

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

Rôle de l'interferon regulatory factor 5 (IRF-5) dans les lymphocytes T

Par
Aymeric Fabié

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

| | |
|---|---|
| Président du jury et examineur interne | Krista Heinonen INRS-Institut Armand-Frappier |
| Examineur externe | Martin Richer Département de microbiologie, et immunologie Université McGill |
| Examineur externe | Nicolas Chomont Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Faculté de Médecine-Université de Montréal |
| Directeur de recherche | Simona Stäger INRS-Institut Armand-Frappier |

REMERCIEMENTS

Je souhaiterai tout d'abord adresser mes plus sincères remerciements à la Professeure Simona Stäger qui m'a permis d'effectuer mon doctorat au sein de son laboratoire. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour la confiance qu'elle m'a accordée ainsi que pour toutes ses connaissances scientifiques qu'elle a su me transmettre.

Je remercie également tous mes amis et collègues, qui chacun à leur manière, ont contribué à cette aventure et ont su me soutenir en tout temps.

Je tiens à remercier tous les professeurs et le personnel de l'Institut Armand Frappier pour avoir pris de leur temps et avoir montré tant de bienveillance à mon égard.

Je remercie aussi les membres de mon jury de thèse, madame et messieurs les professeurs K. Heinonen, M. Richer et N. Chomont, d'avoir accepté de réviser et de juger l'ensemble de mon travail.

Finalement, je remercie tous les membres de ma famille qui ont fait tout ce qu'il fallait pour s'assurer que mes études se déroulent le mieux possible et de ne pas m'avoir tenu rigueur du peu de fois où je suis retourné les voir.

RÉSUMÉ

Interferon Regulatory Factor 5 (IRF-5) est un facteur de transcription connu pour être impliqué dans la réponse immunitaire antivirale, induisant notamment l'expression de gènes cibles tels que l'interféron de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires dont IL-6, IL-12 et TNF. La cascade d'activation d'IRF-5 est induite principalement par deux voies, soit par l'activation de la voie du TLR7/TLR9, soit directement par l'interféron de type I, qui vont entraîner sa dimérisation puis sa translocation au niveau du noyau. Ces observations ont été faites essentiellement dans les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Mais nous avons récemment mis en lumière dans le laboratoire que les lymphocytes T sont eux aussi capables d'exprimer des ARNm d'IRF-5. Cependant, son rôle dans les lymphocytes T est encore inconnu.

Pour étudier son expression et son rôle nous avons utilisé le modèle d'infection par le parasite *L. donovani*, pour étudier la réponse des lymphocytes T CD4 et le modèle d'infection par le virus de la vaccine pour étudier la réponse des lymphocytes T CD8. Le parasite *L. donovani* va infecter principalement le foie et la rate, menant à une réponse de type Th1. Dans la rate, l'infection va s'établir et devenir chronique alors que dans le foie, l'infection va se résoudre. Nous avons pu observer dans la rate une augmentation de l'expression d'IRF-5 par qPCR et par FACS durant la phase chronique dans les lymphocytes T CD4, ainsi qu'une translocation nucléaire accrue, en particulier dans ceux produisant de l'interféron gamma (IFN γ). Pour comprendre son rôle, nous avons généré des lignées de souris déficientes pour IRF-5 uniquement dans les lymphocytes T à l'aide du système Cre-lox. Une fois infectées, nous avons observé une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN γ durant la phase chronique dans les souris déficientes, ainsi qu'une diminution de la charge parasitaire. Puisqu'IRF-5 peut être activé par la voie du TLR7 ou par l'interféron de type I, nous avons effectué un transfert adoptif de lymphocyte T CD4 déficients soit pour TLR7, soit pour le récepteur à l'interféron de type I, puis nous avons infecté les souris avec *L. donovani* pour déterminer quelle voie est impliquée. Nous avons vu que seul le défaut en TLR7 empêche l'expression d'IRF-5, et induit également une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN γ . Finalement, nous avons

cherché à savoir quels pourraient être les gènes cibles d'IRF-5, et nous avons trouvé que le Death Receptor 5 (DR5) est induit par IRF-5 de façon TLR7 dépendante, sensibilisant les cellules à l'apoptose. Nous avons par ailleurs montré que l'activation de la voie du TLR7 n'est pas due à la détection de particules parasitaires par les lymphocytes T, mais plutôt à la détection de matériel provenant de cellules apoptotiques. Cela nous a amené à penser que ce mécanisme pourrait être un mécanisme général induit par la destruction tissulaire que l'on retrouve durant les maladies chroniques, qui permettrait de protéger les tissus d'une réponse inflammatoire excessive.

Nous avons utilisé le modèle d'infection par le virus de la vaccine pour pouvoir étudier IRF-5 dans les lymphocytes T CD8. À ce jour, nous avons montré que les lymphocytes T CD8 expriment IRF-5 durant une infection par le virus de la vaccine. De manière surprenante, la déficience d'IRF-5 dans les lymphocytes T entraîne un défaut dans le développement de réponse T CD8 ce qui se traduit par un défaut d'expansion et de différenciation en cellules effectrices. Pour étudier plus spécifiquement les effets intrinsèques d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8, nous avons mis en place un système de shRNA fonctionnel, qui nous permet d'en diminuer l'expression. D'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour caractériser plus amplement les effets d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8.

IRF-5 semble avoir des effets opposés lorsque l'on considère son rôle dans les lymphocytes T CD4 ou dans les lymphocytes T CD8. Néanmoins, IRF-5 est un facteur de transcription qui joue un rôle fondamental dans ces deux populations et dans le bon fonctionnement de la réponse immunitaire en général. Il est nécessaire dans les lymphocytes T CD4 afin de limiter les dommages tissulaires induit par l'inflammation chronique en sensibilisant les cellules effectrices à l'apoptose. Tandis que dans les lymphocytes T CD8, il va permettre le développement d'une réponse rapide et efficace face à un pathogène.

