

Influence des protéines de l'hôte sur la réponse immunitaire innée face aux adenovirus humains dans les phagocytes humains

Karsten Eichholz

Ces travaux ont été réalisés sous la supervision du Dr Eric Kremer à l'Institut de génétique moléculaire de Montpellier IGMM CNRS UMR 5535.

Mots clés: cellules dendritiques, inflammasome, adénovirus, senseurs innés, facteurs de coagulation

Les adénovirus humains (HAdV) sont à l'origine d'un large spectre de maladies cliniques chez les patients immunodéprimés et immunocompétents. Ce sont également des outils polyvalents pour le transfert de gène ainsi que dans le cadre de vaccination. La préexistence d'une immunité humorale peut être en partie responsable de réponses indésirables à l'encontre de vecteurs AdV comme vu dans plusieurs essais cliniques de vaccins. De plus, différentes protéines hôtes telles que le facteur de coagulation X (FX) ou les immunoglobulines G (IgG) se lient à l'HAdV pouvant alors exacerber une réponse pro-inflammatoire.

De même, l'évaluation des risques précliniques se fait chez la souris bien qu'il y ait de nombreuses différences entre humain et souris concernant l'interaction avec l'HAdV. En effet, la liaison du FX murin à l'HAdV active une réponse pro-inflammatoire chez la souris via le récepteur Toll-Like 4 (TLR4).

Sachant que l'infection d'individus immunodéprimés par AdV est un réel danger avec des concentrations pouvant atteindre 10^9 particules virales par millilitre de sang, on peut croire que le complexe FX-HAdV-TLR4 humain pourrait jouer un rôle crucial lors de l'inflammation systémique. Dans un autre scénario clinique pertinent, le sérum humain contenant des IgG spécifiques d'HAdV-C5 entraîne l'augmentation significative de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β , marqueur de substitution de la formation de l'inflammasome mais par un mécanisme encore inconnu.

Dans ce contexte, mes travaux ont porté sur deux axes de recherche et ont fait l'objet d'une revue. Dans ce résumé, je porterai l'attention sur les deux axes de recherche.

1. Les complexes facteur X humain - adénovirus de type 5 stimulent faiblement une réponse immune innée dans les phagocytes mononucléaires

Karsten Eichholz, Franck Mennechet, Eric J. Kremer

[J Virol.](#) 2015 Mar;89(5):2884-91. doi: 10.1128/JVI.03576-14

J'ai cherché à décrire le rôle potentiel de FX et TLR4 dans la réponse innée à l'HAdV-C5 en utilisant uniquement les acteurs de la réponse d'origine humaine. Puisque l'immunité humorale préexistante remodèle l'immunité innée contre l'HAdV-C5, nous avons réalisé les expériences dans un paradigme de première et seconde infection (Fig. 1A). Nous avons vérifié l'effet d'HAdV-C5 complexé au FX et/ou à des IgG spécifiques d'HAdV et ce à différents niveaux de la voie d'internalisation de TLR4 (Fig 1B). Nous avons trouvé qu'il n'y a aucun axe FX-HAdV-TLR4 détectable chez l'homme et que FX n'affecte en rien la réponse immunitaire innée engendrée par complexe immun (IC) - HAdV-C5 dans les phagocytes humains.

