



► Pour la sixième année consécutive, dans le cadre du module d'enseignement « Physiopathologie de la signalisation » proposé par l'université Paris-sud, les étudiants du Master « Biologie Santé » de l'université Paris-Saclay se sont essayés à l'écriture scientifique. Ils ont sélectionné une quinzaine d'articles scientifiques récents dans le domaine de la signalisation cellulaire, présentant des résultats originaux, *via* des approches expérimentales variées, sur des thèmes allant des relations hôte-pathogène aux innovations thérapeutiques, en passant par la signalisation hépatique et le métabolisme. Après un travail préparatoire réalisé avec l'équipe pédagogique, les étudiants, organisés en binômes, ont ensuite rédigé, guidés par des chercheurs, une Nouvelle soulignant les résultats majeurs et l'originalité de l'article étudié. Ils ont beaucoup apprécié cette initiation à l'écriture d'articles scientifiques et, comme vous pourrez le lire, se sont investis dans ce travail avec enthousiasme ! Deux de ces Nouvelles sont publiées dans ce numéro, les autres le seront dans des prochains numéros. ◀

Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (45)

**L'actualité scientifique
vue par les étudiants
du Master Biologie Santé,
module physiopathologie
de la signalisation,
Université Paris-Saclay**

	SCHOOL	MASTER
	BIOLOGIE, MÉDECINE, PHARMACIE	Biologie Santé

Équipe pédagogique

Karim Benihoud (professeur, université Paris-Sud)
Sophie Dupré (maître de conférences, université Paris-Sud)
Boris Julien (maître de conférences, université Paris-Sud)
Philippe Robin (maître de conférences, université de Paris-Sud)
Hervé Le Stunff (professeur, université Paris-Sud)
karim.benihoud@u-psud.fr

Série coordonnée par Sophie Sibénil.

NOUVELLE

Anticorps et senseurs de l'ADN agissent de concert pour stimuler la réponse anti-virale des macrophages

Fanny Darrault^{1*}, Mohamed Ibrahimen^{1*}, Sophie Dupré-Crochet²

¹M1 Biologie Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

²Institut de chimie physique, UMR8000, CNRS, université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

fanny.darrault@universite-paris-saclay.fr,

ibrahmen.mohamed@gmail.com

sophie.dupre@universite-paris-saclay.fr

* Ces auteurs ont participé de façon égale à la rédaction de cet article

► Les macrophages sont des cellules du système immunitaire dont une des fonctions est de détecter les pathogènes et de les éliminer. Certains pathogènes, tels que des virus [1], peuvent néanmoins infecter ces cellules et s'y multiplier, permettant alors leur dissémination dans l'organisme. Afin d'éviter cette dissémination, des mécanismes de capture du virus et de production de médiateurs de

l'inflammation doivent être stimulés. L'un des mécanismes conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à ces pathogènes met en jeu des complexes multi-protéiques : les inflammasomes [2] (→).

L'inflammasome, assemblé *via* le récepteur NLRP3 (*NOD*-, *LRR*- and *pyrin*

domain-containing protein 3), induit la maturation de la pro-caspase 1 en caspase 1 qui est responsable du clivage de pro-cytokines en cytokines pro-inflammatoires matures, telles l'IL(interleukine)-1β et l'IL-18, et de l'induction d'une mort cellulaire [2, 3] (Figure 1). Une activation de l'inflammasome NLRP3 a été mise en évidence lors de l'infection par des adénovirus

(→) Voir la Synthèse de M. Gros Lambert et B.F. Py, *m/s* n° 1, janvier 2018, page 47