Mots-clefs : Lymphocytes T ; IRF-5 ; TLR7 ; DR5 ; mort cellulaire ; Leishmania ; infection chronique ; SLEC ; différenciation ; shRNA ; virus de la vaccine.

ABSTRACT

Interferon Regulatory Factor 5 (IRF-5) is a transcription factor known to be involved in the antiviral immune response, inducing the expression of target genes such as type I interferon and other pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-12, and TNF. IRF-5 is mainly activated of TLR7/TLR9 or directly by type I interferon, which cause its dimerization and translocation to the nucleus. These observations have been made mainly in macrophages, dendritic cells and B cells. Interestingly, our laboratory recently discovered that T cells express IRF-5. However, its role in those cells remained unknown.

In this work, we used the *L. donovani* and vaccinia virus infection models to study the role of IRF-5 in CD4 and CD8 T cell responses, respectively. The *L. donovani* parasite will mainly infect the liver and spleen, leading to a Th1 response. In the spleen, the infection becomes chronic while in the liver, the infection will resolve. During the chronic phase of infection, we observed an increase in IRF-5 in the spleen, as well as increased nuclear translocation in interferon gamma (IFN γ)-producing CD4 T cells. To understand its function, we used the Cre-lox system to generate T cell-specific knockouts of IRF-5 in mice. During the chronic phase of infection, IRF-5 deficient mice exhibited an increase in the frequency of IFN γ -producing CD4 T cells, and a reduced parasite load. To determine the signalling pathway is involved, we carried out an adoptive transfer of CD4 T cells deficient in TLR7 or the type I interferon receptor, then infected with *L. donovani*. We observed that only the TLR7 deficiency prevents the expression of IRF-5, and also induces an increase in the frequency of CD4 T cells producing IFN γ . Finally, we sought to find the target genes for IRF-5 and found that the Death Receptor (DR5) is induced by IRF-5 in a TLR7-dependent manner. Indeed, DR5 sensitizes the cells to apoptosis. We showed that activation of the TLR7 pathway is not due to the detection of parasitic particles by T cells, but rather by the detection of apoptotic cell material. This led us to hypothesize that this phenomenon could be a general mechanism induced by tissue disruption found during chronic diseases, which could thereby protect tissues from an excessive inflammatory response.

We used the vaccinia virus model to study IRF-5 in CD8 T cells. To date, we have shown that CD8 T cells express IRF-5 during vaccinia virus infection. Surprisingly, the deficiency of IRF-5 in T lymphocytes causes a defect in the development of CD8 T response that decreases the expansion and differentiation of effector cells. To specifically study the intrinsic effects of IRF-5 in CD8 T cells, we used shRNA to reduce its expression. Additional experiments are needed to fully characterize the effects of IRF-5 in CD8 T cells.

In sum, IRF-5 appears to have opposite effects in CD4 and in CD8 T cells. Nevertheless, IRF-5 is a transcription factor that plays a fundamental role in these two populations and in the immune response in general. IRF-5 is necessary for CD4 T cells to limit tissue damage induced by chronic inflammation by sensitizing effector cells to apoptosis. In CD8 T cells, IRF-5 allows the development of a fast and effective response against a pathogen.

