), previously reported to block the conversion of LC3-I to LC3-II and thus the closure of autophagosome (Fujita et al., 2008) (Fig. S3). We cloned Atg4BC74A into a lentiviral vector to overexpress this mutant in DC. Transduction of Atg4BC74A in DC (monitored using by strawberry expression using flow cytometry) was very efficient ranging from 50 to 85% of transduced cells (Fig. S3 B, left panel). As expected, transduced cells failed to form autophagosomes, as evaluated by confocal imaging of LC3 puncta (Fig. S3 A). As described, abolishing autophagosome formation did not impact the capacity of HIV-infected cells to activate L11 (Fig. S3 C). Note that, similar results were obtained using the clone F12 (not shown).

Taken together, these results suggest that autophagy does not play a major role in the processing and presentation of HIV gag2 epitope by infected DC. In order to fully confirm that autophagy does not impact the presentation of neo-synthetized gag2 Ag, we stably invalidated LC3 expression or over expressed Atg4BC74A in Hela-CIITA cells using the corresponding lentiviral vectors (Fig. S4). Down regulation of LC3 expression and the inhibition of autophagy by Atg4BC74A were confirmed by WB using anti-LC3 and anti-p62 antibodies, respectively (Fig. S4 B and D). Of note, p62 (also called SQSTM-1) is a cellular target of autophagy degradation whose accumulation is a classical marker of autophagy inhibition (Blanchet et al., 2010). LC3- and Atg4BC74A+ Hela-CIITA cells were then transfected with HIV proviral DNA (Fig. S4 A), co-cultured with F12 and T cell activation monitored by ICCS (Fig. S4 C and E) or IFNg-Elispot (not shown). As observed with DC, abolishing autophagosome formation did not impact the capacity of HIV-infected cells to activate F12.

Collectively, this data strongly argue that autophagy plays a minor role, if any, in the presentation of endogenous neosynthetized Gag Ag by APC.

HIV Nef does not significantly impact endogenous presentation of HIV-Gag Ag

By the means of accessory viral proteins like Nef, HIV developed multiple strategies to manipulate the trafficking of cellular receptors and vesicles (Basmaciogullari and Pizzato, 2014). In particular, Nef induces a strong accumulation of surface-immature MHC-II molecules that have reduced capacities to present exogenous peptide to Ag-specific CD4+ T cells (Stumptner-Cuvelette et al., 2001). In addition, in infected macrophages, it has been

reported that Nef might favor HIV release while impeding viral degradation by inhibiting the maturation of autophagosomes into autolysosomes (Kyei et al., 2009). We thus asked whether Nef might influence the ability of infected cells to activate HS CD4+ T cells. To this end, MDDC were infected with wild-type and *nef*-deficient HIV ($HIV_{\Delta Nef}$) (Fig. 5). 5 days p.i., $HIV_{\Delta Nef}$ readily infected DC but the percentage of infected cells was slightly reduced as compared with HIV wild-type, 1.8 and 2.2 % of Gag+ cells respectively (Fig. 5 A). This was expected, as Nef affects various steps of viral replication (Basmaciogullari and Pizzato, 2014). Nonetheless, $HIV_{\Delta Nef}$-infected cells activated HS clones to a similar extent as HIV wild-type (Fig. 5 B). We further asked whether the presentation of endogenous Ag by HIV_{DNef}-infected DC might be affected by autophagy flux impairment in cells transduced with shLC3 or ATG4BC74A lentivectors (Fig. 5). Autophagy inhibition was controlled as previously by confocal IF or WB using anti-LC3 Ab (not shown). Inhibiting autophagy flux with shLC3 or Atg4BC74A was neither impacting on the percentage of Gag+ cells (Fig. 5 C and E) nor on L11 activation (Fig. 5 D and F). These data demonstrate that the viral protein Nef does not significantly alter the capacity of HIV-1-infected DC to activate HS CD4+ T cells.

Chaperone Mediated Autophagy is not involved in endogenous presentation of HIV-Gag Ag

CMA has been shown to participate in the processing and presentation of a cytoplasmic self-antigen to Ag-specific CD4+ T cells (Zhou et al., 2005). We thus predicted and cloned an shRNA specific for the CMA receptor, LAMP-2A. Transduction of shLAMP-2A into DC or Hela-CIITA cells inhibited specifically LAMP-2A expression as assessed by WB and RT-qPCR (Fig. 6 A and Fig. S5 A-B). As in Fig 4 A, DC were transduced, infected and co-cultured with L11. We observed that downregulation of LAMP-2A expression did not have a significant impact on the percentage of Gag+ DC (Fig. 6 B) or on the capacity of infected-DC to activate HS cells (Fig. 6 C). Importantly, reducing LAMP-2A expression in cells did not affect their capacity to present the cognate peptide (Fig. 6 C and S5 C, right panels). Similar results were obtained in Hela-CIITA cells impaired for LAMP-2A expression (Fig. S5 C) further arguing against any role of CMA in MHC-II-mediated presentation of neo-synthesized HIV-derived Ag

Targeting Gag to autophagosomes strongly enhances HS CD4+ T cell activation and reveals novel MHC-II-restricted endogenous epitopes.

Directing of viral Ag or epitope to autophagosomes were reported to enhance Ag-specific CD4+ T cells activation (Comber et al., 2011; Schmid et al., 2007). We thus wondered whether targeting Gag to autophagosome could boost to HS CD4+ T cell activation. In a similar approach to Schmid and colleagues, we fused LC3 at the C terminus of Gag p41 leading to the fusion protein p41LC3 (Fig. S6 A). As expected, when transduced in MDDC or Hela-CIITA, p41LC3 co-localized with GFPLC3 (Fig.7 A and Fig. S6 B). We compared the

subcellular localization of p41LC3 with Gag from infected DC (Fig.7 A) and, as expected from our results obtained in Ag presentation assays, Gag in infected DC did not colocalize with GFPLC3 (Fig.7 A). DC transduced with p41LC3 were then co-cultured with L11 and T cell activation was monitored by ICCS. Remarkably, although the transduction levels were very weak with only 2 % of DC expressing p41LC3 (Fig. 7 B)), p41LC3 expression lead to a very strong stimulation of HS clones (Fig. 7 C). T cell activation was reduced to background levels when DC were transduced in the presence of ART (Fig. 7 C). In addition, prior to co-culture, a 16h incubation of p41LC3-transduced DC with 3-MA, inhibited HS T cell activation in a dose-dependent manner (Fig. 7 C). As shown previously, DC treated with 3-MA and pulsed with the cognate gag2 peptide had no impact on HS T cell activation (Fig. 7 C). These results show that an autophagy-dependent processing of HIV-1-Gag, when specifically delivered into autophagosomes, allows a strong and sustained HS CD4+ T cell activation.

We then compare the efficiency of p41LC3-tranduced DC and HIV-1-infected DC in activating HS CD4+ T cells. Although the percentage of Gag+ cells was lower when compared to HIV-1-infected cells (1 versus 3.5 %, respectively) (Fig. 7 D), the p41LC3-transduced DC induced a stronger activation of the HS CD4+ T cell clone (16% versus 11 % of activated T-cells) (Fig. 7 E). Similar results were obtained when using Hela-CIITA cells transfected with p41LC3 and cocultured with HS CD4+ T cell clones (Fig. S6 C). To conclusively demonstrate the role of the autophagy pathway in processing of p41LC3 and consequently enhancing T cell activation, we used two additional controls (Fig S6). First, in order to abrogate the coupling of LC3 with autophagosome membrane (Schmid et al., 2007), we introduced a G120A mutation in the C-terminus of LC3 from our p41LC3 fusion construct (Fig. S6 A). This engineered p41LC3$_{G120A}$ construct should not target p41 to autophagosomes, as confirmed by the lack of colocalization with GFPLC3 in transfected Hela-CIITA cells (Fig. S6 B). A second approach was to transfect p41LC3 in Hela-CIITA stably expressing Atg4BC74A, the dominant negative protein inhibiting autophagy flux. When using both approaches, we observed that p41LC3$_{G120A}$ or p41LC3+Atg4BC74A expressing Hela-CIITA cells activated F12 to similar levels than Hela-CIITA transfected with HIV proviral DNA or a plasmid encoding solely Gag (Fig. S6 C). Thus, functional coupling of Gag to LC3 strongly enhances APC-mediated HS CD4+ T cell activation in an autophagy-dependent manner.

We then analyzed the capacity of p41LC3-tranduced DC to activate the IV-9 HS CD4+ T cell clone, shown to be exclusively activated upon MHC-II-mediated presentation of exogenous HIV particles from challenged DC but not by productively HIV-1-infected DC (see Fig. 2 B and C). Remarkably, 1.8 % of p41LC3+ DC was sufficient to induce a robust activation of IV-9, reaching up to 20 % of activated cells (Fig. 7 F and G). As reported above, infected DC (2.5 % of Gag+ cells) failed in activating IV-9 (Fig. 7 F and G). Therefore, while processing of exogenous HIV-1 Ag by autophagy contributes to HS CD4+ T cell activation, we uncovered that the specific targeting of HIV-1-derived Ag to autophagosomes not only

enhances T cell activation but might also broaden the repertoire of endogenous MHC-II-restricted epitopes.

CONCLUDING REMARKS

HS CD4+ T cells play a critical role in HIV infection. The breadth and specificity of HS CD4+ T cell responses are associated with improved viral control and low viremia during acute and chronic infection, respectively (Ranasinghe et al., 2012; Schieffer et al., 2014). In particular, the generation of anti-Gag CD4+ T cells during acute infection correlates with better disease outcome (Schieffer et al., 2014) and its maintenance is associated with better viral control (Ranasinghe et al., 2012). Furthermore, there is an association between certain HLA-DRβ1 alleles and anti-Gag CD4+ T cell activity with delayed disease progression (Ranasinghe et al., 2013).

MHC-II can present Ag from various origins. We previously showed that HIV virions can be captured and processed by DC leading to Gag-specific CD4+ T cell activation (Moris et al., 2006). We extend these observations by showing that infected cells can process and present newly synthesized Gag Ag to HS CD4+ T cells. This pathway requires *de novo* synthesis of Gag and does not rely on Ag transfer. Remarkably, this endogenous presentation of Gag Ag is epitope dependent as infected DC activate some but not all Gag-specific CD4+ T cell clones. Thereafter, this endogenous pathway is not redundant with the exogenous route of HIV Ag presentation and offers a distinct possibility for the immune system to activate HS CD4+ T cells.

Exogenous HIV antigens are routed toward endolysosomal compartment and processed at least partially through autophagy (Blanchet et al., 2010; Moris et al., 2006). To our surprise, we now show that autophagy does not contribute significantly to the processing of endogenous HIV Ag in infected DC. Nonetheless, we confirm that autophagy connects with the MHC-II loading machinery as a specific targeting of Gag into autophagosomes leads to the stimulation of Gag-specific CD4+ T cells. As for influenza Ag but also Gag from the simian immunodeficiency virus (SIV) (Jin et al., 2014; Schmid et al., 2007), we observed that Ag targeting to autophagosomes promotes CD4+ T cell activation. Directing Gag to autophagy degradation also permits the activation of Gag-specific CD4+ T cell clones that are not activated by HIV-infected DC. Thereafter, depending on their cellular localization endogenous HIV Ag can be processed by at least two distinct routes.

In conclusion, we unravel a novel source of HIV Ag for CD4+ T cell activation. The various routes of endogenous HIV Ag processing might broaden the repertoire of MHC-II-restricted HIV Ag. Further dissecting these pathways, in particular in B cells, might help in the development of innovative vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Cells

PBMC from HLA-DRb1*-matched HIV-1 seronegative donors were purchased from the Etablissement Français du Sang of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). Purified monocyte populations were isolated with CD14+ magnetic beads (Miltenyi Biotec) and cultured with RPMI 1640 containing 10% FBS (Invitrogen), 20 ng/ml GM-CSF, and 2 ng/ml IL-4 (Miltenyi Biotec) for 4 to 5 days to obtain MDDC. This procedure classically yielded immature DC (CD1a+, MHC-I+, MHC-II+, CD83-, CD80-low, CD86-low) (Moris et al., 2006).

Hela-CD4+-CIITA cells were kindly provided by P. Benaroche (Institut Curie, Paris, France) and maintained in RPMI 1640 containing 10% FBS supplemented with 0,5 mg/ml G418 and 50 µg/ml Hygromycin (Life Technologies).

HIV-1-specific CD4+ T cell clones

The F12 and L11 HS CD4+ T cell clones specific for HIV p24Gag (gag2: aa 271–290), restricted by HLA-DRb1*01 and HLA-DRb1*04, respectively and the IV-9 HS CD4+ T cell clone specific for HIV p24Gag (gag1: aa 311–350), restricted by HLA-DRb1*01 were used to monitor MHC-II Ag presentation (Moris et al., 2006). The T cell clones were restimulated and expanded, as previously described (Moris et al., 2006), using irradiated feeders and autologous lymphoblastoid cell lines loaded with cognate peptides in T cell-cloning medium (RPMI 1640 containing 5% serum AB (Institut Jacques Boy), 100 U/ml recombinant human IL-2, and 1 µg/ml of PHA (PAA) complemented with nonessential amino acid and sodium pyruvate (Life Technologies)). At least 4 h before co-culture with APC, T cell clones were thawed and allowed to rest in cloning medium without PHA.

Viral stocks, lentiviral vectors and plasmids

Replication-competent CCR5-tropic HIV-1 (HIV_{Yu2b}), Nef-deficient HIV-1 ($HIV_{Yu2b\Delta Nef}$) and Envelope-deficient HIV-1 ($HIV_{Bru\Delta Env}$) were generated as previously (Moris et al., 2004) by transfection in 293T cells. $HIV_{Bru\Delta Env}$ was pseudotyped with the envelope from vesicular stomatitis virus (VSV) to allow a single round of infection (Moris et al., 2004). The p24Gag content of all viral stocks was measured using an ELISA (PerkinElmer).

Strawberry-Atg4BC74A and GFPLC3 cloned into pE-C1 (U55763) were kindly provided by T. Yoshimori (Osaka University; Suita, Osaka, Japan) and G. Kroemer (IGR, Paris, France) respectively (Fujita et al., 2008; Kabeya et al., 2000). p41LC3 was cloned into pEGFPLC3-C1 by replacing GFP with the Gag p41 encoding sequence from HIV_{Bru} (kindly provided by F. Tangy, Institut Pasteur, Paris, France). Strawberry-Atg4BC74A, GFPLC3 and p41LC3 were then inserted in the lentiviral vector pTRIPdeltaU3-CMV using NheI and KpnI restriction sites (see Fig. S 6). The G120A mutation was introduced in p41LC3 using (5'-

AGCCAGTGCTGTCGCGAACGTCTCCTG-3') primer with QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). pTRIPdeltaU3-CMV-Gag has been already described (Manel et al., 2010).
The shCTRL and shLC3 were purchased (Open Biosystems). The impact of the anti-LC3B shRNA set (RHS4531-EG81631) and anti-LC3A shRNA set (RHS4531-EG84557) on LC3 expression was assessed in 293T cells upon transfection of the plasmid DNA (not shown). Two shRNA targeting LC3B (V2LHS_226621 and V3LHS_408637) were selected for their capacity to inhibit LC3-I and LC3-II in WB and were subsequently used as a pool. The shRNA targeting LAMP-2A was generated according to manufacturer (Paddison et al., 2004) by cloning the siRNA (5'-TCTGCAACCTGATTGATTATAT-3') in pGIPZ Lentiviral shRNA plasmid (Open Biosystems). Lentiviral particles were produced by transfection of 293T cells (Berger et al., 2011).

HIV infection, transduction and transfection

MDDC were exposed to the indicated viruses (at a concentration ranging from 100 or 500 ng/mL of p24) for 3 to 4 hours at 37°C, washed, and cultured in medium with IL-4 and GM-CSF. In the HIV+ART conditions, DC were loaded as before with HIV but in the presence of 5 µM AZT and 1.2 µM NVP. AZT and NVP were maintained in the culture medium and renewed every second day. At the indicated time points, DC infection was monitored using anti-Gag Ab (KC57-FTIC or -PE, from Beckman Coulter) and flow cytometry. Cell transductions were performed as described (Berger et al., 2011) in the presence of SIV-Vpx (kindly provided by A. Cimarelli, CIRI, Lyon, France) to enhance the transduction efficiency. Transduction efficiency was monitored using GFP expression or Strawberry for pGIPZ shRNA lentiviral vectors or the expression of Atg4BC74A, respectively (Fujita et al., 2008) by flow cytometry. Hela-CIITA stably expressing pGIPZ shRNA-LC3 or pAtg4BC74A were obtained by transduction and subsequent selection using puromycin (3 µg/ml). Hela-CIITA cells were transfected with HIV_{Yu2b} encoding plasmid using calcium chloride (Casartelli et al., 2010).

Ag-presentation assays

Four to 5 days p.i., HLA-DRb1*-matched DC productively infected with the indicated strain of HIV or exposed to HIV (HIV+ART) were washed and incubated for 6 hours with HS CD4+ T cell clones at a 1:2 ratio (1 T/2 DC). As additional controls for endogenous Ag presentation, uninfected DC were loaded overnight in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells prior co-culture with T cells. Eventually, the two controls: HIV+ART and uninfected DC exposed to the supernatant were pooled. To monitor HIV Ag exogenous presentation, DC were exposed to HIV at the indicated concentrations 16h prior to the co-culture with T cells in the presence of ART. Transfected Hela-CIITA cells were co-cultured with T cells 3 days post-transfection. As positive controls, stimulator cells were

incubated with cognate peptides (at 0,5 µg/mL) and effector cells treated either with PMA (50 ng/mL; Sigma) in combination with a calcium ionophore (calcimycin, 1 µg/mL; Calbiochem). Brefeldine-A1 (BFA, 5 µg/mL; Sigma) was added 5 hours before staining. Cell-surface stainings were performed at 4°C for 30 minutes using anti-CD4 (13B8.2-APC; Beckman-Coulter, Hialeah, FL), anti-CD3 (SP34-2-PerCP; BD-Pharmingen, San Diego, CA), or anti-DC-SIGN (120507-APC/-PE; R&D) mAbs. Cytokine production was then detected using intracellular staining. Briefly, cells were fixed (4% PFA, 10 minutes), washed, and permeabilized (PBS, 0.1% BSA, 0.05% saponin, 15 minutes) prior to mAb staining. The following antibodies were used: anti-IL-2 (MQ1-17H12-PE), anti-IFNg (B27-PE), anti-TNFa (11-PE) (all from BD-Pharmingen) and anti-MIP1b (24006, R&D systems). Anti-HIV-Gag (KC57-FITC; Beckman-Coulter) mAb was used to detect infected cells. Isotype-matched mAbs and Aqua (InVitrogen) were used as negative controls and viability marker, respectively. Samples were examined by flow cytometry using either FacsCalibur or FacsCanto (both from Becton Dickinson) and results analyzed using Flowjo software (Flowjo).
When stated Torin-1 (Tocris) and 3-MA (Sigma) were added at the indicated concentrations 16h prior to co-culture with HS T cells.

Confocal microscopy

Cells (from 10^5 to 2.5 x 10^5) were left to adhere overnight on glass coverslips at 37°C in culture medium. Prior harvesting, to better visualize LC3+ vesicles, cells were treated with chloroquine (2h, 50µM). Cells were then fixed (4% PFA, 10 minutes), washed, and permeabilized (PBS, 0.1% BSA, 0.05% saponin, 15 minutes), and stained with indicated primary antibodies and then when necessary with fluorescently labeled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Gag staining was performed using KC57-FITC mAb or rabbit polyclonal Ab (kind gift from P. Boulanger, Lyon France). The anti-LC3 rabbit polyclonal Ab was purchase from MBL (PMO36). Confocal microscopy analysis was carried out on an Olympus FV-1000 with a 60x objective. Z series of optical sections were performed at 0.4 µm increments for qualitative analysis. Blue, green and red fluorescence were acquired sequentially. Images were processed using ImageJ Software (NIH).

Western blotting

16h post DC treatment with the drugs, 4 days post DC transduction or one day prior Hela-CIITA infection, 10^6 cells were lysed for 20 min at 4° C in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCL, 1% NP40, 1 mM NaVO4, 50 mM NaF, 10 mM Na4P2O7, and protease inhibitor coktail (Roche) supplemented with PMSF (Sigma)) and centrifuged at 13,000 g for 20 min. Postnuclear supernatants were analyzed by SDS-gel electrophoresis using 4-12% NuPAGE gels (Invitrogen) transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblotted. Anti-LC3 (rabbit, PM036 and mouse, 4E12, MBL), anti-p62 (3/p62, Becton Dickinson), anti-

tubulin (rabbit#2148, Cell Signaling Tech.), anti-actin (C-2, Santa Cruz) and anti-LAMP-2A (rabbit, ab18528, Abcam) were used.

RT-qPCR of LAMP-2

Total RNA was isolated from 2.5 x 10^6 cells by using TRIzol Reagent (Invitrogen), treated with DNAse (Invitrogen) and first-strand cDNA synthesis reverse transcribed according to the manufacturer with oligo(dT)15 primers using SuperScript III RT (Invitrogen). Realtime PCR was performed with 50 ng of cDNA templates using SYBR green commercial kit (Applied Biosystems) and GeneAmp 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Three primer sets were used to amplify LAMP-2A (set 1-3 A) and LAMP2B (set 1-3 B): Lamp2A-For1 (5'-GCAGTGCAGATGACGACAAC-3'); Lamp2-For2 (5'-GGGTTCAGCCTTTCAATGTG-3'); Lamp2-For1 (5'-CCCCTGGGAAGTTCTTATATGTG-3'); Lamp2A-Rev1 (5'-AGCATGATGGTGCTTGAGAC-3'); Lamp2A-Rev2 (5'-AATAAGTACTCCTGCCAAGGC-3'); Lamp2B-rev1 (5'-TCATCCAGCGAACACTCTTG-3'); Lamp2B-rev2 (5'-CTGCCAATTACGTAAGCAATCAC-3'). Set 1A corresponds to Lamp2A-For1+Lamp2A-Rev1; set 2A: Lamp2A-For1+Lamp2A-Rev2; set 3A: Lamp2-For2+Lamp2A-Rev2; set 1B: Lamp2-For1+Lamp2B-rev1; set 2B: Lamp2-For1+Lamp2B-rev2 and set 3B: Lamp2-For2+Lamp2B-rev2. Reactions were run in duplicate and samples were normalized to the internal controls (b2-microglobulin and GADPH). 'Fold differences' were calculated with the DDCt method.

Statistical analysis

Data were analyzed by a Mann-Whitney Wilcoxon rank-sum.

Acknowledgements

We thank T. Yoshimori and F. Lafont for providing the Atg4BC74A encoding plasmid, and "Club Francophone de l'Autophagie (CFATG)" and "Club Francophone des Cellules Dendritiques (CFCD)" for facilitating the presentation of this work at national and international conferences. This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hepatitis virales (ANRS), the "Emergence program" of the University Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris-06), Sidaction (Aide aux Equipes) and INSERM. We also thank the core facility of the UPMC "Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière" for expertise in confocal imaging and NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for providing drugs and compounds. P.-G. Coulon is a fellow of the "Emergence program" and of the ANRS. S. Cardinaud was supported by ANRS and Sidaction. A. Urrutia was supported by Sidaction. The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

Bandyopadhyay, U., S. Kaushik, L. Varticovski, and A.M. Cuervo. 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular and cellular biology* 28:5747-5763.

Basmaciogullari, S., and M. Pizzato. 2014. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Frontiers in microbiology* 5:232.

Berger, G., S. Durand, C. Goujon, X.N. Nguyen, S. Cordeil, J.L. Darlix, and A. Cimarelli. 2011. A simple, versatile and efficient method to genetically modify human monocyte-derived dendritic cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Nature protocols* 6:806-816.

Blanchet, F.P., A. Moris, D.S. Nikolic, M. Lehmann, S. Cardinaud, R. Stalder, E. Garcia, C. Dinkins, F. Leuba, L. Wu, O. Schwartz, V. Deretic, and V. Piguet. 2010. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32:654-669.

Casartelli, N., F. Guivel-Benhassine, R. Bouziat, S. Brandler, O. Schwartz, and A. Moris. 2010. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med* 207:39-49, S31-32.

Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.

Chevalier, M.F., B. Julg, A. Pyo, M. Flanders, S. Ranasinghe, D.Z. Soghoian, D.S. Kwon, J. Rychert, J. Lian, M.I. Muller, S. Cutler, E. McAndrew, H. Jessen, F. Pereyra, E.S. Rosenberg, M. Altfeld, B.D. Walker, and H. Streeck. 2011. HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *Journal of virology* 85:733-741.

Chiodi, F., and R.A. Weiss. 2014. Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. *Journal of internal medicine* 275:444-455.

Comber, J.D., T.M. Robinson, N.A. Siciliano, A.E. Snook, and L.C. Eisenlohr. 2011. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J Virol* 85:6453-6463.

Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Muller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7922-7927.

Dorfel, D., S. Appel, F. Grunebach, M.M. Weck, M.R. Muller, A. Heine, and P. Brossart. 2005. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105:3199-3205.

Eisenlohr, L.C., N. Luckashenak, S. Apcher, M.A. Miller, and G. Sinnathamby. 2011. Beyond the classical: influenza virus and the elucidation of alternative MHC class II-restricted antigen processing pathways. *Immunologic research* 51:237-248.

Esclatine, A., M. Chaumorcel, and P. Codogno. 2009. Macroautophagy signaling and regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 335:33-70.

Fujita, N., M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, and T. Yoshimori. 2008. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* 19:4651-4659.

Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R.M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiency transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* 72:2733-2737.

Ireland, J.M., and E.R. Unanue. 2011. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J Exp Med* 208:2625-2632.

Jacobson, S., R.P. Sekaly, W.J. Bellini, C.L. Johnson, H.F. McFarland, and E.O. Long. 1988. Recognition of intracellular measles virus antigens by HLA class II restricted measles virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 540:352-353.

Jagannath, C., D.R. Lindsey, S. Dhandayuthapani, Y. Xu, R.L. Hunter, Jr., and N.T. Eissa. 2009. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 15:267-276.

Jin, Y., C. Sun, L. Feng, P. Li, L. Xiao, Y. Ren, D. Wang, C. Li, and L. Chen. 2014. Regulation of SIV Antigen-Specific CD4+ T Cellular Immunity via Autophagosome-Mediated MHC II Molecule-Targeting Antigen Presentation in Mice. *PloS one* 9:e93143.

Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728.

Kyei, G.B., C. Dinkins, A.S. Davis, E. Roberts, S.B. Singh, C. Dong, L. Wu, E. Kominami, T. Ueno, A. Yamamoto, M. Federico, A. Panganiban, I. Vergne, and V. Deretic. 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of cell biology* 186:255-268.

Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474:654-657.

Lee, H.K., L.M. Mattei, B.E. Steinberg, P. Alberts, Y.H. Lee, A. Chervonsky, N. Mizushima, S. Grinstein, and A. Iwasaki. 2010. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32:227-239.

Leung, C.S., T.A. Haigh, L.K. Mackay, A.B. Rickinson, and G.S. Taylor. 2010. Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2165-2170.

Majeski, A.E., and J.F. Dice. 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2435-2444.

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

Mantegazza, A.R., J.G. Magalhaes, S. Amigorena, and M.S. Marks. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14:135-152.

Miller, M.A., A.P. Ganesan, and L.C. Eisenlohr. 2013. Toward a Network Model of MHC Class II-Restricted Antigen Processing. *Frontiers in immunology* 4:464.

Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861-2873.

Moris, A., C. Nobile, F. Buseyne, F. Porrot, J.P. Abastado, and O. Schwartz. 2004. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103:2648-2654.

Moris, A., A. Pajot, F. Blanchet, F. Guivel-Benhassine, M. Salcedo, and O. Schwartz. 2006. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* 108:1643-1651.

Moss, C.X., T.I. Tree, and C. Watts. 2007. Reconstruction of a pathway of antigen processing and class II MHC peptide capture. *The EMBO journal* 26:2137-2147.

Nobile, C., C. Petit, A. Moris, K. Skrabal, J.P. Abastado, F. Mammano, and O. Schwartz. 2005. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *Journal of virology* 79:5386-5399.

Nuchtern, J.G., W.E. Biddison, and R.D. Klausner. 1990. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343:74-76.

Paddison, P.J., M. Cleary, J.M. Silva, K. Chang, N. Sheth, R. Sachidanandam, and G.J. Hannon. 2004. Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nature methods* 1:163-167.

Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307:593-596.

Petrovas, C., and R.A. Koup. 2014. T follicular helper cells and HIV/SIV-specific antibody responses. *Current opinion in HIV and AIDS* 9:235-241.

Pinet, V., M. Vergelli, R. Martin, O. Bakke, and E.O. Long. 1995. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 375:603-606.

Porichis, F., and D.E. Kaufmann. 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Current opinion in HIV and AIDS* 6:174-180.

Ranasinghe, S., S. Cutler, I. Davis, R. Lu, D.Z. Soghoian, Y. Qi, J. Sidney, G. Kranias, M.D. Flanders, M. Lindqvist, B. Kuhl, G. Alter, S.G. Deeks, B.D. Walker, X. Gao, A. Sette, M. Carrington, and H. Streeck. 2013. Association of HLA-DRB1-restricted CD4(+) T cell responses with HIV immune control. *Nature medicine* 19:930-933.

Ranasinghe, S., M. Flanders, S. Cutler, D.Z. Soghoian, M. Ghebremichael, I. Davis, M. Lindqvist, F. Pereyra, B.D. Walker, D. Heckerman, and H. Streeck. 2012. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *Journal of virology* 86:277-283.

Rodriguez-Plata, M.T., A. Urrutia, S. Cardinaud, M.J. Buzon, N. Izquierdo-Useros, J.G. Prado, M.C. Puertas, I. Erkizia, P.G. Coulon, S. Cedeno, B. Clotet, A. Moris, and J. Martinez-Picado. 2012. HIV-1 Capture and Antigen Presentation by Dendritic Cells: Enhanced Viral Capture Does Not Correlate with Better T Cell Activation. *J Immunol* 188:6036-6045.

Schieffer, M., H.K. Jessen, A.F. Oster, F. Pissani, D.Z. Soghoian, R. Lu, A.B. Jessen, C. Zedlack, B.T. Schultz, I. Davis, S. Ranasinghe, E.S. Rosenberg, G. Alter, R.R. Schumann, and H. Streeck. 2014. Induction of Gag-Specific CD4 T Cell Responses during Acute HIV Infection Is Associated with Improved Viral Control. *Journal of virology* 88:7357-7366.

Schmid, D., M. Pypaert, and C. Munz. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26:79-92.

Sekaly, R.P., S. Jacobson, J.R. Richert, C. Tonnelle, H.F. McFarland, and E.O. Long. 1988. Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1209-1212.

Sinnathamby, G., and L.C. Eisenlohr. 2003. Presentation by recycling MHC class II molecules of an influenza hemagglutinin-derived epitope that is revealed in the early endosome by acidification. *Journal of immunology* 170:3504-3513.

Steinman, R.M. 2000. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 100:491-494.

Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, and P. Benaroch. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98:12144-12149.

Sun, J.C., and M.J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-342.

Sun, J.C., M.A. Williams, and M.J. Bevan. 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nature immunology* 5:927-933.

Testa, J.S., G.S. Apcher, J.D. Comber, and L.C. Eisenlohr. 2010. Exosome-driven antigen transfer for MHC class II presentation facilitated by the receptor binding activity of influenza hemagglutinin. *Journal of immunology* 185:6608-6616.

Tewari, M.K., G. Sinnathamby, D. Rajagopal, and L.C. Eisenlohr. 2005. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nature immunology* 6:287-294.

Wenger, T., S. Terawaki, V. Camosseto, R. Abdelrassoul, A. Mies, N. Catalan, N. Claudio, G. Clavarino, A. de Gassart, A. Rigotti Fde, E. Gatti, and P. Pierre. 2012. Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHCI-restricted presentation. *Autophagy* 8:350-363.

Yuseff, M.I., A. Reversat, D. Lankar, J. Diaz, I. Fanget, P. Pierobon, V. Randrian, N. Larochette, F. Vascotto, C. Desdouets, B. Jauffred, Y. Bellaiche, S. Gasman, F. Darchen, C. Desnos, and A.M. Lennon-Dumenil. 2011. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. *Immunity* 35:361-374.

Zhou, D., P. Li, Y. Lin, J.M. Lott, A.D. Hislop, D.H. Canaday, R.R. Brutkiewicz, and J.S. Blum. 2005. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22:571-581.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. HIV-infected DC present HIV-Ag to HS CD4+ T cells

(A) MDDC were generated from HLA-DRb1*04+ PBMC and infected with HIV_{Yu2b} or $HIV_{BruVSVDEnv}$ in the absence or presence of RT inhibitors AZT and NVP (HIV+ART). At day 5 after infection, DC were collected and the percentage of infected Gag+ cells was evaluated by intracellular Gag FACS staining (ICS) **(B)** and **(D)**. DC were gated based on their viability using (SSC and FSC). The numbers indicate the % of Gag+ cells. Infected DC were then used to stimulate L11, a HS CD4+ T cell clone restricted by HLA-DRb1*04. T cell activation was monitored using ICCS **(C)** and **(E).** ICCS was performed using anti-IL-2, anti-IFNg, anti-TNFa and anti-MIP1b. Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one of these cytokines/chemokines upon stimulation and are the mean (+/- SD) of duplicates. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive control, respectively. Not infected DC pulsed O/N in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells (Ni+ Sup. of (1)) and DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were used as control to monitor the residual contribution of Ag transfer or/and exogenous Ag presentation in L11 activation. The results are representative of at least three independent experiments using HLA-DRb1*04+ MDDC from various donors. Ni, noninfected cells; HIV (1), HIV-infected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Figure 2. Endogenous presentation of HIV-Gag Ag is epitope dependent

HLA-DRb1*01+ MDDC were generated and infected with HIV +/- ART as in Fig. 1. 5 days after infection, the % of Gag+ cells was monitored by ICS (**A** and **B**, left panel) and DC used to stimulate F12 **(A)** and IV-9 **(B)** two distinct HS CD4+ T cell clones both restricted by HLA-DRb1*01. As in Fig. 1 and S1, T cell activation was monitored using ICCS (**A** and **B**, right panel). Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokines/chemokines and are the mean (+/- SD) of duplicates. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2 or gag1, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 1, not infected DC pulsed O/N in the presence of ART with the supernatant of HIV-infected cells (Ni+ Sup. of (1)) and DC infected in the presence of ART (HIV+ART 5 days) were used as control. **(C)** Side by side comparison of F12 and IV-9 activation by infected DC generated from the same HLA-DRb1*01+ individual. The percentage of Gag+ cells evaluated as in (A) and (B) was 3.5 % (not shown). To confirm the capacity of IV-9 to recognize HIV-derived Ag, 16h prior ICCS, uninfected DC were pulsed with a high dose of HIV in the presence of ART (HIV+ART 16h). Under these conditions, the source of HIV Ag corresponds to the incoming viral particles. To monitor the residual contribution of Ag transfer or/and exogenous Ag presentation in T cell activation, as in A and B, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of

infected cells (Sup. of (1)) and used as control. The results are representative of at least three independent experiments using MDDC from various donors. Ni, noninfected cells; HIV (1), HIV-infected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Figure 3. Modulating Autophagy with drugs does not affect endogenous presentation of HIV-Gag Ag

(A) HLA-DRb1*04+ MDDC were generated and infected with HIV +/- ART as in Fig. 1. Prior co-culture with L11, the % of Gag+ cells was evaluated (11%, not shown) and DC were treated for 16h (O/N) with the indicated concentrations of 3-MA or Torin-1, inhibitor or inducer of autophagy, respectively. **(B)** Autophagy modulation was assessed by measuring the conversion of LC3-I to LC3-II, via Western blotting (WB). Tubulin and actin were used as controls. **(C)** Drug treated or mock treated DC were then co-cultured with L11 and T cell activation assessed by ICCS, as previously. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of infected cells (Sup. of (1)) and used as control. These various controls were also treated with the highest concentration of drugs to evaluate possible effects of the drugs on T cell activation. The results are representative of at least three independent experiments using MDDC from various donors. Ni, noninfected cells; NT, mock treated cells; HIV (1), HIV-infected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells.

Figure 4. Autophagy does not contribute to endogenous presentation of HIV-Gag Ag

(A) HLA-DRb1*04+ MDDC were generated and transduced with control shRNA (shCTRL) or anti-LC3 shRNA (shLC3) together with SIV-Vpx. The knockdown of LC3 expression was determined using WB **(B)** and immunofluorescence (IF) **(C)** using anti-LC3 Ab recognizing the three isoforms (LC3 A-C). 4 days after transduction, DC were infected with HIV, +/- ART as in Fig. 1. **(D)** The % of transduced (GFP+) and infected (Gag+) DC was determined by flow cytometry. **(E)** The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS as in Fig. 1. Uninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of infected cells (Sup. of (1)) and used as control. The results are representative of three independent experiments using MDDC from various donors. Scale bars represent 10µm.

Figure 5. HIV Nef does not significantly impact endogenous presentation of Gag Ag

As in Fig. 1, MDDC were generated from HLA-DRb1*04+ PBMC and infected with HIV_{Yu2b} or $HIV_{Yu2b\Delta Nef}$ +/- ART. At day 5 after infection, DC were collected and the % of infected Gag+ cells was evaluated **(A)**. Infected DC were then used to stimulate L11. T cell activation was monitored using ICCS **(B)**. **(C-D)** as in Fig. 4, DC were transduced with shCTRL or

shLC3 prior infection with HIV_{Yu2b} or $HIV_{Yu2b\Delta Nef}$ +/- ART. **(C)** The % of transduced (GFP+) and infected (Gag+) DC was determined by flow cytometry. **(D)** The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS as in Fig. 1. **(E-F)** as in Fig. S3, DC were mock transduced or with Atg4BC74A prior infection with HIV_{Yu2b} or $HIV_{Yu2b\Delta Nef}$ +/- ART. **(E)** The % of transduced (strawberry+) and infected (Gag+) DC was determined by flow cytometry. **(F)** The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS. Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokines/chemokines. Uninfected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of infected cells (Sup. of (1)) and used as control. The results are representative of three independent experiments using MDDC from various donors. Ni, noninfected cells; NT, mock transduced; HIV (1), HIV-infected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells; Strwb, Strawberry.

Figure 6. CMA is not involve in endogenous presentation of HIV-Gag Ag by infected DC
As in Fig. 4, HLA-DRb1*04+ MDDC were generated and transduced with control shRNA (shCTRL) or anti-LAMP-2A shRNA (shLAMP-2A) together with SIV-Vpx. The knockdown of LAMP-2A expression was determined using WB **(A)**. 4 days after transduction, DC were infected with HIV, +/- ART as in Fig. 1. **(B)** The % of transduced (GFP+) and infected (Gag+) DC was determined by flow cytometry. **(C)** The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS as in Fig. 1. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of infected cells (Sup. of (1)) and used as control. The results are representative of three independent experiments using MDDC from various donors.