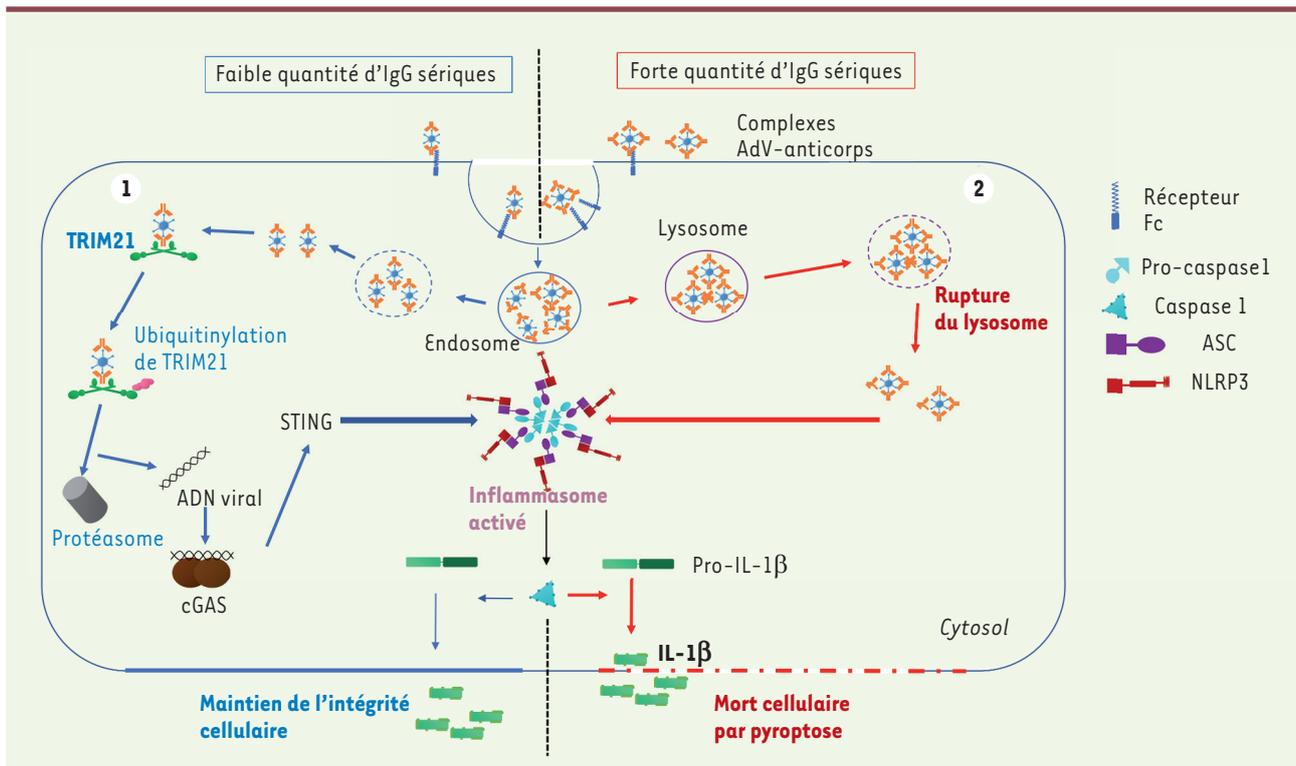


Figure 1. 1. Nouveau mécanisme d'activation de l'inflammasome dans le macrophage humain en réponse à des complexes adénovirus-anticorps. Les adénovirus (Ad), complexés à une quantité faible d'immunoglobulines de sérum humains ou en présence d'un anticorps (Ac) monoclonal, entrent dans les macrophages par endocytose. Ces complexes échappent ensuite de l'endosome. Dans le cytosol, le complexe Ad-Ac est alors reconnu par le récepteur TRIM21. Après ubiquitinylation de TRIM21, le complexe est dégradé par le protéasome, exposant l'ADN viral double brin dans le cytosol. Celui-ci est alors reconnu par cGAS (cGMP-AMP synthase), qui catalyse la formation de cGAMP (*cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*) en présence d'ATP, de GTP et d'ADN. Ce nucléotide cyclique se fixe alors sur STING qui, par un mécanisme non élucidé, active l'inflammasome NLRP3. L'oligomérisation de ce complexe protéique permet l'activation des pro-caspases-1 qui vont alors cliver la pro-IL-1 β en IL-1 β , qui est ensuite sécrétée, sans mort cellulaire concomitante. **2. Mort cellulaire et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dues à une activation de l'inflammasome suite à une infection virale.** Les adénovirus (AdV), complexés à une quantité importante d'immunoglobulines sériques, entrent dans les macrophages par endocytose. Ils se retrouvent alors à l'intérieur d'un endosome puis d'un lysosome. Les Ad vont alors induire la rupture du lysosome, ce qui entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3, permettant son oligomérisation et l'activation des pro-caspases-1. Celles-ci, sous forme de caspase-1, vont cliver la pro-IL-1 β en IL-1 β qui sera libérée du macrophage, suite à sa mort cellulaire par pyroptose.