Keywords: T cell, IRF-5, TLR7, DR5, cell death, *Leishmania*, chronic infection, SLEC, differentiation, shRNA.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| RÉSUMÉ | III |
| ABSTRACT..... | V |
| TABLE DES MATIÈRES | VII |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XIII |
| CHAPITRE 1 : | 1 |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| 1 LA REPONSE IMMUNITAIRE | 2 |
| 1.1 Développement du système immunitaire | 2 |
| 1.1.1 Généralité..... | 2 |
| 1.1.2 Hématopoïèse..... | 2 |
| 1.1.3 Thymopoïèse..... | 3 |
| 1.2 Les cellules du la réponse innée | 4 |
| 1.2.1 Les neutrophiles | 5 |
| 1.2.2 Les monocytes | 5 |
| 1.2.3 Les macrophages..... | 6 |
| 1.2.4 Les cellules dendritiques..... | 7 |
| 1.3 PRR, DAMP et cellules du système inné | 9 |
| 1.3.1 RIG-I Like Receptors..... | 9 |
| 1.3.2 NOD-Like Receptors | 10 |
| 1.3.3 Toll-Like Receptors | 11 |
| 1.3.4 Les motifs moléculaires associés aux dommages..... | 17 |
| 1.3.5 Les PRR et l'inflammation..... | 17 |
| 1.3.6 L'inflammation chronique dans les lymphocytes T | 18 |
| 1.4 Les cellules de la réponse adaptative | 23 |
| 1.4.1 Les lymphocytes B | 23 |
| 1.4.2 Les lymphocytes T CD4..... | 24 |
| 1.4.3 Les lymphocytes T CD8..... | 28 |
| 1.5 Les rôles des PRR sur les cellules du système adaptatif | 35 |
| 1.5.1 RIG-I Like Receptors..... | 35 |
| 1.5.2 NOD-Like Receptors | 36 |
| 1.5.3 Toll-Like Receptors | 36 |
| 2 LA PROTEINE IRF-5..... | 39 |
| 2.1 La famille des IRFs..... | 39 |
| 2.1.1 Généralités | 39 |
| 2.1.2 IRF-5..... | 41 |
| 2.2 Les voies d'activation d'IRF-5 | 42 |
| 2.2.1 Les TLRs | 42 |
| 2.2.2 Les senseurs cytosoliques..... | 43 |
| 2.2.3 L'interféron de type I et les virus | 43 |
| 2.2.4 Les complexes immuns et le matériel apoptotique | 43 |
| 2.3 Régulation et activation d'IRF-5 | 45 |
| 2.3.1 Les régulations négatives..... | 45 |
| 2.3.2 La phosphorylation..... | 47 |
| 2.3.3 L'ubiquitination | 47 |
| 2.3.4 Dimérisation et translocation nucléaire | 48 |
| 2.4 Les fonctions d'IRF-5 | 49 |
| 2.4.1 L'inflammation | 49 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.4.2 | <i>Les maladies auto-immunes</i> | 50 |
| 2.4.3 | <i>Le cycle cellulaire</i> | 51 |
| 2.4.4 | <i>L'apoptose</i> | 52 |
| 3 | LEISHMANIA | 54 |
| 3.1 | <i>La Leishmania</i> | 54 |
| 3.1.1 | <i>Les différents types de leishmaniose</i> | 54 |
| 3.1.2 | <i>Les traitements</i> | 58 |
| 3.2 | <i>Développement des promastigotes chez le vecteur</i> | 59 |
| 3.3 | <i>Infection de l'hôte et maturation en amastigote</i> | 60 |
| 3.4 | <i>La leishmaniose viscérale</i> | 63 |
| 3.4.1 | <i>Le foie</i> | 63 |
| 3.4.2 | <i>La rate</i> | 64 |
| 3.4.3 | <i>La moelle osseuse</i> | 67 |
| 3.4.4 | <i>Le cerveau</i> | 68 |
| 4 | LE VIRUS DE LA VACCINE | 69 |
| 4.1 | <i>Généralités</i> | 69 |
| 4.2 | <i>La réponse immunitaire anti-vaccin</i> | 72 |
| 4.2.1 | <i>Cinétique de la réponse immunitaire</i> | 72 |
| 4.2.2 | <i>L'aide des lymphocytes T CD4 lors de la réponse CD8</i> | 73 |
| 4.2.3 | <i>L'environnement cytokinique</i> | 73 |
| 4.2.4 | <i>La détection du virus de la vaccin</i> | 75 |
| 5 | PROBLEMATIQUE | 76 |
| | CHAPITRE 2 : | 78 |
| | PREMIÈRE PUBLICATION | 78 |
| | CHAPITRE 3 : | 136 |
| | RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES | 136 |
| | CHAPITRE 4 : | 158 |
| | DISCUSSION | 158 |
| | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 170 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1.1 : TLRs et leurs ligands..... | 14 |
| Tableau 1.2 : Les différentes populations de lymphocytes T CD8 mémoires, incluant leurs principaux marqueurs et leurs localisations anatomiques..... | 33 |
| Tableau 1.3 : Effets des PRRs sur les lymphocytes T..... | 38 |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| Figure 1.1 : Voies de signalisation des différents TLRs..... | 16 |
| Figure 1.2 : Polarisation des lymphocytes T CD4. | 25 |
| Figure 1.3 : Différentiation des lymphocytes T CD8..... | 31 |
| Figure 1.4 : Les voies d'activation d'IRF-5..... | 44 |
| Figure 1.5 : Régulation de l'activité d'IRF-5 dans les voies des TLR7/8/9..... | 46 |
| Figure 1.6 : Sites de phosphorylation et d'ubiquitination sur la protéine IRF-5. | 48 |
| Figure 1.7 : Aires de répartition des différentes espèces de <i>Leishmania</i> à travers le monde. | 56 |
| Figure 1.8 : Aires de répartition des espèces responsables de la leishmaniose viscérale à travers le monde. | 57 |
| Figure 1.9 : Développement du parasite <i>Leishmania</i> dans l'intestin du vecteur..... | 60 |
| Figure 1.10 : Cycle de réplication du virus de la vaccine. | 71 |
| Figure 1.11 : Illustration de la cinétique de la réponse CD8 après infection avec un pathogène virulent. | 72 |

CHAPITRE 2 : PREMIERE PUBLICATION

| | |
|---|-----|
| Figure 2.1. IRF-5 is activated in splenic CD4 T cells during chronic visceral leishmaniasis. | 86 |
| Figure 2.2. Cell-specific IRF-5 ablation in T cells results in higher frequencies of IFN- γ -producing CD4 T cells during VL. | 90 |
| Figure 2.3. TLR7 is required to induce IRF-5 in CD4 T cells during VL. | 93 |
| Figure 2.4. TLR7-induced IRF-5 promotes the upregulation of DR5 and induces cell death in CD4 T cells from <i>L. donovani</i> infected mice. | 98 |
| Figure 2.5. IRF-5 does not affect CD4 T cell proliferation during <i>L. donovani</i> infection..... | 101 |
| Figure 2.6. TLR7-mediated IRF-5 activation and CD4 cell death are not a consequence of microbial sensing. | 104 |
| Figure 2.7. Inhibition of TLR7 impairs IRF-5-mediated cell death pathway..... | 108 |