Figure 7. Targeting Gag to autophagosomes strongly enhances HS CD4+ T cell activation and reveals novel MHC-II-restricted endogenous epitopes.
(A) MDDC were transduced with p41LC3, infected with HIV_{Yu2b} and simultaneously co-transduced with GFPLC3. Gag or p41LC3 colocalization with GFPLC3 was evaluated using IF. **(B-C)** HLA-DRb1*04+ MDDC were transduced with p41LC3 +/- ART. 4 days after transduction, DC were treated for 16h with 3-MA at the indicated concentrations, prior coculture with L11. The % of p41LC3 transduced DC was evaluated using Gag ICS **(B)** and T cell activation monitored using ICCS **(C)**. Untreated (NT) untransduced DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. Peptide pulsed DC were also treated with 3-MA to evaluate possible side effect on T cell activation. DC transduced in the presence of ART (p41LC3+ART) lead to residual background stimulation. Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokines/chemokines and are the mean (+/- SD) of duplicates. **(D-G)** HLA-

DRb1*04+ MDDC were either transduced with p41LC3 or infected with HIV_{Yu2b} +/- ART. 5 days after treatment, the % of Gag+ cells was monitored by ICS (**D** and **F**) and DC used to stimulate F12 **(E)** and IV-9 **(G)**. As in Fig. 1 and S1, T cell activation was monitored using ICCS Data are presented as the % of activated cells producing at least one cytokines/chemokines. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2 or gag1, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 1, uninfected DC pulsed O/N, in the presence of ART, with the supernatant of HIV-infected cells (Ni+ Sup. of (1)) and DC infected in the presence of ART (HIV+ART 5 days) were pooled and used as a control. The results are representative of at least three independent experiments using MDDC from various donors. Ni, noninfected or untransduced cells; HIV (1), HIV-infected cells; Sup. of (1), supernatant of HIV-infected cells. Scale bars represent 10µm.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Figure S1. Gating strategy for the monitoring by ICCS of HS CD4+ T cell activation
At day 5 post infection, DC were collected and used to stimulate HS CD4+ T cell clone L11 in ICCS. CD4+ T cell were gated based on their size and granulosity (FSC and SSC) and subsequently viability (aqua) and high expression of CD4 receptor. ICCS was performed using a pool of anti-IL-2, anti-IFNg and anti-TNFa PE-conjugated Abs and anti-MIP1b-FITC. The % of CD4+ cells positive for each staining is indicated in the quadrant. The proportion of activated CD4+ cells producing at least one of these cytokines/chemokines upon stimulation is indicated on the right. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were used as a control to monitor the residual contribution of exogenous Ag presentation in L11 activation. The results are representative of at least three independent experiments using MDDC from various donors.

Figure S2. HIV-transfected cells present newly synthetized HIV Ag to HS CD4+ T cells
(A) Hela-CIITA that express HLA-DRb1*01 were transfected with a DNA plasmid expressing HIV genome. At day 3 post transfection, cells were collected and the % of infected Gag+ cells evaluated using ICS **(B)**. The cells were then used to stimulate F12, an HS CD4+ T cell clone restricted by HLA-DRb1*01 **(C)**. T cell activation was monitored using ICCS as in Fig. 1 and S1. Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokines/chemokines upon stimulation and are the mean (+/- SD) of duplicates. The results are representative of at least three independent experiments. UT, mock transfected.

Figure S3. Inhibiting Autophagy with Atg4BC74A does not affect endogenous presentation of HIV-Gag Ag by DC
HLA-DRb1*04+ MDDC were generated and transduced with Atg4BC74A together with SIV-Vpx. **(A)** Atg4BC74A-transduced DC were further transduced with GFPLC3 and the knockdown of autophagy was determined using IF and formation of GFPLC3+ puncta. 4 days after transduction, DC were infected with HIV, +/- ART as in Fig. 1. **(B)** Atg4BC74A-transduced DC were infected with HIV. The % of transduced (Strwb+) and infected (Gag+) DC was determined by flow cytometry. **(C)** The capacity of treated DC to activate L11 was then evaluated by ICCS as in Fig. 1. Not infected DC (Ni) and DC pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. As in Fig. 2C, DC infected in the presence of ART (HIV+ART) were loaded with the supernatant of infected cells (Sup. of (1)) and used as control. The results are representative of three independent experiments using MDDC from various donors. NT, mock transduced; Strwb, Strawberry. Scale bars represent 10µm.

Figure S4. Autophagy does not contribute to present newly synthetized HIV Ag to HS CD4+ T

(A) Hela-CIITA were transduced with shCTRL , shLC3 or Atg4BC74A and selected using puromycin to obtain an homogenous population. The knockdown of autophagy was determined by WB using anti-LC3 **(B)** and anti-p62 **(D)**. The cells were then transfected with HIV DNA. At day 3 post transfection, cells were collected and the % of infected Gag+ cells evaluated using ICS. **(C)** 4.2 and 6.2 % of shCTRL and shLC3 transduced cells were Gag+ respectively (not shown). **(E)** 12 and 8.5 % of mock treated and Atg4BC74A transduced cells were Gag+ respectively (not shown). The cells were then used to stimulate F12 **(C)** and **(E)**. T cell activation was monitored using ICCS as in Fig. 1 and S1. Mock transfected cells (UT) and UT cells pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. Data are presented as the proportion of activated cells producing at least one cytokines/chemokines upon stimulation and are the mean (+/- SD) of duplicates. The results are representative of at least three independent experiments. NT, mock transduced; UT, mock transfected.

Figure S5. CMA is not involved in endogenous presentation of HIV-Gag Ag by HIV-transfected cells

As in Fig. S4, Hela-CIITA were transduced with shCTRL or shLAMP-2A and selected using puromycin to obtain a homogenous population. The knockdown of LAMP-2A was determined by RT-qPCR **(A)** and WB using anti-LAMP-2A ab and anti-p62 and anti-actin were used as controls **(B)**. **(A)** Due to the high homology of LAMP-2A and LAMP-2B, three sets of primers for LAMP-2A (set 1-3 A) and for LAMP-2B (set 1-3 B) were used to confirm the specific down-modulation of LAMP-2A by RT-qPCR. The cells were transfected with HIV DNA. At day 3 post transfection, cells were collected and the % of infected Gag+ cells evaluated using ICS: 5.5 and 3.5 % of shCTRL and shLAMP-2A transduced cells were Gag+ respectively (not shown). The cells were then used to stimulate F12 **(C)** and T cell activation was monitored using ICCS as in Fig. 1 and S1. Mock transfected cells (UT) and UT cells pulsed with the cognate peptide (gag2, 0.5 µg/ml) were used as negative and positive controls, respectively. Data are presented as the % of activated cells producing at least one cytokines/chemokines upon stimulation. The results are representative of at least three independent experiments. UT, mock transfected.

Figure S6. p41LC3 processing is dependent on autophagy.

(A) Schematic representation of the lentiviral vectors encoding p41LC3 and p41LC3$_{G120A}$. **(B)** Hela-CIITA cells were transduced with GFPLC3 or cotransduced with p41LC3 and p41LC3$_{G120A}$ and colocalization analyzed by IF and confocal imaging. **(C)** Hela-CIITA cells and Atg4BC74A+ Hela-CIITA cells were transfected with DNA plasmids encoding HIV$_{Yu2b}$,

Gag, p41LC3$_{G120A}$ and p41LC3. At day 3-post transfection, cells were collected and the % of Gag+ cells evaluated using ICS (not shown). The cells were then used to stimulate F12 **(C)** and T cell activation was monitored using ICCS as in Fig. S1. Data are presented as the % of activated cells producing at least one cytokines/chemokines divided by the % of Gag+ cells and are the mean (+/- SD) of three independent experiments performing in duplicate. Enhancement of T cell activation with p41LC3 ($P < .038$) was statistically significant (Mann-Whitney Wilcoxon rank sum test). Scale bars represent 10µm.

Figure 1

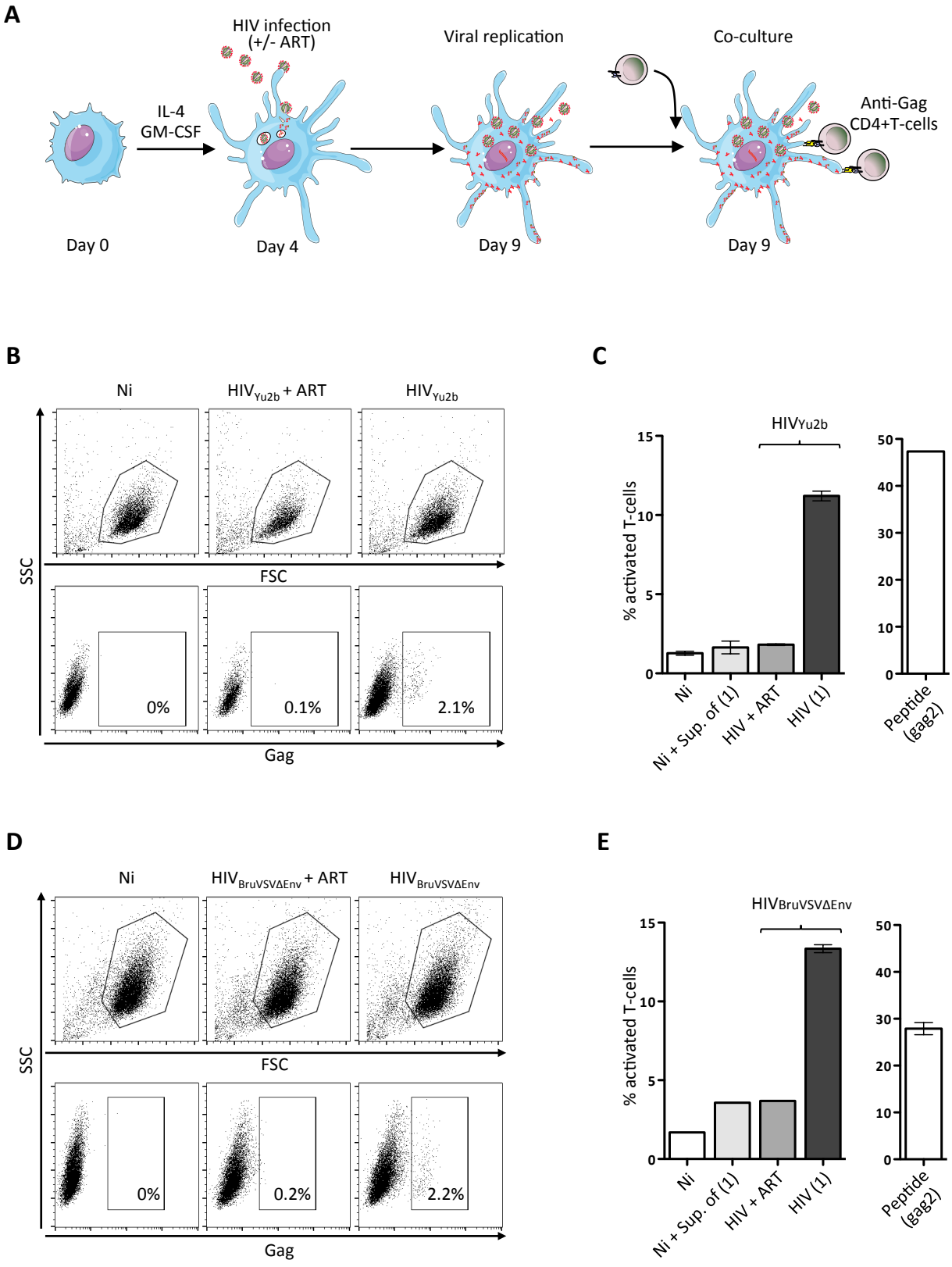

A
HIV infection
(+/- ART)
Viral replication
Co-culture
IL-4
GM-CSF
Anti-Gag
CD4+T-cells
Day 0
Day 4
Day 9
Day 9
B
Ni
HIV Yu2b + ART
HIV Yu2b
SSC
FSC
0%
0.1%
2.1%
Gag
C
HIVYu2b
% activated T-cells
Ni
Ni + Sup. of (1)
HIV + ART
HIV (1)
Peptide (gag2)
D
Ni
HIV BruVSVΔEnv + ART
HIV BruVSVΔEnv
SSC
FSC
0%
0.2%
2.2%
Gag
E
HIVBruVSVΔEnv
% activated T-cells
Ni
Ni + Sup. of (1)
HIV + ART
HIV (1)
Peptide (gag2)

Figure S 1

A

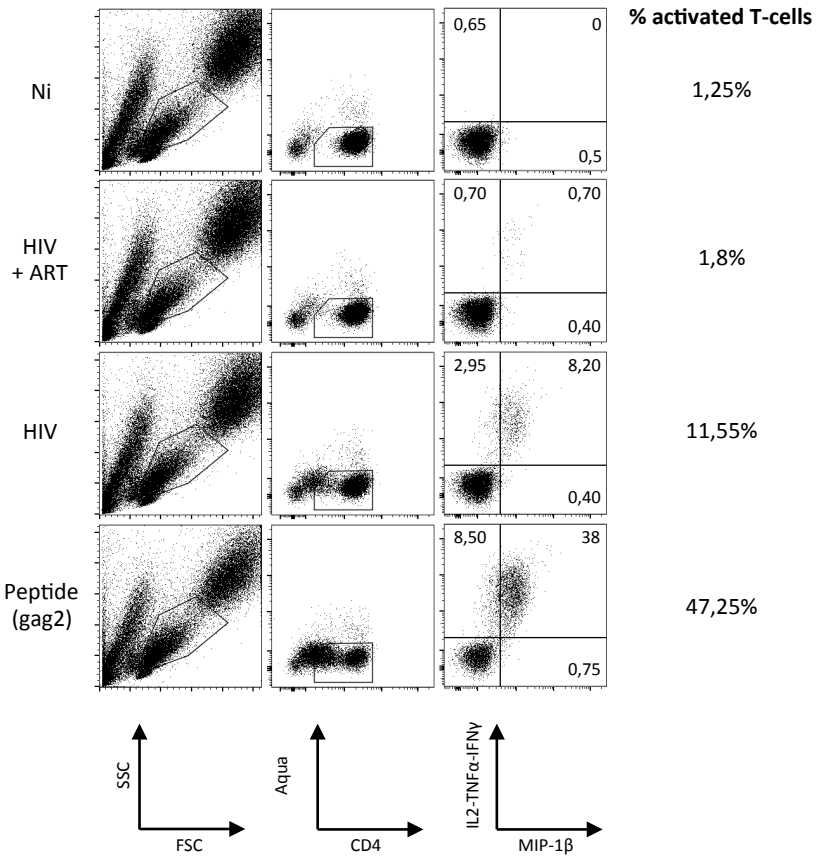

% activated T-cells
Ni
1,25%
HIV
+ ART
1,8%
HIV
11,55%
Peptide
(gag2)
47,25%
0,65
0
0,5
0,70
0,70
0,40
2,95
8,20
0,40
8,50
38
0,75
SSC
FSC
Aqua
CD4
IL2-TNFα-IFNγ
MIP-1β

Figure S 2

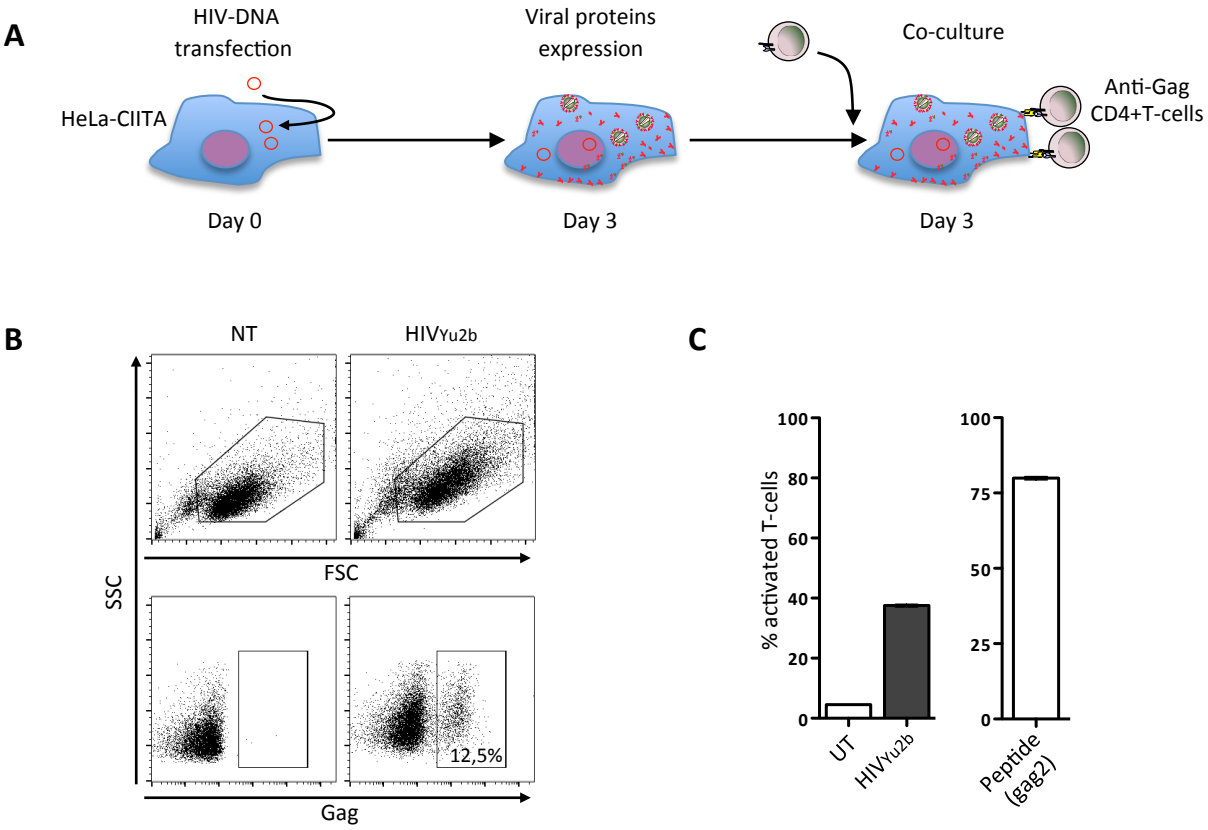

A
HIV-DNA transfection
Viral proteins expression
Co-culture
HeLa-CIITA
Anti-Gag CD4+T-cells
Day 0
Day 3
Day 3
B
NT
HIVYu2b
FSC
SSC
12,5%
Gag
C
% activated T-cells
100
80
60
40
20
0
UT
HIVYu2b
100
75
50
25
0
Peptide (gag2)

Figure 2

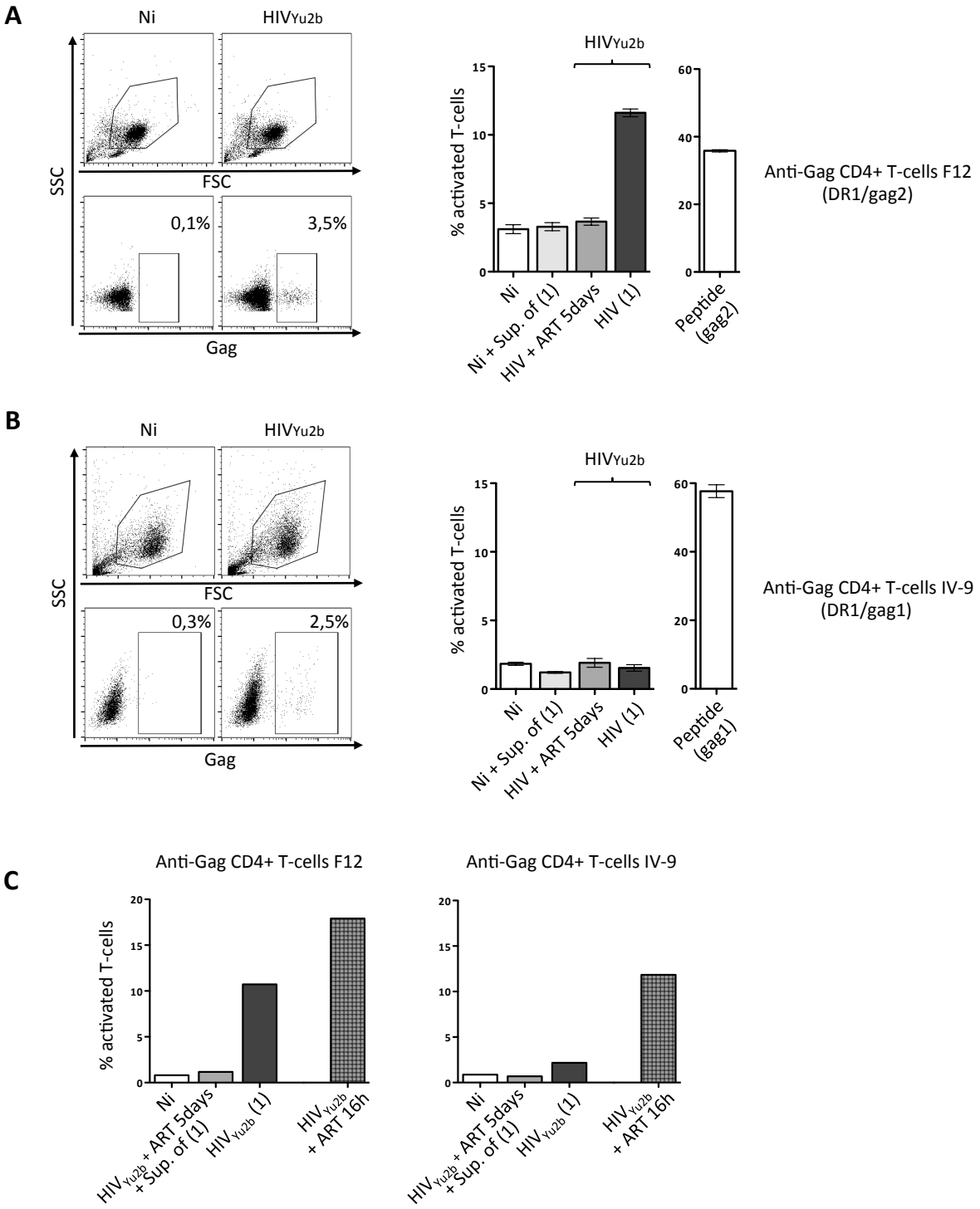
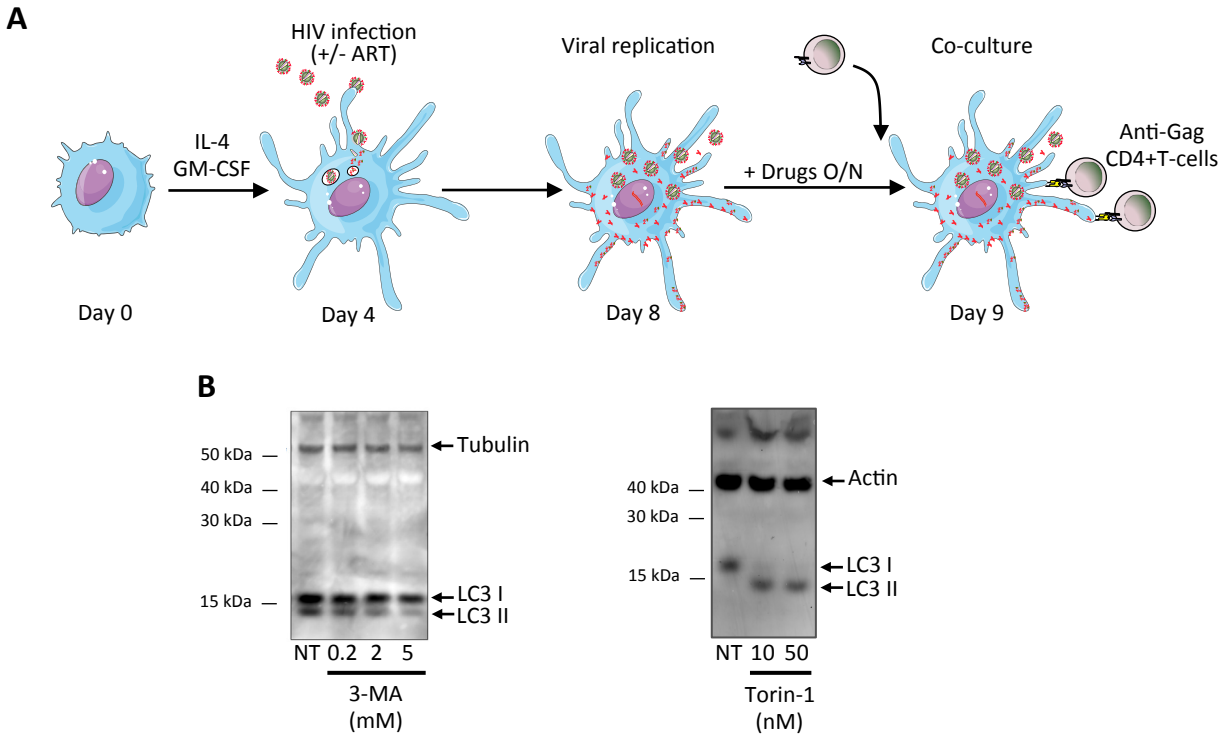

A
Ni
HIVYu2b
SSC
FSC
0,1%
3,5%
Gag
HIVYu2b
% activated T-cells
Ni
Ni + Sup. of (1)
HIV + ART 5days
HIV (1)
Peptide (gag2)
Anti-Gag CD4+ T-cells F12 (DR1/gag2)
B
Ni
HIVYu2b
SSC
FSC
0,3%
2,5%
Gag
HIVYu2b
% activated T-cells
Ni
Ni + Sup. of (1)
HIV + ART 5days
HIV (1)
Peptide (gag1)
Anti-Gag CD4+ T-cells IV-9 (DR1/gag1)
C
Anti-Gag CD4+ T-cells F12
Anti-Gag CD4+ T-cells IV-9
% activated T-cells
Ni
HIVYu2b + ART 5days + Sup. of (1)
HIVYu2b (1)
HIVYu2b + ART 16h

Figure 3


A
HIV infection
(+/- ART)
Viral replication
Co-culture
IL-4
GM-CSF
+ Drugs O/N
Anti-Gag
CD4+T-cells
Day 0
Day 4
Day 8
Day 9
B
50 kDa
40 kDa
30 kDa
15 kDa
Tubulin
LC3 I
LC3 II
NT 0.2 2 5
3-MA
(mM)
40 kDa
30 kDa
15 kDa
Actin
LC3 I
LC3 II
NT 10 50
Torin-1
(nM)

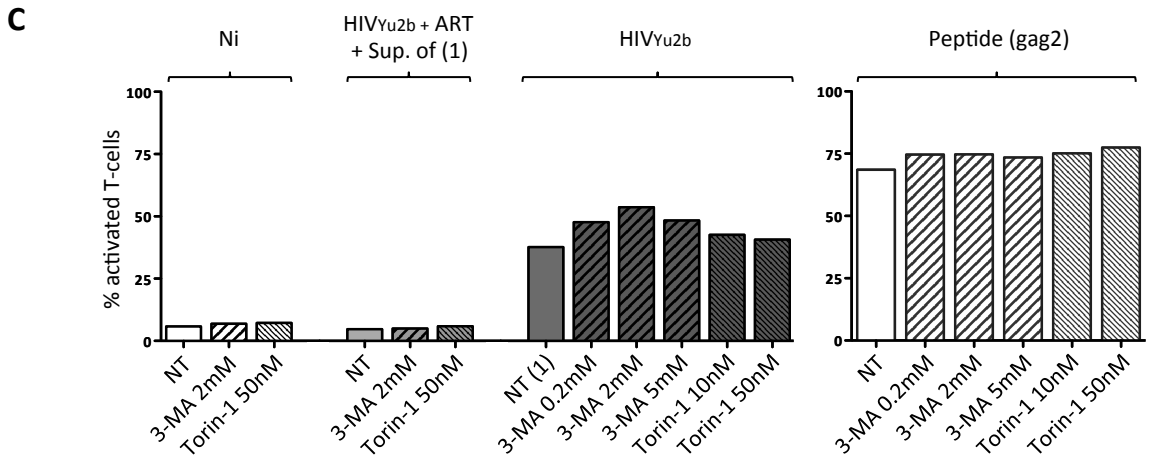

C
Ni
HIVYu2b + ART
+ Sup. of (1)
HIVYu2b
Peptide (gag2)
% activated T-cells
100
75
50
25
0
NT
3-MA 2mM
Torin-1 50nM
NT
3-MA 2mM
Torin-1 50nM
NT (1)
3-MA 0.2mM
3-MA 2mM
3-MA 5mM
Torin-1 10nM
Torin-1 50nM
NT
3-MA 0.2mM
3-MA 2mM
3-MA 5mM
Torin-1 10nM
Torin-1 50nM

Figure 4

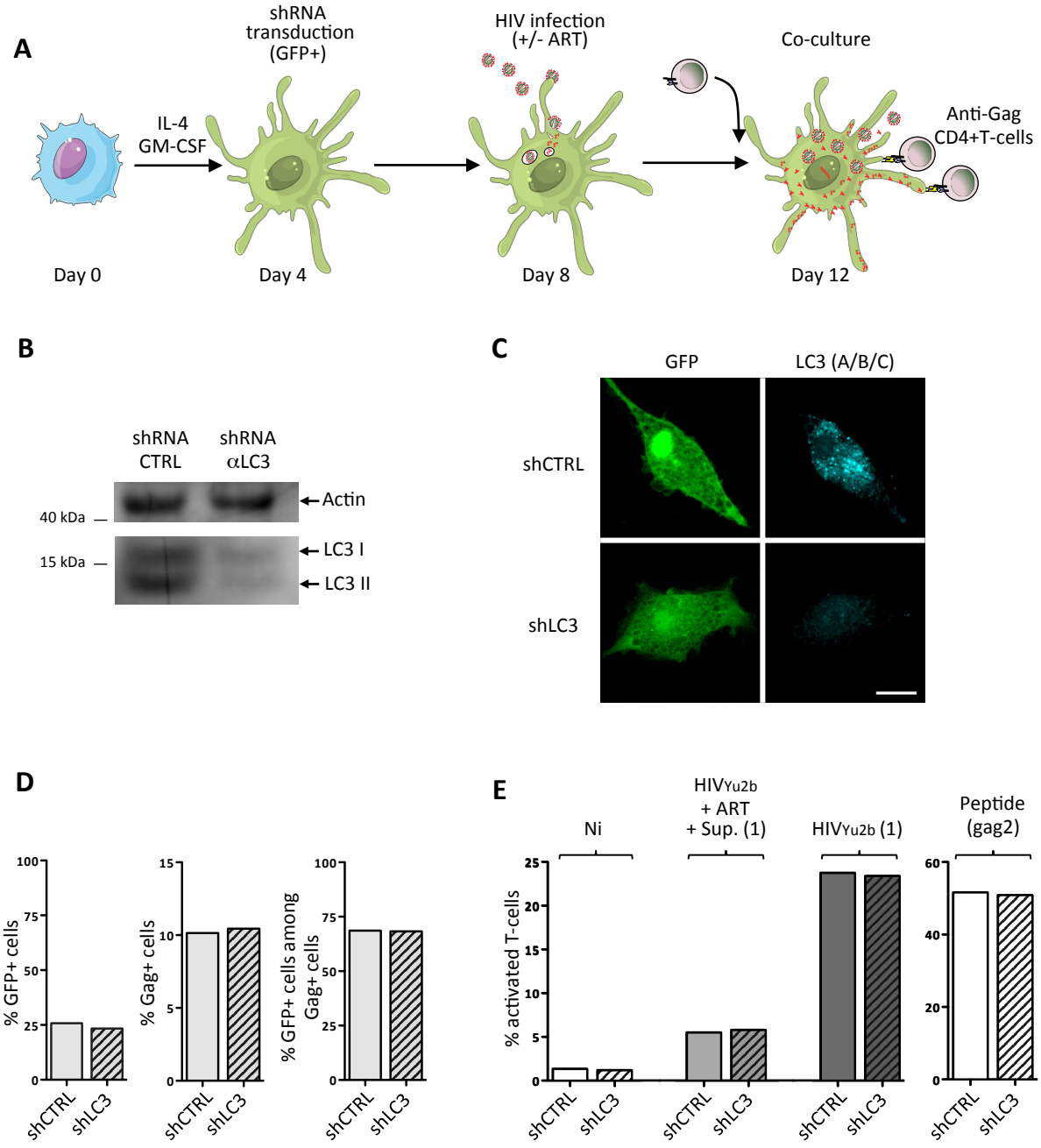

A
shRNA transduction (GFP+)
HIV infection (+/- ART)
Co-culture
IL-4
GM-CSF
Anti-Gag CD4+T-cells
Day 0
Day 4
Day 8
Day 12
B
shRNA CTRL
shRNA αLC3
40 kDa
15 kDa
Actin
LC3 I
LC3 II
C
GFP
LC3 (A/B/C)
shCTRL
shLC3
D
% GFP+ cells
% Gag+ cells
% GFP+ cells among Gag+ cells
shCTRL
shLC3
E
Ni
HIVYu2b + ART + Sup. (1)
HIVYu2b (1)
Peptide (gag2)
% activated T-cells

Figure S 3

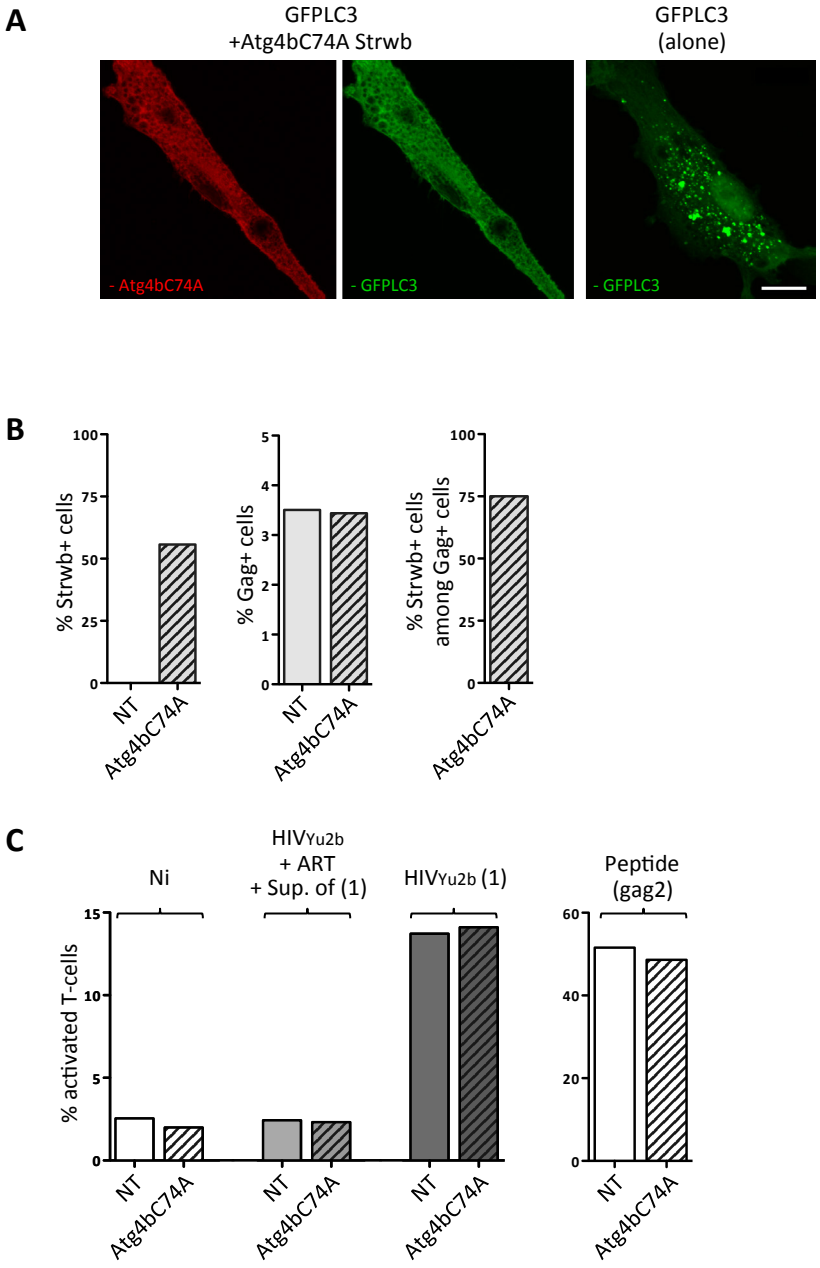

A
GFPLC3
+Atg4bC74A Strwb
GFPLC3
(alone)
- Atg4bC74A
- GFPLC3
- GFPLC3
B
% Strwb+ cells
% Gag+ cells
% Strwb+ cells
among Gag+ cells
NT
Atg4bC74A
C
Ni
HIVYu2b
+ ART
+ Sup. of (1)
HIVYu2b (1)
Peptide
(gag2)
% activated T-cells