humains de type 5 (Ad5) [4], un des sérotypes les plus étudiés, et fait l'objet de l'article analysé dans cette Nouvelle [5].

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN double brin linéaire, peu pathogènes chez l'homme. Ces virus sont utilisés sous la forme de vecteurs recombinants dans le cadre de thérapies anti-tumorales et pour la vaccination [6, 7]. La présence d'anticorps (Ac) anti-Ad5 dans le sérum est fréquente dans la population. L'internalisation d'Ad5 opsonisés, c'est-à-dire recouverts d'Ac spécifiques, dans les macrophages

augmente la production par ces cellules de cytokines, notamment d'IL-1 β via l'inflammasome NLRP3 [8]. Dans leur étude [5], Labzin *et al.* ont cherché à comprendre les voies d'activation de l'inflammasome induites par ces virus opsonisés.

Une activation de l'inflammasome sans mort cellulaire concomitante

Afin d'examiner le rôle des Ac dans l'induction de la réponse inflammatoire des macrophages suite à une infection par l'Ad5, les auteurs ont évalué, par ELISA, une méthode immunoenzymatique, la

sécrétion des cytokines IL-1 β et TNF- α (*tumor necrosis factor α*), dans le milieu de culture des cellules infectées. Deux types de cellules ont été utilisés : des monocytes humains différenciés en macrophages¹ (qui seront appelés macrophages humains) et les cellules d'une lignée monocyttaire (les cellules THP-1) différenciées en macrophages sous l'effet d'un agent pharmacologique. Ces deux types cellulaires ont été infec-

¹ Les macrophages humains sont pré-activés avec un agoniste du TLR-3 (*Toll-like receptor 3*) pour induire la synthèse de la pro-IL-1 β .



tés par des Ad5 en l'absence ou en la présence d'Ac. Les Ac utilisés étaient des immunoglobulines G (IgG) provenant d'un pool de sérums humains, ou des Ac monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid hexon de l'Ad5 humain. Dans les deux types cellulaires, la sécrétion des cytokines a nécessité la présence des complexes formés entre les Ac et le virus Ad5. Activées par l'inflammasome, les caspases induisent le clivage de la pro-IL-1 β , mais elles peuvent aussi induire une forme de mort cellulaire appelée pyroptose. Les auteurs ont donc examiné si ces deux processus étaient liés en détectant dans le milieu de culture cellulaire, la production d'IL-1 β , mais aussi la libération d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogénase (LDH), un marqueur de la mort cellulaire. Les complexes formés entre l'Ad5 et les Ac monoclonaux anti-hexon induisent effectivement une sécrétion d'IL-1 β par les macrophages humains. Mais ils n'induisent pas de libération de LDH (signe de la mort cellulaire). Il en est de même lorsque les Ad5 ont été opsonisés avec une faible concentration (0,8 mg/ml) d'IgG humaines.