CHAPITRE 3 : RESULTATS PRELIMINAIRES

| | |
|--|-----|
| Figure 3.1 : IRF-5 est exprimé <i>in vitro</i> après stimulation de lymphocytes T CD8 OT-I | 140 |
| Figure 3.2 : IRF-5 est exprimé par les lymphocytes T CD8 <i>in vivo</i> pendant une infection avec le virus de la vaccine | 144 |
| Figure 3.3 : La déficience en IRF-5 dans les lymphocytes T entraine un défaut pendant la phase d'expansion clonale | 145 |
| Figure 3.4 : Les populations SLEC et MPEC sont affectées par la déficience en IRF-5 | 147 |
| Figure 3.5 : Cartes des vecteurs et sites spécifiques de liaison des shRNA | 150 |
| Figure 3.6 : Vérification de l'efficacité de transduction des shRNA spécifiques pour IRF-5 | 151 |
| Figure 3.7 : Les shRNA sont capables de diminuer l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 <i>in vitro</i> | 153 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|--|
| ADN/DNA | Acide désoxyribonucléique |
| AIM-2 | Absent in melanoma 2 |
| AhR | Aryl hydrocarbon receptor |
| ARN/RNA | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| BATF | B cell activating transcription factor |
| BCR | B cell receptor |
| Bcl-6 | B cell lymphoma 6 |
| BID | BH3 interacting-domain death agonist |
| BimEL | Bim extra long |
| BLIMP-1 | B lymphocyte-induced maturation protein-1 |
| BMDC | Bone marrow-derived dendritic cells |
| CARD | Caspase activation and recruitment domains |
| CBP/p300 | CREB-binding protein/p300 |
| CCL | C-C chemokine ligand |
| CCR | C-C chemokine receptor |
| cGAMP | Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate |
| cGAS | Cyclic GMP-AMP synthase |
| CLP | Common lymphoid progenitor |
| CMP | Common myeloid progenitor |
| CPA | Cellules présentatrices d'antigène |
| CpG | Cytosine–phosphate–guanine |
| cTEC | cortical thymic epithelial cells |
| CTL | Cytotoxic T cell |
| CTLA-4 | Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 |
| CRTAM | Cytotoxic and regulatory T cell molecule |
| CXCL | Chemokine CXC motif ligand |
| CXCR | Chemokine CXC motif receptor |
| DAI | DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors |
| DAMPs | Damage-associated molecular patterns |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DC | Dendritic cells |
| DD | Death domain |
| DEPC | Double positive effector cells |

| | |
|--------|--|
| DNA-PK | DNA-dependent protein kinase |
| DNMT3A | ADN méthyltransférase 3A |
| DR5 | Death receptor 5 |
| EEC | Early effector cell |
| EEV | Extracellular enveloped virus |
| Eomes | Eomesodermin |
| ETP | Early thymic progenitor |
| FcγR | Fc gamma receptor |
| FADD | Fas-Associated protein with death domain |
| Fas | Apoptosis stimulating fragment |
| FasL | Apoptosis stimulating fragment ligand |
| Foxp3 | Forkhead box P3 |
| GATA3 | GATA binding protein 3 |
| GITR | Glucocorticoid-induced TNFR-related protein |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| GzmB | Granzyme B |
| HIF-1α | Hypoxia-inducible factor 1 alpha |
| HIV | Human immunodeficiency virus |
| HMGB1 | High-mobility group protein 1 |
| HSC | Hematopoietic stem cells |
| HSV-1 | Herpes simplex virus 1 |
| HTLV-1 | Virus lymphotrope-T humain de type 1 |
| IBD | Inflammatory bowel diseases |
| ID2 | DNA binding 2 |
| ID3 | DNA binding 3 |
| IEV | Intracellular enveloped virion |
| IFI16 | Interferon-γ-inducible protein 16 |
| IFN | Interferon |
| IFNAR1 | Interferon-alpha/beta receptor alpha chain |
| Ig | Immunoglobulin |
| IMQ | Imiquimod |
| IMV | Intracellular mature virion |
| IRAK | Interleukin-1 receptor-associated kinase |
| IKKε | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon |
| IL | Interleukine |
| IRFs | Interferon regulatory factor |
| ISRE | IFN-stimulated response element |

| | |
|----------------|---|
| iTreg | Induced regulatory T cell |
| KAP | Karyopherin protein |
| KLRG-1 | Killer-cell lectin like receptor G1 |
| LAG3 | Lymphocyte-activation protein 3 |
| Lck | Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase |
| LCMV | lymphocytic choriomeningitis virus |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Lyn | Lck/Yes novel tyrosine kinase |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases |
| MDA5 | Melanoma differentiation-associated protein-5 |
| MDSC | Myeloid-derived suppressor cells |
| MIP | Macrophage Inflammatory Proteins |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| Mo-MDSC | Monocytic myeloid-derived suppressor cells |
| MPEC | Memory precursor effector cell |
| MMP9 | Matrix metalloproteinase 9 |
| mTEC | Medullary thymic epithelial cells |
| MyD88 | Myeloid differentiation primary response 88 |
| NDV | Newcastle disease virus |
| NETs | Neutrophil extracellular traps |
| NF- κ B | Nuclear Factor of KappaB |
| NFAT | Nuclear factor of activated T cells |
| NK | Natural killer |
| NLRC | NOD-like receptors CARD-containing |
| NLRP | NOD-like receptors PYD-containing |
| NLRs | NOD-like receptors |
| NOD | Nucleotide oligomerization domain |
| nTreg | Natural regulatory T cell |
| NXF-1 | Nuclear RNA Export Factor 1 |
| ova | Ovalbumin |
| PALS | Periarteriolar lymphoid sheaths |
| PAMPs | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PD-1 | Programmed death-1 |
| PRR | Pattern Recognition Receptor |
| RAG | Recombination-activating genes |
| RIG-I | Retinoic acid-inducible gene-I |

| | |
|-----------------|--|
| ROR- γ t | Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma thymus-specific isoform |
| shRNA | Short hairpin RNA |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SLE | Systemic lupus erythematosus |
| SLEC | Short-Lived effector cell |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| STING | Stimulator of interferon genes |
| T-bet | T-box binding transcription factor |
| TBK1 | TANK-binding kinase 1 |
| TCF1 | T-Cell-Factor 1 |
| T _{CM} | T cell central memory |
| TCR | T-cell receptor |
| T _{EM} | T cell effector memory |
| Tfh | T follicular helper |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| Th | T helper |
| ThPOK | Th inducing POZ-Kruppel factor |
| TIM3 | T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 |
| TLRs | Toll like receptors |
| TNFR | Tumor necrosis factor receptor |
| Tr1 | Type 1 regulatory T cell |
| TRAF | TNF receptor associated factor |
| TRAIL | Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand |
| TRAILR | Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand receptor |
| Treg | Regulatory T cell |
| TRIF | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β |
| TRIM | Tripartite motif family |
| T _{RM} | Tissue-resident memory T cells |
| TNF | Tumor necrosis factor- α |
| VSV | Vesicular stomatitis virus |
| VV | Vaccinia virus |
| WT | Wild type |
| XBP1 | X-box binding protein 1 |