Figure S 4

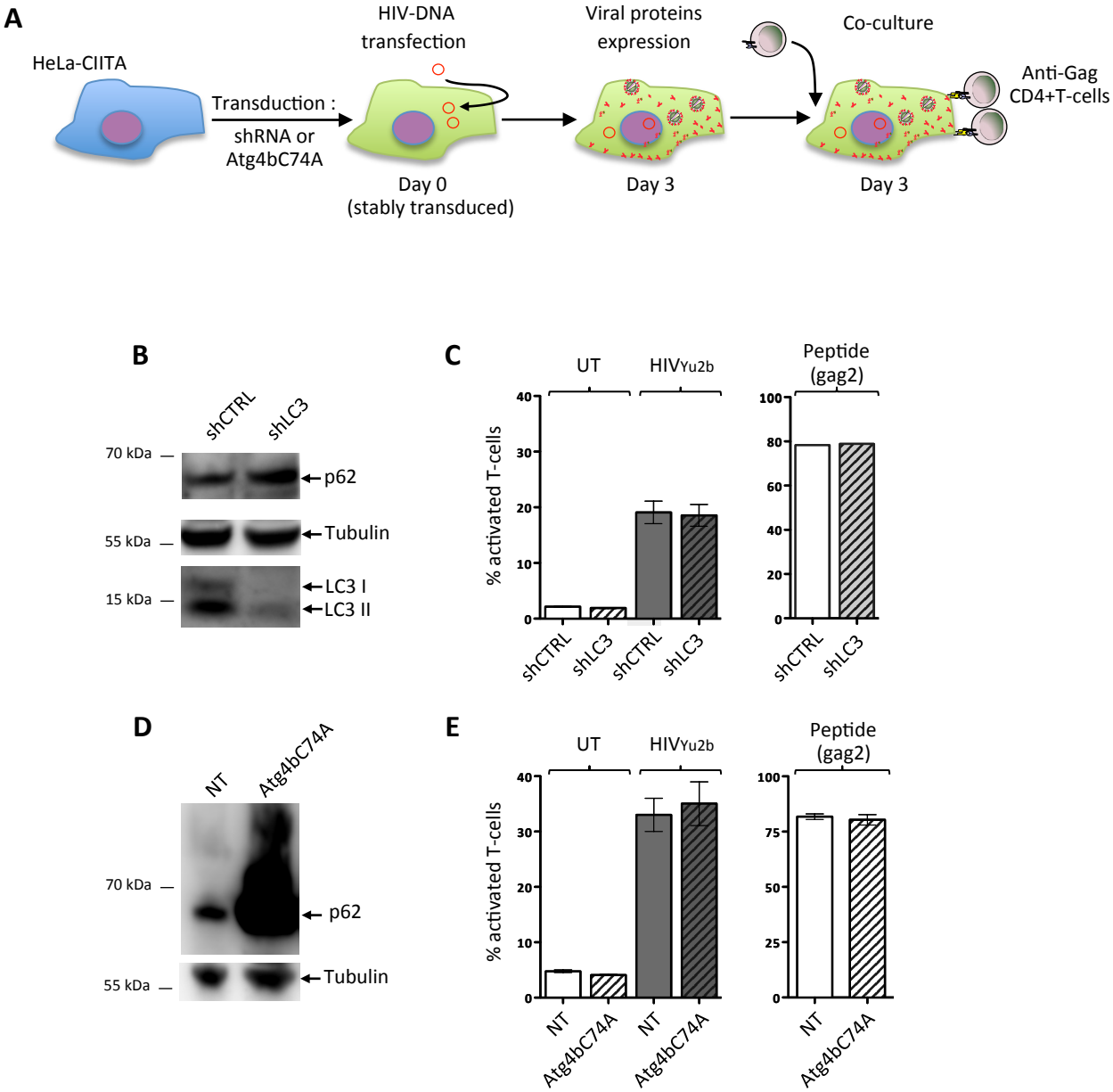

A
HeLa-CIITA
Transduction :
shRNA or
Atg4bC74A
HIV-DNA
transfection
Day 0
(stably transduced)
Viral proteins
expression
Day 3
Co-culture
Anti-Gag
CD4+T-cells
Day 3
B
shCTRL
shLC3
70 kDa
p62
55 kDa
Tubulin
15 kDa
LC3 I
LC3 II
C
UT
HIVYu2b
Peptide
(gag2)
% activated T-cells
shCTRL
shLC3
shCTRL
shLC3
shCTRL
shLC3
D
NT
Atg4bC74A
70 kDa
p62
55 kDa
Tubulin
E
UT
HIVYu2b
Peptide
(gag2)
% activated T-cells
NT
Atg4bC74A
NT
Atg4bC74A
NT
Atg4bC74A

Figure 5

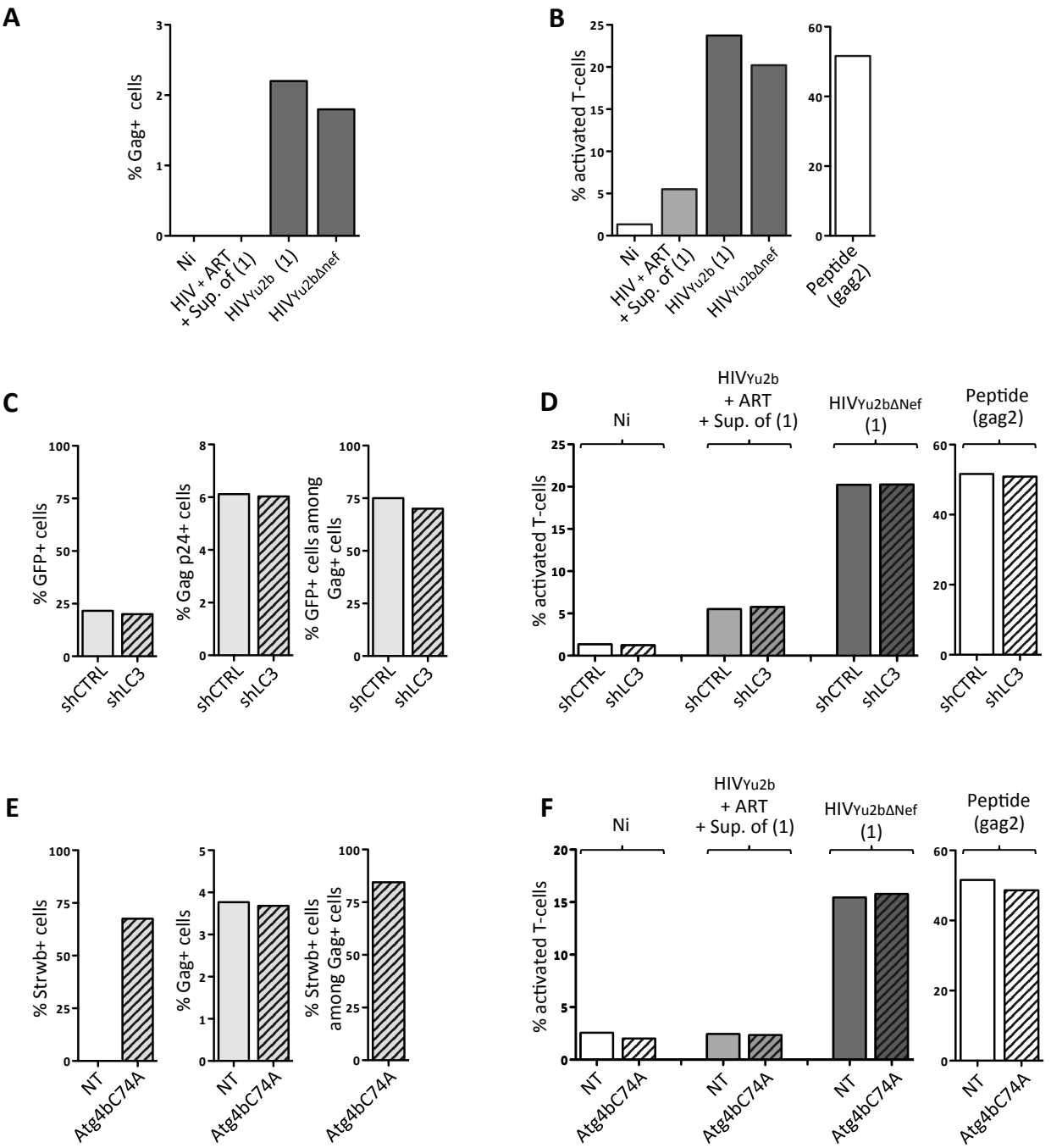

A
% Gag+ cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIVYu2b (1)
HIVYu2bΔnef
B
% activated T-cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIVYu2b (1)
HIVYu2bΔnef
Peptide (gag2)
C
% GFP+ cells
% Gag p24+ cells
% GFP+ cells among Gag+ cells
shCTRL
shLC3
D
Ni
HIVYu2b + ART + Sup. of (1)
HIVYu2bΔNef (1)
Peptide (gag2)
% activated T-cells
shCTRL
shLC3
E
% Strwb+ cells
% Gag+ cells
% Strwb+ cells among Gag+ cells
NT
Atg4bC74A
F
Ni
HIVYu2b + ART + Sup. of (1)
HIVYu2bΔNef (1)
Peptide (gag2)
% activated T-cells
NT
Atg4bC74A

Figure 6

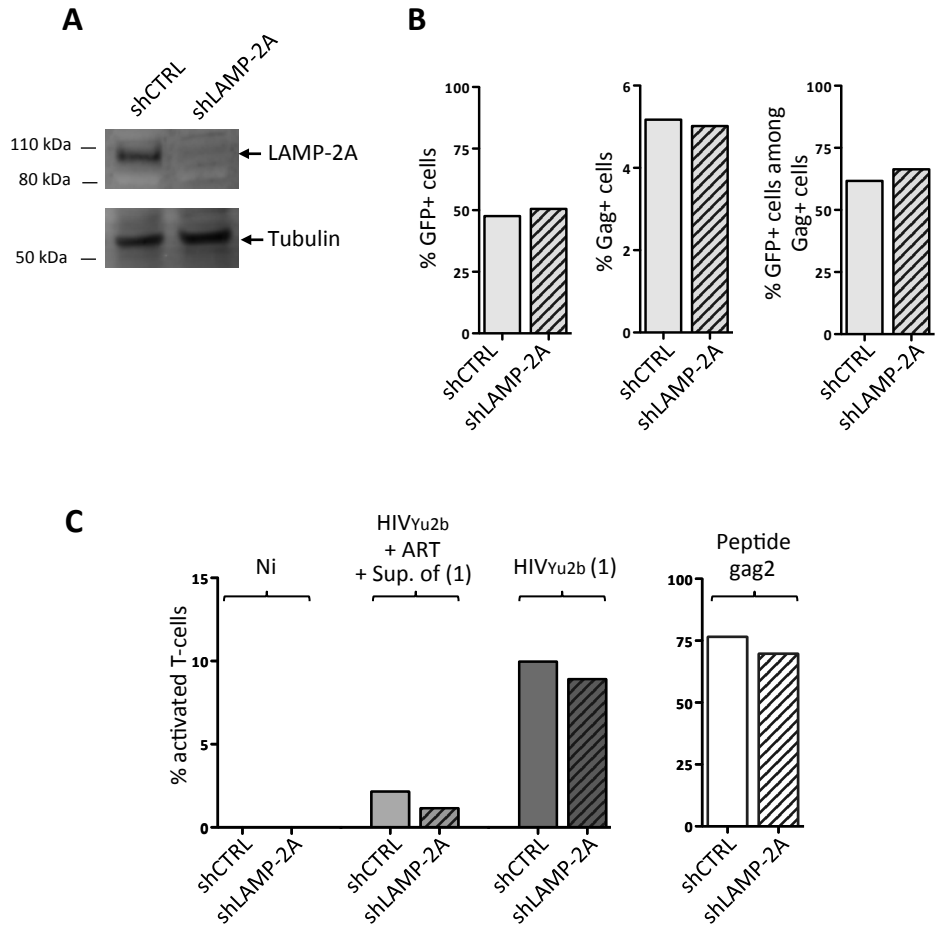

A
shCTRL
shLAMP-2A
110 kDa
80 kDa
LAMP-2A
50 kDa
Tubulin
B
% GFP+ cells
% Gag+ cells
% GFP+ cells among Gag+ cells
shCTRL
shLAMP-2A
C
Ni
HIVYu2b + ART + Sup. of (1)
HIVYu2b (1)
Peptide gag2
% activated T-cells

Figure S 5

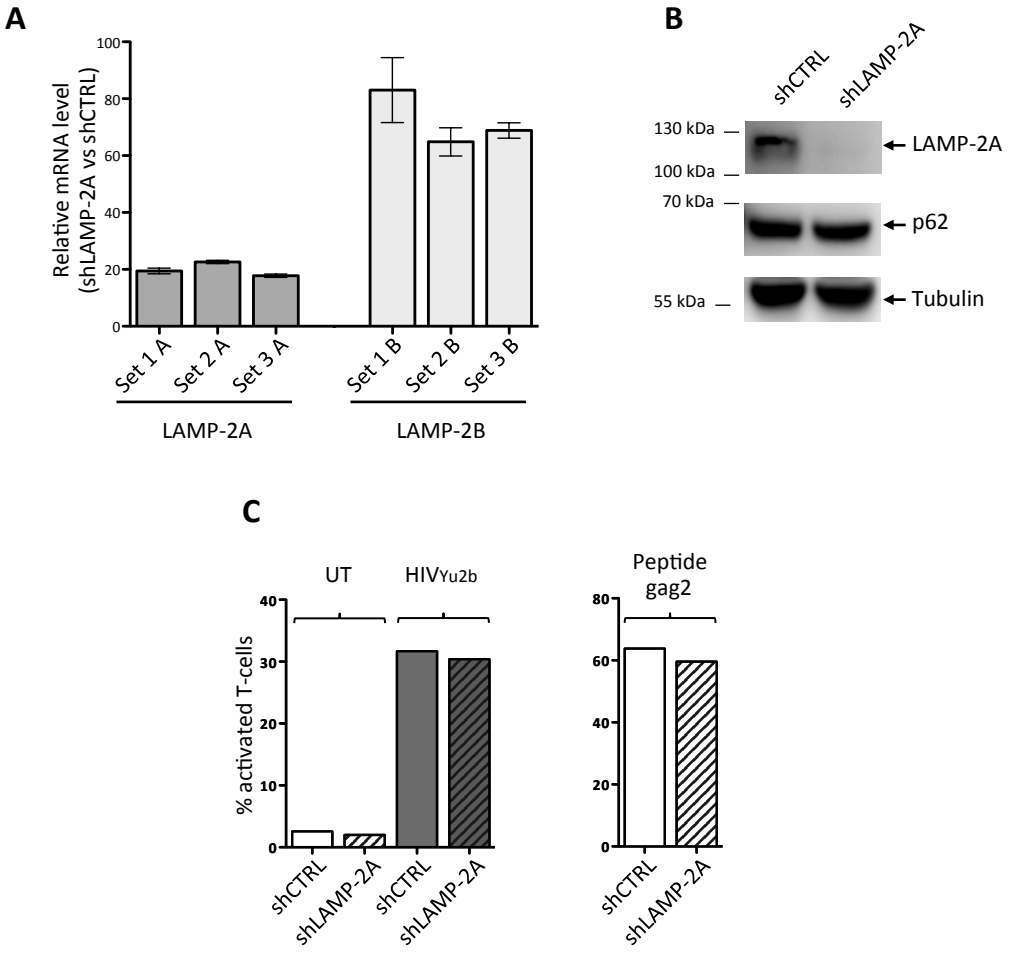

A
Relative mRNA level (shLAMP-2A vs shCTRL)
100
80
60
40
20
0
Set 1 A
Set 2 A
Set 3 A
Set 1 B
Set 2 B
Set 3 B
LAMP-2A
LAMP-2B
B
shCTRL
shLAMP-2A
130 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
LAMP-2A
p62
Tubulin
C
UT
HIVYu2b
% activated T-cells
40
30
20
10
0
shCTRL
shLAMP-2A
shCTRL
shLAMP-2A
Peptide gag2
80
60
40
20
0
shCTRL
shLAMP-2A

Figure 7

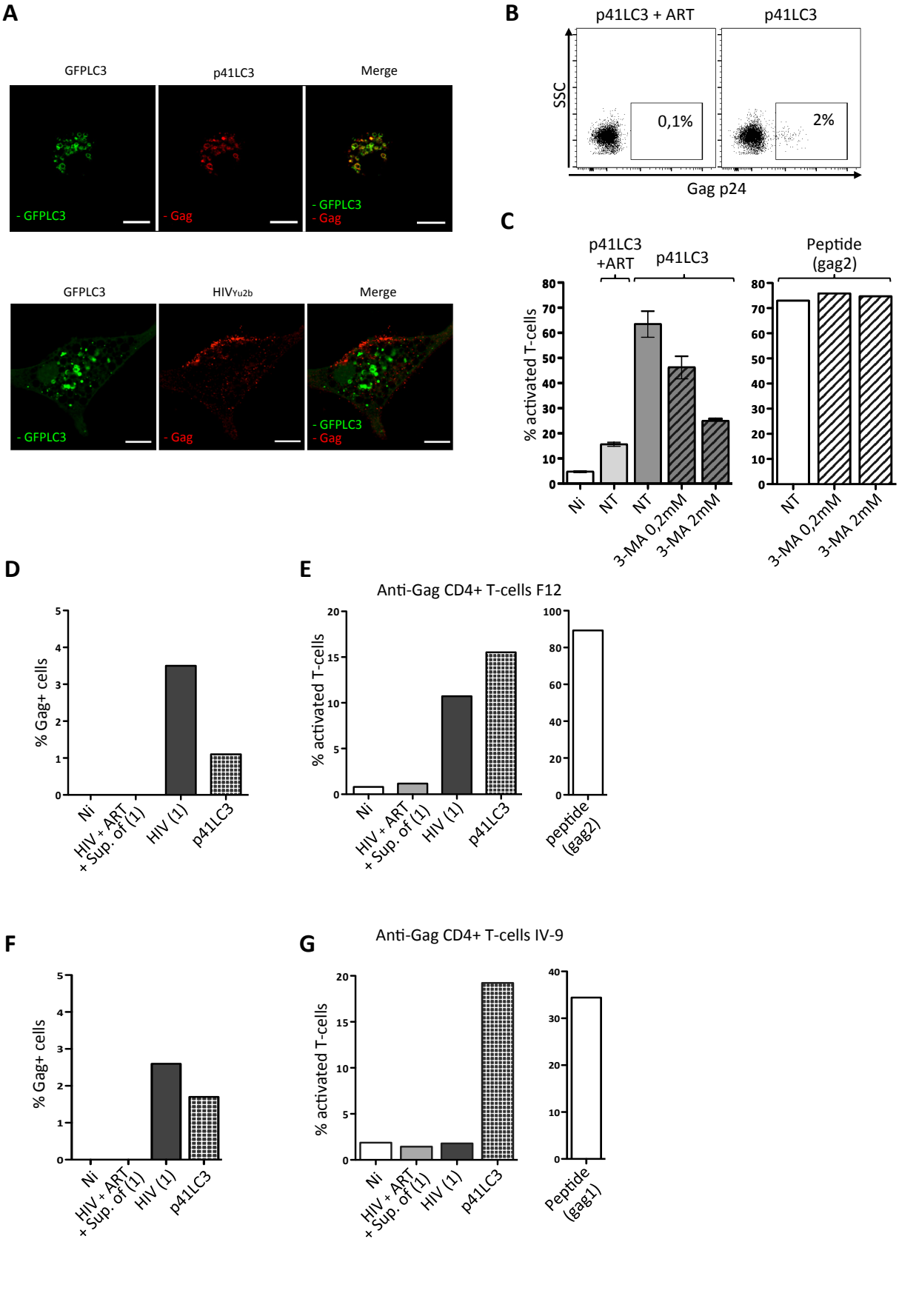
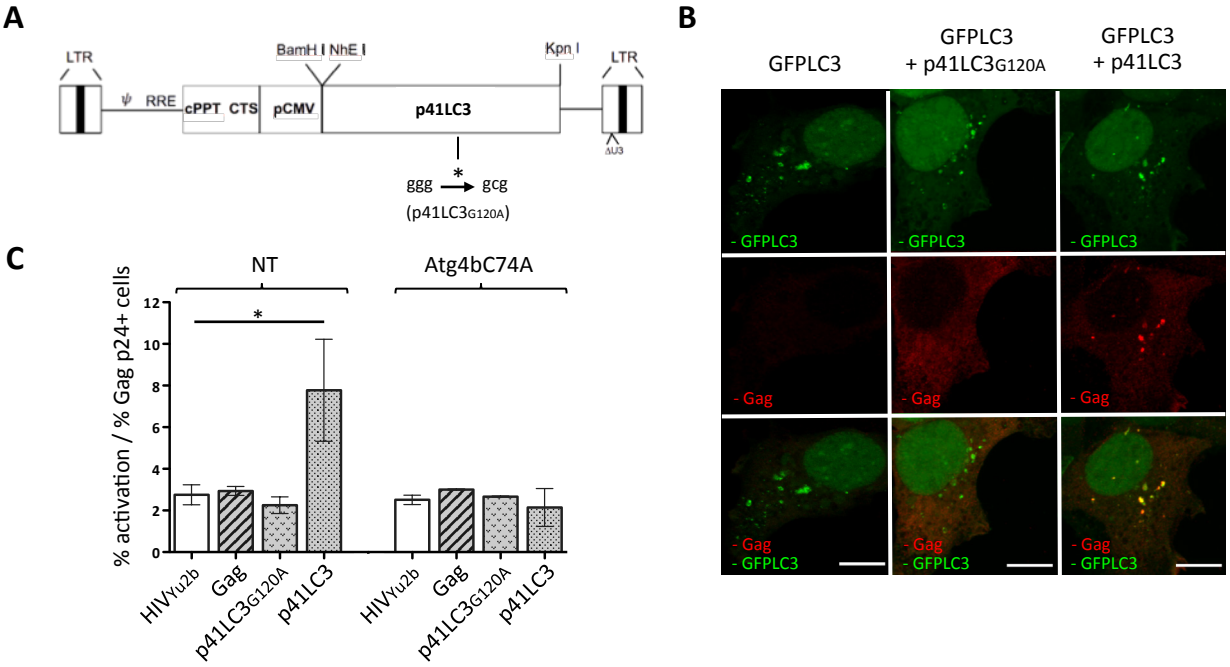

A
GFPLC3
p41LC3
Merge
- GFPLC3
- Gag
- GFPLC3
- Gag
GFPLC3
HIVYu2b
Merge
- GFPLC3
- Gag
- GFPLC3
- Gag
B
p41LC3 + ART
p41LC3
SSC
0,1%
2%
Gag p24
C
p41LC3 +ART
p41LC3
Peptide (gag2)
% activated T-cells
Ni
NT
NT
3-MA 0,2mM
3-MA 2mM
NT
3-MA 0,2mM
3-MA 2mM
D
% Gag+ cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIV (1)
p41LC3
E
Anti-Gag CD4+ T-cells F12
% activated T-cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIV (1)
p41LC3
peptide (gag2)
F
% Gag+ cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIV (1)
p41LC3
G
Anti-Gag CD4+ T-cells IV-9
% activated T-cells
Ni
HIV + ART + Sup. of (1)
HIV (1)
p41LC3
Peptide (gag1)

Figure S 6


A
LTR
ψ RRE
cPPT CTS
BamH I NhE I
pCMV
p41LC3
Kpn I
LTR
ΔU3
ggg → gcg
(p41LC3G120A)
B
GFPLC3
GFPLC3 + p41LC3G120A
GFPLC3 + p41LC3
- GFPLC3
- Gag
- Gag - GFPLC3
C
NT
Atg4bC74A
% activation / % Gag p24+ cells
HIVYu2b
Gag
p41LC3G120A
p41LC3

C - RESULTATS NON PUBLIES

– Article en préparation

Autophagy does not impact HIV replication in DC

Les résultats précédents suggèrent que l'autophagie dans les DC infectées VIH 1 (VIH) ne joue pas de rôle dans la présentation d'antigènes viraux endogène par les molécules du CMH-II, mais cela n'exclut pas une contribution de l'autophagie dans la dégradation de protéines virales ou dans l'inhibition de la réplication (comme cela a été décrit dans les macrophages (Campbell & Spector, 2011; Kyei et al., 2009), cf. partie I -E -4.2).

Dans les DC, absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et le marqueur de l'autophagie LC3.

Afin de déterminer l'impact de l'autophagie sur la dégradation de la protéine virale Gag dans les DC infectées, j'ai cherché à caractériser une colocalisation potentielle de Gag néosynthétisé avec les compartiments autophagiques. Pour cela, j'ai examiné la distribution relative de Gag avec la protéine LC3 par microscopie confocale.

J'ai généré des DC à partir de monocytes triés de PBMC comme décrit précédemment (cf. article précédent). Après quatre jours de différenciation, les cellules sont transduites avec un vecteur lentivirus développé au laboratoire exprimant la protéine de fusion GFP-LC3, qui me permet de visualiser les autophagosomes. Elles sont ensuite infectées pendant 3 jours avec un virus VIH_{YU2b} (Fig. 1A). Le pourcentage de cellules infectées et transduites est évalué par cytométrie (marquage anti-Gag et détection des cellules vertes GFP+) (Fig. 1B). De façon remarquable, je n'observe pas de colocalisation, en microscopie confocale dans les DC infectées, entre la GFP-LC3 et la protéine Gag du VIH (Fig. 1C, DC non traitées – NT). Le flux autophagique dans les DC peut être bloqué avec la chloroquine (ChQ) qui inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (cf. partie I -A -2.1.6). L'utilisation de cette drogue bloque le flux autophagique comme attendu (Fig. 1C – ChQ) mais ne dévoile pas de colocalisation entre LC3 et Gag.

L'autophagie peut être induite dans les cellules par la rapamycine ou certains ligands TLR comme le LPS (Delgado, Elmaoued, Davis, Kyei, & Deretic, 2008) (cf. partie I -C -1.1.2.1) . J'ai donc étudié la colocalisation de Gag avec GFP-LC3 après divers traitements induisant l'autophagie dans les DC pour essayer de forcer l'acheminement du Gag dans les autophagosomes. Comparé au traitement chloroquine seul, l'ajout de rapamycine induit bien une augmentation du nombre de vésicules d'autophagie (Fig. 1C). Cependant, quel que soit le traitement, Gag ne colocalise pas avec la GFP-LC3 comme le confirme la quantification de la colocalisation par analyse des recouvrements respectifs des pixels correspondant aux marquages Gag (rouge) et LC3 (vert) (Fig. 1C et 2C). Ces recouvrements sont exprimés par

les coefficients de Manders M1 (recouvrement du vert sur le rouge) et M2 (inversement). La protéine de fusion p41LC3 décrite précédemment (cf. article précédent) a été utilisée ici comme contrôle positif de colocalisation (DC co-transduites avec GFP-LC3 et p41LC3, Fig. 2A, B et C). L'absence de colocalisation entre Gag et la GFP-LC3 a ensuite été confirmée par marquage anticorps du LC3 endogène dans les DC infectées (Fig.S1).

Par ailleurs, j'ai étudié la colocalisation entre Gag et la protéine ubiquitine ligase p62, impliquée dans le ciblage spécifique de protéines à dégrader dans les autophagosomes (cf. partie I -C -1.1.1). Gag ne colocalise pas avec p62 dans les DC infectées (Fig. S2), mais mes données confirment la colocalisation entre la GFP-LC3 et la protéine p62, utilisée alors comme contrôle positif de la colocalisation d'une protéine endogène avec les autophagosomes.

L'ensemble de ces résultats suggère que dans les DC productivement infectées, la protéine Gag du VIH n'est pas acheminée dans les autophagosomes. Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été obtenus dans les expériences de présentation antigénique (cf. article précédent), où moduler l'autophagie ne modifie pas la présentation du Gag néosynthétisé aux LT CD4.

Les protéines Nef et Env ne contribuent pas à l'échappement du virus à l'autophagie.

De nombreux pathogènes ont développé des mécanismes pour échapper à leur destruction dans les autophagosomes (Kudchodkar & Levine, 2009).

Dans les DC infectées, l'interaction du facteur Nef avec des composants de la machinerie autophagique pourrait perturber la séquestration de particules virales dans les autophagosomes, comme cela a déjà été décrit dans les macrophages infectés (Kyei et al., 2009) (cf. partie I -E -4.2). Pour tester cette possibilité, j'ai répété les expériences de colocalisation en utilisant une souche virale délétée de Nef ($VIH_{YU2b\Delta Nef}$). Les résultats montrent (Fig. 3A) que même en l'absence de cette protéine virale, Gag ne colocalise pas (en présence ou non de chloroquine) avec des vésicules d'autophagie GFP-LC3 +. On observe des résultats similaires avec le virus délété de l'enveloppe $VIH_{BruVSV\Delta Env}$, (Fig. 3B) impliquée dans l'inhibition de l'autophagie dans les DC chargées avec le virus (Blanchet et al., 2010) (cf. partie I -E -5.2) . De façon intéressante, Gag exprimé seul par transduction dans les DC ne colocalise pas non plus avec les autophagosomes (Fig. 3C).

Ces résultats vont dans le sens de l'absence d'un mécanisme d'échappement développé par le virus pour contrecarrer l'autophagie dans les phases tardives de l'infection des DC. L'autophagie dans les DC infectées ne ciblerait donc pas spécifiquement les protéines du VIH, contrairement à ce qui a été décrit dans les macrophages (Campbell & Spector, 2011; Kyei et al., 2009). Des différences dans la biologie de ces cellules pourraient expliquer ces résultats (Delamarre, Pack, Chang, Mellman, & Trombetta, 2005; Savina & Amigorena, 2007)

L'inhibition de l'autophagie dans les DC infectées n'a pas d'effet sur la réplication virale.

Une manière directe d'illustrer une possible dégradation par autophagie de protéines virales néosynthétisées est d'étudier l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la réplication virale (cf. Tableau 4 partie I -E -4). Des DC ont été transduites avec les shRNA anti-LC3 décrits précédemment (cf. article précédent), puis infectées avec deux doses de virus. La réplication virale a ensuite été analysée par marquage Gag-p24 intracellulaire en cytométrie et par ELISA (Fig. 4A).

La transduction à l'aide des shLC3 et shCTRL n'a pas d'impact sur la cinétique de réplication du virus évaluée par le marquage intracellulaire p24+. Aussi bien dans les cellules GFP+ (30% des cellules) transduites (Fig. 4B – panneau gauche) que dans les cellules GFP- (75%) non transduites, la transduction par le shLC3 n'affecte pas la réplication du virus par rapport aux cellules traitées shCTRL (aux deux doses d'infection). La propagation du virus évaluée dans les surnageants de culture par ELISA p24+ n'est pas non plus affectée par la transduction (Fig. 4B – panneau droit).

Ces expériences indiquent que l'autophagie n'a pas d'impact sur la réplication du VIH dans les DC. Par ailleurs, j'ai confirmé ces résultats en bloquant l'autophagie avec la protéine Atg4bC74A (décrite dans l'article précédent). De plus, le blocage de la CMA ne semble pas non plus affecter la réplication du virus dans les DC (non montré).

En conclusion, l'ensemble de ces observations montrent que dans les DC infectées, la réplication du VIH ne semble pas être affectée par le flux autophagique : la protéine de matrice virale Gag n'est pas acheminée dans les autophagosomes dans un contexte infectieux, ou exprimée seule dans les DC, et la capacité du virus à se répliquer ne semble pas modifiée lorsque l'autophagie est inhibée.

REFERENCES

Blanchet, F. P., Moris, A., Nikolic, D. S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., … Piguet, V. (2010). Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity*, *32*(5), 654–69. doi:S1074-7613(10)00160-3 [pii] 10.1016/j.immuni.2010.04.011

Campbell, G. R., & Spector, S. A. (2011). Hormonally active vitamin D3 (1{alpha},25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J Biol Chem*. doi:M110.206110 [pii] 10.1074/jbc.M110.206110

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5715), 1630–4. doi:10.1126/science.1108003

Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., & Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*, *27*(7), 1110–1121. doi:emboj200831 [pii] 10.1038/emboj.2008.31

Kudchodkar, S. B. S., & Levine, B. (2009). Viruses and autophagy. *Reviews in Medical Virology*, *19*(6), 359–378. doi:10.1002/rmv.630.Viruses

Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., … Deretic, V. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*, *186*(2), 255–268. doi:jcb.200903070 [pii] 10.1083/jcb.200903070

Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*, *219*, 143–56. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x

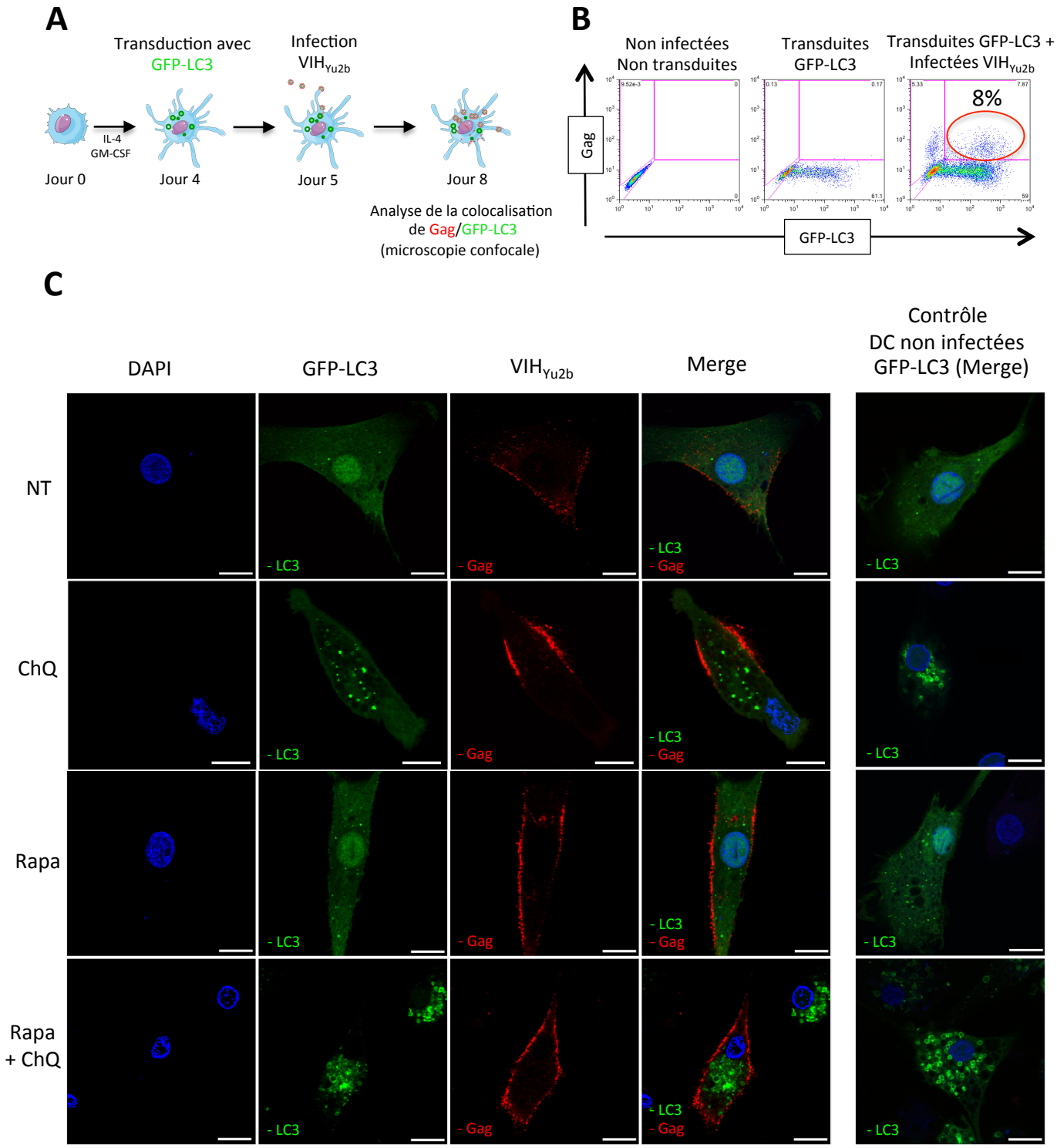


***Figure 1* : Absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et le marqueur de l'autophagie GFP-LC3 dans les DC infectées.**

(A) Schéma expérimental : après 4 jours de différenciation, des DC ont été transduites GFP-LC3 pour suivre les autophagosomes, puis infectées VIH$_{Yu2b}$. *(B) Mesure du pourcentage de DC transduites GFP-LC3 et infectées.* Le pourcentage de cellules transduites GFP-LC3 et infectées (marquage anticorps anti-p24) est mesuré par cytométrie intracellulaire. 8% des DC sont GFP-LC3+/p24+. *(C) Gag et GFP-LC3 ne colocalisent pas dans les DC infectées VIH$_{Yu2b}$.* Les DC infectées et transduites ont été mises sur lames et la colocalisation entre GFP-LC3 et Gag (marquage anticorps anti-Gag en rouge) du virus est analysée par microscopie confocale. *Panneau droit :* des DC transduites non infectées permettent de visualiser la spécificité du marquage Gag. NT: cellules non traitées ; ChQ : traitées chloroquine 100µM (1h) pour permettre la visualisation de l'accumulation des autophagosomes ; Rapa : traitées rapamycine 5µg/ml (4h). Observation confocale (objectif 60x). Marquage DAPI des noyaux (en bleu). Barre d'échelle = 10µm

Ces résultats sont représentatifs de 5 expériences indépendantes réalisées avec des DC dérivées de monocytes, issues de donneurs différents et infectées avec différents isolats viraux.

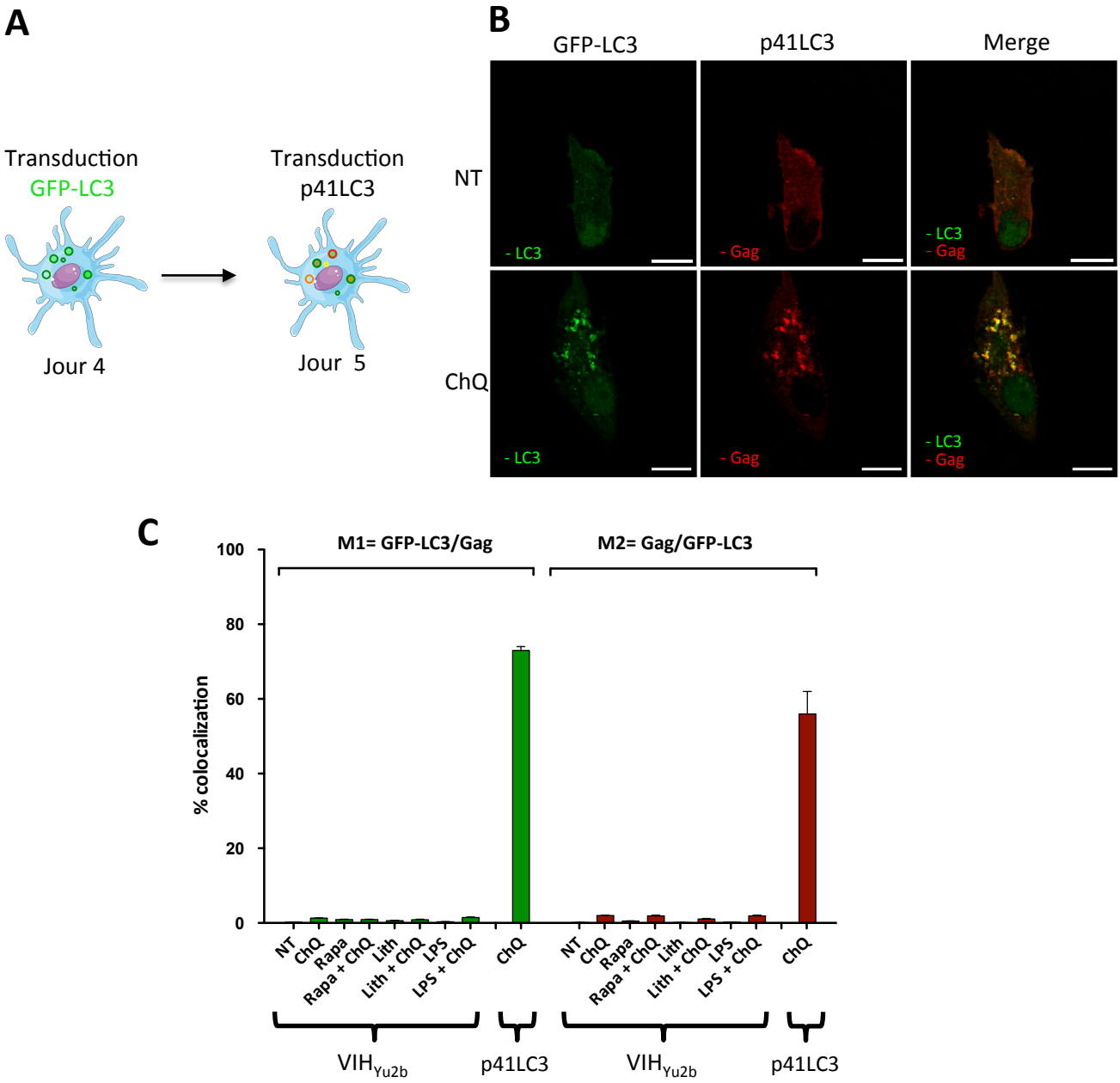


***Figure 2* : Quantification de la colocalisation GFP-LC3/Gag dans les DC infectées VIH$_{Yu2b}$ ou transduites p41LC3.**

(A) Schéma expérimental : après 4 jours de différenciation, des DC ont été co-transduites GFP-LC3 et p41LC3. *(B) Colocalisation entre p41LC3 et GFP-LC3 dans les DC co-transduites.* Les DC co-transduites ont été mises sur lames et la colocalisation entre GFP-LC3 et la p41LC3 (marquage anticorps anti-Gag en rouge) est analysée par microscopie confocale. Dans les DC non traitées (NT) on observe une colocalisation entre la p41LC3 et la GFP-LC3. Le traitement chloroquine (ChQ, 100µM 1h) permet l'accumulation des autophagosomes confirmant la colocalisation de la p41 avec les vésicules d'autophagie marquées GFP-LC3. Observation confocale (objectif 60x). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Barre d'échelle : 10µm.