Les auteurs ont ensuite examiné si l'activation de l'inflammasome dans les macrophages était due à une augmentation de la pénétration des Ad5 dans ces cellules. L'opsonisation des Ad5 par une faible concentration d'IgG ou d'Ac monoclonal anti-hexon, n'augmente pas l'internalisation des particules virales. En revanche, en présence d'une forte concentration d'IgG (supérieure à 0,8 mg/ml), l'opsonisation des Ad5 conduit à une augmentation de l'entrée du virus dans les cellules, déterminé par le nombre de particules virales par cellule. Les auteurs montrent cependant que les anticorps du sérum ou l'anticorps monoclonal anti-hexon inhibent, de façon dose dépendante, l'expression génique des virus, à l'aide d'un gène rapporteur inséré dans le génome viral, suggérant que ce mode d'entrée dans la cellule n'est pas productif pour le virus. Des travaux précédents, utilisant

les cellules THP-1, avaient montré que les Ac favorisaient l'adressage des Ad5 dans les lysosomes [9] et que les Ad5 étaient capables d'induire la rupture des lysosomes. Cela entraînait la libération de cathepsine B, une enzyme qui active l'inflammasome NLRP3 et qui est responsable de la mort cellulaire [9]. Les auteurs ont effectivement constaté, en utilisant des marqueurs fluorescents et la cytométrie en flux, une corrélation entre le nombre de cellules mortes et le nombre de cellules ayant subi d'importants dommages lysosomaux, mais cela uniquement lors de l'infection des macrophages humains avec des Ad5 opsonisés par une forte concentration d'IgG sériques. En revanche, en présence d'une faible concentration d'IgG (0,8 mg/ml) ou d'Ac anti-hexon, les Ad5 pénètrent dans les cellules, induisent l'activation de l'inflammasome, mais ne provoquent ni rupture des lysosomes, ni mort cellulaire.

TRIM21 : la clé de l'activation de l'inflammasome

Afin de comprendre le mécanisme d'activation de l'inflammasome sans qu'il y ait rupture lysosomale, les auteurs ont analysé l'implication des RfC, les récepteurs de la région Fc des immunoglobulines qui sont exprimés à la surface des macrophages, et celle d'un récepteur des immunoglobulines qui est cytoplasmique, TRIM21 (*tripartite motif-containing 21*). TRIM21 est impliqué dans la neutralisation des Ad5 en présence d'Ac. En se fixant sur les Ac, il induit la dégradation des complexes Ad5-Ac par le protéasome et la production de médiateurs de l'inflammation [10]. L'utilisation d'Ac anti-hexon mutés ne pouvant se fixer à TRIM21 (mutation H433A), ou aux RfC (série de mutations dans la région Fc nommée LALA) a permis de montrer que la libération d'IL-1 β et de TNF- α impliquait le récepteur TRIM21 mais pas les RfC. Labzin *et al.* ont également observé que seule l'étape de clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β était induite par ces complexes Ad5-Ac anti-hexon

dans les macrophages humains ; TRIM21 intervient donc lors de cette étape et pas lors de la synthèse de pro-IL-1 β . Les chercheurs ont ensuite voulu valider leurs observations *in vivo*, en analysant le recrutement des neutrophiles dans la rate, recrutement dépendant de la production d'IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome. Après infection de souris par des Ad5 ou par des Ad5 opsonisés par les Ac anti-hexon parentaux ou mutés (H433A), ils ont pu observer que le recrutement des neutrophiles suite à l'infection était plus important en présence des Ac anti-hexon parentaux. Ces résultats indiquent que TRIM21 est un acteur important pour la production d'IL-1 β *in vivo*.

Comment TRIM21 ouvre-t-il la porte à l'activation de l'inflammasome ?

La production d'IL-1 β nécessite le clivage de la forme inactive pro-IL-1 β en IL-1 β mature par la caspase 1 qui est activée par l'inflammasome. Les auteurs ont montré que l'inflammasome impliqué était l'inflammasome NLRP3. Ce dernier est composé du récepteur NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*, aussi appelée PYCARD, CARD5, TMS1, Q9ULZ3) et de la pro-caspase 1. Labzin *et al.* ont cherché à comprendre comment TRIM21 activait NLRP3. Ils ont observé, par *western blot*, qu'en présence d'Ac anti-hexon, que les hexons de la capsid d'Ad5 étaient dégradés. Ce résultat est en accord avec les précédentes publications montrant que TRIM21 recrute le protéasome pour dégrader la capsid virale [10]. L'ADN viral, ainsi exposé, peut alors être reconnu par les senseurs d'ADN cytosoliques de la cellule infectée. L'inflammasome NLRP3 peut être activé par ces senseurs cytosoliques, comme cGAS (cGMP-AMP synthase) associés à la protéine adaptatrice STING [3]. Les auteurs ont effectivement montré que la sécrétion d'IL-1 β en réponse aux complexes Ad5-Ac était réduite dans des cellules THP-1 déficientes