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

1.1 Développement du système immunitaire

1.1.1 Généralité

Le système immunitaire a été nommé à partir du mot latin « immunis » signifiant « exempté » ou « immunisé », qui rappelle sa capacité à protéger l'organisme d'éventuelles menaces externes que sont les pathogènes tels que les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons mais également à empêcher le développement de pathologies comme les cancers. Les premières observations relatives à la protection du corps face à des maladies datent de l'antiquité. Mais ce n'est vraiment qu'à partir de la fin du XVIII^e siècle, lorsque Jenner met en place son procédé de « vaccination », que le monde scientifique va commencer à comprendre le fonctionnement du système immunitaire, d'abord de manière empirique puis par la démonstration scientifique.

1.1.2 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus ayant lieu dans la moelle osseuse consistant à renouveler l'intégralité des cellules sanguines et hématopoïétiques. Les cellules à l'origine de ce processus sont les HSC. Ces cellules ont la particularité de pouvoir s'auto-renouveler par le biais de divisions symétriques mais également de pouvoir se différencier en progéniteurs grâce à une division asymétrique (Ting *et al.*, 2012). Les HSC ont une capacité de multipotence, c'est-à-dire de pouvoir se différencier en plusieurs types cellulaires, ce qui leur permettra de générer l'ensemble des éléments nécessaires pour soutenir l'hématopoïèse (Weissman *et al.*, 2001). Les HSC ont besoin d'un microenvironnement particulier que l'on appelle la niche. Cette niche permet de réguler les différentes fonctions des HSC via la production de facteurs qui consisteront en des interactions directes entre les cellules ou des interactions indirectes par le biais de cytokines. Elle est constituée de cellules stromales, d'ostéoclastes, d'ostéoblastes, de cellules endothéliales des capillaires sanguins environnants ainsi que de mégakaryocytes. Une des principales caractéristiques des HSC est qu'elles sont capables de se différencier pour donner des progéniteurs qui seront à leur tour capables de proliférer de manière importante et d'aboutir à des cellules matures totalement différenciées. Tout au long de cette différenciation, on peut distinguer des progéniteurs tel que les précurseurs communs des cellules myéloïdes (CMP) qui donneront lieu au développement des cellules myéloïdes (cellules dendritiques,

monocytes, macrophages, granulocytes), aux érythrocytes et aux plaquettes (Akashi *et al.*, 2000). Les précurseurs communs des lymphocytes (CLP) permettront le développement des lymphocytes T, des lymphocytes B, et des lymphocytes « natural killer » (Kondo *et al.*, 1997).

1.1.3 Thymopoïèse

Bien que les progéniteurs des lymphocytes T se développent dans la moelle osseuse, la différenciation terminale en cellule mature se déroule dans le thymus (Moore *et al.*, 1967). Les progéniteurs les plus précoces des lymphocytes T sont appelés *Early T cells Progenitor* (ETP) et sont inclus dans la population DN1 (Wu *et al.*, 1991). Ils arrivent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire (Lind *et al.*, 2001). Le développement des lymphocytes T commence donc avec une population hétérogène de précurseurs, caractérisés comme négatifs pour les marqueurs CD4, CD8 et CD25, mais positifs pour le marqueur CD44 (CD4⁻ CD8⁻ CD25⁻ CD44⁺) qui, bien qu'ils soient considérés comme des précurseurs des lymphocytes T, sont encore capables de se différencier en lymphocytes B ou cellules myéloïdes s'ils reçoivent les signaux appropriés (Luc *et al.*, 2012).

Ces progéniteurs migrent ensuite dans la zone corticale et acquièrent un phénotype double négatif (CD4⁻ CD8⁻ CD25⁺ CD44⁺) (Porritt *et al.*, 2003). En même temps que le développement des lymphocytes T se poursuit avec le stade double négatif 3 (CD4⁻ CD8⁻ CD25⁺ CD44⁺), on observe une forte prolifération des progéniteurs et le début du réarrangement génique qui, à terme, permettra l'expression du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Ciofani *et al.*, 2004). Pour la prolifération de ces progéniteurs, un contact étroit avec les cellules stromales thymiques est primordial car ces dernières délivrent de nombreux signaux de survie et de prolifération, dont les interactions entre Notch et les Delta-like récepteurs (Ciofani *et al.*, 2004, Radtke *et al.*, 1999).

Au stade double négatif 3 les progéniteurs deviendront obligatoirement des lymphocytes T. En effet, la recombinaison des gènes V et J qui va se faire grâce aux enzymes RAG1 et 2, va permettre dans un premier temps l'expression de la chaîne β du TCR (Dudley *et al.*, 1994). A ce stade de leur développement les progéniteurs subissent une première sélection, la β -sélection, qui différenciera les futures lymphocytes T possédant les chaînes de TCR α et β ou γ et δ . Pour les progéniteurs sélectionnés va s'en suivre la recombinaison des gènes V, D et J qui permet l'expression de la chaîne α du TCR (Petrie *et al.*, 1995, Wilson *et al.*, 1994). En parallèle, les

précurseurs expriment les co-récepteurs CD4 et CD8 pour atteindre le stade double positif (CD4⁺ CD8⁺) et acquérir toute la machinerie moléculaire nécessaire à la transduction du signal du TCR, avec entre autre la protéine tyrosine kinase Lck. C'est à ce moment, une fois que le TCR et les co-récepteurs sont fonctionnels, que les lymphocytes T subissent une nouvelle sélection, la sélection positive. Ce mécanisme permet de sélectionner les lymphocytes T dont le TCR a de l'affinité pour les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) des cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs).