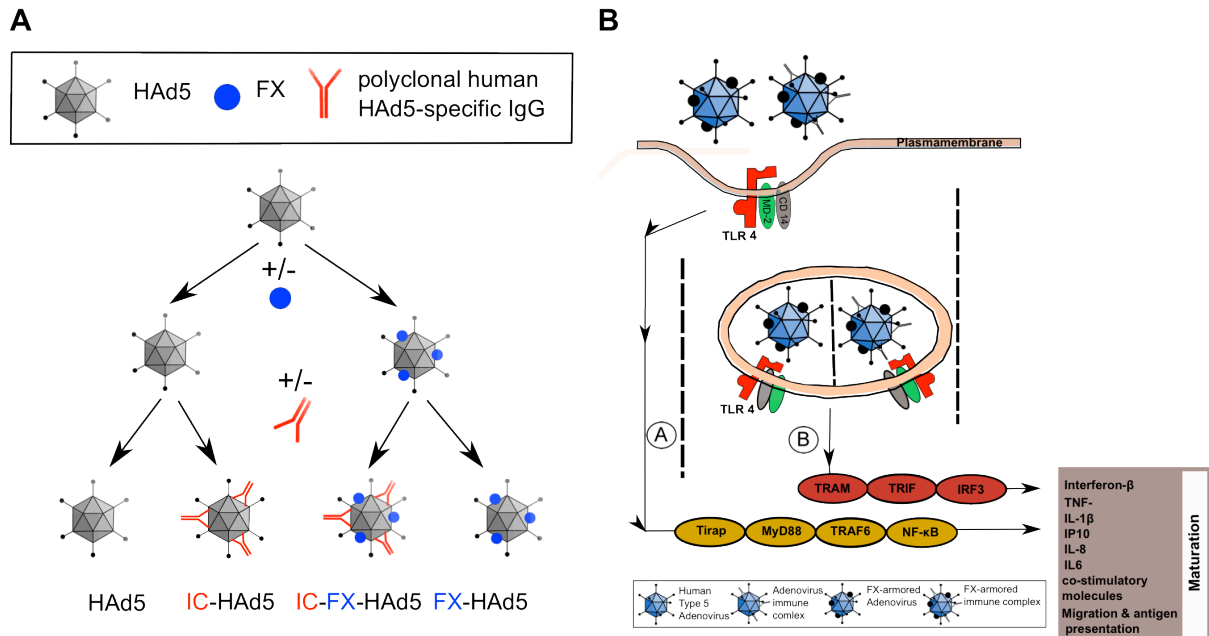


Figure 1: Schéma d'étude afin de comprendre si le facteur de coagulation X (FX) complexé à l'HAHV-C5 induit l'internalisation de TLR4. Quatre stimuli différents ont été générés par incubation séquentielle d'HAHV-C5 avec le FX et/ou des IgG spécifiques d'HAHV-C5 (A). L'induction/interaction de la voie TLR4 par/avec les différents stimuli a été estimée par la fixation du virus sur la surface des cellules, l'internalisation de TLR4, la sécrétion et le niveau d'expression des ARNm de cytokines et interférons pro-inflammatoires dépendant de NF-κB et IRF3 ainsi que par le suivi de l'expression de marqueurs de maturation de cellule dendritique et de molécules co-stimulatrices à la surface des cellules (B).

2. Les adénovirus en complexe immun induisent la mort des cellules dendritiques par pyroptose en activant des senseurs d'ADN vésiculaires et cytoplasmiques.

Karsten Eichholz*, Thierry Bru*, Thi Thu Phuong Tran, Paulo Fernandes, Hughes Welles, Crystal Moyer, Franck Mennechet, Paula Alves, Nicolas Manel, Glen Nemerov, Matthieu Perrreau, Eric J.Kremer

En préparation, *co-premiers auteurs

Ici, nous avons abordé le mécanisme sous-jacent de l'inflammation induite par IC-HAdV-C5 qui mène à une sécrétion accrue d'IL-1β dans les phagocytes primaires humains. Une étape clé dans l'inflammation est l'apparition de l'inflammasome, une plateforme multi-protéique cytosolique. Les senseurs de l'inflammasome, tels que le senseur d'ADN absent dans le mélanome 2 (AIM2), surveillent la présence d'ADN microbien cytosolique et déclenchent l'assemblage de l'inflammasome après fixation à cet ADN. Un autre capteur de l'inflammasome, le récepteur Nod-like NLRP3 est impliqué dans cet assemblage lorsque l'HAHV seul s'échappe des endosomes. A priori, nous pourrions penser que l'opsonisation de l'HAHV-C5 par les IgG devrait empêcher sa fuite dans le cytosol. Nous avons donc étudié l'acheminement de IC-HAdV-C5 après endocytose médiée par le récepteur Fcγ ainsi que les événements cellulaires menant à l'assemblage de l'inflammasome en utilisant des ARNi, par des tests ELISA, de la microscopie, de la cytométrie en flux et grâce à des HAdV mutés incapables de s'échapper des endosomes. (Fig. 2). Nous avons pu montrer que IC-HAdV-C5 induit la formation de l'inflammasome dans des cellules dendritiques dérivées de monocyte et que ceci est fortement lié à la fuite endosomale d'HAHV-C5 grâce à la protéine VI présente sur la