pour le senseur cGAS ou pour la protéine STING. Pour compléter ces observations, les auteurs ont étudié, par immunofluorescence et microscopie confocale, l'oligomérisation d'ASC, induite lors de l'activation de l'inflammasome, et ils ont montré qu'un inhibiteur de STING empêchait l'oligomérisation d'ASC, indiquant que cGAS-STING est bien impliqué dans l'activation de NLRP3.

Inflammasome : lieu de convergence de la défense antivirale des macrophages

Cet article met en évidence l'existence d'une nouvelle voie d'activation de l'inflammasome suite à une présentation d'Ad opsonisés, qui implique TRIM21. En effet, Labzin *et al.* ont montré que des Ad opsonisés par des Ac monoclonaux ou par de faibles concentrations d'Ac sériques humains sont reconnus par TRIM21 dans les macrophages. La liaison de TRIM21 aux complexes Ac-Ad5 entraîne la dégradation de la capsid virale et l'ADN des Ad est alors reconnu

par le senseur cGAS/STING. Ce senseur active, par un mécanisme non encore élucidé, l'inflammasome NLRP3, ce qui entraîne le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β , cette dernière étant ensuite sécrétée (Figure 1). Ce mécanisme permet la neutralisation de l'Ad5, bloquant les mécanismes d'expression de son génome, mais ne conduit pas à la mort des macrophages, comme cela est le cas lorsque les Ad5 sont opsonisés par de fortes concentrations d'IgG (Figure 1). Cet article permet ainsi de mieux comprendre les voies de signalisation activées par les complexes Ad5-Ac et met en évidence le rôle du récepteur intracellulaire des Ac, TRIM21, dans la défense anti-virale. \diamond

Antibodies and DNA sensors act together to stimulate macrophage antiviral response

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Klepper A, Branch AD. Macrophages and the Viral Dissemination Super Highway. *EC Microbiol* 2015 ; 2 : 328-36.
2. Gros Lambert M, Py BF. NLRP3, un inflammasome sous contrôle. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 47-53.
3. Gaidt MM, Hornung V. The NLRP3 Inflammasome Renders Cell Death Pro-inflammatory. *J Mol Biol* 2018 ; 430 : 133-41.
4. Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, *et al.* Innate Immunity to Adenovirus. *Human Gene Therapy* 2014 ; 25 : 265-84.
5. Labzin LI, Bottermann M, Rodriguez-Silvestre P, *et al.* Antibody and DNA sensing pathways converge to activate the inflammasome during primary human macrophage infection. *EMBO J* 2019 ; 38 : e101365.
6. Wold W, Toth K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *CGT* 2014 ; 13 : 421-33.
7. Bressy C, Benihoud K. Association of oncolytic adenoviruses with chemotherapies: An overview and future directions. *Biochem Pharmacol* 2014 ; 90 : 97-106.
8. Zaiss AK, Vilaysane A, Cotter MJ, *et al.* Antiviral Antibodies Target Adenovirus to Phagolysosomes and Amplify the Innate Immune Response. *J Immunol* 2009 ; 182 : 7058-68.
9. Barlan AU, Griffin TM, McGuire KA, Wiethoff CM. Adenovirus Membrane Penetration Activates the NLRP3 Inflammasome. *J Virol* 2011 ; 85 : 146-55.
10. Foss S, Bottermann M, Jonsson A, *et al.* TRIM21-From Intracellular Immunity to Therapy. *Front Immunol* 2019 ; 10 : 2049.