En fonction de la molécule de MHC reconnue (de type I ou II) par les co-récepteurs, le lignage des lymphocytes s'orienter vers des lymphocytes simples positifs CD4⁺ (MHC II) ou CD8⁺ (MHC I). Les lymphocytes T migrent alors au niveau de la médulla du thymus, grâce à l'expression par ces derniers du récepteur CCR7 et par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) des ligands CCL19 et CCL21 (Misslitz *et al.*, 2004, Ueno *et al.*, 2004), et subissent une deuxième sélection, la sélection négative. Ce mécanisme permet d'éliminer les lymphocytes T interagissant avec des antigènes du soi présentés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), afin d'éviter le développement de lymphocytes T auto-réactifs. En effet, les lymphocytes T qui interagissent avec les mTECs, ou les cellules dendritiques, présentant des antigènes du soi subissent le phénomène de délétion clonale qui entraîne l'apoptose de ces cellules.

1.2 Les cellules de la réponse innée

La composante innée du système immunitaire est considérée comme la seconde ligne de défense de l'organisme face à de potentielles infections, après les barrières physiques que constituent la peau et les muqueuses. Ce système inné est composé de différentes cellules qui agissent en synergie en fonction des signaux reçus. Mais avant de pouvoir échanger ces signaux, la première étape sera la détection d'agents pathogènes grâce à des récepteurs qui bien que ne représentant qu'un répertoire peu varié ont l'avantage de cibler des motifs communs à de nombreux agents pathogènes. Comme nous le verrons, ces senseurs seront nécessaires au développement d'une réponse inflammatoire requise pour lutter contre l'agent pathogène de manière directe, ou indirectement en activant et recrutant des cellules du système immunitaire adaptatif.

1.2.1 Les neutrophiles

Parmi les leucocytes circulants dans le sang périphérique, les neutrophiles représentent la population cellulaire la plus abondante, et sont caractérisés par les marqueurs de surface CD11b⁺ Ly6G^{hi}. Les neutrophiles font partis de la première ligne de défense du corps lors d'une infection et possèdent plusieurs mécanismes ayant pour but l'élimination de l'agent pathogène. On peut citer les granules azurophiles, les granules spécifiques ou les vésicules sécrétoires qui permettent de sécréter dans le milieu extracellulaire des facteurs antimicrobiens ou lytiques, le processus de phagocytose pour dégrader l'agent pathogène ou encore la formation de pièges extracellulaires (NETs). Les NETs sont une particularité des neutrophiles correspond à une expulsion du matériel génétique créant une sorte de filet, servant à capturer les agents pathogènes (Brinkmann *et al.*, 2004). La mise en place de ces mécanismes n'aura lieu que lorsque les neutrophiles auront migré vers le lieu de l'inflammation grâce aux macrophages et aux basophiles qui vont augmenter la perméabilité des capillaires et sécréter des chimiokines, en particulier CXCL2 (Ajuebor *et al.*, 1999, Heit *et al.*, 2008). Bien entendu, ils seront impliqués lors d'infection par *Leishmania*, en particulier durant la leishmaniose cutanée où les neutrophiles vont jouer un rôle important dans l'évolution de maladie, bien que plusieurs études montrent des effets opposés. Dans certains cas on leur attribue un rôle protecteur (Chen *et al.*, 2005) alors que dans d'autres il semblerait qu'ils augmentent la susceptibilité de l'hôte (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000).

1.2.2 Les monocytes

Les monocytes sont des cellules, dont on distingue deux populations en fonction des marqueurs de surface exprimés et en particulier l'expression du marqueur Ly6C, qui est un marqueur exprimé par les monocytes murins, mais ne se trouvant pas sur les monocytes humains. Les monocytes qui expriment faiblement Ly6C (Ly6C^{lo}) sont les monocytes patrouillants, qui peuvent migrer dans les tissus et se différencier en cellules résidentes, participant par la suite à l'induction de la réponse immunitaire (Gundra *et al.*, 2017), alors que leur rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire est encore très controversé (Guilliams *et al.*, 2017). Mais les monocytes patrouillants jouent aussi un rôle dans le compartiment sanguin puisqu'ils sont capables de phagocyter sélectivement les cellules endothéliales mortes (Carlin *et al.*, 2013) mais aussi de lutter contre le développement de métastases (Hanna *et al.*, 2015). Les monocytes exprimant une grande quantité de Ly6C (Ly6C^{hi}) sont des monocytes