(C) Quantification de la colocalisation GFP-LC3/Gag. DC infectées VIH$_{Yu2b}$ (*figure 5*) ou transduites p41LC3 (*figure 6*) +/- traitements induisant l'autophagie (Rapa : rapamycine 5µg/ml, 4h ; Lith : lithium 10mM, 4h ; LPS 1µg/ml, 4h) en présence ou absence de chloroquine (ChQ, 100µM 1h). Indépendamment du traitement, on n'observe pas de colocalisation. Les DC co-transduites avec p41LC3 et GFP-LC3 sont utilisées comme contrôle positif de colocalisation.

Les coefficients M1 et M2 permettant d'estimer la colocalisation sont apportés par le logiciel ImageJ et le plugin JACoP (Just Another Colocalization Plugin). M1=fraction du marquage LC3 contenant un marquage Gag. M2=fraction du marquage Gag contenant un marquage LC3. Ces résultats sont issus d'une moyenne sur 20 cellules par conditions, sur 3 expériences indépendantes. (Barres d'erreur: Déviation Standard)

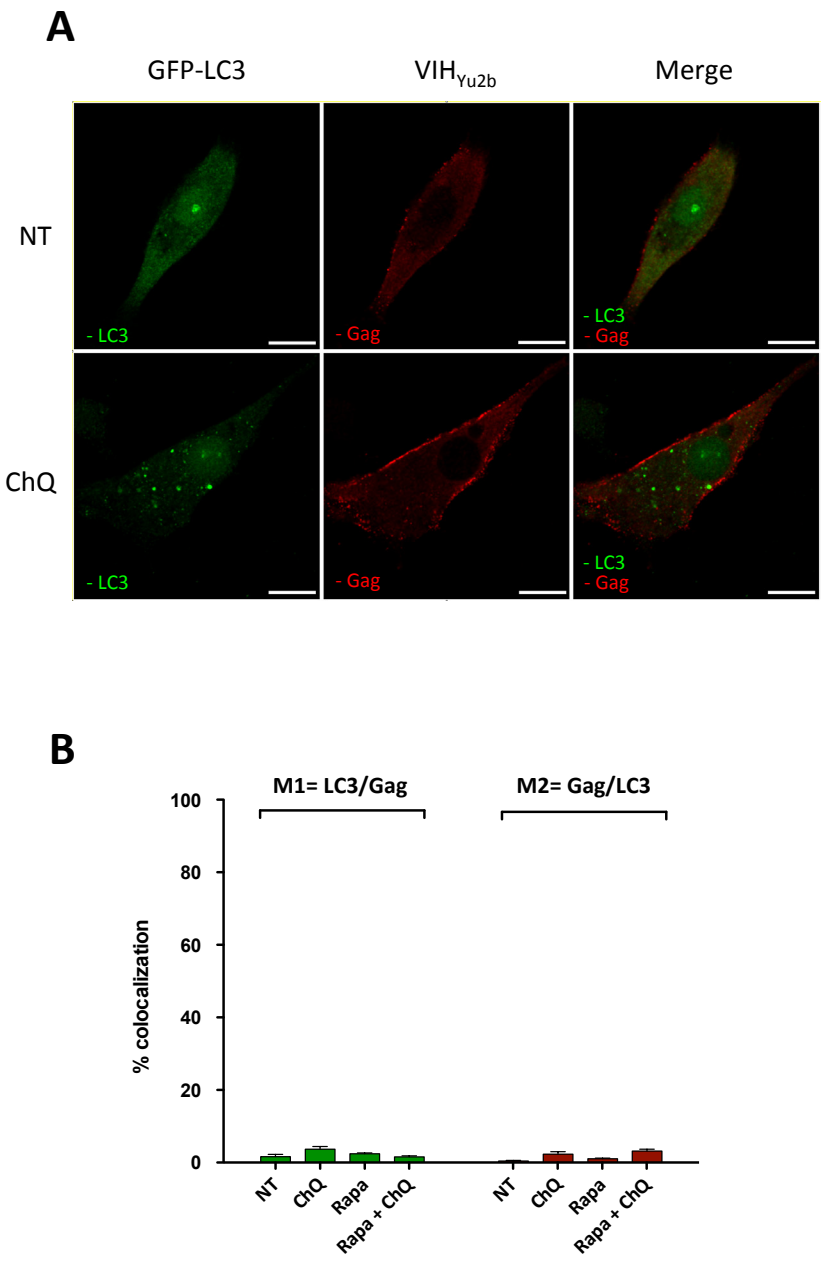


***Figure S1* : Dans les DC, absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et le LC3 endogène.**
Après 4 jours de différenciation, les DC ont été infectées VIH$_{Yu2b}$. *(A) Gag ne colocalise pas avec le LC3 endogène dans les DC infectées VIH$_{Yu2b}$.* Les DC infectées ont été mises sur lames, marquées avec un anticorps dirigé contre LC3-A/B (en vert) et la colocalisation avec Gag (marquage anticorps anti-Gag en rouge) du virus est analysée par microscopie confocale. NT: cellules non traitées ; ChQ : traitées chloroquine 100µM (1h) pour permettre la visualisation de l'accumulation des autophagosomes. Observation confocale (objectif 60x). Barre d'échelle = 10µm.
Ces résultats sont représentatifs de 5 expériences indépendantes réalisées avec des DC dérivées de monocytes issues de donneurs différents et infectées avec différents isolats viraux.
(B) Quantification de la colocalisation entre LC3-A/B et Gag. DC infectées VIH$_{Yu2b}$ +/- traitements induisant l'autophagie (Rapa : rapamycine 5µg/ml, 4h), en présence ou absence de ChQ (100µM, 1h). Indépendamment du traitement, on n'observe pas de colocalisation. L'analyse des coefficients M1 et M2 est effectuée comme dans la figure 2.(Barres d'erreur: Déviation Standard)

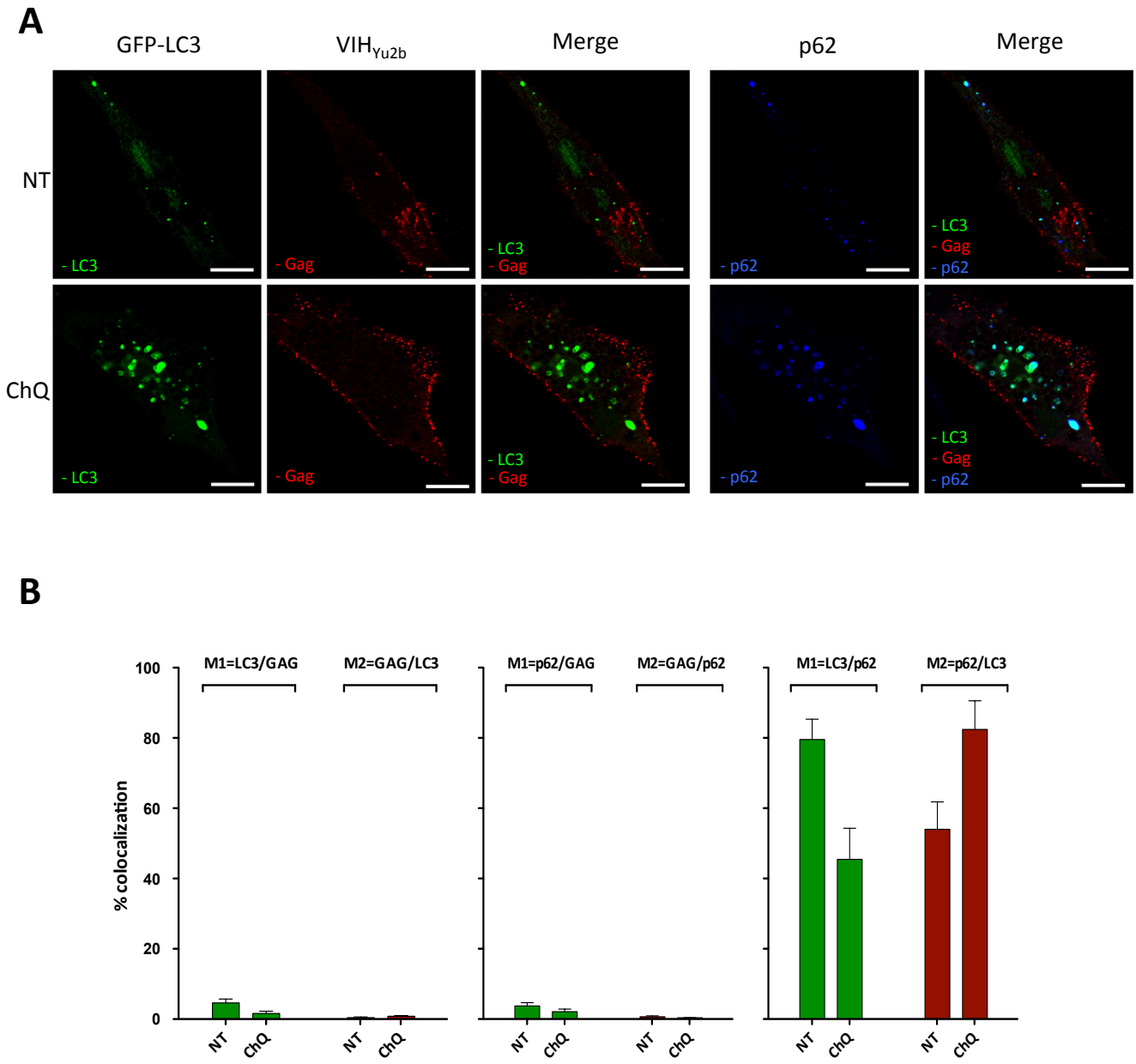


***Figure S2* : Absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et p62 dans les DC infectées**

Après 4 jours de différenciation, les DC ont été transduites GFP-LC3 pour suivre les autophagosomes, puis infectées VIH$_{Yu2b}$. *(A) Gag ne colocalise pas avec p62 dans les DC infectées VIH$_{Yu2b}$.* Les DC infectées et transduites ont été mises sur lames et marquées avec un anticorps dirigé contre p62 (en bleu). La colocalisation de Gag (marquage anticorps anti-Gag en rouge) du virus avec p62 ou la GFP-LC3 est analysée par microscopie confocale. Dans les DC non traitées (NT), on observe une colocalisation entre la p62 et la GFP-LC3. Le traitement chloroquine (ChQ, 100µM, 1h) permet l'accumulation des autophagosomes confirmant la colocalisation de la p62 avec les vésicules d'autophagie marquées GFP-LC3. Observation confocale (objectif 60x). Barre d'échelle = 10µm

(B) Quantification de la colocalisation entre Gag&GFP-LC3, Gag&p62 et p62&GFP-LC3. DC infectées VIH$_{Yu2b}$ en présence ou absence de ChQ (100µM, 1h). On n'observe pas de colocalisation entre Gag et p62 ou Gag et GFP-LC3. La p62 est utilisée comme un contrôle positif de colocalisation des autophagosomes avec une protéine endogène. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes réalisées avec des DC dérivées de monocytes issues de donneurs différents et infectées avec différents isolats viraux. L'analyse des coefficients M1 et M2 est effectuée comme dans la figure 2.(Barres d'erreur: Déviation Standard)

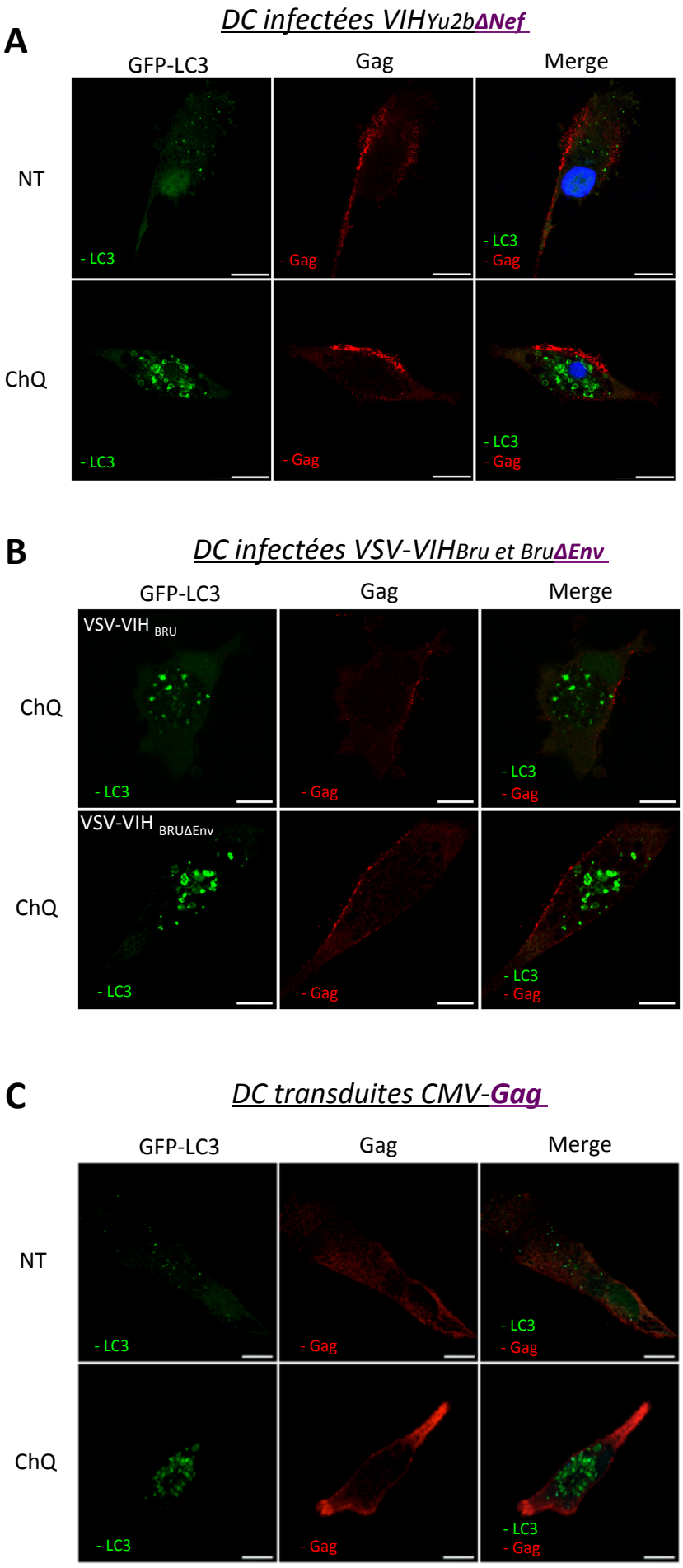


Figure 3: **Le VIH ne semble pas manipuler l'autophagie dans les DC infectées.**

(A et B) Les protéines Nef et Env ne contribuent pas à l'échappement du virus à l'autophagie.

(A) Des DC transduites GFP-LC3 ont été infectées avec un virus VIH_{Yu2b} délété de la protéine accessoire Nef. Comme précédemment, on n'observe pas en miscroscopie de colocalisation dans les DC non traitées (NT) ou traitées chloroquine (ChQ) entre la protéine virale Gag (en rouge) et la GFP-LC3 qui marque les autophagosomes.

(B) De la même manière, des DC transduites GFP-LC3 ont été infectées avec un virus VIH_{Bru} pseudotypé VSV-G (*en haut*, VSV-VIH_{Bru}) ou avec un virus issu de la même souche virale mais délété de la protéine Env (*en bas*, VSV-$VIH_{Bru\Delta Env}$). Avec un traitement chloroquine (ChQ), on observe l'accumulation des autophagosomes mais toujours aucune colocalisation Gag/GFP-LC3 ni en présence ni en absence de la protéine Env.

(C) Des DC exprimant la GFP-LC3 sont transduites avec un vecteur lentiviral exprimant Gag seul (CMV-Gag). En dehors du contexte d'une infection VIH productive, Gag (en rouge) ne colocalise pas avec la GFP-LC3 et ce dans les DC non traitées (NT) ou traitées avec la chloroquine (ChQ).

Ces résultats vont dans le sens de l'absence d'un mécanisme d'échappement développé par le virus pour contrecarrer l'autophagie dans les phases tardives de l'infection des DC.

Observation confocale (objectif 60x). Tous ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes. Barre d'échelle : 10µm.

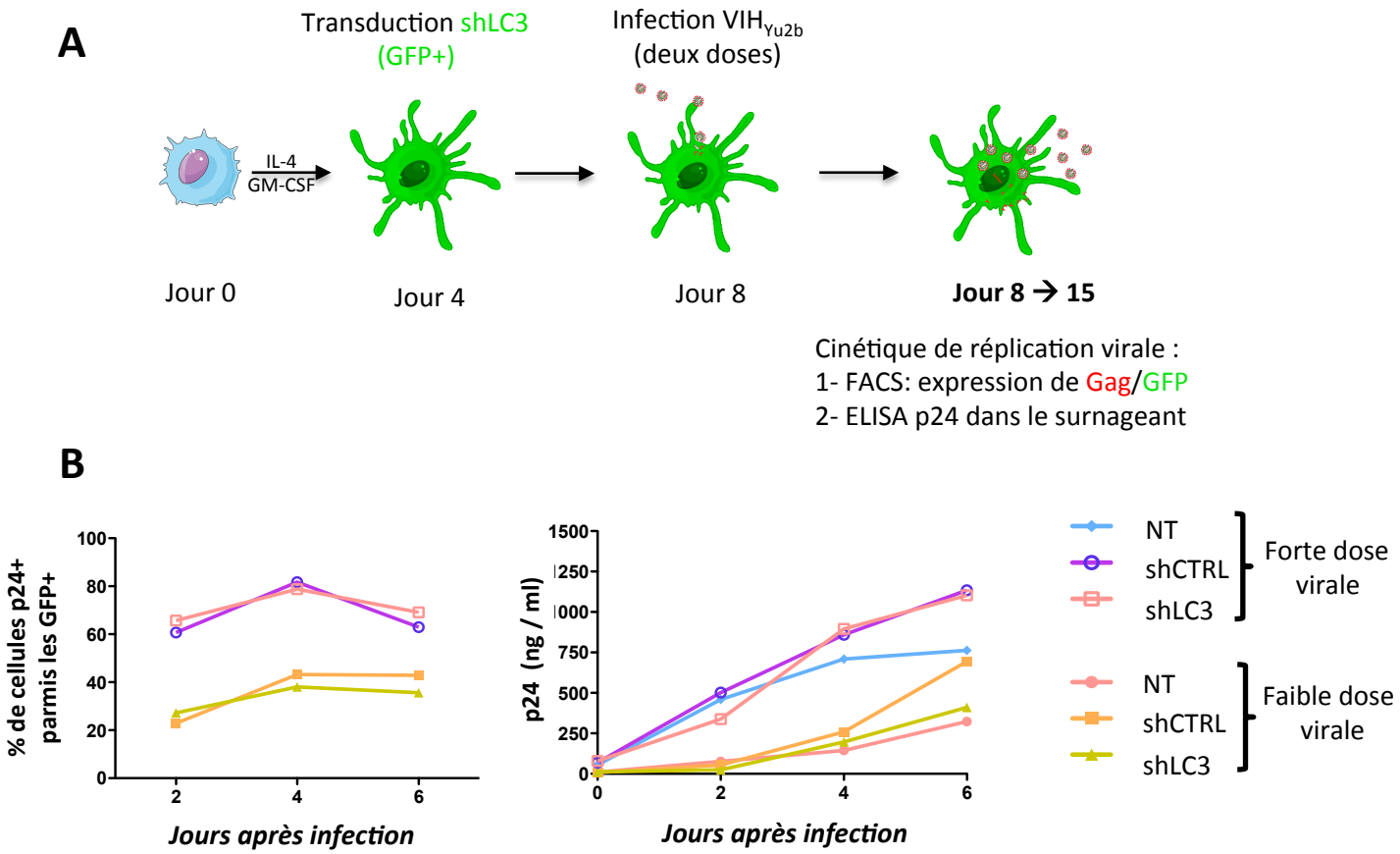


***Figure 4* : L'inhibition de l'autophagie dans les DC infectées n'a pas d'effet sur la réplication virale.**
(A) Schéma expérimental : Après différenciation, des DC ont été transduites avec les vecteurs lentiviraux shCTRL ou shLC3 exprimant la GFP (30% des cellules sont GFP+), puis infectées avec deux doses de virus (50ng/ml p24 : faible dose ; 500ng/ml p24 : forte dose). *(B) Analyse de la réplication virale dans les DC transduites.* La réplication virale a ensuite été analysée par marquage de la p24 intracellulaire en cytométrie dans les cellules GFP+ (*à gauche*) transduites shCTRL ou shLC3 et par ELISA (dosage de la p24 dans le surnageant de culture ; *panneau de droite*). NT : cellules non transduites ; shCTRL/shLC3 : cellules transduites shCTRL ou shLC3. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

IV - DISCUSSION/CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La caractérisation et la description des réponses T CD4 spécifiques d'antigènes du VIH chez les patients infectés ont reçu une attention croissante ces dernières années quant à l'étude du contrôle de la réplication virale. En effet, les LT CD4, via leur différenciation en T_{FH}, contrôlent plusieurs étapes de l'activation des LB pour la génération d'anticorps neutralisants[774] à fort potentiel de protection contre l'infection[775]. De plus, plusieurs données se sont accumulées, montrant que l'apparition d'une réponse T CD4 spécifique efficace et diversifiée serait associée, d'une part, à l'augmentation de l'efficacité de la réponse CTL antivirale[722] (qui jouerait elle-même un rôle déterminant dans le contrôle de la réplication du VIH[253,254,718,720]) et, d'autre part, au contrôle de la charge virale pendant la primo-infection et la phase d'infection chronique[721,722,776,777]. Notamment, l'induction précoce d'une réponse T CD4 contre la protéine virale Gag semble particulièrement importante pour le contrôle de la réplication du VIH[776]. De façon cohérente, certains allèles HLA de classe II sont corrélés avec la capacité de patients vaccinés (RV144) à produire des anticorps neutralisants[723]. En outre, la présence d'allèles codant pour certaines molécules HLA de classe II DR, capables de fixer un répertoire varié de peptides antigéniques, est corrélée avec une faible charge virale chez les patients infectés[777]. L'activation des T CD4 spécifiques du virus étant dépendante de la capacité des APC à présenter des antigènes viraux sur leurs molécules du CMH-II, l'ensemble de ces données suggère un rôle primordial des APC dans l'induction d'une réponse immune adaptative cellulaire efficace. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'apprêtement des antigènes du VIH dans les APC semble être une étape clef dans la recherche d'un vaccin qui activerait efficacement la réponse cellulaire T (et B) spécifique.

Les DC sont des APC qui jouent un rôle majeur dans l'induction des réponses T CD4 (et CD8) spécifiques dirigées contre les pathogènes. Ceci de par leur capacité à capturer, reconnaître et dégrader les pathogènes, à s'activer et à sur-exprimer à leur surface les molécules du CMH-I/-II ainsi que différentes molécules de costimulation, et à migrer dans les organes lymphoïdes secondaires.

Dans le contexte de l'infection VIH, la capacité des DC à présenter efficacement des antigènes du VIH pour activer la réponse lymphocytaire T antivirale spécifique a fait l'objet de nombreuses études. Les DC exprimant des facteurs de restriction limitant la réplication du virus[645,778], ces études se sont majoritairement concentrées sur l'aptitude de ces cellules à capturer le virus (libre[779] ou dans des cellules infectées[344]), à le dégrader et à présenter les antigènes viraux issus de cette dégradation sur leurs molécules du CMH. Ainsi, la capture du virus médiée par des CLR comme DC-SIGN entraîne la dégradation partielle du virus dans des compartiments endosomaux et conduit au chargement des molécules du CMH-II pour l'activation des LT CD4 spécifiques[512,724,780]. D'autre part, après fusion de l'enveloppe virale, les virus entrants ayant échappé à la dégradation dans les DC constituent une source d'antigènes exogènes dégradés par le protéasome et chargés sur les molécules du CMH-I,

conduisant à l'activation des LT CD8 spécifiques[279,344,724,725,779](présentation croisée). Cependant, le VIH peut également se répliquer dans les DC *in vitro* et des DC infectées sont retrouvées dans les tissus des patients infectés[642,643]. Ces cellules pourraient être capables de migrer dans les ganglions [730] pour activer la réponse T antivirale spécifique. Si plusieurs études ont montré que des antigènes du VIH exprimés *de novo* dans divers modèles d'APC induisent l'activation des LT CD8 spécifiques[627,731,781], très peu d'études *in vitro* ont cherché à caractériser les capacités des APC/DC infectées VIH à présenter les antigènes viraux néosynthétisés sur les molécules du CMH[732].

Lors de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence pour la première fois que les DC humaines dérivées de monocytes et infectées par le VIH *in vitro* étaient capables d'apprêter et de présenter sur les molécules du CMH-II des peptides issus de la protéine Gag endogène, conduisant à l'activation de clones T CD4 spécifiques de cet antigène. De façon remarquable, l'activation de ces LT CD4 nécessite la synthèse *de novo* de la protéine Gag. Par ailleurs, en utilisant plusieurs clones T CD4 spécifiques pour deux épitopes différents (gag1 reconnu par les clones L11&F12 et gag2 reconnu par le clone IV-9), j'ai montré que seul l'épitope gag2 était apprêté via la voie de présentation endogène. En effet, les DC infectées sont incapables d'activer le clone IV-9 spécifique de gag1, contrairement aux DC chargées avec le virus en exogène. Ainsi, la voie de présentation endogène responsable de l'apprêtement des antigènes du VIH sur les molécules du CMH-II ne serait pas redondante avec la voie exogène et pourrait générer un répertoire différent de peptides présentés.

Il est souvent admis comme un dogme en immunologie que les molécules du CMH-II présentent exclusivement des peptides dérivés d'antigènes exogènes, capturés dans l'environnement extracellulaire. Mes résultats montrent que, dans le contexte de l'infection VIH des DC, des antigènes viraux néosynthétisés peuvent aussi être apprêtés sur les molécules du CMH-II par une voie non classique. Ils s'ajoutent ainsi à plusieurs autres études qui révèlent que l'infection d'APC par différents virus conduit à l'activation de LT CD4 spécifiques d'antigènes viraux néosynthétisés[413,583,782–784], posant ainsi la question de la relevance de ce dogme dans un contexte infectieux. En outre, 20% des peptides du soi présentés sur les molécules du CMH-II seraient issus de protéines cytoplasmiques et nucléaires[411,785]. Il importe de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires responsables de cette présentation.

Plusieurs évidences suggèrent un rôle de la macroautophagie (appelée communément autophagie) dans la présentation sur les molécules du CMH-II d'antigènes endogènes/néosynthétisés du soi ou de pathogènes intracellulaires[576,786]. L'autophagie permet en effet la dégradation lysosomale de composants cytoplasmiques pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, et elle est également impliquée dans la dégradation de plusieurs pathogènes[219], dont certains virus[517]. Dans des LB transformés par l'EBV, certains épitopes de la protéine virale nucléaire EBNA1 sont apprêtés sur les molécules du CMH-II de façon dépendante de l'autophagie, qui joue donc un rôle dans l'activation des LT CD4 spécifiques

de cet antigène[583]. En outre, dans les DC, les autophagosomes fusionnent continuellement avec des compartiments riches en molécules du CMH-II[785].

Fabien Blanchet a montré en collaboration avec notre laboratoire que l'autophagie pouvait participer à l'activation de LT CD4 spécifiques de la protéine Gag du VIH dans des DC chargées avec le virus en absence de réplication virale[512]. Le virus entrant est dirigé dans les autophagosomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes ; l'autophagie participe alors au chargement sur les molécules du CMH-II des peptides générés par la dégradation du virus. L'autophagie intervient donc dans la présentation d'antigènes exogènes du VIH.

Dans la continuité de cette étude, j'ai cherché à caractériser le rôle de l'autophagie dans l'apprêtement et la présentation sur les molécules du CMH-II du Gag néosynthétisé, après l'infection des DC, pendant la réplication du virus. J'ai montré que l'autophagie, de façon surprenante, ne participait pas à la présentation endogène CMH-II de l'épitope gag2. En effet, ni l'inhibition de l'autophagie avec des drogues et des shRNA contre la protéine LC3 (shLC3), ni le blocage de la formation des autophagosomes avec la protéine Atg4BC74A, n'affectent la capacité des DC infectées à activer les clones L11&F12 spécifiques de cet épitope. La CMA est une autre forme d'autophagie, également impliquée dans la présentation d'antigènes endogènes par les CMH-II[602]. Les protéines substrat de cette voie contiennent le motif dégénéré KFERQ, permettant leur prise en charge par les protéines chaperonnes de la CMA. Une analyse de la séquence de Gag montre qu'il existe un motif similaire dans cette protéine. Cependant, bloquer la CMA à l'aide d'un shRNA ciblant spécifiquement LAMP-2A n'altère pas non plus la présentation endogène de l'épitope gag2.

La contribution de l'autophagie à la présentation d'antigènes viraux endogènes par les molécules du CMH-II semble intuitivement séduisante. Cette idée a été relayée par les études montrant que l'autophagie est impliquée dans la présentation sur les molécules du CMH-II de l'antigène EBNA1 de l'EBV[583,584]. Cependant cette voie de présentation n'est pas exclusive car certains épitopes d'EBNA1 sont apprêtés de façon indépendante de l'autophagie[584]. De plus, le rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes endogènes semble dépendre du contexte infectieux. Par exemple, le virus de la grippe induit l'autophagie dans les cellules infectées, et l'antigène de matrice virale peut être apprêté par la voie endogène sur les molécules du CMH-II des DC murines[414]. De façon intéressante, tout comme dans le contexte de l'infection des DC humaines par le VIH, seuls certains épitopes de la matrice peuvent être présentés par la voie endogène, et l'autophagie n'est pas le mécanisme responsable[413,414]. Au contraire, les transporteurs TAP et le protéasome semblent impliqués dans l'apprêtement des épitopes présentés par la voie endogène. Au laboratoire, nous sommes en train de développer un lentivirus qui exprime la protéine ICP47 du virus HSV de manière à bloquer les pompes TAP[787] dans les DC, pour évaluer si cette voie contribue à la présentation de l'épitope gag2 du Gag néosynthétisé aux clones T CD4 spécifiques.

Acheminer dans les autophagosomes des DC la protéine de la matrice virale du virus de la grippe en la fusionnant avec la protéine LC3 augmente de façon importante l'activation

de la réponse T CD4 dirigée contre cet antigène *in vitro*[785]. De plus, une étude récente montre, dans un modèle murin, que l'expression de la protéine de fusion VIS-GagLC3, augmente significativement l'activation de la réponse LT CD4 *in vivo* en comparaison avec la protéine VIS-Gag[601]. Via une approche similaire, j'ai démontré que des DC transduites avec un vecteur lentivirus codant pour la protéine VIH-GagLC3 sont capables d'induire une forte réponse T CD4 dirigée contre l'épitope gag2. La protéine Gag dans ces DC colocalise avec les autophagosomes LC3+ ; inhiber l'autophagie avec des drogues conduit alors à une inhibition dose dépendante de l'activation des clones T CD4 spécifiques. Le ciblage de Gag du VIH dans les autophagosomes des DC conduit à une meilleure activation des clones L11&F12, en comparaison avec les DC infectées VIH. Par ailleurs, en introduisant une mutation dans GagLC3 qui empêche son couplage à la membrane des autophagosomes, la réponse T CD4 spécifique n'est plus potentialisée.

De façon remarquable, les DC transduites avec GagLC3 sont capables d'activer efficacement les clones T CD4 spécifiques de l'épitope gag1. Ainsi, forcer l'apprêtement de la protéine Gag dans les autophagosomes, en plus de potentialiser la réponse T CD4 spécifique, est susceptible d'élargir le répertoire des peptides présentés par la voie endogène sur les molécules du CMH-II. Notons qu'il est également possible de forcer la dégradation lysosomale d'une protéine via la CMA en rajoutant à son extrémité N-terminal le motif KFERQ[170]. En reprenant cette stratégie, il sera possible d'évaluer l'impact de l'expression dans les DC d'une protéine de fusion KFERQ-Gag sur l'activation de nos clones T CD4, et sur le répertoire des épitopes de Gag présentés.

Un même antigène néosynthétisé peut donc être présenté sur les molécules du CMH-II via différents mécanismes. Les DC infectées exprimant Gag néosynthétisé présentent certains épitopes de cette protéine, mais l'autophagie ne joue pas de rôle dans cette voie de présentation. Pourtant, forcer l'accumulation de Gag dans les autophagosomes conduit à une potentialisation de la présentation CMH-II endogène et à une diversification du répertoire des épitopes présentés. Ces observations posent logiquement la question de la localisation du Gag néosynthétisé dans les DC infectées VIH, mais aussi de l'existence d'éventuels mécanismes d'échappement développés par le virus.

Dans les macrophages infectés VIH, deux études ont montré que Gag colocalise avec les autophagosomes, via une interaction avec la protéine LC3[788,789]. J'ai donc analysé la colocalisation dans les DC infectées entre la protéine Gag et les vésicules d'autophagie marquées LC3. Contrairement aux observations faites avec les macrophages, Gag néosynthétisé ne se retrouve pas dans les autophagosomes des DC infectées, en absence ou en présence d'inducteur de l'autophagie. Bien que l'autophagie soit parfois considérée comme un mécanisme non sélectif, de nombreuses évidences montrent que l'acheminement de protéines ou de pathogènes dans les autophagosomes peut être dépendant de récepteurs/adaptateurs spécifiques[143,513] comme la protéine p62. J'ai montré que la protéine virale Gag ne colocalisait pas non plus avec cette protéine dans les DC infectées par le VIH.

Ces résultats suggèrent que les néovirions ne se retrouvent pas dans les autophagosomes des DC. Or, l'étude de F. Blanchet a révélé que la protéine Gag du virus entrant colocalise avec les autophagosomes des DC, en absence de réplication virale. Le virus entrant serait dirigé rapidement (dès 15 min) dans les autophagosomes, avec un pic de colocalisation à 12h d'infection. De 12h à 20h post-infection, la colocalisation entre Gag et LC3 commence à diminuer, avant même le début de la néosynthèse de la protéine Gag. Pendant ma thèse, j'ai effectué des cinétiques de colocalisation du virus avec LC3 entre 30min et 6 jours post-infection, qui sont en cours d'analyse. Mes résultats confirment la colocalisation de Gag avec les autophagosomes lors de l'entrée du virus, et montrent que cette colocalisation disparaît ensuite aux temps tardifs de l'infection pendant la réplication virale lorsque Gag est exprimé dans les DC.

Il est intéressant de noter que, dans un contexte infectieux différent, en utilisant un vecteur vaccinal rougeole recombinant exprimant la protéine Gag du VIH (MeV-Gag, fourni par Frédéric Tangy), j'ai montré que Gag endogène colocalise avec les autophagosomes dans les DC. Il a été montré que la rougeole, par l'intermédiaire du récepteur CD46, induit l'autophagie dans les cellules[622]. Ces vecteurs rougeole recombinants sont fortement immunogènes[790] : les DC infectées activent efficacement les clones LT CD4 anti-Gag et la néosynthèse de cette protéine est nécessaire pour sa présentation. Étudier l'implication de l'autophagie dans la présentation des antigènes issus de Gag dans ce contexte infectieux pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette immunogénicité. Les outils que j'ai développés durant ma thèse permettront la caractérisation rapide du rôle de l'autophagie dans l'infection par ce vecteur rougeole recombinant. Ainsi, en fonction du contexte infectieux (VIH ou MeV-Gag), l'autophagie pourrait jouer un rôle plus ou moins important dans la dégradation de la protéine Gag néosynthétisée. Il serait intéressant d'évaluer la colocalisation de Gag dans des DC infectées VIH après stimulation de l'autophagie par des anticorps anti-CD46 qui simulent l'induction du flux autophagique[622] observée dans le contexte d'une infection rougeole[622].

Les données de la littérature montrent que, dans les macrophages infectés, le virus peut se trouver dans les autophagosomes, et l'inhibition de l'autophagie basale diminue la réplication virale[510,789]. Kyei et coll ont révélé que, dans ces cellules, via l'interaction entre Nef et Beclin 1, le virus serait capable d'inhiber la maturation des autophagosomes pour éviter sa dégradation dans les compartiments autophago-lysosomaux[789]. Ces résultats suggèrent qu'une fois la maturation des autophagosomes bloquée, le virus pourrait alors utiliser la machinerie autophagique pour augmenter sa réplication. Dans les DC infectées VIH, Nef pourrait donc éventuellement permettre au virus d'échapper à la dégradation, ce qui expliquerait l'absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et les autophagosomes. Cependant, j'ai montré que Gag ne colocalisait pas avec les autophagosomes LC3+ dans des DC infectées par un virus délété pour Nef. En accord avec ces résultats, l'inhibition de

l'autophagie (via l'expression de shLC3 ou d'Atg4bC74A) dans les DC infectées par ce virus muté ne modifie pas l'activation des clones T CD4 L11&F12.

Par ailleurs, dans les DC chargées avec le virus, la protéine Env serait capable d'inhiber l'autophagie précocement (1h post-infection) via son interaction avec le récepteur CD4[512]. Cependant, dans les DC productivement infectées, je n'ai pas observé de diminution du nombre d'autophagosomes (données en cours d'analyse). Par ailleurs, la protéine Gag néosynthétisée ne colocalise pas avec les autophagosomes des DC infectées par un virus délété pour la protéine Env.

Ainsi, en utilisant différents virus mutants délétés pour les protéines Nef et Env, mes résultats suggèrent que dans les DC infectées, le virus ne semble pas avoir développé de mécanisme d'échappement qui expliquerait l'absence de colocalisation entre Gag néosynthétisé et les autophagosomes. En outre, Gag exprimé seul dans les DC ne colocalise pas non plus avec les autophagosomes, ce qui confirme ces résultats. Par ailleurs, dans les DC infectées par le VIH, la manipulation du flux autophagique à l'aide de drogues qui induisent l'autophagie ou bloquent la dégradation lysosomale des autophagosomes ne révèle pas de colocalisation entre Gag et les autophagosomes.