capside, entraînant finalement l'activation d'AIM2 présente dans le cytosol (Fig.2). Les résultats de cette étude auront des répercussions pour les personnes souffrant de maladies liées aux HAdV pour qui des niveaux élevés d'IL-1 β , des anticorps sérotype-spécifiques et des titres élevés de virus peuvent être trouvés dans le sang.

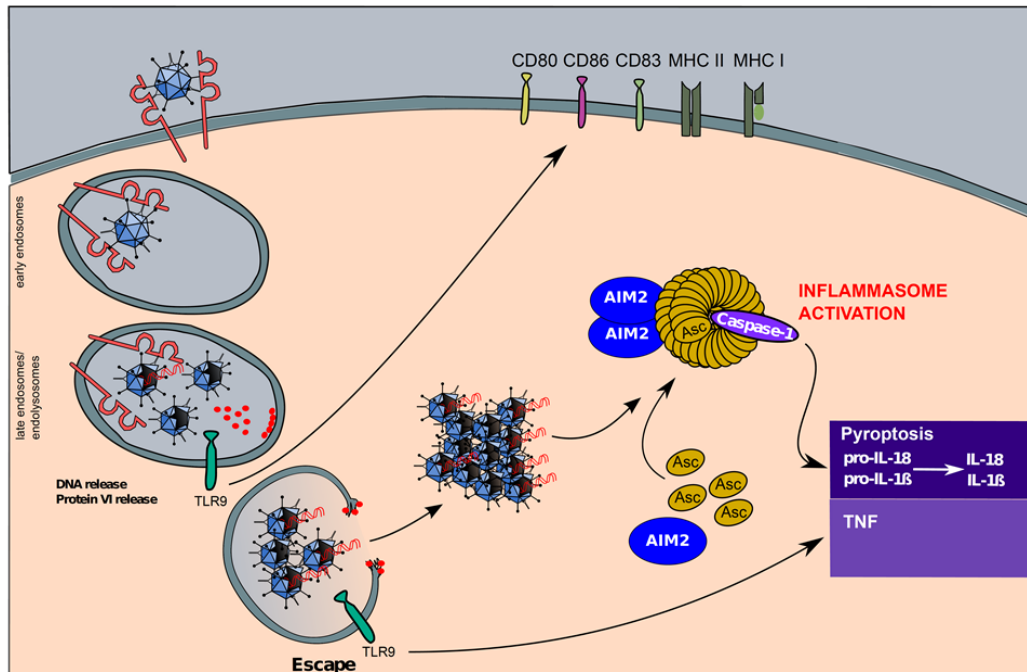


Figure 2: Complexe immun - HAdV-C5 (IC-HAdV-C5) induit l'inflammasome via AIM2 après sortie de l'endosome. Les complexes IC-HAdV-C5 sont internalisés par endocytose après interaction avec le récepteur Fc γ (en haut à gauche) et commencent à se désassembler partiellement au cours de la maturation de l'endosome, entraînant alors la libération du génome viral et de la protéine Vi présente sur la capsid (centre gauche). Alors que le génome viral induit TLR9, la protéine VI peut lyser la membrane endosomale. À leur tour, les IC-HAdV-C5 vont s'agréger formant ainsi des particules intracellulaires de plusieurs micromètres de diamètre et induire la formation de l'inflammasome via AIM2.

Cette étude nous permet à présent de mieux comprendre les différences entre les résultats obtenus lors des tests précliniques chez la souris et ceux obtenus lors d'essais cliniques chez l'humain mais aussi comment l'immunité pré-existante façonne la réponse immunitaire innée à l'HAdV afin d'améliorer les traitements contre les maladies dues aux HAdV ainsi que l'efficacité de ces vecteurs HAdV.