inflammatoires capables de migrer vers le lieu de l'inflammation et participer au développement et au maintien de ce milieu inflammatoire dans différentes pathologies comme lors d'infections bactériennes (Jia *et al.*, 2008), virales (Barbalat *et al.*, 2009) ou parasitaires (Leon *et al.*, 2007). Cette différence de migration va s'expliquer en outre par l'expression différentielle des récepteurs aux chimiokines CX3CR1 et CCR2. Les monocytes Ly6C^{lo} expriment principalement le récepteur CX3CR1 alors que les monocytes Ly6C^{hi} expriment plus le récepteur CCR2 (Geissmann *et al.*, 2003). Les monocytes ont la capacité de se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques, mais en fonction des cytokines présentes cette différenciation s'oriente vers des phénotypes différents. Par exemple la présence de TNF ou d'interleukine 12 mène à une polarisation en macrophages de type M1 ou en cellules dendritiques inflammatoires (Italiani *et al.*, 2014). Lors de différentes infections, leur présence soutient l'inflammation et favorise le développement d'une réponse de type Th1, comme dans le cas de la leishmaniose cutanée où les monocytes sont recrutés et se différencient en cellules dendritiques (Leon *et al.*, 2007). Cependant, en présence de cytokines associées à la réponse Th2 comme l'interleukine 4, l'interleukine 10 ou l'interleukine 13 les monocytes se différencient en macrophages de type M2, c'est à dire des macrophages anti-inflammatoires qui favorisent la réponse de type Th2 ainsi que la cicatrisation tissulaire (Nahrendorf *et al.*, 2007, Stein *et al.*, 1992). Mais il a été reporté que dans le cas de certains cancers ou de leishmanioses, les monocytes peuvent acquérir un phénotype de cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (Mo-MDSC). Dans le cas d'un modèle murin de mélanome, les Mo-MDSC sont induits par le GM-CSF et limitent l'entrée de lymphocytes T CD8 activés au niveau de la tumeur (Lesokhin *et al.*, 2012) ou encore la production d'interféron gamma par les lymphocytes T CD4 dans un carcinome ovarien (Cui *et al.*, 2013). Dans le cas de la leishmaniose viscérale, l'expression du facteur inductible à l'hypoxie 1 alpha (HIF-1 α) augmente les capacités immunosuppressives des Mo-MDSC. Cette population de Mo-MDSC est responsable de l'inhibition de la réponse de type Th1, bien que dans ce cas précis le mécanisme d'inhibition reste à déterminer (Hammami *et al.*, 2017).

1.2.3 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules que l'on retrouve dans tous les organes et tissus, y compris dans les tissus immunologiquement privilégiés comme le cerveau, les yeux ou les testicules. Ils sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques que ce soit dans le remodelage de la matrice extracellulaire, dans l'élimination de cellules apoptotiques ou dans la

présentation antigénique (Aderem *et al.*, 1999, Bosurgi *et al.*, 2017, Miyazaki *et al.*, 1993). Pour pouvoir accomplir une telle variété de tâches, les macrophages sont très plastiques. En fonction des signaux extérieurs les macrophages se polarisent en macrophages de type M1 ou de type M2. La polarisation en M1 est induite par les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th1, soit l'interféron gamma et le TNF mais aussi par l'activation de TLR ou même directement par certains pathogènes. Une fois polarisé en M1, les macrophages produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF, l'interleukine 1 β , l'interleukine 6 ou l'interleukine 12. Dans le même temps, ils acquièrent des fonctions antibactériennes, antiparasitaires et anticancéreuses principalement au travers de l'expression de radicaux libres oxygénés et de la production d'oxyde nitrique. Les macrophages M1 participent au développement et au maintien de l'inflammation. A contrario, la polarisation des macrophages en M2 est dû aux cytokines sécrétées par les lymphocytes Th2 dont l'interleukine 4 et l'interleukine 13 (Doyle *et al.*, 1994, Stein *et al.*, 1992). Une fois polarisés en M2, ils ont une activité phagocytaire augmentée, expriment plus d'arginase et sécrètent de l'interleukine 10 (Iniesta *et al.*, 2002, Qi *et al.*, 2016). Leurs fonctions sont plus tournées vers la réparation tissulaire ou, par exemple, le soutien de la réponse Th2 pour combattre les infections parasitaires extracellulaires (Bosurgi *et al.*, 2017, Herbert *et al.*, 2004).

1.2.4 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont les CPA par excellence et permettent de faire le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative du système immunitaire. Bien qu'elles se retrouvent en faible quantité, elles se distribuent à travers tous les organes. Il existe de nombreuses populations de cellules dendritiques qui sont caractérisées par leurs marqueurs de surface, par leurs effets physiologiques et par leurs facteurs de transcription menant à leur développement. Ainsi on peut retrouver deux grandes populations que sont les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les deux marqueurs communs à toutes les DC sont les marqueurs CD11c⁺ et MHC-II⁺, mais il faut considérer l'ajout d'autres marqueurs tels que CD4⁺, CD8⁺ et CD11b⁺ pour différencier les trois sous-populations de DC au niveau des tissus lymphoïdes, CD103⁺ pour les DC qui sont localisées dans les tissus non lymphoïdes qui peuvent elles aussi être CD11b⁺ ou CD11b⁻, CD209⁺ et LyC6⁺ pour les pDC. Les DC sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques. En effet, ce sont par exemple les principaux acteurs dans la médiation de la

tolérance périphérique et centrale, des senseurs de pathogènes ou de dommages tissulaires extrêmement efficaces et les CPA les plus efficaces pour activer les lymphocytes T CD4 et CD8. Dans le thymus les DC contribuent à la tolérance centrale en jouant un rôle dans la sélection négative des lymphocytes ainsi que dans le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg), notamment via les interactions entre les co-récepteurs CD80/86 et CD28 (Hinterberger *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2009). Dans les autres organes les DC se trouvent souvent à des endroits stratégiques pour faciliter la détection de l'agent pathogène ou de dommages tissulaires. Les DC se localisent dans la peau, autour des sinus sub-scapulaires dans les ganglions ou dans la zone marginale dans la rate. La détection des agents pathogènes se fait via les PRRs comme les TLRs qui peuvent par exemple reconnaître le virus de l'herpes de type I (Davey *et al.*, 2010) ou les protéines ressemblant à la profiline chez *T. gondii* (Yarovinsky *et al.*, 2005). La rencontre avec un pathogène sur le site d'infection entraîne l'activation des DC, qui migrent vers les ganglions drainants et activent les lymphocytes T (Brewig *et al.*, 2009).