Certains virus interagissent avec la machinerie autophagique pour augmenter leur réplication mais ne sont pas retrouvés dans les autophagosomes[623]. Ainsi, bien que la protéine Gag néosynthétisée du virus ne semble pas dégradée dans les autophagosomes des DC, cela n'exclut pas un rôle de l'autophagie dans l'inhibition ou la potentialisation de la réplication virale. Cependant dans les DC, la réplication virale, mesurée par le pourcentage de cellules infectées et de Gag extracellulaire, ne semble pas modifiée lorsque l'autophagie est inhibée. Ces résultats, et mes données relatives à l'absence de colocalisation entre Gag et les autophagosomes, suggèrent que l'autophagie n'a pas d'impact sur la réplication virale dans les DC.

Pourtant, ces données semblent en contradiction avec les études dans les macrophages infectés où le flux autophagique affecte la réplication virale[760,789]. Toutefois, nos résultats dans les macrophages infectés montrent une absence de colocalisation entre Gag et LC3 dans les cellules mononucléées. L'infection des macrophages *in vitro* induit la formation de larges syncytia polynucléés. Nos observations montrent que, dans ces cellules fusionnées, Gag semble colocaliser avec les autophagosomes. Ainsi, la colocalisation observée par Kyei et coll. & Campell et coll. pourrait n'être observable que dans ces syncytia. Leur présence dans les tissus de patients infectés est controversée, ce qui pose la question de la relevance de ces études quant au rôle de l'autophagie dans les macrophages infectés *in vivo*.

Par ailleurs, il existe des différences dans la biologie cellulaire intrinsèque des macrophages et des DC, qui pourraient expliquer les différences de colocalisation entre les protéines Gag et LC3 dans les macrophages et les DC. En effet, les macrophages sont des cellules dont la fonction principale est de dégrader efficacement les pathogènes, via leur activité protéolytique lysosomale élevée[238]. Au contraire, les DC dégradent les pathogènes

plus lentement pour favoriser la présentation des peptides antigéniques sur les molécules du CMH[238,239]. L'autophagie dans les macrophages pourrait être plus efficace que l'autophagie dans les DC pour dégrader les pathogènes. Ainsi, dans les T CD4 infectées par le VIH, où l'autophagie basale est moins élevée que dans les cellules myéloïdes, le virus n'est pas retrouvé dans les autophagosomes[118].

Une autre hypothèse particulièrement intéressante établit un lien entre les observations montrant la colocalisation de Gag néosynthétisé avec les autophagosomes des macrophages infectés[788,789] et les observations sur la colocalisation de la protéine Gag de l'input viral avec les autophagosomes des DC[512]. En effet, dans les macrophages productivement infectés, le virus peut bourgeonner, du moins en partie, dans des compartiments endosomaux multivésiculaires (MVB)[791,792] (contrairement aux DC et aux LT CD4 où le virus bourgeonne majoritairement à la membrane plasmique). De façon marquante, le virus exogène peut être capturé par les DC dans des compartiments qui possèdent les mêmes marqueurs que ces MVB, notamment CD81, CD63 et les molécules du CMH-II[666,792]. Ces compartiments sont eux aussi multivésiculaires. Qui plus est, ils possèdent la même capacité à « excréter » le virus vers les LT CD4 lors de son transfert au niveau de la synapse virologique[792]. La différence principale est que dans le cas des DC le virus provient de l'input viral, alors que dans les macrophages celui-ci est issu de la réplication *de novo*[792]. Quoi qu'il en soit, la maturation des autophagosomes passe par la fusion avec des compartiments endosomaux d'acidité croissante[75] que sont les endosomes précoces, tardifs et les MVB[78,83,87], pour créer des compartiments appelés amphisomes[79,512], avant de fusionner avec les lysosomes. Ainsi, dans les DC, l'input viral, en s'accumulant dans des compartiments MVB-like riches en CMH-II[792], pourrait être dégradé (partiellement) via la machinerie autophagique, et conduire à l'apprêtement des antigènes viraux exogènes sur les molécules du CMH-II. De manière équivalente, dans les macrophages, les virus issus de la réplication virale qui s'accumulent dans les MVB seraient retrouvés dans des structures amphisomales suite à la fusion des autophagosomes avec ces compartiments multivésiculaires. Pour évaluer cette hypothèse, on pourrait bloquer la formation des MVB (en inhibant l'expression de la machinerie ESCRT[793]) et évaluer l'effet sur la colocalisation de Gag néosynthétisé avec les autophagosomes des macrophages. Il est envisageable que la protéine Nef, en interagissant avec Beclin 1, inhibe la fusion MVB/autophagosomes, favorisant ainsi la réplication du virus : en effet, il a été montré que Nef interagissait avec la voie PI3K pour induire l'accumulation des MVB dans les cellules[794] (et perturbait ainsi le trafic des molécules du CMH-II). Dans les DC infectées[795] et les LT CD4, le virus bourgeonne majoritairement à la membrane plasmique, et ne serait donc pas retrouvé dans les autophagosomes, qui alors ne participeraient pas au chargement d'antigènes viraux endogènes sur les molécules du CMH-II. Forcer l'accumulation de Gag dans les MVB des DC pourrait alors conduire, si cette hypothèse est exacte, à une présentation des épitopes de cette protéine via la machinerie autophagique. De façon

intéressante, le récepteur CD46, responsable de l'induction de l'autophagie par le MeV vaccinal[622], transite via les MVB de façon constitutive[622].

Par ailleurs, si l'autophagie ne joue pas de rôle dans la présentation endogène de la protéine Gag dans les DC infectées VIH, d'autres protéines du virus, notamment l'enveloppe virale qui interagit avec les membranes, pourraient se retrouver dans les autophagosomes et être apprêtées sur les molécules du CMH-II de façon dépendante de l'autophagie. Dans des cellules APC modèles infectées avec un vecteur vaccine recombinant exprimant la protéine Env, celle-ci est exprimée à la membrane avant d'être présentée sur les molécules du CMH-II[404]. Le mécanisme de cette voie de présentation n'est pas décrit, mais l'autophagie pourrait jouer un rôle.

Au sein du laboratoire d'Arnaud Moris, j'ai donc pu montrer pour la première fois que des DC infectées par le VIH sont capables de présenter des antigènes viraux endogènes sur les molécules du CMH-II. Cette voie de présentation permet l'activation efficace de la réponse T CD4, et constitue une alternative à la présentation exogène CMH-II, de par le répertoire différent des peptides présentés qu'elle engendre. Dans ce contexte infectieux, l'autophagie ne serait pas impliquée dans cette voie de présentation non classique. Ainsi, la protéine virale Gag néosynthétisée ne colocalise pas avec les autophagosomes dans les DC infectées. L'autophagie n'affecte pas la réplication virale, suggérant que le virus ne serait pas dégradé par la machinerie autophagique. Cependant, forcer la colocalisation de la protéine Gag avec les autophagosomes, via l'expression de la protéine de fusion GagLC3, potentialise la capacité des DC à activer la réponse T CD4 spécifique, et élargit le répertoire des épitopes présentés par la voie endogène sur les CMH-II.

Ainsi, dans les DC, plusieurs voies différentes coexistent et peuvent conduire à l'apprêtement d'antigènes viraux sur les molécules du CMH-II. En fonction du contexte infectieux (virus exogène ou réplicatif) et de la localisation intracellulaire des antigènes viraux (à l'intérieur ou à l'extérieur des autophagosomes), différents mécanismes partiellement redondants sont donc impliqués dans la présentation des antigènes sur les molécules de CMH-II. Plusieurs études ont montré que les virus ont développé au cours de leur évolution de nombreux mécanismes pour échapper à leur présentation sur les molécules du CMH. Par exemple, le virus HCMV a développé différentes protéines afin de bloquer l'apprêtement des peptides antigéniques sur les molécules de CMH-I et sur les molécules de CMH-II[796]. De même, la protéine Nef du VIH dérégule le trafic vésiculaire et l'expression des molécules de CMH-I/-II[638,734,794]. Ainsi, il semble logique que les DC, qui interagissent avec ces pathogènes et sont spécialisées dans la présentation des antigènes, aient développé plusieurs mécanismes de présentation antigénique afin de contourner de manière la plus efficace possible les mécanismes d'échappement mis en place par les virus, et de conduire à l'induction d'une réponse immune adaptative efficace.

Mon étude sur les interactions autophagie/VIH dans les DC infectées s'ajoute aux travaux de F. Blanchet et aux autres données *in vitro* dans les LT CD4[118,749] et les macrophages[527,760], pour souligner le rôle complexe de l'autophagie dans l'infection VIH et l'élaboration de la réponse antivirale. Au sein d'un même type cellulaire, les DC, il faut distinguer les cellules qui capturent le virus des cellules où le virus se réplique, car l'autophagie semble jouer des rôles différents, en fonction de la cinétique d'infection, dans la dégradation du virus et la présentation des antigènes viraux. Par ailleurs, en fonction des voies d'induction de l'autophagie, celle-ci pourrait alternativement favoriser ou diminuer la réplication virale dans les macrophages infectés[768,789]. De plus, en fonction des types cellulaires infectés (LT CD4, macrophage ou DC) l'autophagie semble avoir un impact différent sur la survie des cellules infectées ou en contact avec le virus[118,749,750]. Enfin, le virus module différemment l'autophagie dans tous ces types cellulaires[118,512,789].

Cette complexité des interactions entre l'autophagie et le VIH pose la question du rôle de l'autophagie *in vivo* chez les individus infectés, dans le contrôle de la réplication virale mais aussi dans la pathogenèse, la physiopathologie, et la progression de la maladie. Une étude récente semble montrer qu'il existe, dans les cellules mononucléées du sang périphérique des patients qui contrôlent l'infection et des patients non-progresseurs, un niveau d'autophagie basale/induite plus élevé que dans les cellules des patients dont la maladie progresse plus rapidement[797]. S'il persiste des doutes quant à la relevance d'une telle étude où l'autophagie est étudiée sans distinction des différents types cellulaires, ces observations restent intéressantes. En effet, l'infection par le VIH est caractérisée par une inflammation importante pendant la primo-infection et la phase d'infection chronique chez les patients. Cette inflammation semble en partie responsable de l'épuisement du système immunitaire et de la dérégulation des fonctions lymphocytaires au cours de l'évolution de la maladie[798]. Or, l'autophagie est étroitement associée avec le contrôle de l'inflammation, et des dérégulations de la machinerie autophagique sont associées avec des maladies inflammatoires chroniques[799,800]. Ainsi, un flux autophagique élevé pourrait aider au contrôle de l'inflammation lors d'une infection virale chronique. De futures études du flux autophagique dans les différentes populations lymphocytaires et myéloïdes chez des patients infectés chroniquement (par le VIH ou d'autres virus) permettront sans doute une meilleure compréhension du rôle de l'autophagie dans le contrôle de ces infections et l'évolution de ces maladies. La poursuite de telles études doit passer par le développement de techniques efficaces permettant un screening à large échelle de l'autophagie et de son flux[801] dans des échantillons provenant de cohortes de patients infectés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hughes T, Rusten TE. Origin and evolution of self-consumption: Autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;607:111–118.
2. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006;443(7113):780–6.
3. Deretic V. A master conductor for aggregate clearance by autophagy. *Dev Cell*. 2010;18(5):694–696.
4. Kundu M, Lindsten T, Yang CY, et al. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*. 2008;112(4):1493–1502.
5. Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, et al. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 2006;281(7):4035–41.
6. Wada Y, Sun-Wada G-H, Kawamura N, Aoyama M. Role of autophagy in embryogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014;27C:60–66.
7. Ryter SW, Mizumura K, Choi AMK. The impact of autophagy on cell death modalities. *Int. J. Cell Biol.* 2014;2014:502676.
8. Lamb C a, Yoshimori T, Tooze S a. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(12):759–74.
9. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011;7(7):673–682.
10. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407–17.
11. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* 1993;333:169–74.
12. Axe EL, Walker SA, Manifava M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008;182(4):685–701.
13. O Farrell F, Rusten TE, Stenmark H. Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS J.* 2013;280(24):6322–37.
14. Simonsen A, Tooze S a. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 2009;186(6):773–82.
15. Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, et al. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene*. 2004;23(58):9314–25.
16. Simonsen A, Birkeland HCG, Gillooly DJ, et al. Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *J. Cell Sci.* 2004;117(Pt 18):4239–51.
17. Petiot a., Ogier-Denis E, Blommaart EFC, Meijer a. J, Codogno P. Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275(2):992–998.
18. Vergne I, Deretic V. The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1313–8.
19. Sun Q, Fan W, Chen K, et al. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(49):19211–6.
20. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. 2008;19(December):5360–5372.
21. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(4):385–96.
22. Zhong Y, Wang QJ, Li X, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(4):468–76.
23. Fan W, Nassiri A, Zhong Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(19):7769–74.
24. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* 2010;190(4):511–21.
25. Liang C, Feng P, Ku B, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:688–699.
26. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 2007;9(10):1142–51.
27. Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*. 2011;7:61–73.
28. Liang C, Lee J, Inn K, et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:776–787.
29. McAlpine F, Williamson LE, Tooze S a, Chan EYW. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*. 2013;9(3):361–73.
30. Lee E-J, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy*. 2011;7(7):689–695.
31. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992–2003.
32. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. 2009;20(m):1981–1991.
33. Chan EYW, Longatti A, McKnight NC, Tooze S a. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(1):157–71.
34. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163–75.
35. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4(2):
36. Mercer C a, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 2009;5(5):649–62.
37. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007;447(7148):1121–5.

38. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* 2010;191(1):155–68.
39. Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, et al. RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell*. 2011;144(2):253–67.
40. Kim J, Huang W-P, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 2002;277:763–773.
41. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-LL, Yla-Anttila P. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2009;5(8):1180–1185.
42. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, et al. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1433–1437.
43. Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*. 2010;6:506–522.
44. Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* 2006;119:3888–3900.
45. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*. 2010;141:656–667.
46. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Abu-Asab M, et al. Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell Biosci.* 2014;4(1):16.
47. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* 2010;12:747–757.
48. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*. 2010;6:764–776.
49. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* 2013;126:5224–38.
50. Stenmark H, Aasland R, Driscoll P. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *Febs Lett.* 2002;513:77–84.
51. Orsi a, Razi M, Dooley HC, et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell*. 2012;23(10):1860–73.
52. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013;495:389–93.
53. Webber JL, Tooze S a. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* 2010;29(1):27–40.
54. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A New Protein Conjugation System in Human. The counterpart of the yeast apg12p conjugaison system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 1998;273(51):33889–33892.
55. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 2003;116:1679–1688.
56. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720–5728.
57. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, et al. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell*. 2014;200:1–15.
58. Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, Otomo T. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013;20(1):59–66.
59. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J. Biol. Chem.* 2001;276(3):1701–6.
60. Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, et al. The Mouse APG10 Homologue, an E2-like Enzyme for Apg12p Conjugation, Facilitates MAP-LC3 Modification. *J. Biol. Chem.* 2003;278(41):39517–39526.
61. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* 2004;117(Pt 13):2805–12.
62. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488–92.
63. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 2010;6(6):808–9.
64. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*. 2007;130:165–178.
65. Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 2012;8:177–186.
66. Fujita N, Hayashi-Nishino M. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Mol. Biol. ….* 2008;19(November):4651–4659.
67. Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J. Biol. Chem.* 2002;277:13739–13744.
68. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007;282(52):37298–302.
69. Noda NN, Fujioka Y, Hanada T, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation. *EMBO Rep.* 2013;14(2):206–11.
70. Kaufmann A, Beier V, Franquelim HG, Wollert T. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell*. 2014;156(3):469–81.
71. Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell*. 2011;146(2):303–17.
72. Yu Z, Ni T, Hong B, Wang H, Jiang F. Dual roles of Atg82PE deconjugation by Atg4 in autophagy. …. 2012;(June):883–892.
73. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4(2):151–175.

74. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *Autophagy*. 2007;3(5):452–460.
75. Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 1997;136(1):61–70.
76. Tooze SA, Razi M. The essential role of early endosomes in autophagy is revealed by loss of COPI function. 2009;5(6):874–875.
77. Hyttinen JMT, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1833(3):503–10.
78. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* 2007;179(3):485–500.
79. Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 2000;79(12):871–82.
80. Lawrence BP, Brown WJ. Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J. Cell Sci.* 1992;102 (Pt 3:515–26.
81. Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*. 2013;154(6):1285–99.
82. Longatti A, Lamb C a, Razi M, et al. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 2012;197(5):659–75.
83. Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1793(12):1901–16.
84. Ganley IG, Wong P-M, Gammoh N, Jiang X. Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Mol. Cell*. 2011;42(6):731–43.
85. Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 2004;117:2687–2697.
86. Jäger S, Bucci C, Tanida I, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* 2004;117:4837–4848.
87. Lee J-A, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao F-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* 2007;17(18):1561–7.
88. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012;151(6):1256–69.
89. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010;330(6009):1344–8.
90. Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. 2006;17(December):5094–5104.
91. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Poüs C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J. Cell Sci.* 2013;126(Pt 5):1071–80.
92. Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, et al. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* 2005;37(7):771–6.
93. Pankiv S, Alemu E a, Brech A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* 2010;188(2):253–69.
94. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell*. 2010;40(2):310–22.
95. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(8):935–45.
96. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320(5882):1496–501.
97. Li L, Kim E, Yuan H, et al. Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *J. Biol. Chem.* 2010;285(26):19705–9.
98. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*. 2011;334(6056):678–83.
99. Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010;465(7300):942–6.
100. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521–34.
101. Yan X, Sun Q, Ji J, et al. Reconstitution of leucine-mediated autophagy via the mTORC1-Barkor pathway in vitro. *Autophagy*. 2012;(February):213–221.
102. Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell*. 2003;11(6):1457–66.
103. Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 2011;286(8):6128–42.
104. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32(1):2–11.
105. Klionsky DJ, Meijer AJ, Codogno P, Scott RC. Autophagy and p70S6 Kinase. 2005;(June):59–61.
106. Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122(6):927–39.
107. Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, et al. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 2009;284:2719–2728.
108. E X, Hwang S, Oh S, et al. Viral Bcl-2-mediated evasion of autophagy aids chronic infection of gammaherpesvirus 68. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000609.
109. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 2007;26:2527–2539.
110. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*. 2005;170(7):1101–1111.
111. Williams A, Sarkar S, Cuddon P. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem.* .... 2008;(0):

112. Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(10):2594–608.
113. Schlottmann S, Buback F, Stahl B, et al. Prolonged classical NF-k;B activation prevents autophagy upon E. coli stimulation in vitro: A potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:
114. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF-κB signaling pathways in cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* 2011;1:629–49.
115. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29:2570–2581.
116. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2008;283:10892–10903.
117. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, et al. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell.* 2006;126:121–134.
118. Laforge M, Limou S, Harper F, et al. DRAM Triggers Lysosomal Membrane Permeabilization and Cell Death in CD4+ T Cells Infected with HIV. *PLoS Pathog.* 2013;9:
119. Sadowski M, Sarcevic B. Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine. *Cell Div.* 2010;5:19.
120. Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1843(1):182–96.
121. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1843(1):163–81.
122. Fuertes G, Villarroya A, Knecht E. Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003;35:651–664.
123. Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJA. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and "aggresomes" during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36:2519–2530.
124. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1393–8.
125. Milani M, Rzymski T, Mellor HR, et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 2009;69:4415–4423.
126. Zhu K, Dunner KJ, McConkey DJ. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene*. 2009;
127. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007;447:859–863.
128. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* 2005;280:40282–40292.
129. Ding W-X, Ni H-M, Gao W, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* 2007;171:513–524.
130. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol. Cell*. 2008;30:678–688.
131. Du Y, Yang D, Li L, et al. An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. *Autophagy*. 2009;5(5):663–75.
132. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003;115:727–738.
133. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010;29(5):969–80.
134. Su M, Shi JJ, Yang YP, et al. HDAC6 regulates aggresome-autophagy degradation pathway of ??-synuclein in response to MPP+-induced stress. *J. Neurochem.* 2011;117:112–120.
135. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, et al. SQSTM1/p62 Interacts with HDAC6 and Regulates Deacetylase Activity. *PLoS One*. 2013;8:
136. Fusco C, Micale L, Egorov M, et al. The E3-ubiquitin ligase TRIM50 interacts with HDAC6 and p62, and promotes the sequestration and clearance of ubiquitinated proteins into the aggresome. *PLoS One*. 2012;7:
137. Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441:885–889.
138. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441:880–884.
139. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy*. 2009;5:862–863.
140. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol. Cell*. 2009;33:517–527.
141. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279–296.
142. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.* 2008;283:22847–22857.
143. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007;282:24131–24145.
144. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, et al. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2013;288(2):1099–113.
145. Wild P, Farhan H, McEwan DGD, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science*. 2011;333(6039):228–33.
146. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603–614.

147. Shvets E, Abada A, Weidberg H, Elazar Z. Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes. *Autophagy*. 2011;7:683–688.
148. Cavey JR, Ralston SH, Hocking LJ, et al. Loss of ubiquitin-binding associated with Paget's disease of bone p62 (SQSTM1) mutations. *J. Bone Miner. Res.* 2005;20:619–624.
149. Laurin N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70:1582–1588.
150. Garner TP, Long J, Layfield R, Searle MS. Impact of p62/SQSTM1 UBA domain mutations linked to paget's disease of bone on ubiquitin recognition. *Biochemistry*. 2011;50:4665–4674.
151. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007;131(6):1149–63.
152. Long J, Gallagher TRA, Cavey JR, et al. Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *J. Biol. Chem.* 2008;283:5427–5440.
153. Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell*. 2011;44:279–289.
154. Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol. Cell*. 2003;12:39–50.
155. Lelouard H, Gatti E, Cappello F, et al. Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature*. 2002;417(6885):177–82.
156. Szeto J, Kaniuk N a, Canadien V, et al. ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*. 2006;2(3):189–99.
157. Fujita K-I, Srinivasula SM. TLR4-mediated autophagy in macrophages is a p62-dependent type of selective autophagy of aggresome-like induced structures (ALIS). *Autophagy*. 2011;7(5):552–554.
158. Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, et al. The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alfy. *Mol. Cell*. 2010;38:265–279.
159. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, et al. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy*. 2010;6:330–344.
160. Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell*. 2009;33(4):505–16.
161. Zhou J, Wang J, Cheng Y, et al. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003196.
162. Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*. 2009;8(13):1986–90.
163. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 2010;12(2):119–31.
164. Kanki T. Nix, a receptor protein for mitophagy in mammals. *Autophagy*. 2010;6:433–435.
165. Deosaran E, Larsen KB, Hua R, et al. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.* 2013;126:939–52.
166. Cuervo a M, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 1996;273(5274):501–3.
167. Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* 1988;263:6797–6805.
168. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 1990;15:305–309.
169. Dice JF, Chiang HL, Spencer EP, Backer JM. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide. *J. Biol. Chem.* 1986;261:6853–6859.
170. Koga H, Martinez-Vicente M, Macian F, Verkhusha V V, Cuervo AM. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat. Commun.* 2011;2:386.
171. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*. 1989;246:382–385.
172. Agarraberes F a, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.* 2001;114(Pt 13):2491–9.
173. Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 2000;275:27447–27456.
174. Gough NR, Hatem CL, Fambrough DM. The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol.* 1995;14:863–867.
175. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(18):5747–63.
176. Agarraberes F a, Terlecky SR, Dice JF. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* 1997;137(4):825–34.
177. Cuervo AM, Dice JF, Knecht E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 1997;272:5606–5615.
178. Lv L, Li D, Zhao D, et al. Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell*. 2011;42(6):719–30.
179. Thompson LM, Aiken CT, Kaltenbach LS, et al. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 2009;187:1083–1099.
180. Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell*. 2010;39(4):535–547.
181. Kaushik S, Massey AC, Cuervo AM. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J.* 2006;25(17):3921–33.
182. Rodriguez-Navarro JA, Kaushik S, Koga H, et al. Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109:E705–14.

183. Wing SS, Chiang HL, Goldberg AL, Dice JF. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. *Biochem. J.* 1991;275 (Pt 1:165–169.
184. Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 1995;269:C1200–C1208.
185. Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(15):5805–10.
186. Cuervo AM, Hu W, Lim B, Dice JF. IkappaB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol. Biol. Cell*. 1998;9:1995–2010.
187. Wang Y, Martinez-Vicente M, Kr??ger U, et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: The dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18:4153–4170.
188. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte D a. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem*. 2010;285(18):13621–13629.
189. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* 2008;118(2):777–788.
190. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004;305(5688):1292–5.
191. Kon M, Kiffin R, Koga H, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Is Required for Tumor Growth. *Sci. Transl. Med.* 2011;3:109ra117–109ra117.
192. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 2000;275:31505–31513.
193. Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med*. 2008;14(9):959–965.
194. Steinman R, Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 1973;137:1142–1162.
195. León B, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* 2008;86(4):320–4.
196. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006;311:17–58.
197. Van der Aar AMG, Sylva-Steenland RMR, Bos JD, et al. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J. Immunol.* 2007;178:1986–1990.
198. Meier A, Alter G, Frahm N, et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J. Virol.* 2007;81(15):8180–91.
199. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(16):9237–42.
200. Lundberg K, Rydnert F, Greiff L, Lindstedt M. Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. *Immunology*. 2014;142:279–288.
201. Hémont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 2013;93(4):599–609.
202. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:141–65.
203. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006;13(5):816–25.
204. Dziarski R, Gupta D. Staphylococcus aureus Peptidoglycan Is a Toll-Like Receptor 2 Activator : a Reevaluation Staphylococcus aureus Peptidoglycan Is a Toll-Like Receptor 2 Activator : a Reevaluation. 2005;73(8):
205. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 2002;169:10–14.
206. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145–51.
207. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 1999;162:3749–3752.
208. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky a, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099–103.
209. Alexopoulou L, Holt a C, Medzhitov R, Flavell R a. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732–8.
210. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303:1529–1531.
211. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2002;3:196–200.
212. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010;7:54.
213. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (80-.).* 2004;303(5663):1526–1529.
214. Lee SMY, Kok K-H, Jaume M, et al. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(10):3793–8.
215. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LAM, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003;300:1584–1587.
216. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003;278:8869–8872.
217. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J.* 2008;27(2):373–83.
218. Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Eur. J. Immunol.* 2012;42(4):880–9.
219. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 2010;16(1):90–7.
220. Travassos LH, Carneiro L a M, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 2010;11(1):55–62.

221. Szabo A, Rajnavolgyi E. Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2013;2(3):195–207.
222. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 2004;5:730–737.
223. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006;314:997–1001.
224. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 2005;6(10):981–8.
225. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 2008;455(7213):674–8.
226. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* 2014;16(2):185–94.
227. Groves E, Dart a E, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(13):1957–76.
228. Fric J, Zelante T, Ricciardi-Castagnoli P. Phagocytosis of Particulate Antigens - All Roads Lead to Calcineurin/NFAT Signaling Pathway. *Front. Immunol.* 2014;4(January):513.
229. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450(7173):1253–1257.
230. Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med.* 2004;199:81–90.
231. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*. 2004;304:1014–1018.
232. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999;401:811–815.
233. Wolf AJ, Arruda A, Reyes CN, et al. Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J. Immunol.* 2011;187(11):6002–10.
234. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587–97.
235. Zhang J-G, Czabotar PE, Policheni AN, et al. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity*. 2012;36(4):646–57.
236. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1998;188:1359–1368.
237. Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. 2004;76(December):1093–1103.
238. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* 2007;219:143–56.
239. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*. 2005;307(5715):1630–4.
240. Smith LM, May RC. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem. Soc. Trans.* 2013;41(2):475–90.
241. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003;197:823–829.
242. Ludwig I, Lekkerkerker A. Hepatitis C Virus Targets DC-SIGN and L-SIGN To Escape Lysosomal Degradation. *J. ….* 2004;
243. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine. 2004;21:279–288.
244. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* 2003;198(4):615–21.
245. Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 2003;4:1223–1229.
246. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, et al. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(9):3491–6.
247. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 1997;388:787–792.
248. Ackerman a. L, Cresswell P. Regulation of MHC Class I Transport in Human Dendritic Cells and the Dendritic-Like Cell Line KG-1. *J. Immunol.* 2003;170(8):4178–4188.
249. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. 2002;418(August):
250. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997;388:782–787.
251. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3(12):984–93.
252. Tan JKH, Neill HCO. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. 2005;78(August):
253. Almeida JR, Sauce D, Price D a, et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*. 2009;113(25):6351–60.
254. Almeida JR, Price D a, Papagno L, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* 2007;204(10):2473–85.
255. Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351:290–296.
256. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:793–806.
257. Muhlethaler-Mottet a, Otten L a, Steimle V, Mach B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* 1997;16(10):2851–60.
258. Smith MA, Wright G, Wu J, et al. Positive regulatory domain I (PRDM1) and IRF8/PU.1 counter-regulate MHC class II transactivator (CIITA) expression during dendritic cell maturation. *J. Biol. Chem.* 2011;286:7893–7904.

259. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol.* 1985;135:3750–3762.
260. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J. Immunol.* 2007;179:1549–1558.
261. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3(12):952–61.
262. Ferrington D a, Gregerson DS. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. 2012.
263. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:179–187.
264. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50:213–219.
265. De Verteuil D, Muratore-Schroeder TL, Granados DP, et al. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell. Proteomics*. 2010;9:2034–2047.
266. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, et al. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science*. 1994;265:1234–1237.
267. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 2001;193:1319–1326.
268. Rock KL, York I a, Goldberg AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 2004;5(7):670–7.
269. Qian S-B, Reits E, Neefjes J, et al. Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *J. Immunol.* 2006;177:227–233.
270. Michalek M, Grant E, Gramm C. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Lett. to Nat.* 1993;
271. Wherry EJ, Golovina TN, Morrison SE, et al. Re-evaluating the generation of a "proteasome-independent" MHC class I-restricted CD8 T cell epitope. *J. Immunol.* 2006;176:2249–2261.
272. Antón LC, Yewdell JW. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. *J. Leukoc. Biol.* 2014;95(4):551–62.
273. Yewdell JW, Nicchitta C V. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol.* 2006;27(8):368–73.
274. Schubert U, Antón LC, Gibbs J, et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000;404(6779):770–4.
275. Reits EA, Vos JC, Grommé M, Neefjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*. 2000;404:774–778.
276. Yewdell JW, Antbn LC, Bennink JR. Defective Ribosomal Products. *J. Immunol.* 1996;7:1823–1826.
277. Rock KL, Farfán-Arribas DJ, Colbert JD, Goldberg AL. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol.* 2014;35(4):144–52.
278. Dolan BP, Li L, Veltri C a, et al. Distinct pathways generate peptides from defective ribosomal products for CD8+ T cell immunosurveillance. *J. Immunol.* 2011;186(4):2065–72.
279. Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C, et al. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat. Med.* 2001;7(3):344–9.
280. Cardinaud S, Starck SR, Chandra P, Shastri N. The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS One*. 2010;5(1):e8692.
281. Yewdell JW, Bennink JR, Mackett M, et al. Recognition of cloned vesicular stomatitis virus internal and external gene products by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1986;163:1529–1538.
282. Cardinaud S, Moris A, Février M, et al. Identification of cryptic MHC I-restricted epitopes encoded by HIV-1 alternative reading frames. *J. Exp. Med.* 2004;199(8):1053–63.
283. Cardinaud S. Le bulletin de la SFI. 2011;
284. Shastri N, Schwab S, Serwold T. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:463–493.
285. Cardinaud S, Consiglieri G, Bouziat R, et al. CTL escape mediated by proteasomal destruction of an HIV-1 cryptic epitope. *PLoS Pathog.* 2011;7(5):e1002049.
286. Schwab SR, Li KC, Kang C, Shastri N. Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science*. 2003;301:1367–1371.
287. Lelouard H, Ferrand V, Marguet D, et al. Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* 2004;164:667–675.
288. Lelouard H, Schmidt EK, Camosseto V, et al. Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation. *J. Cell Biol.* 2007;179:1427–1439.
289. Pierre P. Dendritic cells, DRiPs, and DALIS in the control of antigen processing. *Immunol. Rev.* 2005;207:184–90.
290. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 2001;20:2357–2366.
291. Seifert U, Marañón C, Shmueli A, et al. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 2003;4(4):375–9.
292. York I a, Mo AXY, Lemerise K, et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 2003;18(3):429–40.
293. Reits E, Neijssen J, Herberts C, et al. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 2004;20:495–506.
294. Kunisawa J, Shastri N. The Group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol. Cell*. 2003;12:565–576.
295. Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 1993;261:769–771.

296. Koopmann JO, Post M, Neefjes JJ, Hämmerling GJ, Momburg F. Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* 1996;26:1720–1728.
297. Chang S-C, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:17107–17112.
298. Hammer GE, Gonzalez F, James E, Nolla H, Shastri N. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* 2007;8:101–108.
299. Paulsson K, Wang P. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2003;1641(1):1–12.
300. Peaper DR, Wearsch PA, Cresswell P. Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J.* 2005;24:3613–3623.
301. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 1997;277:1306–1309.
302. Bangia N, Lehner PJ, Hughes EA, Surman M, Cresswell P. The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:1858–1870.
303. Barnden MJ, Purcell AW, Gorman JJ, McCluskey J. Tapasin-mediated retention and optimization of peptide ligands during the assembly of class I molecules. *J. Immunol.* 2000;165:322–330.
304. Wearsch PA, Cresswell P. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat. Immunol.* 2007;8:873–881.
305. Roelse J, Gromme M. Trimming of TAP-translocated Peptides in the Endoplasmic Reticulum and in the Cytosol during Recycling. *J. …* 1994;180(November):
306. Bartee E, Mansouri M, Hovey BT, et al. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. 2004;
307. Boname JM, Thomas M, Stagg HR, et al. Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic*. 2010;11:210–220.
308. Lev A, Princiotta MF, Zanker D, et al. Compartmentalized MHC class I antigen processing enhances immunosurveillance by circumventing the law of mass action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(15):6964–9.
309. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(8):557–69.
310. Segura E, Amigorena S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.* 2014;158(1-2):73–8.
311. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 1995;267:243–246.
312. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 1997;158:2723–2730.
313. Rodriguez a, Regnault a, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1999;1(6):362–8.
314. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2011;147(6):1355–68.
315. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A Role for the Endoplasmic Reticulum Protein Retrotranslocation Machinery during Crosspresentation by Dendritic Cells. *Immunity*. 2006;25:607–617.
316. Wang X, Venable J, LaPointe P, et al. Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. *Cell*. 2006;127:803–815.
317. Imai T, Kato Y, Kajiwara C, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108:16363–16368.
318. Giodini A, Cresswell P. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J.* 2008;27:201–211.
319. Basha G, Omilusik K, Chavez-Steenbock A, et al. A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* 2012;13:237–245.
320. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. 2003;425:402–406.
321. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 2003;425(6956):397–402.
322. Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 2008;9:558–566.
323. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:12889–12894.
324. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*. 2002;110:119–131.
325. Muller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, et al. Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* 2001;20:6772–6782.
326. Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, et al. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell*. 2005;123:157–170.
327. Campbell-Valois F-X, Trost M, Chemali M, et al. Quantitative Proteomics Reveals That Only a Subset of the Endoplasmic Reticulum Contributes to the Phagosome. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012;11:M111.016378–M111.016378.
328. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science*. 2009;325:213–217.
329. Firat E, Saveanu L, Aichele P, et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J. Immunol.* 2007;178:2241–2248.
330. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*. 2004;21(2):155–65.

331. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2006;177:3525–3533.
332. Howe C, Garstka M, Al-Balushi M, et al. Calreticulin-dependent recycling in the early secretory pathway mediates optimal peptide loading of MHC class I molecules. *EMBO J.* 2009;28:3730–3744.
333. Lizée G, Basha G, Tiong J, et al. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 2003;4(11):1065–73.
334. Chefalo PJ, Grandea AG, Van Kaer L, Harding C V. Tapasin-/- and TAP1-/- macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J. Immunol.* 2003;170:5825–5833.
335. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, et al. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*. 2005;434(7029):83–8.
336. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci. Transl. Med.* 2010;2:44ra57.
337. Wakim LM, Bevan MJ. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature*. 2011;471:629–632.
338. Dolan BP, Gibbs KD, Ostrand-Rosenberg S. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2006;177:6018–6024.
339. Bevan M. Cross-Priming for a Secondary Cytotoxic Response to Minor H Antigens with H-2 Congenic Cells Which Do Not Cross-React in the Cytotoxic Assay. *J. Exp. Med.* 1976;
340. Bevan MJ. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 1976;117:2233–2238.
341. Hickman HD, Takeda K, Skon CN, et al. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat. Immunol.* 2008;9:155–165.
342. Xu RH, Remakus S, Ma X, Roscoe F, Sigal LJ. Direct presentation is sufficient for an efficient anti-viral CD8 + T cell response. *PLoS Pathog.* 2010;6:
343. Hoeffel G, Ripoche A-C, Matheoud D, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2007;27(3):481–92.
344. Marañón C, Desoutter J-FF, Hoeffel G, et al. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(16):6092–7.
345. Winau F, Weber S, Sad S, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 2006;24:105–117.
346. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392:86–89.
347. Ramirez MC, Sigal LJ. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J. Immunol.* 2002;169:6733–6742.
348. John B, Harris TH, Tait ED, et al. Dynamic imaging of CD8+ T cells and dendritic cells during infection with Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog.* 2009;5:
349. Matheoud D, Perié L, Hoeffel G, et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood*. 2010;115(22):4412–20.
350. Matheoud D, Baey C, Vimeux L, et al. Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS One*. 2011;6(4):e19104.
351. Moris A, Nobile C, Buseyne F, et al. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood*. 2004;103(7):2648–2654.
352. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*. 2006;25(1):153–62.
353. Edelson BT, KC W, Juang R, et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2010;207:823–836.
354. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*. 2008;322:1097–1100.
355. Lutz MB, Rovere P, Kleijmeer MJ, et al. Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J. Immunol.* 1997;159:3707–3716.
356. Garstka M a, Neefjes J. How to target MHC class II into the MIIC compartment. *Mol. Immunol.* 2013;55(2):162–5.
357. Landsverk OJB, Bakke O, Gregers TF. MHC II and the endocytic pathway: Regulation by invariant chain. *Scand. J. Immunol.* 2009;70:184–193.
358. Kropshofer H, Vogt AB, Hämmerling GJ. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92:8313–8317.
359. Bodmer H, Viville S, Benoist C, Mathis D. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science*. 1994;263:1284–1286.
360. Castellino F, Han R, Germain RN. The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur. J. Immunol.* 2001;31(3):841–50.
361. Dixon AM, Stanley BJ, Matthews EE, Dawson JP, Engelman DM. Invariant chain transmembrane domain trimerization: a step in MHC class II assembly. *Biochemistry*. 2006;45(16):5228–34.
362. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 1994;13:675–682.
363. McCormick PJ, Martina JA, Bonifacino JS. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:7910–7915.
364. Rodionov DG, Bakke O. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J. Biol. Chem.* 1998;273:6005–6008.
365. Dugast M, Toussaint H, Dousset C, Benaroch P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J. Biol. Chem.* 2005;280:19656–19664.
366. Saudrais C, Spehner D, de la Salle H, et al. Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J. Immunol.* 1998;160:2597–2607.

367. Santambrogio L, Potolicchio I, Fessler SP, et al. Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2005;6:1020–1028.
368. Stern LJ, Potolicchio I, Santambrogio L. MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):64–69.
369. Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 2005;207:229–241.
370. Schulze MSED, Wucherpfennig KW. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 2012;24:105–111.
371. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 1995;82:155–165.
372. Engering A, Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int. Immunol.* 2001;13:127–134.
373. Hoorn T Van Den, Paul P, Janssen L, Janssen H, Neefjes J. Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression. *J. Cell Sci.* 2012;125(Pt 2):328–39.
374. Hornell TMC, Burster T, Jahnsen FL, et al. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J. Immunol.* 2006;176:3536–3547.
375. Poluektov YO, Kim A, Sadegh-Nasseri S. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 2013;4(August):260.
376. Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, et al. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* 2009;185:1209–1225.
377. Vyas JM, Kim Y-M, Artavanis-Tsakonas K, et al. Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells. *J. Immunol.* 2007;178:7199–7210.
378. Van Nispen tot Pannerden HE, Geerts WJ, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG. Spatial organization of the transforming MHC class II compartment. *Biol. Cell*. 2010;102:581–591.
379. Boes M, Cerny J, Massol R, et al. T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature*. 2002;418:983–988.
380. Reid PA, Watts C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature*. 1990;346:655–657.
381. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature*. 1995;375:603–606.
382. Pathak SS, Blum JS. Endocytic recycling is required for the presentation of an exogenous peptide via MHC class II molecules. *Traffic*. 2000;1:561–569.
383. Villadangos JA, Driessen C, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL. Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM. *EMBO J.* 2000;19:882–891.
384. Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, et al. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* 2001;155:53–63.
385. Van Niel G, Wubbolts R, ten Broeke T, et al. Dendritic Cells Regulate Exposure of MHC Class II at Their Plasma Membrane by Oligoubiquitination. *Immunity*. 2006;25:885–894.
386. McGehee AM, Strijbis K, Guillen E, et al. Ubiquitin-dependent control of class ii mhc localization is dispensable for antigen presentation and antibody production. *PLoS One*. 2011;6:
387. Zwart W, Griekspoor A, Kuijl C, et al. Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity*. 2005;22:221–233.
388. Shin J-S, Ebersold M, Pypaert M, et al. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*. 2006;444(7115):115–8.
389. Paul P, van den Hoorn T, Jongsma MLM, et al. A Genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. *Cell*. 2011;145(2):268–83.
390. Piper RC, Dikic I, Lukacs GL. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6:1–21.
391. Van Niel G, Wubbolts R, Stoorvogel W. Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008;20:437–444.
392. Ten Broeke T, van Niel G, Wauben MHM, Wubbolts R, Stoorvogel W. Endosomally stored MHC class II does not contribute to antigen presentation by dendritic cells at inflammatory conditions. *Traffic*. 2011;12:1025–1036.
393. Walseng E, Furuta K, Bosch B, et al. Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:20465–20470.
394. Oh J, Wu N, Baravalle G, et al. MARCH1-mediated MHCII ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2013;210:1069–77.
395. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, et al. Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. *J. Immunol.* 2009;183:6893–6897.
396. Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J. Exp. Med.* 2011;208:149–165.
397. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppé G, et al. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2008;38:1225–1230.
398. Villadangos JA, Schnorrer P, Wilson NS. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: A balance between creative and destructive forces. *Immunol. Rev.* 2005;207:191–205.
399. Bosch B, Heipertz EL, Drake JR, Roche P a. Major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complexes arrive at the plasma membrane in cholesterol-rich microclusters. *J. Biol. Chem.* 2013;288(19):13236–42.
400. Mantegazza AR, Guttentag SH, El-Benna J, et al. Adaptor protein-3 in dendritic cells facilitates phagosomal toll-like receptor signaling and antigen presentation to CD4(+) T cells. *Immunity*. 2012;36(5):782–94.
401. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*. 2006;440(7085):808–12.
402. Bikoff E, Birshtein BK. T cell clones specific for IgG2a of the a allotype: direct evidence for presentation of endogenous antigen. *J. Immunol.* 1986;137:28–34.

403. Sekaly RP, Jacobson S, Richert JR, et al. Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85(4):1209–12.
404. Callahan KM, Rowell JF, Soloski MJ, Machamer CE, Siliciano RF. HIV-1 envelope protein is expressed on the surface of infected cells before its processing and presentation to class II-restricted T lymphocytes. *J. Immunol.* 1993;151:2928–2942.
405. Eisenlohr L, Hackett C. II major histocompatibility complex-restricted T cells specific for a virion structural protein that do not recognize exogenous influenza virus. Evidence that presentation. *J. Exp. Med.* 1989;169(March):
406. Jaraquemada D, Marti M, Long EO. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 1990;172(3):947–54.
407. Lee SP, Wallace LE, Mackett M, et al. MHC class II-restricted presentation of endogenously synthesized antigen: Epstein-Barr virus transformed B cell lines can present the viral glycoprotein gp340 by two distinct pathways. *Int. Immunol.* 1993;5:451–460.
408. Marrack P, Ignatowicz L, Kappler JW, Boymel J, Freed JH. Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J. Exp. Med.* 1993;178(6):2173–83.
409. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, et al. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 1993;178(1):27–47.
410. Schmid D, Pypaert M, Munz C, Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007;26(1):79–92.
411. Costantino CM, Spooner E, Ploegh HL, Hafler D a. Class II MHC self-antigen presentation in human B and T lymphocytes. *PLoS One*. 2012;7(1):e29805.
412. Mukherjee P, Dani a., Bhatia S, et al. Efficient Presentation of Both Cytosolic and Endogenous Transmembrane Protein Antigens on MHC Class II Is Dependent on Cytoplasmic Proteolysis. *J. Immunol.* 2001;167(5):2632–2641.
413. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat. Immunol.* 2005;6(3):287–94.
414. Comber JD, Robinson TM, Siciliano N a, Snook AE, Eisenlohr LC. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J. Virol.* 2011;85(13):6453–63.
415. Houlihan JL, Metzler JJ, Blum JS. HSP90alpha and HSP90beta isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells. *J. Immunol.* 2009;182:7451–7458.
416. Tsuji T, Matsuzaki J, Caballero OL, et al. Heat shock protein 90-mediated peptide-selective presentation of cytosolic tumor antigen for direct recognition of tumors by CD4(+) T cells. *J. Immunol.* 2012;188(8):3851–8.
417. Eisenlohr LC. Alternative generation of MHC class II-restricted epitopes: not so exceptional? *Mol. Immunol.* 2013;55(2):169–71.
418. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA+ macrophages. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2517–2525.
419. Macdonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. 2002;100(13):4512–4520.
420. Rovati B, Mariucci S, Manzoni M, Bencardino K, Danova M. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *Eur. J. Histochem.* 2008;52(1):45–52.
421. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74–80.
422. Dzionek a., Fuchs a., Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* 2000;165(11):6037–6046.
423. Crozat K, Guiton R, Guilliams M, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* 2010;234:177–198.
424. Gautier EL, Shay T, Miller J, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 2012;13:1118–1128.
425. Miller JC, Brown BD, Shay T, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 2012;13:888–899.
426. Robbins SH, Walzer T, Dembélé D, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 2008;9(1):R17.
427. Lundberg K, Albrekt A-S, Nelissen I, et al. Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models--unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. *PLoS One*. 2013;8:e52875.
428. Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CAK. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* 2005;175:4839–4846.
429. Harman AN, Bye CR, Nasr N, et al. Identification of lineage relationships and novel markers of blood and skin human dendritic cells. *J. Immunol.* 2013;190(1):66–79.
430. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 2010;234(1):45–54.
431. Reizis B. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage. *J. Exp. Med.* 2012;209(6):1053–6.
432. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 2012;13(12):1145–54.
433. Teijeira A, Russo E, Halin C. Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Semin. Immunopathol.* 2014;36(2):261–74.
434. Pulendran B, Tang H, Denning T. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsetsdivir. *Curr. Opin. Immunol.* 2008;20(1):61–67.
435. Manh TPV, Alexandre Y, Baranek T, Crozat K, Dalod M. Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *Eur. J. Immunol.* 2013;43:1706–1715.
436. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, et al. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2012;209(4):653–661.
437. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, et al. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 1997;185:1101–1111.
438. Haniffa M, Shin A, Bigley V, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012;37(1):60–73.
439. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*. 2013;38:970–983.
440. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324:392–397.

441. Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009;(188):31–49.
442. Mittag D, Proietto AI, Loudovaris T, et al. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *J. Immunol.* 2011;186:6207–6217.
443. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 2010;207:1247–1260.
444. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*. 2013;122:932–942.
445. Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:679–691.
446. Haniffa M, Ginhoux F, Wang X-N, et al. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* 2009;206:371–385.
447. Klechevsky E, Morita R, Liu M, et al. Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity*. 2008;29:497–510.
448. Angel CE, Lala A, Chen CJJ, et al. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int. Immunol.* 2007;19:1271–1279.
449. Crozat K, Guiton R, Contreras V, et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2010;207:1283–1292.
450. Bachem A, Güttler S, Hartung E, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2010;207:1273–1281.
451. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, et al. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2010;207:1261–1271.
452. Lauterbach H, Bathke B, Gilles S, et al. Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* 2010;207:2703–2717.
453. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*. 2009;458:899–903.
454. Segura E, Albiston AL, Wicks IP, Chai SY, Villadangos J a. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106(48):20377–81.
455. Schreibelt G, Klinkenberg LJJ, Cruz LJ, et al. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood*. 2012;119(10):2284–92.
456. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, et al. Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity*. 2009;31:823–833.
457. Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005;433:887–892.
458. Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: One general or all sergeants? *Trends Immunol.* 2013;34:361–370.
459. Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2013;210(5):1035–47.
460. Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* 2013;210:1049–63.
461. Savina A, Peres A, Cebrian I, et al. The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8+ Dendritic Cells. *Immunity*. 2009;30:544–555.
462. Osorio F, Tavernier SJ, Hoffmann E, et al. The unfolded-protein-response sensor IRE-1α regulates the function of CD8α+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2014;15:248–57.
463. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:935–947.
464. Valladeau J. Les cellules de Langerhans. *M/S médecine Sci.* 2006;22:144–148.
465. Ito T, Inaba M, Inaba K, et al. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J. Immunol.* 1999;163(3):1409–19.
466. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 2002;3(12):1135–41.
467. Kanitakis J, Morelon E, Petruzzo P, Badet L, Dubernard J-M. Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp. Dermatol.* 2011;20(2):145–6.
468. Villablanca EJ, Mora JR. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(11):2975–80.
469. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* 2009;182:6815–6823.
470. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994;82:487–493.
471. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell. Immunol.* 2002;218:74–86.
472. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*. 2007;315(5817):1398–401.
473. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-??/?? in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:2154–2163.
474. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449:564–569.
475. Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109:3012–3017.
476. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:594–606.

477. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2004;34:796–805.
478. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 1999;5:919–923.
479. Quan T, Roman R. Epstein-Barr Virus Promotes Interferon-α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Arthritis …*. 2010;62(6):1693–1701.
480. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(16):7431–6.
481. Benlahrech A, Patterson S. HIV-1 infection and induction of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2011;6(5):373–8.
482. Ito T, Yang M, Wang Y-H, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 2007;204:105–115.
483. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2004;173:4433–4442.
484. Baccala R, Gonzalez-Quintial R, Blasius AL, et al. Essential requirement for IRF8 and SLC15A4 implicates plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:2940–5.
485. Guéry L, Hugues S. Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Front. Immunol.* 2013;4:59.
486. Morelli AE, Rubin JP, Erdos G, et al. CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *J. Immunol.* 2005;175:7905–7915.
487. Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, et al. Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat. Immunol.* 2001;2:1151–1158.
488. Angel CE, George E, Brooks AES, et al. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J. Immunol.* 2006;176:5730–5734.
489. Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J. Invest. Dermatol.* 2008;128:2225–2231.
490. Serbina N V, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003;19:59–70.
491. Geissmann F, Revy P, Brousse N, et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003;198:623–634.
492. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity*. 2007;26(4):519–31.
493. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghels M, et al. Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity*. 2013;38:322–335.
494. Segura E, Touzot M, Bohineust A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013;38(2):336–48.
495. Beitnes A-CR, Ráki M, Brottveit M, et al. Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS One*. 2012;7(3):e33556.
496. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 1996;106:446–453.
497. Segura É, Amigorena S. Les cellules dendritiques inflammatoires. 2014;30:16–18.
498. Satpathy AT, KC W, Albring JC, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* 2012;209:1135–1152.
499. Meredith MM, Liu K, Darrasse-Jeze G, et al. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J. Exp. Med.* 2012;209:1153–1165.
500. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994;179:1109–1118.
501. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 1998;282:480–483.
502. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994;180:83–93.
503. Zhou L, Tedder T. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *… Natl. Acad. Sci.* 1996;93(March):2588–2592.
504. Xu Y, Zhan Y, Lew a. M, Naik SH, Kershaw MH. Differential Development of Murine Dendritic Cells by GM-CSF versus Flt3 Ligand Has Implications for Inflammation and Trafficking. *J. Immunol.* 2007;179(11):7577–7584.
505. Sansonetti PJ, Ryter a, Clerc P, Maurelli a T, Mounier J. Multiplication of Shigella flexneri within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* 1986;51(2):461–9.
506. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, et al. Arrest of Mycobacterial Phagosome Maturation Is Caused by a Block in Vesicle Fusion between Stages Controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 1997;272(20):13326–13331.
507. Bergant Marušič M, Ozbun M a, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic*. 2012;13(3):455–67.
508. Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*. 2012;150(4):803–15.
509. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753–766.
510. Campbell GR, Spector S a. Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages through the induction of autophagy. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002689.
511. Yuk J-MM, Shin D-MM, Lee H-MM, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 2009;6(3):231–243.

512. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, et al. Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity*. 2010;32(5):654–69.
513. Mostowy S, Sancho-Shimizu V, Hamon MA, et al. p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 2011;286(30):26987–95.
514. Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, et al. Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe*. 2009;6(2):137–49.
515. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, et al. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol*. 2009;183(9):5909–5916.
516. Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter Jr. R, et al. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe*. 2010;7(2):115–127.
517. Tallóczy Z, Virgin HW, Levine B. PKR-Dependent Autophagic Degradation of Herpes Simplex Virus Type 1. *Autophagy*. 2006;2(March):24–29.
518. Orvedahl A, Sumpter R, Xiao G, et al. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature*. 2011;480(7375):113–7.
519. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels M, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti – Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy- dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. 2006;116(9):
520. Van Grol J, Muniz-Feliciano L, Portillo J-AC, Bonilha VL, Subauste CS. CD40 induces anti-Toxoplasma gondii activity in nonhematopoietic cells dependent on autophagy proteins. *Infect. Immun.* 2013;81(6):2002–11.
521. Celli J. LRSAM1, an E3 Ubiquitin ligase with a sense for bacteria. *Cell Host Microbe*. 2012;12(6):735–6.
522. Huett A, Heath RJ, Begun J, et al. The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular Salmonella Typhimurium. *Cell Host Microbe*. 2012;12(6):778–90.
523. Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity*. 2012;37(2):223–34.
524. Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1215–1221.
525. Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, et al. A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):376–89.
526. Ponpuak M, Davis AS, Roberts E a, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*. 2010;32(3):329–41.
527. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*. 2009;186(2):255–268.
528. Remer K a, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol. Lett.* 2003;85(1):75–80.
529. Xu Y, Jagannath C, Liu X-D, et al. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007;27(1):135–44.
530. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*. 2008;27(7):1110–1121.
531. Shi C-SS, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*. 2008;283(48):33175–33182.
532. Shi C-S, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci. Signal.* 2010;3(123):ra42.
533. Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* 2013;15(4):406–16.
534. Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(4):1427–32.
535. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603.
536. Plantinga T, Joosten L, Netea M. ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. 2011;7(9):1074–1075.
537. McFarlane S, Aitken J, Sutherland JS, et al. Early induction of autophagy in human fibroblasts after infection with human cytomegalovirus or herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 2011;85(9):4212–21.
538. Rasmussen SB, Horan K a, Holm CK, et al. Activation of autophagy by α-herpesviruses in myeloid cells is mediated by cytoplasmic viral DNA through a mechanism dependent on stimulator of IFN genes. *J. Immunol.* 2011;187(10):5268–76.
539. Matsuzawa T, Kim B-H, Shenoy AR, et al. IFN-γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol.* 2012;189:813–8.
540. Singh S, Davis A, Taylor G, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science (80-.).* 2006;313(September):1438–1441.
541. Li JCB, Au K, Fang J, et al. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN-γ signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *AIDS*. 2011;25(1):15–25.
542. Grégoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, et al. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):e1002422.
543. Fabri M, Stenger S, Shin D-M, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci. Transl. Med.* 2011;3(104):104ra102.
544. Shin D, Yuk J, Lee H, Lee S. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell. ….* 2010;12(11):1648–1665.
545. Harris J, De Haro S a, Master SS, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity*. 2007;27(3):505–17.
546. Martinez J, Almendinger J. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. ….* 2011;108:
547. Kim JY, Zhao H, Martinez J, et al. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell*. 2013;154:365–376.
548. Gong L, Cullinane M, Treerat P, et al. The Burkholderia pseudomallei type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS One*. 2011;6:

549. Lerena MC, Colombo MI. Mycobacterium marinum induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell. Microbiol.* 2011;13:814–835.
550. Kageyama S, Omori H, Saitoh T, et al. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Mol. Biol. Cell*. 2011;22(13):2290–300.
551. Lai S, Devenish RJ. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells*. 2012;1(4):396–408.
552. Morris S, Swanson MS, Lieberman A, et al. Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J. Immunol.* 2011;187(8):3953–61.
553. Zhou D, Kang KH, Spector S a. Production of Interferon α by Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Dependent on Induction of Autophagy. *J. Infect. Dis.* 2012;6(8):1258–67.
554. Li Y-Y, Ishihara S, Aziz MM, et al. Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 2011;27(3):337–44.
555. Henault J, Martinez J, Riggs JM, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity*. 2012;37(6):986–97.
556. Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity*. 2008;28(6):799–809.
557. Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(35):14050–5.
558. Lei Y, Wen H, Ting JPY. The NLR protein, NLRX1, and its partner, TUFM, reduce type I interferon, and enhance autophagy. *Autophagy*. 2013;9(3):432–3.
559. Yang C-S, Rodgers M, Min C-K, et al. The autophagy regulator Rubicon is a feedback inhibitor of CARD9-mediated host innate immunity. *Cell Host Microbe*. 2012;11(3):277–89.
560. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, et al. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J. Immunol.* 2011;186(3):1646–55.
561. Saitoh T, Fujita N. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. ….* 2009;2–6.
562. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009;461:788–792.
563. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008;456(7219):264–8.
564. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 2012;13(3):255–63.
565. Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, et al. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 2013;14(5):480–8.
566. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221–5.
567. Harris J, Hartman M, Roche C, et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* 2011;286(11):9587–97.
568. Dupont N, Jiang S, Pilli M, et al. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1β. *EMBO J.* 2011;30(23):4701–11.
569. Castillo EF, Dekonenko A, Arko-Mensah J, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(46):E3168–76.
570. Peral de Castro C, Jones S a, Ní Cheallaigh C, et al. Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion. *J. Immunol.* 2012;189(8):4144–53.
571. Jones S a, Mills KHG, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol. Cell Biol.* 2013;91:250–8.
572. Kondylis V, Nispen HE Van, Dijk S Van, et al. An unconventional MIIC-driven autophagic pathway operational in dendritic cells Endosome-mediated autophagy. 2013;(June):861–880.
573. Romao S, Gasser N, Becker AC, et al. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J. Cell Biol.* 2013;203(5):757–66.
574. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7922–7927.
575. Suri A, Walters JJ, Rohrs HW, Gross ML, Unanue ER. First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J. Immunol.* 2008;180:3849–3856.
576. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*. 2008;455(7211):396–400.
577. Kasai M, Tanida I, Ueno T, et al. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J. Immunol.* 2009;183(11):7278–85.
578. Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.* 2013;210(2):287–300.
579. Appel S, Gru F, Weck MM, et al. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood*. 2005;105(8):3199–205.
580. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(5):1250–9.
581. Fu X, Tao L, Zhang X. A short polypeptide from the herpes simplex virus type 2 ICP10 gene can induce antigen aggregation and autophagosomal degradation for enhanced immune presentation. *Hum. Gene Ther.* 2010;21(12):1687–96.
582. Ireland JM, Unanue ER. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J. Exp. Med.* 2011;208(13):2625–32.
583. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*. 2005;307(5709):593–6.
584. Leung CS, Haigh TA, Mackay LK, Rickinson AB, Taylor GS. Nuclear location of an endogenously expressed antigen , EBNA1 , restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. 2010;107(5):2165–2170.

585. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):367–80.
586. Rüssmann H, Panthel K, Köhn B, et al. Alternative endogenous protein processing via an autophagy-dependent pathway compensates for Yersinia-mediated inhibition of endosomal major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Infect. Immun.* 2010;78(12):5138–50.
587. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, et al. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med*. 2009;15(3):267–276.
588. Strisciuglio C, Miele E, Wildenberg ME, et al. T300A Variant of Autophagy ATG16L1 Gene is Associated with Decreased Antigen Sampling and Processing by Dendritic Cells in Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2013;19:2339–48.
589. Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity*. 2010;32(2):227–39.
590. Ma J, Becker C, Lowell C a, Underhill DM. Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *J. Biol. Chem.* 2012;287(41):34149–56.
591. Wenger T, Terawaki S, Camosseto V, et al. Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHCI-restricted. *Autophagy*. 2012;(March):1–14.
592. Fiegl D, Kägebein D, Liebler-Tenorio EM, et al. Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 2013;190:2791–806.
593. Tey S, Khanna R. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood*. 2012;120(5):994–1004.
594. English L, Chemali M, Duron J, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol*. 2009;10(5):480–487.
595. Johnstone C, Ramos M, García-Barreno B, et al. Exogenous, TAP-independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope. *Immunol. Cell Biol.* 2012;
596. Li Y, Hahn T, Garrison K, et al. The vitamin E analogue α-TEA stimulates tumor autophagy and enhances antigen cross-presentation. *Cancer Res.* 2012;72(14):3535–45.
597. Li Y, Wang L-X, Pang P, et al. Tumor-derived autophagosome vaccine: mechanism of cross-presentation and therapeutic efficacy. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(22):7047–57.
598. Li Y, Wang L-X, Yang G, et al. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res.* 2008;68(17):6889–95.
599. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, et al. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):991–1005.
600. Ravindran R, Khan N, Nakaya HI, et al. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science*. 2014;343:313–7.
601. Jin Y, Sun C, Feng L, et al. Regulation of SIV Antigen-Specific CD4+ T Cellular Immunity via Autophagosome-Mediated MHC II Molecule-Targeting Antigen Presentation in Mice. *PLoS One*. 2014;9(3):e93143.
602. Zhou D, Li P, Lin Y, et al. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity*. 2005;22(5):571–581.
603. Crotzer VL, Glosson N, Zhou D, Nishino I, Blum JS. LAMP-2-deficient human B cells exhibit altered MHC class II presentation of exogenous antigens. *Immunology*. 2010;131(3):318–30.
604. Kettern N, Rogon C, Limmer A, Schild H, Höhfeld J. The Hsc/Hsp70 co-chaperone network controls antigen aggregation and presentation during maturation of professional antigen presenting cells. *PLoS One*. 2011;6(1):e16398.
605. He B, Gross M, Roizman B. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(3):843–8.
606. Talloczy Z, Jiang W, Iv HWV, et al. Regulation of starvation and virus-induced autophagy by the eIF2a kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;99:190–195.
607. Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007;1(1):23–35.
608. Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard M-F, et al. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J. Virol.* 2013;87(2):859–71.
609. Chaumorcel M, Souquère S. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. …. 2008;1(January):46–53.
610. Chaumorcel M, Lussignol M, Mouna L, et al. The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *J. Virol.* 2012;86(5):2571–84.
611. Lee J-S, Li Q, Lee J-Y, et al. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(11):1355–62.
612. Polster BM, Pevsner J, Hardwick JM. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004;1644(2-3):211–27.
613. Li J, Liu Y, Wang Z, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J. Virol.* 2011;85(13):6319–33.
614. Sir D, Tian Y, Chen W, et al. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2010;107(9):4383–8.
615. Dreux M, Chisari F V. Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. *Autophagy*. 2009;5(8):1224–1225.
616. Sir D, Chen W-L, Choi J, et al. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008;48(4):1054–61.
617. Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, et al. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J. Virol.* 2008;82(5):2241–9.
618. Kirkegaard K, Jackson W. Topology of Double-Membraned Vesicles and the Opportunity for Non-Lytic Release of Cytoplasm. *Autophagy*. 2005;1(3):182–184.
619. Jackson WT, Giddings Jr. TH, Taylor MP, et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol*. 2005;3(5):e156.
620. Taylor MP, Kirkegaard K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J. Virol.* 2007;81(22):12543–53.

621. Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, et al. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. *J. Virol.* 2006;80(12):6061–71.
622. Joubert P-EE, Meiffren G, Gregoire IP, et al. Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):354–366.
623. Richetta C, Grégoire IP, Verlhac P, et al. Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003599.
624. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (80-.).* 1983;220:868–871.
625. Rinaldo CR. HIV-1 Trans Infection of CD4(+) T Cells by Professional Antigen Presenting Cells. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:164203.
626. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux L V, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998;280:427–431.
627. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004;200:749–759.
628. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95–98.
629. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505:509–14.
630. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2161–2172.
631. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu. Rev. Med.* 2011;62:141–155.
632. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(8):
633. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*. 2010;7(1):96.
634. O'Brien WA, Namazi A, Kalhor H, et al. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in blood mononuclear phagocytes are slowed by limitations of nucleotide precursors. *J Virol.* 1994;68:1258–1263.
635. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 2012;13:621–621.
636. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(7):a006890.
637. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 1996;2(3):338–342.
638. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12144–12149.
639. Garcia J V, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*. 1991;350:508–511.
640. Sundquist WI, Kräusslich H-G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(7):a006924.
641. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(11):859–868.
642. Macatonia SE, Lau R, Patterson S, Pinching a J, Knight SC. Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology*. 1990;71(1):38–45.
643. Tschachler E, Groh V, Popovic M, et al. Epidermal Langerhans cells--a target for HTLV-III/LAV infection. *J. Invest. Dermatol.* 1987;88:233–237.
644. Casartelli N, Guivel-Benhassine F, Bouziat R, et al. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med*. 2010;207(1):39–49.
645. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;1–5.
646. Pope M, Gezelter S, Gallo N, Hoffman L, Steinman RM. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1995;182(6):2045–2056.
647. Smed-Sörensen A, Loré K, Vasudevan J, et al. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 2005;79:8861–8869.
648. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J. Virol.* 2001;75:6710–6713.
649. Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, et al. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:8401–8406.
650. Bakri Y, Schiffer C, Zennou V, et al. The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J. Immunol.* 2001;166(6):3780–8.
651. Dong C, Janas AM, Wang J-H, Olson WJ, Wu L. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J. Virol.* 2007;81:11352–11362.
652. Cavrois M, Neidleman J, Kreisberg JF, et al. Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature. *J. Virol.* 2006;80:1992–1999.
653. Moris A, Pajot A, Blanchet F, et al. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 2006;108(5):1643–1651.
654. Lambert AA, Gilbert C, Richard M, Beaulieu AD, Tremblay MJ. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood*. 2008;112:1299–1307.
655. Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, et al. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J. Virol.* 2007;81:7559–7570.
656. Ahmed Z, Czubala M, Blanchet F, Piguet V. HIV impairment of immune responses in dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013;762:201–238.
657. Hatch SC, Archer J, Gummuluru S. Glycosphingolipid composition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particles is a crucial determinant for dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *J. Virol.* 2009;83:3496–3506.
658. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, et al. Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol.* 2012;10:

659. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, McLaren PJ, et al. HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004146.
660. De Witte L, Nabatov A, Pion M, et al. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* 2007;13:367–371.
661. Davis AJ, Li P, Burrell CJ. Kinetics of viral RNA synthesis following cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 1997;78:1897–1906.
662. McDonald D, Wu L, Bohks SM, et al. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003;300:1295–1297.
663. Ganesh L, Leung K, Loré K, et al. Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2004;78:11980–11987.
664. Smith AL, Ganesh L, Leung K, et al. Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2007;204:421–430.
665. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*. 2002;16:135–144.
666. Garcia E, Pion M, Pelchen-Matthews A, et al. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*. 2005;6:488–501.
667. Yu HJ, Reuter MA, McDonald D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog.* 2008;4:
668. Izquierdo-Useros N, Esteban O, Rodriguez-Plata MT, et al. Dynamic Imaging of Cell-Free and Cell-Associated Viral Capture in Mature Dendritic Cells. *Traffic*. 2011;12:1702–1713.
669. Felts RL, Narayan K, Estes JD, et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:13336–13341.
670. Sanders RW, de Jong EC, Baldwin CE, et al. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol.* 2002;76:7812–7821.
671. Coleman C, Gelais C, Wu L. Cellular and Viral Mechanisms of HIV-1 Transmission Mediated by Dendritic Cells. *HIV Interact. with Dendritic Cells*. 2013;1–20.
672. Turville SG, Santos JJ, Frank I, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170–2179.
673. Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, et al. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J Virol*. 2009;83(12):6234–6246.
674. Martin N, Welsch S, Jolly C, et al. Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. *J. Virol.* 2010;84:3516–3527.
675. Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* 2004;199:283–293.
676. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2007;81(11):5547–60.
677. Burleigh L, Lozach P, Schiffer C, et al. Infection of Dendritic Cells (DCs), Not DC-SIGN-Mediated Internalization of Human Immunodeficiency Virus , Is Required for Long-Term Transfer of Virus to T Cells Infection of Dendritic Cells (DCs), Not DC-SIGN-Mediated Internalization of Human Immunod. 2006;
678. Nobile C, Moris A, Porrot F, Sol-Foulon N, Schwartz O. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J. Virol.* 2003;77:5313–5323.
679. Kappes JC, Conway JA, Lee SW, Shaw GM, Hahn BH. Human immunodeficiency virus type 2 vpx protein augments viral infectivity. *Virology*. 1991;184:197–209.
680. Goujon C, Rivière L, Jarrosson-Wuilleme L, et al. SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology*. 2007;4:2.
681. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*. 2011;474:658–661.
682. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, et al. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*. 2011;480:379–382.
683. Ahn J, Hao C, Yan J, et al. HIV/Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Accessory Virulence Factor Vpx Loads the Host Cell Restriction Factor SAMHD1 onto the E3 Ubiquitin Ligase Complex CRL4DCAF1. *J. Biol. Chem.* 2012;287:12550–12558.
684. Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol. Cell*. 2002;10:1247–1253.
685. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*. 2003;113:803–809.
686. Browne EP, Allers C, Landau NR. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology*. 2009;387:313–321.
687. Hultquist JF, Lengyel JA, Refsland EW, et al. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J. Virol.* 2011;85:11220–11234.
688. Mohanram V, Sköld AE, Bächle SM, Pathak SK, Spetz A-L. IFN-α induces APOBEC3G, F, and A in immature dendritic cells and limits HIV-1 spread to CD4+ T cells. *J. Immunol.* 2013;190(7):3346–53.
689. Chiu Y-L, Soros VB, Kreisberg JF, et al. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*. 2005;435:108–114.
690. Marquet R, Guerrero S. Un facteur de transcription se fait complice du VIH-1 pour détruire les défenses cellulaires. *M/S médecine Sci.* 2012;1–3.
691. Neil SJD, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD. An Interferon-alpha-Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein. *Cell Host Microbe*. 2007;2:193–203.
692. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451:425–430.
693. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell*. 2009;139:499–511.

694. Janvier K, Pelchen-Matthews A, Renaud JB, et al. The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS Pathog.* 2011;7:
695. Yap MW, Nisole S, Stoye JP. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5α leads to HIV-1 restriction. *Curr. Biol.* 2005;15:73–78.
696. Battivelli E, Lecossier D, Matsuoka S, et al. Strain-specific differences in the impact of human TRIM5alpha, different TRIM5alpha alleles, and the inhibition of capsid-cyclophilin A interactions on the infectivity of HIV-1. *J. Virol.* 2010;84:11010–11019.
697. Larangé A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Römer S. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* 2009;85:673–683.
698. Manel N, Hogstad B, Wang Y, et al. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature*. 2010;467(7312):214–7.
699. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumpfheller C, Siegal FP, Steinman RM. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:7669–7674.
700. Harman AN, Lai J, Turville S, et al. HIV infection of dendritic cells subverts the IFN induction pathway via IRF-1 and inhibits type 1 IFN production. *Blood*. 2011;118:298–308.
701. Gringhuis SI, van der Vlist M, van den Berg LM, et al. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2010;11:419–426.
702. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, et al. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* 2011;7:
703. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3265–3275.
704. Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, et al. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2003;74:1125–1138.
705. Müller-Trutwin M, Hosmalin A. Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol. Cell Biol.* 2005;83:578–585.
706. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV Infection. *HIV Interact. with Dendritic Cells*. 2013;1–35.
707. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, et al. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol*. 2007;8(6):569–577.
708. Geijtenbeek TBH. Host DNase TREX1 hides HIV from DNA sensors. *Nat. Immunol.* 2010;11(11):979–80.
709. Yan N, Cherepanov P, Daigle JE, Engelman A, Lieberman J. The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *PLoS Pathog.* 2009;5:
710. Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol.* 2010;11:1005–1013.
711. Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, et al. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013;110(48):19651–19651.
712. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, et al. The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity*. 2013;39:1132–1142.
713. Gao D, Wu J, Wu Y-T, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013;341(6148):903–6.
714. Berg RK, Melchjorsen J, Rintahaka J, et al. Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PLoS One*. 2012;7(1):e29291.
715. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, et al. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity*. 2013;39(6):1132–42.
716. Manel N, Littman DR. Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell*. 2011;147(2):271–4.
717. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* 2003;54:535–51.
718. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10(1):11–23.
719. Asquith B. The evolutionary selective advantage of HIV-1 escape variants and the contribution of escape to the HLA-associated risk of AIDS progression. *PLoS One*. 2008;3(10):e3486.
720. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* 2004;10:282–289.
721. Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci. Transl. Med.* 2012;4(123):123ra25.
722. Chevalier MF, Jülg B, Pyo A, et al. HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *J. Virol.* 2011;85(2):733–41.
723. Paris R, Bejrachandra S, Thongcharoen P, et al. HLA class II restriction of HIV-1 clade-specific neutralizing antibody responses in ethnic Thai recipients of the RV144 prime-boost vaccine combination of ALVAC-HIV and AIDSVAX(®) B/E. *Vaccine*. 2012;30(5):832–6.
724. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu J-M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2004;10:1359–1365.
725. Sabado RL, Babcock E, Kavanagh DG, et al. Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1. *Eur. J. Immunol.* 2007;37(7):1752–63.
726. Schwartz O, Maréchal V, Friguet B, Arenzana-Seisdedos F, Heard JM. Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1998;72:3845–3850.
727. Nobile C, Moris A, Porrot F, Sol-Foulon N, Schwartz O. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J Virol*. 2003;77(9):5313–5323.
728. Tjomsland V, Ellegård R, Burgener A, et al. Complement opsonization of HIV-1 results in a different intracellular processing pattern and enhanced MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2013;43(6):1470–83.
729. Larsson M, Fonteneau JF, Lirvall M, et al. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *AIDS*. 2002;16(10):1319–1329.
730. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J. Virol.* 2000;74:6087–6095.

731. Goldwich a., Hahn SSC, Schreiber S, et al. Targeting HIV-1 Gag into the Defective Ribosomal Product Pathway Enhances MHC Class I Antigen Presentation and CD8+ T Cell Activation. *J. Immunol.* 2007;180(1):372–382.
732. Fujiwara M, Takiguchi M. HIV-1 – specific CTLs effectively suppress replication of HIV-1 in HIV-1 – infected macrophages. 2007;109(11):4832–4838.
733. Rowell JF, Guarnieri FG, Carroll KS, et al. Lysosome-Associated Membrane Protein-1 -Mediated Targeting of the HIV-1 Envelope Protein to an Endosomal/Lysosomal Compartment Enhances Its Presentation to MHC Class Il-Restricted T Cells. *J. Immunol.* 1995;5–8.
734. Andrieu M, Chassin D, Desoutter JF, et al. Downregulation of major histocompatibility class I on human dendritic cells by HIV Nef impairs antigen presentation to HIV-specific CD8+ T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001;17(14):1365–70.
735. Miller E, Bhardwaj N. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 2013;254(1):170–89.
736. Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood*. 2010;116(19):3839–52.
737. Manches O, Munn D, Fallahi A. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2, 3-dioxygenase–dependent mechanism. *J. ….* 2008;118(10):3431–3439.
738. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008;319(5865):921–6.
739. Eekels JJ, Sagnier S, Geerts D, et al. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. *Virol. J.* 2012;9(1):69.
740. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1995;1:129–134.
741. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, et al. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*. 2010;143:789–801.
742. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma Z. Peak SIV replication in resting memory CD4 1 T cells depletes gut lamina propria CD4 1 T cells. 2005;434(APRIL):
743. Fausther-Bovendo PH, Vieillard V, Sagan S, Bismuth G, Debr?? P. Hiv gp41 engages gc1qr on cd4+ t cells to induce the expression of an nk ligand through the pip3/h2o2. *PLoS Pathog.* 2010;6:1–14.
744. Cummins NW, Badley a D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis.* 2010;1(11):e99.
745. Laurent-Crawford AG, Krust B, Rivière Y, et al. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1993;9:761–773.
746. Garg H, Blumenthal R. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65:3134–3144.
747. Joshi A, Nyakeriga AM, Ravi R, Garg H. HIV ENV Glycoprotein-mediated Bystander Apoptosis Depends on Expression of the CCR5 Co-receptor at the Cell Surface and ENV Fusogenic Activity. *J. Biol. Chem.* 2011;286:36404–36413.
748. Vieillard V, Strominger JL, Debré P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:10981–10986.
749. Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, et al. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009;4(6):e5787.
750. Denizot M, Varbanov M, Espert L, et al. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy*. 2008;4(8):998–1008.
751. Molina L, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, et al. Proteomic analysis of the cellular responses induced in uninfected immune cells by cell-expressed X4 HIV-1 envelope. *Proteomics*. 2007;7(17):3116–30.
752. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, et al. Autophagy and CD4+ T lymphocyte destruction by HIV-1. *Autophagy*. 2007;3(1):32–34.
753. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope F. Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(2):169–176.
754. Janji B, Viry E, Baginska J, Moer K Van, Berchem G. Role of Autophagy in Cancer and Tumor Progression. 2013;
755. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 2012;19:87–95.
756. Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science*. 2014;343:428–32.
757. Zhou D, Spector S a. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS*. 2008;22(6):695–699.
758. Wang X, Gao Y, Tan J, et al. HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4(+) T cells. *Cell. Signal.* 2012;24(7):1414–1419.
759. Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J. Virol.* 1998;72:7992–8001.
760. Campbell GR, Spector SA. Hormonally active vitamin D3 (1{alpha},25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J Biol Chem*. 2011;
761. Van Grol J, Subauste C, Andrade RM, et al. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One*. 2010;5(7):e11733.
762. Rayne F, Debaisieux S, Bonhoure A, Beaumelle B. HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane. *Cell Biol. Int.* 2010;34:409–413.
763. Xiao H, Neuveut C, Tiffany HL, et al. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(21):11466–71.
764. Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011;11(3):269–83.
765. Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, et al. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2004;279:48197–48204.
766. Gee K, Angel JB, Mishra S, Blahoianu MA, Kumar A. IL-10 regulation by HIV-Tat in primary human monocytic cells: involvement of calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated p38 MAPK and Sp-1 and CREB-1 transcription factors. *J. Immunol.* 2007;178:798–807.
767. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*. 2013;494(7436):201–6.
768. Campbell GR, Spector SA. Toll-Like Receptor 8 Ligands Activate a Vitamin D Mediated Autophagic Response that Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1. *PLoS Pathog.* 2012;8:

769. Martinson JA, Roman-Gonzalez A, Tenorio AR, et al. Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell Immunol*. 2007;250(1-2):75–84.
770. Nicol MQ, Mathys JM, Pereira A, et al. Human immunodeficiency virus infection alters tumor necrosis factor alpha production via Toll-like receptor-dependent pathways in alveolar macrophages and U1 cells. *J Virol*. 2008;82(16):7790–7798.
771. Sun J, Bevan M. Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. *Science (80-.)*. 2003;300(5617):339–342.
772. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*. 2003;300(5617):337–9.
773. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:621–63.
774. Pissani F, Streeck H. Emerging concepts on T follicular helper cell dynamics in HIV infection. *Trends Immunol.* 2014;35(6):278–286.
775. Chiodi F, Weiss RA. Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. *J. Intern. Med.* 2014;275:444–455.
776. Schieffer M, Jessen HK, Oster AF, et al. Induction of Gag-Specific CD4 T Cell Responses during Acute HIV Infection Is Associated with Improved Viral Control. *J. Virol.* 2014;88:7357–7366.
777. Ranasinghe S, Cutler S, Davis I, et al. Association of HLA-DRB1-restricted CD4(+) T cell responses with HIV immune control. *Nat Med*. 2013;19:930–933.
778. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, et al. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 2006;203:2887–2893.
779. Moris A, Nobile C, Buseyne F, et al. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood*. 2004;103(7):2648–2654.
780. Moris A, Pajot A, Blanchet F, et al. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 2006;108(5):1643–1651.
781. Herath S, Benlahrech A, Papagatsias T, et al. Fusion of ubiquitin to HIV gag impairs human monocyte-derived dendritic cell maturation and reduces ability to induce gag T cell responses. *PLoS One*. 2014;9(2):e88327.
782. Eisenlohr LC, Hackett CJ. Class II major histocompatibility complex-restricted T cells specific for a virion structural protein that do not recognize exogenous influenza virus. Evidence that presentation of labile T cell determinants is favored by endogenous antigen synthesis. *J. Exp. Med.* 1989;169(3):921–31.
783. Jacobson S, Sekaly RP, Bellini WJ, et al. Recognition of intracellular measles virus antigens by HLA class II restricted measles virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1988;540:352–3.
784. Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature*. 1990;343:74–76.
785. Schmid D, Pypaert M, Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007;26(1):79–92.
786. Münz C. Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Front. Immunol.* 2012;3(February):9.
787. Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. 1995;375:411–415.
788. Campbell GR, Spector S a. Hormonally active vitamin D3 (1alpha,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 2011;286(21):18890–902.
789. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*. 2009;186(2):255–268.
790. Guerbois M, Moris A, Combredet C, et al. Live attenuated measles vaccine expressing HIV-1 Gag virus like particles covered with gp160DeltaV1V2 is strongly immunogenic. *Virology*. 2009;388(1):191–203.
791. Jouve M, Sol-Foulon N, Watson S, Schwartz O, Benaroch P. HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe*. 2007;2(2):85–95.
792. Kramer B, Pelchen-Matthews A, Deneka M, et al. HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2005;35:136–142.
793. Lee YS, Pressman S, Andress AP, et al. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat. Cell Biol.* 2009;11:1150–1156.
794. Stumptner-Cuvelette P, Jouve M, Helft J, et al. Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell*. 2003;14:4857–4870.
795. Blom J, Nielsen C, Rhodes JM. An ultrastructural study of HIV-infected human dendritic cells and monocytes/macrophages. *APMIS*. 1993;101:672–680.
796. Johnson DC, Hegde NR. Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002;269:101–15.
797. Nardacci R, Amendola A, Ciccosanti F, et al. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. *Autophagy*. 2014;10(7):1–12.
798. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity*. 2013;39:633–645.
799. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469:323–335.
800. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13:722–37.
801. Phadwal K, Alegre-abarrategui J, Watson AS, et al. A novel method for autophagy detection in primary cells. *Autophagy*. 2012;(April):677–689.

ANNEXES

Travaux collaboratifs

Au sein du laboratoire, j'ai eu l'opportunité d'apporter ma contribution à l'étude de Maria Rodriguez-Plata (du laboratoire de Javier Martinez-Picado) en participant avec Sylvain Cardinaud aux expériences de présentation antigénique et à l'expansion des clones lymphocytaires T spécifiques utilisés dans ces expériences.

Article :

HIV-1 capture and antigen presentation by dendritic cells: enhanced viral capture does not correlate with better T cell activation.

Rodriguez-Plata MT, Urrutia A, Cardinaud S, Buzón MJ, Izquierdo-Useros N, Prado JG, Puertas MC, Erkizia I, Coulon PG, Cedeño S, Clotet B, Moris A, Martinez-Picado J.

2012 Jun 15 ; 188(12):6036-45. doi: 10.4049/jimmunol.1200267. Epub 2012 May 11.

Résumé :

En comparaison avec les DC immatures, les DC en fin de maturation (après activation LPS), bien qu'elle capturent davantage de virus et le transmettent plus efficacement en *trans* aux LT CD4, ne présentent pas plus efficacement les antigènes viraux (exogènes) aux LT CD4 et LT CD8. Les compartiments où les virus sont capturés diffèrent suivant l'état de maturation : dans les DC matures activées à l'aide du LPS, le virus se retrouve dans majoritairement dans un compartiment qui empêcherait sa dégradation et favoriserait son transfert aux LT CD4.

A contrario, la stimulation au LPS pendant l'incubation avec le virus n'augmente pas sa capture mais potentialise la présentation CMH-I et CMH-II. La quantité de virus capturée par les DC ne corrèle donc pas avec leur capacité à présenter les antigènes du VIH, mais semble dépendante de la cinétique de leur maturation (et des différents stimuli utilisés).

HIV-1 Capture and Antigen Presentation by Dendritic Cells: Enhanced Viral Capture Does Not Correlate with Better T Cell Activation

Maria T. Rodriguez-Plata,* Alejandra Urrutia,[†,1] Sylvain Cardinaud,[†,1] Maria J. Buzón,* Nuria Izquierdo-Useros,* Julia G. Prado,* Maria C. Puertas,* Itziar Erkizia,* Pierre-Grégoire Coulon,[†] Samandhy Cedeño,* Bonaventura Clotet,* Arnaud Moris,[†] and Javier Martinez-Picado*,[‡]

During HIV-1 infection, dendritic cells (DC) facilitate dissemination of HIV-1 while trying to trigger adaptive antiviral immune responses. We examined whether increased HIV-1 capture in DC matured with LPS results in more efficient Ag presentation to HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. To block the DC-mediated *trans*-infection of HIV-1 and maximize Ag loading, we also evaluated a noninfectious integrase-deficient HIV-1 isolate, $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$. We showed that higher viral capture of DC did not guarantee better Ag presentation or T cell activation. Greater $HIV_{NL4\text{-}3}$ uptake by fully LPS-matured DC resulted in higher viral transmission to target cells but poorer stimulation of HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Conversely, maturation of DC with LPS during, but not before, viral loading enhanced both HLA-I and HLA-II HIV-1–derived Ag presentation. In contrast, DC maturation with the clinical-grade mixture consisting of IL-1β, TNF-α, IL-6, and PGE_2 during viral uptake only stimulated HIV-1–specific $CD8^+$ T cells. Hence, DC maturation state, activation stimulus, and time lag between DC maturation and Ag loading impact HIV-1 capture and virus Ag presentation. Our results demonstrate a dissociation between the capacity to capture HIV-1 and to present viral Ags. Integrase-deficient $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ was also efficiently captured and presented by DC through the HLA-I and HLA-II pathways but in the absence of viral dissemination. $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ seems to be an attractive candidate to be explored. These results provide new insights into DC biology and have implications in the optimization of DC-based immunotherapy against HIV-1 infection. ***The Journal of Immunology*****, 2012, 188: 6036–6045.**

Dendritic cells (DC) are the most potent APCs in the immune system and act as a link between innate and adaptive immunity (1, 2). DC reside as immature cells in peripheral tissues, where they monitor their environment for danger signals, capture pathogens, and migrate to draining lymph nodes. During migration, DC process captured Ags while acquiring a mature phenotype by upregulating costimulatory and HLA molecules at the cell membrane. Once they reach the T cell areas of the lymph nodes, mature DC (mDC) can present pathogen-derived peptides to naive T cells in association with HLA molecules. This process initiates a cellular immune response that involves $CD4^+$ Th cells and $CD8^+$ CTL, as well as a humoral immune response that requires activation of B cells (3). Nevertheless, during HIV-1 exposure in vivo, DC can also contribute to the spread of HIV-1 (4). At portals of viral entry, such as the mucosa, DC are among the first cells to encounter HIV-1; subsequently, the DC move to lymphoid tissues, where they interact with $CD4^+$ T cells, the main targets of HIV-1 (4).

Several studies demonstrated that, upon maturation, DC improve their efficiency in transmitting HIV-1 through *trans*-infection (5–9), a process in which DC can retain and transfer infectious virions without becoming infected themselves. It was proposed that HIV-1 takes advantage of a pre-existing exosome Ag-dissemination pathway intrinsic to mDC to enable final *trans*-infection of $CD4^+$ T cells (10–12), whereas others investigators adduce that only DC surface-bound HIV-1 are able to *trans*-infect target cells (13). However, both models have been reconciled, demonstrating that LPS-matured DC (mDC LPS) concentrate HIV-1 in a tetra-

*Institut de Recerca de la SIDA IrsiCaixa, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain; [†]INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 945, Infection et Immunité, Université Pierre et Marie Curie, 75013 Paris, France; and [‡]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain

[1]A.U. and S. Cardinaud contributed equally to this study.

Received for publication January 24, 2012. Accepted for publication April 11, 2012.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant SAF2010-21224), the Spanish Ministry of Health (Grant FIS PS09/01297), the Spanish AIDS Network (RD06/0006), the Catalan HIV Vaccine Development Program, the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis, Sidaction, Université Pierre et Marie Curie, INSERM, and the Centre National de la Recherche Scientifique. M.T.R.-P. is supported by Grant BES-2008-002609 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. A.U. and S. Cardinaud are funded by Sidaction. J.G.P. holds a Miguel Servet contract (MS09/00279) funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III).

M.T.R.-P. designed and performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; A.U. and S. Cardinaud designed and performed research, contributed vital analytical tools, and analyzed data; M.J.B., N.I.-U., J.G.P., M.C.P., and I.E. contributed vital analytical tools, designed research, provided technical assistance, and analyzed data; P.-G.C., S. Cedeño, and B.C. contributed vital analytical tools; A.M. contributed vital analytical tools, designed research, analyzed data, and wrote the manuscript, and J.M.-P. designed research, analyzed data, and wrote the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Javier Martinez-Picado, Institut de Recerca de la SIDA IrsiCaixa, Hospital Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain. E-mail address: jmpicado@irsicaixa.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AZT, azidothymidine; BlaM, β-lactamase; DC, dendritic cell; iDC, immature dendritic cell; iDC+ITIP, IL-1β, TNF-α, IL-6, and PGE_2-matured DC during viral loading; iDC+LPS, LPS-matured DC during viral loading; ITIP, IL-1β, TNF-α, IL-6, and PGE_2; mDC, mature dendritic cell; mDC ITIP, IL-1β, TNF-α, IL-6, and PGE_2-matured dendritic cell; mDC LPS, LPS-matured dendritic cell; MPL, monophosphoryl lipid A; NIH, National Institutes of Health; NVP, nevirapine.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1200267

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

spanin-rich compartment that remains physically connected to the extracellular milieu (9). Generally, all maturation signals upregulate expression of HLA and costimulatory molecules, although the functional ability of the resulting mDC varies (14). Consequently, depending on their qualitative maturation state, DC are able to polarize various T cell responses (15). The ability of mDC to transfer HIV-1 is also largely influenced by the maturation stimulus and the resulting DC subsets (8). For instance, DC matured in the presence of PGE_2 are inefficient in HIV-1 transmission to T lymphocytes (8), whereas other maturation factors, such as TNF and LPS, are very potent in transmission of HIV-1 (16). We previously showed that mDC LPS (i.e., both monocyte-derived and blood-derived myeloid DC) capture higher amounts of HIV-1 than do immature DC (iDC) (6) and that this finding correlated with a greater ability to transfer HIV-1 to susceptible target cells (6, 9, 17). In addition, plasma LPS levels, which are significantly augmented in chronically HIV-1–infected individuals as the result of increased microbial translocation, might also support the contribution of mDC to the spread of HIV-1 in vivo (18).

Considering that DC are crucial in the generation and regulation of immune responses, they may play a dual role in HIV-1 infection by increasing the spread of HIV-1 while trying to trigger an adaptive response against viral infection. Although it is well documented that the higher viral capture of mDC LPS results in increased *trans*-infection to target cells (4, 6, 8), little is known about the Ag-presentation ability of this DC subset. It was recently suggested that *Mycobacterium tuberculosis* promotes HIV-1 *trans*-infection similarly to LPS, while suppressing class II Ag processing by DC (19). In this study, we address the efficiency of mDC LPS for presenting HIV-1–derived Ags to both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Using a more clinical approach, we extend the question to the proinflammatory mixture composed of IL-1β, TNF-α, IL-6, and PGE_2 (hereafter referred as ITIP), the gold standard for DC maturation in immunotherapy (14, 20). Moreover, to block the DC-mediated *trans*-infection of HIV-1, we also evaluate a noninfectious integrase-deficient HIV-1 isolate, $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$. We show that higher HIV-1 capture by DC does not correlate with better T cell activation. Although mDC LPS captured greater amounts of HIV-1 particles, this resulted in higher viral transmission to target cells but poor stimulation of HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Our data suggest that, in mDC LPS, HIV-1 exploits a specific route to be transmitted to $CD4^+$ T cells, thus significantly limiting viral Ag degradation. In addition, DC maturation with LPS during, but not before, viral loading (iDC+LPS) enhanced both HLA-I and HLA-II HIV-1–derived Ag presentation, whereas maturation of DC with ITIP during viral loading (iDC+ITIP) only stimulated the HLA-I pathway. Finally, compared with replication-competent $HIV_{NL4\text{-}3}$, integrase-deficient $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ was equally captured and presented to HIV-1–specific T cells by DC. Therefore, $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ appears to be a promising immunogen for anti–HIV-1 vaccine development.

Materials and Methods

Cells

PBMC from HIV-1–seronegative donors were purchased from the Banc de Sang i de Teixits (Barcelona, Spain) or the Etablissement Français du Sang of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). Purified monocyte populations were isolated with $CD14^+$ magnetic beads (Miltenyi Biotec) and cultured with RPMI 1640 containing 10% FBS (Invitrogen), 1000 U/ml GM-CSF, and IL-4 (R&D Systems) for 5 d to obtain iDC. On day 5, mDC were obtained by adding 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) or 300 U/ml IL-1β, 1000 U/ml IL-6, 1000 U/ml TNF-α (all from CellGenix), and 1 μg/ml PGE_2 (Sigma-Aldrich) for an additional 2 d. Monocytes, iDC, and mDC were immunophenotyped using flow cytometry at day 7 (FACSCalibur Flow Cytometer; BD Biosciences). The mAb used for cell immunophenotyping were as follows: CD14-FITC and -PE (clone M5E2; BD Pharmingen), CD209-PE and -allophycocyanin (clone DCN46; BD Pharmingen), CD4-PerCP (clone SK3; BD Biosciences), HLA-DR–PE and -PerCP (clone L243; BD Biosciences), HLA class I-FITC (clone W6/32; Sigma-Aldrich), CD86-FITC (clone 2331; BD Pharmingen), CD83-PE and -allophycocyanin (clone HB15e; BD Pharmingen), and CD80–PE–Cy5 (clone L307.4; BD Pharmingen). The institutional review boards of University Hospital Germans Trias i Pujol and Pitié-Salpêtrière Hospital approved this study.

TZM-bl (National Institutes of Health [NIH] AIDS Research and Reference Reagent Program: from J.C. Kappes and X. Wu, and from Tranzyme) and HEK-293T (ATCC-LGC) cell lines were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. All media contained 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Invitrogen).

HIV-1–specific T cell clones

The F12 and N2 $CD4^+$ T cell clones specific for HIV $p24^{Gag}$ (aa 271–290), restricted by HLA-DRβ*01/HLA-DRβ*04 and HLA-DRβ*04 (21), respectively, were used to monitor HLA-II Ag presentation. The SL9-2 and EM40-F21 $CD8^+$ T cell clones specific for HIV $p17^{Gag}$ (aa 77–85, SL9 peptide) and restricted by HLA-A*02 (22) were used to evaluate HLA-I Ag presentation. The T cell clones were restimulated and expanded, as previously described (21, 22), using irradiated feeders and autologous lymphoblastoid cell lines loaded with cognate peptides in T cell-cloning medium (RPMI 1640 containing 5% serum AB [Institut Jacques Boy], 100 U/ml recombinant human IL-2, and 1 μg/ml PHA [PAA] complemented with nonessential amino acid and sodium pyruvate [Life Technologies]). At least 4 h before coculture with DC, T cell clones were thawed and allowed to rest in cloning medium without PHA.

Viral stocks and plasmids

Replication-competent full-length CXCR4-tropic HIV-1 ($HIV_{NL4\text{-}3}$) and integrase-deficient CXCR4-tropic HIV-1 ($HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$) stocks were generated by transfecting the proviral construct pNL4-3 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program: from M. Martin) and pNL4-3ΔIN (23) with calcium phosphate (Clontech) in HEK-293T cells. Both pNL4-3 and pNL4-3ΔIN were modified to express the optimal epitope (SLYNTVATL) (24) and escape epitope (SLFNTIAVL) (25) for $p17^{Gag}$ 77–85 (SL9 epitope) restricted by HLA-A*02. Forty-eight hours after transfection, supernatants containing virus were collected, filtered (Millex HV, 0.45 μm; Millipore), concentrated using the Lenti-X Concentrator kit (Clontech), and frozen at −80°C until use.

$HIV_{NL4\text{-}3\text{-}Vpr\text{-}eGFP}$ was obtained by cotransfecting the plasmids pNL4-3 and pEGFP/Vpr with calcium phosphate (Clontech) in HEK-293T cells, as previously described (26). Supernatants containing virus were collected 48 h after transfection, filtered (Millex HV, 0.45 μm; Millipore), and frozen at −80°C until use.

The $p24^{Gag}$ content of all viral stocks was measured using an ELISA (PerkinElmer). Titers of all viruses were determined using the TZM-bl reporter cell line. Cells were assayed for luciferase activity 48 h postinfection (Bright-Glo Luciferase Assay System; Promega) in a Fluoroskan Ascent FL Luminometer.

DC viral capture and trans*-infection assays*

A total of 2.5×10^5 iDC and mDC matured for 48 h with ITIP (mDC ITIP) or LPS (mDC LPS) from at least seven donors was incubated at 37°C for 6 h with 50 ng $p24^{Gag}$ of $HIV_{NL4\text{-}3}$ or $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ at a final concentration of 1×10^6 cells/ml. During viral pulse, some iDC were matured with ITIP (iDC+ITIP), others were matured with LPS (iDC+LPS), and the rest were immature (iDC). After incubation, cells were extensively washed with PBS to remove uncaptured viral particles and lysed with 0.5% Triton X-100 at a final concentration of 5×10^5 cells/ml. Lysates were cleared of cell debris by centrifugation to measure intracellular $p24^{Gag}$ Ag content using an ELISA (PerkinElmer), as described elsewhere (6). Before lysis, 10^4 HIV-1–pulsed DC were cocultured with the TZM-bl reporter cell line at a ratio of 1:1/well in a 96-well plate at a final volume of 100 μl. Cells were assayed for luciferase activity after 48 h of coculture (Bright-Glo Luciferase Assay System; Promega) using a Fluoroskan Ascent FL Luminometer.

Ag-presentation assays

To evaluate the impact of the time lag between DC maturation and Ag loading on the stimulation of HIV-1–specific T cell clones, Ag presentation assays were designed as follows.

For HLA-I Ag-presentation experiments, monocytes from HLA-A*02$^+$ donors were used to generate DC. iDC and mDC matured for 48 h with

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

ITIP (mDC ITIP) or LPS (mDC LPS) were exposed for 24 h to the viruses (500 ng $p24^{Gag}$/ml per 1×10^6 cells) at 37°C and 5% CO_2 in culture medium with IL-4, GM-CSF, 5 μM azidothymidine (AZT), and 1.2 μM nevirapine (NVP) (AZT and NVP were both from Sigma-Aldrich). During viral incubation, iDC were simultaneously matured with ITIP (iDC+ITIP) or LPS (iDC+LPS) or remained unstimulated (iDC). Cells were then extensively washed with PBS to remove unbound viruses and cocultured for 16–18 h with SL9-2 or EM40-F21 CTL clones. T cell activation was monitored using the IFN-γ ELISPOT assay, as previously described (22). Negative controls consisting of non–HIV-1–exposed DC-$CD8^+$ T cell clone cocultures were included to exclude nonspecific activation of the T cell clone. As a positive control, DC were loaded with 0.1 μg/ml cognate peptide.

For HLA-II Ag-presentation experiments, monocytes from HLA-DRβ*04 or HLA-DRβ*04/HLA-DRβ*01 donors were used to generate DC. iDC and mDC matured for 48 h with ITIP (mDC ITIP) or with LPS (mDC LPS) were exposed for 6 h to the viruses (285 ng $p24^{Gag}$/ml per 1×10^6 cells) at 37°C and 5% CO_2 in culture medium with 5 μM AZT and 1.2 μM NVP. Cells were then washed extensively with PBS to remove unbound viruses and cultured overnight in medium with IL-4, GM-CSF, AZT, and NVP. During viral incubation, iDC were simultaneously matured with ITIP (iDC+ITIP) or LPS (iDC+LPS) or remained unstimulated (iDC). Cells were then washed with PBS and cocultured for 16–18 h with F12 or N2 $CD4^+$ T cell clones. T cell activation was monitored using an IFN-γ ELISPOT assay. Negative controls consisting of non–HIV-1–exposed DC–$CD4^+$ T cell clone cocultures were included to exclude nonspecific activation of the T cell clone. As a positive control, DC were loaded with 0.1 μg/ml cognate peptide.

Although differing in the time lag between maturation and viral loading, as well as in the exposure time to maturation stimuli, all DC conditions were exposed to virus for the same amount of time in the HLA-I or HLA-II Ag-presentation assays.

Viral fusion assay

HIV-1 virions containing the β-lactamase (BlaM)-Vpr chimera were produced, as previously described (27). In brief, HEK-293T cells were cotransfected with 60 μg pNL4-3 or pNL4-3ΔIN proviral DNA, 20 μg pCMV–BlaM-Vpr (Addgene), and 10 μg pAdVAntage vectors (Promega). Supernatants containing virus were collected 48 h later, filtered (Millex HV, 0.45 μm; Millipore), ultracentrifuged at 72,000 × *g* for 90 min at 4°C, and frozen at −80°C until use. The $p24^{Gag}$ content of viral stocks was determined using ELISA (PerkinElmer).

The viral fusion assay was performed, as previously described (27). Briefly, 5×10^5 Jurkat T cells were infected with 400 ng $p24^{Gag}$ of HIV_{NL4-3} or $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ containing BlaM-Vpr for 4 h (spinoculation at 600 × *g* for 90 min at 22°C and incubation for 2.5 h at 37°C 5% CO_2) in the presence or absence of 5 μg/ml C34 fusion inhibitor (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). Cells were then washed in CO_2-independent medium (Life Technologies, Invitrogen) to remove free virions and loaded with 1 mM CCF2-AM dye (Invitrogen) for 1 h at room temperature, as described by the manufacturer. After two washes with development medium (CO_2-independent medium supplemented with 10% FBS), the BlaM cleavage of CCF2 reaction was allowed to proceed in the dark for 16 h at room temperature in 200 μl development medium. Finally, cells were washed in PBS and fixed in a 1.2% paraformaldehyde solution. The degradation of CCF2-AM by BlaM cleavage and its change in emission fluorescence were measured by flow cytometry using a BD LSR II (Becton Dickinson). Data were collected with FACSDiva software (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Confocal microscopy

A total of 2×10^5 iDC and mDC matured for 48 h with ITIP (mDC ITIP) or LPS (mDC LPS) was incubated at 37°C for 5 h with 120 ng $p24^{Gag}$ of $HIV_{NL4-3-Vpr-eGFP}$. Cells were stained with DAPI and, after extensive washing, were fixed with 2% formaldehyde and cytospun onto glass slides. Cells were then mounted with Dako fluorescent media for analysis under a confocal microscope with hybrid detector (Leica TCS SP5 AOBS; Leica Microsystems). To obtain three-dimensional reconstructions, confocal z stacks were collected every 0.13 μm and processed with Imaris software v.7.2.3 (Bitplane), using the maximum fluorescent intensity projection for $HIV_{NL4-3-Vpr-eGFP}$ and surface modeling for DAPI-stained nucleus.

Electron microscopy

For electron microscopy analysis of viral capture by DC, cells were processed as described elsewhere (6). In brief, 3×10^6 mDC LPS were pulsed at 37°C overnight with 1600 ng $p24^{Gag}$ of HIV_{NL4-3} or $HIV_{NL4-3\Delta IN}$. Cells were then extensively washed with PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 h. Finally, cells were processed for analysis of ultrathin sections using a Jeol JEM 1010 electron microscope.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad software Prism v.5.

Results

Maturation of DC with LPS, but not with ITIP, enhances HIV-1 capture and trans*-infection*

We previously showed that mDC LPS capture greater amounts of HIV-1 than do iDC, thus facilitating viral transmission to T lymphocytes (6). Before evaluating the Ag-presentation abilities of iDC and mDC, we studied the viral capture and *trans*-infection capabilities of DC matured for 48 h with LPS or with ITIP, the gold standard for DC maturation in immunotherapy (14, 20). Therefore, we assessed the replication-competent HIV_{NL4-3} and an integrase-deficient HIV-1 isolate, $HIV_{NL4-3\Delta IN}$, which allowed us to exploit viral uptake of DC in the absence of *trans*-infection.

iDC and mDC (i.e., matured with ITIP [mDC ITIP] or LPS [mDC LPS] for 48 h) were incubated with HIV_{NL4-3} or $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ for 6 h (Fig. 1, *left panel*). After extensive washing, we lysed some cells to determine the amounts of DC-associated HIV-1. The remaining washed cells were cocultured with TZM-bl to assay DC-mediated *trans*-infection. As expected, maturation with LPS (mDC LPS) enhanced HIV-1 capture compared with iDC (>5-fold, $p = 0.0039$, Fig. 1, *middle panel*), resulting in higher *trans*-infection of HIV_{NL4-3} to target cells (>7-fold, $p = 0.0156$, Fig. 1, *right panel*). Unexpectedly, maturation with ITIP (mDC ITIP) increased neither uptake nor transmission of HIV_{NL4-3}, and it remained at similar levels to iDC (Fig. 1), although phenotypic markers of maturation and differentiation did not diverge between mDC LPS and mDC ITIP (Fig. 2A). To further address these differences in viral capture, $HIV\text{-}1_{NL4-3\text{-}Vpr\text{-}eGFP}$–pulsed iDC, mDC ITIP, and mDC LPS were monitored by confocal microscopy (Fig. 2B). Confirming our results by $p24^{Gag}$ ELISA (Fig. 1, *middle panel*), mDC LPS captured higher amounts of viral particles, concentrating them in a large sac-like compartment, as previously described (10, 28). In contrast, mDC ITIP showed a random distribution of captured HIV-1, more similar to iDC than to mDC LPS.

Because vaccine adjuvants boost immune responses, mainly because they are DC activators (29, 30), we wondered whether timing of maturation during Ag loading affected viral capture and transmission to HIV-1–susceptible cells. Thus, we compared the viral uptake and *trans*-infection abilities of DC matured with LPS (iDC+LPS) or with ITIP (iDC+ITIP) during viral capture with those DC fully matured before HIV-1 incubation. Surprisingly, both iDC+ITIP and iDC+LPS exhibited a lower capacity to capture and transfer HIV-1, which was similar to iDC (Fig. 1). Therefore, only DC fully matured with LPS (mDC LPS) retained the greatest capacity to capture and transmit HIV-1 to susceptible cells. Taken together, these results show that DC-mediated HIV-1 capture and transmission depend on DC maturation state (6), the activation stimulus used for maturation (8), and the time lag between DC maturation and Ag loading.

Fig. 1 (*middle panel*) shows that $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ was captured by DC as efficiently as was replicative-competent HIV_{NL4-3}. As expected, functional *trans*-infection of $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ was completely abrogated, even for mDC LPS (Fig. 1, *right panel*). Because infection of target cells was not detected, we checked whether the $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ preserved its envelope integrity and functionality, despite lacking the whole integrase-coding region. Using viral fusion assays (27), we confirmed that $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ was as fuso-

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

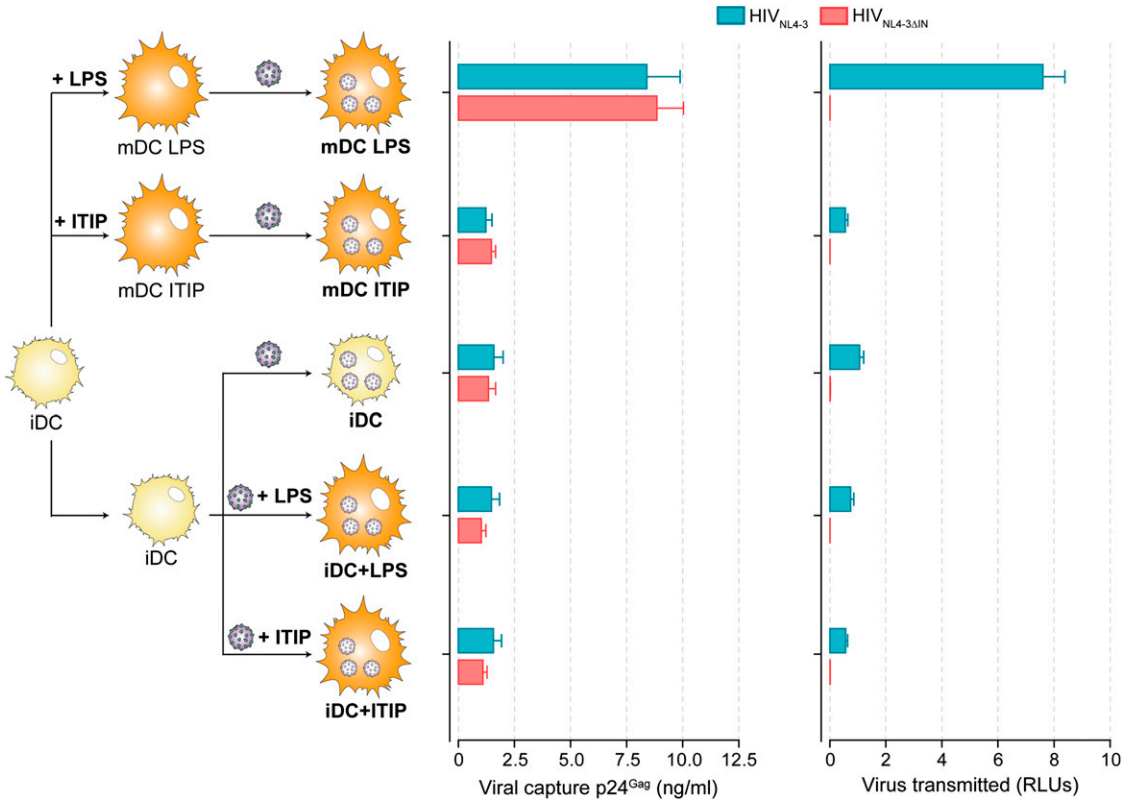


FIGURE 1. Complete maturation of DC with LPS, but not with ITIP, enhances HIV-1 capture and *trans*-infection. *Left panel*, Protocol for HIV-1 capture assay of fully mature DC matured with LPS (mDC LPS) or ITIP (mDC ITIP) for 48 h before viral incubation, iDC, and iDC that were matured with LPS (iDC+LPS) or with ITIP (iDC+ITIP) during viral exposure. *Middle panel*, Comparative capture of HIV$_{NL4-3}$ and HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ under each cell condition described in the *left panel*. The amount of DC-associated HIV-1 was determined using p24^{Gag} ELISA after viral incubation at 37°C for 6 h. Complete maturation of DC with LPS (mDC LPS), but not with ITIP (mDC ITIP), enhanced HIV-1 capture ($p = 0.0390$, Wilcoxon matched-pairs test). HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ was captured with the same efficiency as was the wild-type HIV$_{NL4-3}$ by DC (p = NS, Wilcoxon matched-pairs test). Conversely, maturation of DC with LPS during viral pulse (iDC+LPS) did not enhance HIV-1 capture to levels observed in mDC LPS. *Right panel*, Transmission of HIV$_{NL4-3}$ and HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ captured under each cell condition described in the *left panel* to the TZM-bl reporter cell line. Luciferase activity was assayed after 48 h of coculture. Background values based on non–HIV-1–exposed DC–TZM-bl cocultures were subtracted for each cell condition. In all cell subsets, viral capture correlates with viral *trans*-infection of HIV$_{NL4-3}$ to target cells, with higher ability of mDC LPS ($p = 0.0156$, Wilcoxon matched-pairs test). DC-mediated *trans*-infection of HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ was completely abrogated under all cell conditions ($p = 0.0156$, Wilcoxon matched-pairs test). Data are expressed as mean and SEM and are from three independent experiments including cells from at least seven different donors.

genic as the wild-type HIV$_{NL4-3}$ and equally susceptible to the C34 fusion inhibitor (Supplemental Fig. 1A). Additionally, to evaluate whether HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ followed the same intracellular trafficking as did the wild-type HIV$_{NL4-3}$ in DC, both viral particles were monitored in parallel in mDC LPS using electron microscopy (Supplemental Fig. 1B). The HIV$_{NL4-3}$ and HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ virions had an identical structure, with a characteristic electron-dense core and similar accumulation in intracellular compartments in DC. Altogether, these findings indicated that the lack of integrase in HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ did not alter viral fusogenicity or morphology and that HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ behaved as a wild-type virus, despite not being infectious. Thus, HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ seems to be an attractive vaccine candidate to be explored.

Enhanced viral capture does not correlate with better T cell activation

To elucidate whether viral capture correlates with Ag presentation and T cell activation, we evaluated the abilities of iDC, mDC ITIP, mDC LPS, iDC+ITIP, and iDC+LPS, to present HIV-1–derived Ags to CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells.

To this end, we used various previously generated HIV-1–specific T cell clones (21, 22). To monitor HLA-I HIV-1 Ag presentation, we used two CD8$^+$ T cell clones, SL9-2 and EM40-F21, which are specific for HIV-1 p17^{Gag} (aa 77–85), restricted by HLA-A*02, and derived from two HIV-1–infected patients (22). Because the wild–type HIV$_{NL4-3}$ and its derived HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ did not present the consensus SL9 epitope restricted by HLA-A*02, we engineered HIV$_{NL4-3}$ and HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ to express the optimal SL9 sequence (SLYNTVATL) (24) or the escape variant (SLFNTIAVL) (25) of the SL9 epitope. Two CD4$^+$ T cell clones, F12 and N2, which are specific for HIV-1 p24^{Gag} (aa 271–290) and restricted by HLA-DRβ*04/HLA-DRβ*01 and HLA-DRβ*04, respectively, were used to evaluate HLA-II Ag presentation (21). HLA-matched DC for each HIV-1–specific T cell clone were exposed for 24 h (HLA-I assays) or 6 h (HLA-II assays) to HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3\Delta IN}$ (Fig. 3). T cell activation was monitored using IFN-γ ELISPOT after overnight coculture of HIV-1–pulsed DC with HIV-1–specific T cell clones. Because it is known that, after activation with LPS, DC transiently produces IL-12 subsequently becoming refractory to further stimulation (31), and that DC activation with PGE$_2$ suppresses IL-12 production (32), we included several negative controls consisting of non–HIV-1–exposed DC–T cell clone cocultures or SL9 escape HIV-1 variants in the ELISPOT assays, to exclude the nonspecific activation of the T cell clones and eliminate potential background due to IL-12 secretions. Fig. 3 shows a representative experiment using SL9-2 and F12 clones for HLA-I and HLA-II presentation, respectively. All assays were performed in the presence of NVP and

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

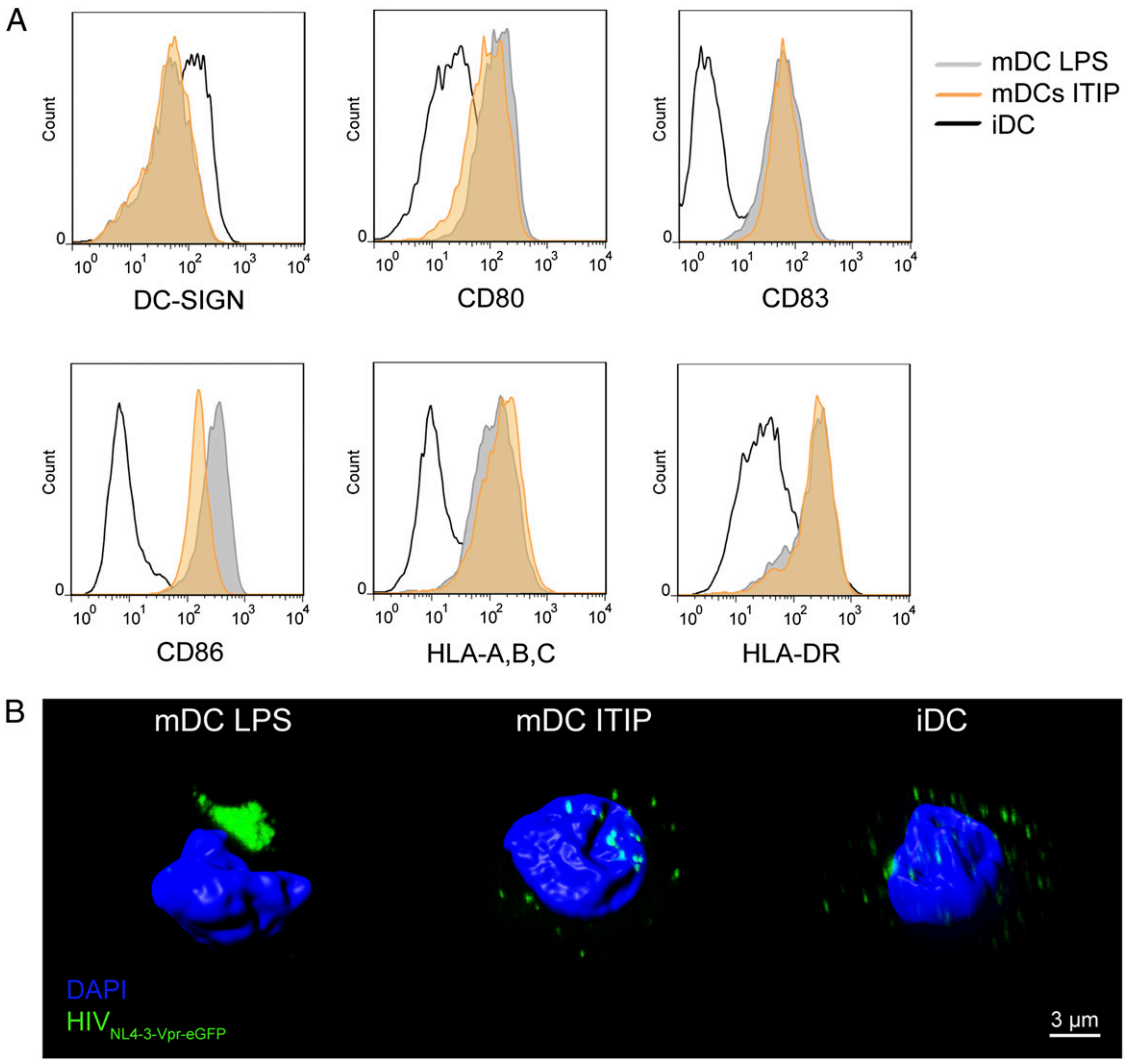


FIGURE 2. mDC LPS and mDC ITIP display similar phenotypic profile but different HIV-1 localization. (**A**) Immunophenotyping of iDC and mDC matured for 48 h with ITIP (mDC ITIP) or with LPS (mDC LPS). Both maturation stimuli conferred a mature phenotype to DC, by upregulating costimulatory molecules (CD80, CD83, CD86) and HLA class-I and class-II molecules (HLA-A, -B, -C, and -DR) at the cell surface. (**B**) Confocal microscopy images of iDC and mDC matured for 48 h with ITIP (mDC ITIP) or with LPS (mDC LPS) and exposed to $HIV_{NL4\text{-}3\text{-}Vpr\text{-}eGFP}$ for 5 h. For three-dimensional reconstructions, confocal z stacks were collected every 0.13 μm and processed with Imaris software, using the maximum fluorescent intensity projection for $HIV_{NL4\text{-}3\text{-}Vpr\text{-}eGFP}$ and the surface modeling for DAPI-stained nucleus. mDC LPS captured higher amounts of viral particles, concentrating them into a large sac-like compartment, whereas mDC ITIP showed a random distribution of captured HIV-1, similar to that observed in iDC. Scale bar, 3 μm.

AZT to prevent viral replication and guarantee that activation of HIV-1–specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell clones was not due to the presentation of de novo viral proteins synthesized in DC.

Remarkably, compared with iDC, mDC LPS loaded with $HIV_{NL4\text{-}3}$ or $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ did not enhance HIV-1–specific $CD8^+$ T cell activation (Fig. 3). This contrasts with the extremely high viral capture and HLA molecule expression observed in mDC LPS (Figs. 1, 4A, 4C). Furthermore, inducing full DC maturation with ITIP (mDC ITIP) had a moderate effect, if any, on HIV-1–specific CTL activation (Fig. 3, *middle panel*). It was reported that HLA-I–restricted exogenous HIV-1 Ag presentation requires fusion of viral and cellular membranes in a CD4/coreceptor–dependent manner and release of $HIV\text{-}1^{Gag}$ capsid into the cytosol of DC for proteasomal processing and HLA-I loading (33, 34). However, maturation of DC is associated with a decrease in HIV-1 fusion (35), which, in turn, has a direct impact on the ability of mDC to support viral replication (16, 35). These observations most likely explain why DC matured with either LPS or ITIP (mDC LPS and mDC ITIP, respectively), exhibiting very high levels of HLA-I and costimulatory molecules, induced very low stimulations of HIV-1–specific $CD8^+$ T cell clones.

Interestingly, compared with mDC ITIP and mDC LPS, iDC induced a 3-fold increase in HIV-1–specific $CD4^+$ T cell clone activation (Fig. 3, *right panel*), in contrast to their reduced expression of HLA-II and costimulatory molecules and their poor capacity to capture HIV-1 virions (Figs. 1, 4B, 4D). These results strongly suggest that HIV-1 capture by mDC LPS does not route HIV-1 virions toward degradation compartments and HLA loading. Our results are reminiscent of the observations that localization of captured virus differs between iDC and mDC (36), because mDC, but not iDC, accumulate whole virions in a nonconventional endocytic compartment rich in tetraspanins with a mildly acidic pH (6, 10, 37). In addition, HLA-II Ag presentation depends on viral degradation in acidified endosomes (34); however, inhibition of endosomal acidification preserves HIV-1 infectivity (38).

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

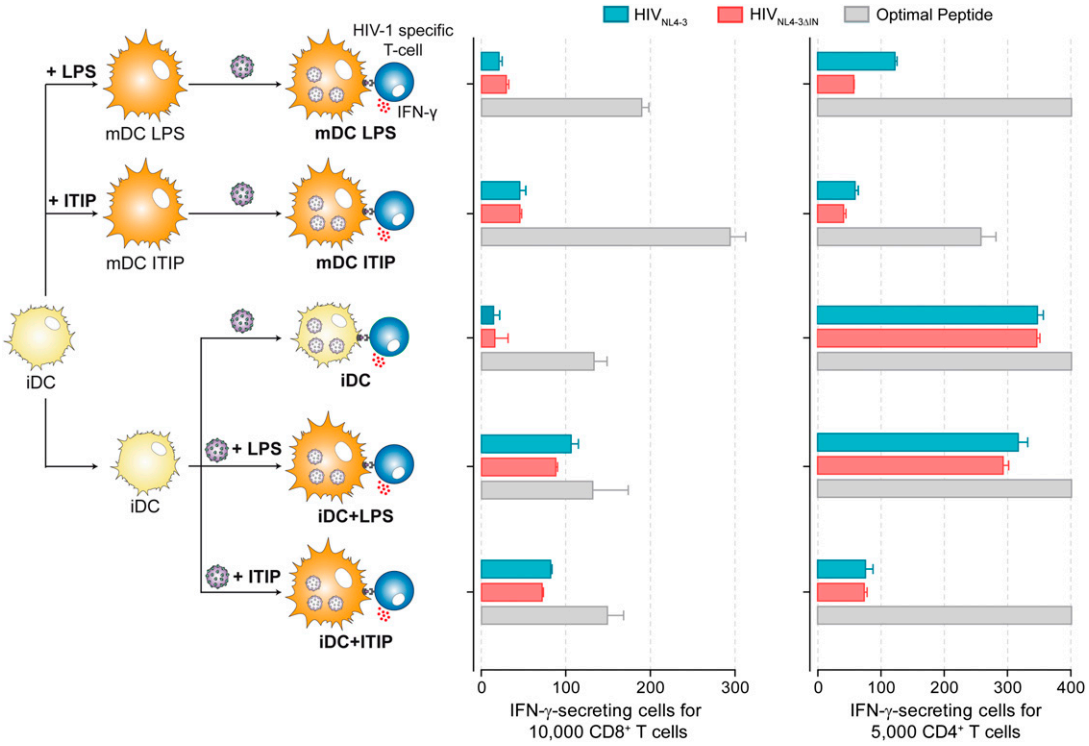


FIGURE 3. Increased viral capture does not correlate with better T cell activation. DC maturation with LPS during viral capture enhanced both HLA-I and HLA-II Ag presentation. *Left panel*, Protocol for HLA-I and HLA-II Ag presentation assays of iDC that were matured with ITIP (iDC+ITIP) or with LPS (iDC+LPS) during viral incubation, as well as fully mature DC that were matured with ITIP (mDC ITIP) or with LPS (mDC LPS) for 48 h before viral incubation. The SL9-2 and EM-40-F21 HIV-1 p17^{Gag} SL9 CD8$^+$ T cell clones (aa 77–85), restricted by HLA-A2, were used for the analysis of exogenous HLA-I Ag presentation, and the F12 and N2 HIV-1 p24^{Gag} CD4$^+$ T cell clones (aa 271–290), restricted by HLA-DRβ*01/HLA-DRβ*04 and HLA-DRβ*04, respectively, were used to evaluate HLA-II Ag presentation. HLA-matched DC for each HIV-1–specific T cell clone were exposed for 24 h (HLA-I assays) or 6 h (HLA-II assays) to HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3ΔIN}$. Ag presentation was quantified using IFN-γ ELISPOT after overnight coculture of HIV-1–pulsed DC with HIV-1–specific T cell clones. All assays were performed in the presence of NVP and AZT to prevent viral replication. *Middle panel*, The high viral capture of mDC LPS (see Fig. 1, *middle panel*) did not result in greater HIV-1–specific CD8$^+$ activation when loaded with HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3ΔIN}$. Nevertheless, maturation with ITIP and LPS during HIV-1 loading (iDC+ITIP and iDC+LPS, respectively) induced greater activation of the SL9-2 HIV-1–specific CD8$^+$ T cells. Both HIV$_{NL4-3}$ and HIV$_{NL4-3ΔIN}$ were equally cross-presented to HIV-1–specific CD8$^+$ T cells. As a positive control, DC were incubated with 0.1 μg/ml of cognate peptide under the same conditions as HIV-1–pulsed cells, with optimal activation. Negative-control values consisting of non–HIV-1–exposed DC-CD8$^+$ T cell clone cocultures were subtracted from each cell condition to specifically show the response to HIV-1–derived Ags. The panel shows one representative experiment of two (using two different HIV-1–specific CD8$^+$ T cell clones, see *Materials and Methods*) that yielded similar results. Experiments were performed in triplicate and at three E:T ratios. Data are expressed as mean and SEM. *Right panel*, iDC presented the HIV-1–derived Ags more efficiently to HIV-1–specific CD4$^+$ T cells than did fully mature DC (either mDC ITIP or mDC LPS). Despite their increased capacity for viral capture, mDC LPS loaded with HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3ΔIN}$ did not enhance F12 HIV-1–specific activation of CD4$^+$ (see Fig. 1, *middle panel*). Nevertheless, LPS maturation of iDC during viral pulse (iDC+LPS) substantially increased activation of HIV-1–specific CD4$^+$ T cells. HIV$_{NL4-3ΔIN}$ induced an HIV-1–specific CD4$^+$ T cell response comparable to that observed for HIV$_{NL4-3}$ under all DC conditions. As a positive control, DC were incubated with 0.1 μg/ml of cognate peptide under the same conditions as HIV-1–pulsed cells, with optimal activation. Negative-control values consisting of non–HIV-1–exposed DC-CD4$^+$ T cell clone cocultures were subtracted from each cell condition to specifically show the response to HIV-1–derived Ags. The panel shows one representative experiment of two (using two different HIV-1–specific CD4$^+$ T cell clones, see *Materials and Methods*) that yielded similar results. Experiments were performed in triplicate and at three E:T ratios. Data are expressed as mean and SEM.

DC maturation with LPS during viral capture enhances both HLA-I and HLA-II Ag presentation

We next examined the effect of maturation of iDC during HIV-1 loading on Ag presentation by HLA-I and HLA-II molecules. iDC were simultaneously matured with ITIP or LPS (iDC+ITIP and iDC+LPS, respectively) and pulsed with HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3ΔIN}$ for 24 h in HLA-I Ag-presentation assays or 6 h in HLA-II experiments. After overnight coculture of HIV-1–pulsed DC with HIV-1–specific T cell clones, Ag presentation was quantified by IFN-γ ELISPOT (Fig. 3). All assays were performed in the presence of NVP and AZT to ensure that Ags did not derive from neosynthesized HIV-1 proteins.

In contrast to fully matured DC (mDC LPS and mDC ITIP), DC stimulated with LPS or ITIP simultaneously with virus loading (iDC+LPS and iDC+ITIP) induced greater activation of HIV-1–specific CD8$^+$ T cells than did iDC (Fig. 3, *middle panel*). Minor differences were observed in HLA-I Ag presentation between DC matured with LPS and ITIP, although iDC+LPS were associated with a 3-fold increase in IFN-γ secretion and iDC+ITIP were associated with a 1.5-fold change compared with their fully matured counterparts. It is worth noting that HIV-1–specific CD8$^+$ T cell activation levels induced by peptide-loaded mDC LPS and mDC ITIP were higher than levels induced by peptide-loaded iDC, iDC+LPS, and iDC+ITIP (Fig. 3, *middle panel*), most likely reflecting higher HLA-I molecule expression (Fig. 4C). In contrast, upon loading of the DC subsets with HIV$_{NL4-3}$ or HIV$_{NL4-3ΔIN}$, neither viral capture nor HLA-I molecule expression correlated with better CD8$^+$ T cell activation (Fig. 4A, 4C). As expected, neither HIV$_{NL4-3}$ nor HIV$_{NL4-3ΔIN}$ expressing the escape variant (SLFNTIAVL) of the SL9 epitope induced responses in the SL9-2 CD8$^+$ T cell clone under any DC condition (Supplemental

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

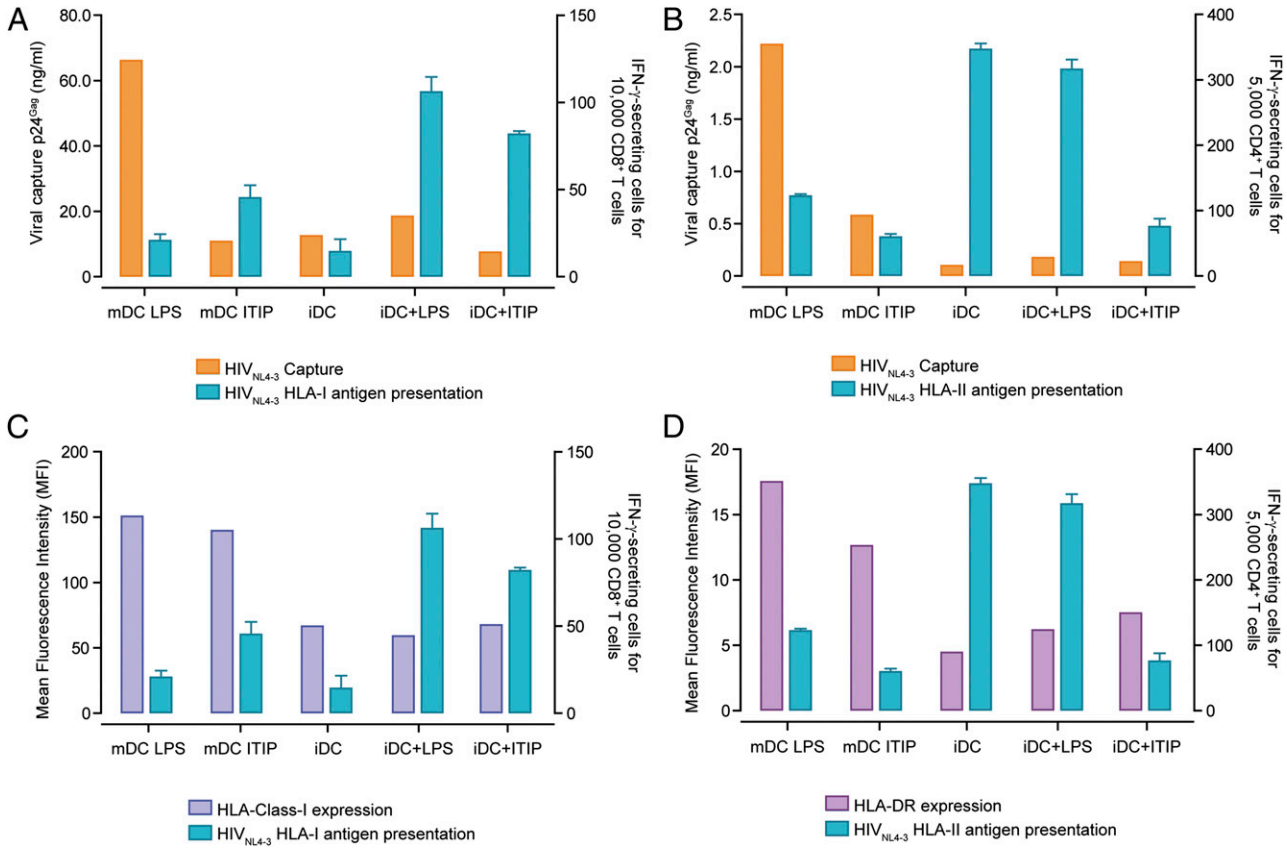


FIGURE 4. Ag presentation does not correlate with viral capture or HLA expression. Comparative analysis of IFN-γ production by the SL9-2 $CD8^+$ T cell clone (**A**) and the F12 $CD4^+$ T cell clone (**B**) in Ag-presentation assays and viral capture, as evaluated by measurement of intracellular $p24^{Gag}$ HIV_{NL4-3} content under each DC condition tested in Fig. 3 before launching the ELISPOT assay. Enhanced viral capture in DC did not correlate with better T cell activation in the HLA-I pathway (A) or in the HLA-II pathway (B). Similar results were obtained for $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ (data not shown). Relationship between IFN-γ production by SL9-2 $CD8^+$ T cell clone and HLA class-I expression (**C**) and by F12 $CD4^+$ T cell clone and HLA-DR expression (**D**). Enhanced expression of HLA molecules in DC did not correlate with better T cell activation in the HLA-I pathway (C) or in the HLA-II pathway (D). Similar results were obtained for $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ (data not shown).

Fig. 2). As stated elsewhere (35), DC maturation restricts viral fusion, which is crucial for cytosolic proteasomal processing of Gag proteins and proper HLA-I Ag presentation (33, 34). Thereafter, although iDC capture fewer virions, HIV-1 is more prone to fuse, potentially enhancing viral uptake and HLA-I Ag presentation of HIV-1–derived peptides.

Compared with mDC LPS and mDC ITIP, LPS maturation of iDC simultaneously with viral pulse (iDC+LPS) increased activation of HIV-1–specific $CD4^+$ T cells, reaching levels similar to those induced by iDC (Fig. 3, *right panel*). Once again, the ability to activate HIV-1–specific $CD4^+$ T cell clones did not correlate with the ability to capture HIV-1 or HLA-II expression levels (Fig. 1, 4B, 4D). In contrast, maturation of iDC with ITIP during Ag uptake (iDC+ITIP), rather than before Ag uptake (mDC ITIP), did not improve HLA-II Ag presentation (Fig. 3). These results show that maturation of DC with ITIP simultaneously with Ag loading (iDC+ITIP) does not guarantee efficient $CD4^+$ T cell activation. The type of activation (ITIP induced or LPS induced) also determines the ability to process and present Ags.

Interestingly, DC loaded with integrase-deficient $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ induced comparable activation of both HIV-1–specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell clones than DC loaded with HIV_{NL4-3}, further demonstrating that no viral replication was needed for HIV-1–derived Ag presentation. $HIV_{NL4-3\Delta IN}$ is a promising immunogen for the development of an HIV-1 vaccine, because it was processed and presented by DC as wild-type HIV-1 without being infectious.

Discussion

DC play a pivotal role in the generation and regulation of immune responses, and they might also facilitate in vivo viral dissemination during HIV-1 infection. The classic DC paradigm proclaims that iDC have abundant endocytic ability and Ag-processing activity but a reduced ability to activate T cells, whereas mDC show low endocytic activity with enhanced Ag presentation and immunostimulatory function (1). In contrast, mDC LPS have a greater ability to uptake and transmit viral particles than do iDC (4, 6, 8). In fact, it was recently shown that *M. tuberculosis* is able to mature DC, promoting similar phenotype of HIV-1 *trans*-infection and viral sequestration to those seen in LPS-stimulated DC, while suppressing class II Ag processing (19). Although both agonists would mature DC primarily by MyD88-dependent TLR-mediated mechanisms, little is known about the fate of captured particles in mDC LPS and whether they represent a source of viral Ags for HLA loading and T cell activation. Therefore, we assessed the ability of mDC LPS to present HIV-1–derived Ags to HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. To apply a more clinically oriented approach, we also analyzed DC matured with the proinflammatory mixture ITIP, the standard stimulus for DC maturation in immunotherapy. Furthermore, we evaluated a noninfectious integrase-deficient HIV-1 isolate, $HIV_{NL4-3\Delta IN}$, to maximize Ag loading of DC while blocking DC-mediated *trans*-infection of HIV-1.

We first confirmed that maturation of DC with LPS (mDC LPS) increased subsequent HIV-1 capture and *trans*-infection compared

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

with iDC. Surprisingly, although mDC LPS and mDC ITIP displayed a similar phenotypic profile (with regard to DC-SIGN, CD80, CD83, and CD86, as well as HLA-A, -B, -C, and -DR), maturation of DC with ITIP did not improve the uptake or transmission of HIV_{NL4-3}. Moreover, both cell types exhibited distinct intracellular localization of viral particles by confocal microscopy. Consistent with our $p24^{Gag}$ ELISA results, mDC LPS displayed a large sac-like compartment in which viral particles were concentrated, whereas mDC ITIP showed a random distribution of HIV-1, similar to that observed in iDC. Several activation signals have been used for DC maturation, including polyinosinic:polycytidylic acid, R848, LPS, IFN-γ, CD40L, and TNF-α; however, although all maturation stimuli confer a mature phenotype, the functional ability of the resulting mDC for polarization, secretion, or migration of Th cell function varies (4, 14). In addition, comparable results to those of iDC were obtained when DC were matured with LPS (iDC+LPS) or ITIP (iDC+ITIP) during viral uptake, suggesting that complete LPS activation can provide DC with an exceptional ability to capture HIV-1 particles. In fact, we recently showed that DC matured with LPS for 48 h (our mDC LPS) exhibit maximal viral capture ability, whereas DC matured for 6 h (our iDC+LPS) show a viral uptake similar to that of iDC (28). Altogether, our results indicate that DC-mediated HIV-1 capture and transmission are not only dependent on the DC maturation state (6), they are also dependent on the activation stimulus used for maturation (8), as well as the time lag between DC maturation and Ag loading.

DC are able to process exogenous Ags and present them through HLA-I and HLA-II for stimulation of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells, respectively. However, we have observed that, despite greater viral uptake and increased HLA molecule expression levels in mDC LPS, this DC condition induced poor stimulation of HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell clones. On the contrary, when DC are matured with LPS during viral capture (iDC+LPS), Ag presentation of HIV-1–derived Ags was efficiently triggered through the HLA-I and HLA-II pathways. Although iDC+LPS trapped five times fewer virions than did mDC LPS, they were more efficient in eliciting HIV-1–specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses. Conversely, DC maturation with ITIP during viral capture (iDC +ITIP) was able to efficiently activate HIV-1–specific $CD8^+$ T cells but not $CD4^+$ T cells. Like other investigators (39), we observed that DC maturation differentially regulated exogenous HLA-I and HLA-II presentation pathways, although in our case, LPS activation of DC during viral uptake facilitated presentation of HIV-1–derived Ags to $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Our experiments showed that HIV-1–derived Ag presentation was not directly associated with viral capture but was mainly affected by DC status and the activation stimulus used for DC maturation.

mDC efficiently trapped more intact viral particles than did iDC, with a completely different localization of internalized HIV-1–derived proteins, indicating different intracellular fates for captured virions (36). Trapped infectious HIV-1 in mDC LPS are concentrated in nonconventional compartments rich in the tetraspanins CD81, CD82, CD9, and CD63 but not in the lysosomal marker LAMP-1 (6, 9, 10, 37). This large vesicle, not present in iDC, is suggestive of a multivesicular body; in addition, its mildly acidic pH preserves HIV-1 infectivity (6, 37). However, HLA-II Ag presentation depends on endosomal/lysosomal maturation and acidification (34), and inhibition of endosomal acidification was reported to increase HIV-1 infectivity (38). Some studies even showed that intracellular HIV-1 degradation occurs faster in iDC than in mDC LPS (6, 37, 40). Therefore, the low ability to activate HIV-1–specific $CD4^+$ T cells observed in mDC is probably the result of the accumulation of virions in a nondegrading neutralized endosome, thus protecting HIV-1 infectivity and hampering proper lysosomal degradation. Consequently, intact virions confined in this slow-degrading vesicle in mDC would be routed to a *trans*-infection pathway rather than to Ag presentation, thus enabling dissemination of HIV-1 infection. In contrast, Ag presentation to $CD4^+$ T cells is initiated upon LPS activation of DC (41, 42) and is dependent on the presence of TLR4 ligands, such as LPS, with the cargo within the individual phagosome (41). Furthermore, maturation of DC with LPS activates the vacuolar proton pump that acidifies the lysosomes and facilitates Ag proteolysis and efficient formation of peptide–HLA-II complexes (43). Our results are consistent with these observations, because DC maturation with LPS, but not with ITIP, during Ag loading notably increases HIV-1–derived Ag presentation to $CD4^+$ T cells.

Envelope integrity and virion functionality are crucial for exogenous presentation of HIV-1 Ags through the HLA-I pathway, because adequate fusion of viral and cellular membranes via CD4 and coreceptor enables cytosolic cleavage of Gag protein by the proteasome (33, 34). Nevertheless, maturation of DC is associated with a decline in HIV-1 fusion (35), which, in turn, has a direct impact on the ability of mDC to support viral replication (16, 35). In addition, other restriction factors, such as SAMHD1 (44) or APOBEC3G (45), in mDC were reported to limit HIV-1 replication upon viral fusion. Consistent with these findings, our results showed that mDC matured with either LPS (mDC LPS) or ITIP (mDC ITIP) had a limited capacity for cross-presenting HIV-1–derived Ags, probably owing to the reduced viral fusion in these cell subsets. Interestingly, although iDC capture smaller amounts of virions, HIV-1 would be more able to fuse in iDC rather than in mDC, facilitating cytosolic degradation of viral Ags. Therefore, these findings support our observations, given that HLA-I Ag presentation of HIV-1–derived peptides was triggered more efficiently when iDC matured during Ag uptake.

Because of the exceptional ability of DC to generate cellular and humoral immune responses, they have been used as tools for immunotherapy of HIV-1 infection (46). An anti–HIV-1 therapeutic vaccine should induce a specific and efficient immune response against the virus while regulating chronic activation of the immune system. $CD4^+$ T cells are required for the development of cytotoxic $CD8^+$ T cells, which lyse infected cells by HLA-I–dependent mechanisms. Thus, Ag presentation by HLA-I or HLA-II molecules is mandatory for the development of a cognate T cell response (47). However, the qualitative response of a DC-based vaccine will be determined primarily by the adjuvants used, because these are DC activators (29, 30). The most widely used DC-maturation stimulus in immunotherapy is the proinflammatory mixture ITIP (14, 20); however, our results show that it only boosts HLA-I Ag presentation when DC mature during viral capture. In contrast, maturation of DC with LPS during Ag loading was the best approach when eliciting both HLA-I and HLA-II Ag-specific responses. LPS is a potent adjuvant in vivo, although it is not used in clinical practice because of its high toxicity. Furthermore, it was reported that levels of circulating LPS increase significantly in chronically HIV-1–infected individuals as a result of microbial translocation, contributing to chronic immune activation (18). However, our results indicate that other TLR-4 ligands are worthy of evaluation. Monophosphoryl lipid A (MPL), a derivative form of lipid A, retains the immunostimulatory activity of LPS but with lower toxicity (48). MPL was recently successful in mice as an adjuvant in immunization with liposomes containing HIV-1 $p24^{Gag}$, because it induced HIV-1 $p24^{Gag}$–specific $CD8^+$ T cells, effector $CD4^+$ T cells, and cytokines with a Th1-type profile (49). Moreover, stimulation of human DC with MPL induces maturation, migration, survival

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

signals, and secretion of cytokines (50, 51). Although MPL-matured DC secrete lower levels of IL-12 than do mDC LPS (51), IL-12 secretion can be rescued by maturing DC with MPL and IFN-γ to induce more potent Th1 polarization, which is essential for the induction and maintenance of the $CD8^+$ T cell response (52). Although further investigation is required, our iDC +LPS approach seems feasible in an immunotherapeutic context when MPL is used as a maturation stimulus.

Several protocols have been used in DC-based immunotherapy to stimulate the presentation of peptide–HLA complexes with high efficiency. Chemical inactivation with AT-2, which preserves the native morphology of viral particles (53), provided encouraging immune results in eliciting HLA-I responses (22, 54, 55), but its use in human clinical trials is not approved by European regulatory authorities. Thus, novel delivery tools for cell therapy vaccination and new methods to enhance the immunogenicity and antiviral efficacy of DC-based vaccines for HIV-1 infection are needed. We evaluated $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$, an integrase-deficient $HIV_{NL4\text{-}3}$ isolate that lacks the whole integrase-coding region. We showed that $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ preserves intact virion morphology and envelope functionality, despite not being infectious. Interestingly, in the context of Ag-presentation assays, $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ behaves as a wild-type virus, because it is efficiently captured and presented by DC in the absence of viral replication. Consequently, $HIV_{NL4\text{-}3\Delta IN}$ could be an attractive immunogen for future vaccine candidates.

In summary, our results clarify the different intracellular trafficking routes of HIV-1 in DC, diverting the processing and presentation pathway from *trans*-infection, depending on DC maturation status and the activation signal used for DC maturation. Moreover, we observed that greater viral capture in DC does not guarantee better Ag presentation or T cell activation. These results provide new insights into DC biology and have implications in the optimization of DC-based immunotherapy against HIV-1 infection.

Acknowledgments

We thank Maria Teresa Fernández-Figueras and Purificación Parrales, Pathology Department, University Hospital Germans Trias i Pujol, and Mònica Roldán from the Universitat Autònoma de Barcelona Microscopy Service.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
2. Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspord, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, et al. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219: 118–142.
3. Banchereau, J., and A. K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 296–306.
4. Wu, L., and V. N. KewalRamani. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 859–868.
5. Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* 72: 2733–2737.
6. Izquierdo-Useros, N., J. Blanco, I. Erkizia, M. T. Fernández-Figueras, F. E. Borràs, M. Naranjo-Gómez, M. Bofill, L. Ruiz, B. Clotet, and J. Martinez-Picado. 2007. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J. Virol.* 81: 7559–7570.
7. McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295–1297.
8. Sanders, R. W., E. C. de Jong, C. E. Baldwin, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and B. Berkhout. 2002. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J. Virol.* 76: 7812–7821.
9. Yu, H. J., M. A. Reuter, and D. McDonald. 2008. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog.* 4: e1000134.
10. Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gómez, J. Archer, S. C. Hatch, I. Erkizia, J. Blanco, F. E. Borràs, M. C. Puertas, J. H. Connor, M. T. Fernández-Figueras, et al. 2009. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113: 2732–2741.
11. Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gómez, I. Erkizia, M. C. Puertas, F. E. Borràs, J. Blanco, and J. Martinez-Picado. 2010. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog.* 6: e1000740.
12. Izquierdo-Useros, N., M. C. Puertas, F. E. Borràs, J. Blanco, and J. Martinez-Picado. 2011. Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg? *Cell. Microbiol.* 13: 10–17.
13. Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene. 2007. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog.* 3: e4.
14. Ahlers, J. D., and I. M. Belyakov. 2009. Strategies for recruiting and targeting dendritic cells for optimizing HIV vaccines. *Trends Mol. Med.* 15: 263–274.
15. Kaliński, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20: 561–567.
16. Dong, C., A. M. Janas, J. H. Wang, W. J. Olson, and L. Wu. 2007. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J. Virol.* 81: 11352–11362.
17. Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olson, and L. Wu. 2007. Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J. Virol.* 81: 8933–8943.
18. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, et al. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12: 1365–1371.
19. Reuter, M. A., N. D. Pecora, C. V. Harding, D. H. Canaday, and D. McDonald. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* promotes HIV trans-infection and suppresses major histocompatibility complex class II antigen processing by dendritic cells. *J. Virol.* 84: 8549–8560.
20. Oshiro, T. M., A. de Almeida, and A. J. da Silva Duarte. 2009. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. *Immunotherapy* 1: 1039–1051.
21. Moris, A., A. Pajot, F. Blanchet, F. Guivel-Benhassine, M. Salcedo, and O. Schwartz. 2006. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* 108: 1643–1651.
22. Moris, A., C. Nobile, F. Buseyne, F. Porrot, J. P. Abastado, and O. Schwartz. 2004. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103: 2648–2654.
23. Buzón, M. J., J. Dalmau, M. C. Puertas, J. Puig, B. Clotet, and J. Martinez-Picado. 2010. The HIV-1 integrase genotype strongly predicts raltegravir susceptibility but not viral fitness of primary virus isolates. *AIDS* 24: 17–25.
24. Llano, A., N. Frahm, and C. Brander. 2009. How to optimally define optimal cytotoxic t-lymphocyte epitopes in HIV infection? In *HIV Molecular Immunology 2009*. B. Korber, C. Brander, B. Haynes, R. Koup, J. Moore, B. Walker, W. Watkins, and K. Yusim, eds. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. p. 1-3-5.
25. Iversen, A. K., G. Stewart-Jones, G. H. Learn, N. Christie, C. Sylvester-Hviid, A. E. Armitage, R. Kaul, T. Beattie, J. K. Lee, Y. Li, et al. 2006. Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. *Nat. Immunol.* 7: 179–189.
26. Zhang, Y. J., T. Hatziioannou, T. Zang, D. Braaten, J. Luban, S. P. Goff, and P. D. Bieniasz. 2002. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J. Virol.* 76: 6332–6343.
27. Cavrois, M., C. De Noronha, and W. C. Greene. 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat. Biotechnol.* 20: 1151–1154.
28. Izquierdo-Useros, N., O. Esteban, M. T. Rodriguez-Plata, I. Erkizia, J. G. Prado, J. Blanco, M. F. García-Parajo, and J. Martinez-Picado. 2011. Dynamic imaging of cell-free and cell-associated viral capture in mature dendritic cells. *Traffic* 12: 1702–1713.
29. Ahlers, J. D., and I. M. Belyakov. 2009. Strategies for optimizing targeting and delivery of mucosal HIV vaccines. *Eur. J. Immunol.* 39: 2657–2669.
30. Palucka, K., J. Banchereau, and I. Mellman. 2010. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 33: 464–478.
31. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1: 311–316.
32. Kaliński, P., P. L. Vieira, J. H. Schuitemaker, E. C. de Jong, and M. L. Kapsenberg. 2001. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 97: 3466–3469.
33. Buseyne, F., S. Le Gall, C. Boccaccio, J. P. Abastado, J. D. Lifson, L. O. Arthur, Y. Rivière, J. M. Heard, and O. Schwartz. 2001. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat. Med.* 7: 344–349.
34. Sabado, R. L., E. Babcock, D. G. Kavanagh, V. Tjomsland, B. D. Walker, J. D. Lifson, N. Bhardwaj, and M. Larsson. 2007. Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1. *Eur. J. Immunol.* 37: 1752–1763.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014

35. Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, D. Fenard, C. Callebaut, and W. C. Greene. 2006. Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature. *J. Virol.* 80: 1992–1999.
36. Frank, I., M. Piatak, Jr., H. Stoessel, N. Romani, D. Bonnyay, J. D. Lifson, and M. Pope. 2002. Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J. Virol.* 76: 2936–2951.
37. Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J. F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J. M. Escola, N. Demaurex, M. Marsh, and V. Piguet. 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* 6: 488–501.
38. Fredericksen, B. L., B. L. Wei, J. Yao, T. Luo, and J. V. Garcia. 2002. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76: 11440–11446.
39. Delamarre, L., H. Holcombe, and I. Mellman. 2003. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* 198: 111–122.
40. Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stössel, N. Romani, M. Piatak, Jr., et al. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103: 2170–2179.
41. Blander, J. M., and R. Medzhitov. 2006. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440: 808–812.
42. Manickasingham, S., and C. Reis e Sousa. 2000. Microbial and T cell-derived stimuli regulate antigen presentation by dendritic cells in vivo. *J. Immunol.* 165: 5027–5034.
43. Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299: 1400–1403.
44. Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Ségéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474: 654–657.
45. Pion, M., A. Granelli-Piperno, B. Mangeat, R. Stalder, R. Correa, R. M. Steinman, and V. Piguet. 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 203: 2887–2893.
46. Connolly, N. C., B. A. Colleton, and C. R. Rinaldo. 2007. Treating HIV-1 infection with dendritic cells. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9: 353–363.
47. Rinaldo, C. R. 2009. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J. Intern. Med.* 265: 138–158.
48. Johnson, A. G., M. Tomai, L. Solem, L. Beck, and E. Ribi. 1987. Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A. *Rev. Infect. Dis.* 9(Suppl. 5): S512–S516.
49. Steers, N. J., K. K. Peachman, S. McClain, C. R. Alving, and M. Rao. 2009. Liposome-encapsulated HIV-1 Gag p24 containing lipid A induces effector CD4+ T-cells, memory CD8+ T-cells, and pro-inflammatory cytokines. *Vaccine* 27: 6939–6949.
50. De Becker, G., V. Moulin, B. Pajak, C. Bruck, M. Francotte, C. Thiriart, J. Urbain, and M. Moser. 2000. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 12: 807–815.
51. Ismaili, J., J. Rennesson, E. Aksoy, J. Vekemans, B. Vincart, Z. Amraoui, F. Van Laethem, M. Goldman, and P. M. Dubois. 2002. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J. Immunol.* 168: 926–932.
52. Ten Brinke, A., M. L. Karsten, M. C. Dieker, J. J. Zwaginga, and S. M. van Ham. 2007. The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFNgamma generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization. *Vaccine* 25: 7145–7152.
53. Rossio, J. L., M. T. Esser, K. Suryanarayana, D. K. Schneider, J. W. Bess, Jr., G. M. Vasquez, T. A. Wiltrout, E. Chertova, M. K. Grimes, Q. Sattentau, et al. 1998. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J. Virol.* 72: 7992–8001.
54. Larsson, M., J. F. Fonteneau, M. Lirvall, P. Haslett, J. D. Lifson, and N. Bhardwaj. 2002. Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *AIDS* 16: 1319–1329.
55. Lu, W., and J. M. Andrieu. 2001. In vitro human immunodeficiency virus eradication by autologous CD8(+) T cells expanded with inactivated-virus-pulsed dendritic cells. *J. Virol.* 75: 8949–8956.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at INSERM DISC DOC on August 20, 2014