1.3 PRR, DAMP et cellules du système inné

Au cours de l'évolution, la majorité des organismes ont développés des senseurs capables de différencier le « soi » du « non-soi ». L'efficacité de ces senseurs se reflète à travers leur large distribution dans le monde du vivant. Collectivement ces récepteurs sont capables de reconnaître toute forme de danger et sont appelés les « récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires » (PRR). Ils sont retrouvés dans différents compartiments cellulaires, que ce soit au niveau de la membrane cellulaire, des vacuoles endosomales ou du cytoplasme. Ces PRR sont répartis en trois familles qui sont représentées par les « retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors » (RLRs) et les « nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors » (NLRs) qui sont retrouvés dans le cytosol des cellules, ainsi que les « Toll-like receptors » (TLRs) qui eux se localisent au niveau des membranes, à la surface cellulaire ou dans les endosomes. Chaque famille de récepteurs est composée de plusieurs membres qui sont capables de reconnaître des motifs bien particulier, regroupés sous le terme de « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMPs) et de « motifs moléculaires associés au danger » (DAMPs). Et bien que leur bon fonctionnement soit essentiel à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace, il peut arriver que la reconnaissance de molécules non désirées ou le dysfonctionnement de leur voie de signalisation soit à la base de maladies.

Ces récepteurs ont été d'abord étudiés dans les cellules appartenant au système immunitaire inné, principalement dans les macrophages et les cellules dendritiques. Suite à la détection des signaux adéquats, ces senseurs sont à la base de la réponse inflammatoire puisqu'ils l'induisent à travers leurs voies de signalisation. Cela mène à la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que ceux de l'interféron de type I, du TNF, ou des interleukines 1, 6 et 12. Cette première réponse induite par les cellules du système immunitaire inné est nécessaire pour lutter rapidement contre l'agent pathogène détecté et pour activer la réponse immunitaire adaptative.

1.3.1 RIG-I Like Receptors

La famille des RLRs comprend des senseurs cytosoliques pour détecter aussi bien l'ARN que l'ADN. Pour les senseurs d'ARN on retrouve RIG-I et « melanoma differentiation associated gene-5 » (MDA5). Bien que reconnaissant tous deux de l'ARN viral, RIG-I et MDA5 ne détectent pas les mêmes virus. RIG-I a été montré comme étant important dans la réponse

immunitaire contre les paramyxovirus, le virus de la grippe et le virus de l'encéphalite japonaise à l'aide de leur domaine hélicase, tant dis que MDA5 est impliqué dans la détection des picornavirus (Kato *et al.*, 2006). Les deux senseurs sont capables de détecter des portions d'ARN double brins (Kato *et al.*, 2006, Yoneyama *et al.*, 2004) alors que seul RIG-I est capable de lier des extrémités ARN 5' triphosphates (Hornung *et al.*, 2009, Pichlmair *et al.*, 2006). Tous deux sont composés d'un « domaine de recrutement de caspases » (CARD) qui leur permet d'induire une cascade d'activation à partir de la protéine « interferon- β promoter stimulator 1 » (IPS-1) (Kawai *et al.*, 2005). Ensuite, TRAF3 est recrutée et activée par IPS-1 (Oganesyan *et al.*, 2006) et finalement active les différentes voies qui lui sont associés, à savoir celles de l'IRF-3, de l'IRF-7 et de NF- κ B (Sharma *et al.*, 2003). De rares études ont mis en avant l'activation d'IRF-5 par RIG-I lors d'une infection virale par le NDV, bien que cette activation ne soit pas aussi importante que celle connue pour IRF-3 (Paun *et al.*, 2008).

Parmi les senseurs à ADN double brins on peut citer le « DNA-dependent activator of IFN regulatory factors » (DAI), le « stimulator of interferon genes » (STING) et la protéine « absent in melanoma 2 » (AIM-2). DAI et STING sont connus pour activer la kinase TBK1 qui active ensuite le facteur de transcription IRF-3 (Takaoka *et al.*, 2007, Tanaka *et al.*, 2012) afin de permettre la transcription de gènes cibles, en particulier l'interféron de type I. AIM-2 quant à lui agit différemment en induisant la création d'un nouvel inflammasome et de ce fait, favorise la maturation de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 1b et 18 (Hornung *et al.*, 2009).

1.3.2 NOD-Like Receptors

La famille des NLRs est celle qui comprend le plus de membres puisque l'on recense quelques 34 membres chez la souris, qui sont retrouvés dans le compartiment cytoplasmique de la cellule. Cette abondance a amené les scientifiques à les diviser en sous-familles basées sur les caractéristiques de leur domaine N-terminal. Mais celle qui nous intéressera le plus ici sera la sous-famille des NLRCs avec notamment NOD1 et NOD2, qui contiennent respectivement un et deux domaines CARD en N-terminal. NOD1 est capable de reconnaître un motif présent sur la majorité des bactéries à gram-négatif qui est l'acide γ -d-glutamyl-meso-diaminopimelique (iE-DAP) (Girardin *et al.*, 2003). Quant à NOD2, il est capable de reconnaître le muramyldipeptide (MDP) présent dans un grand nombre de bactéries qu'elles soient gram-positive ou gram-négative (Girardin *et al.*, 2003). L'activation de NOD1 ou NOD2 va amener à l'activation de la kinase « Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 » (RIPK2) de

par son domaine d'activation CARD. Cette kinase aboutie à l'activation des voies NF- κ B et MAPK (Inohara *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2007). Mais la voie de signalisation de NOD2 peut également mener à l'activation d'IRF-5 et ainsi à la production d'interféron bêta lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2009).

1.3.3 Toll-Like Receptors

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui sont présents soit au niveau de la membrane cellulaire, soit à l'intérieur de la cellule dans les endosomes. La famille des TLRs comprend 13 membres. Alors que le TLR10 et les TLR11 à 13 ne sont exprimés, respectivement, que par les humains et les souris, les TLR 1 à 9 sont présents chez les deux espèces. Les TLRs sont en fait des dimères de récepteurs, qui contiennent notamment un domaine « riche en leucine répété » (LRR), un domaine transmembranaire et, au niveau intracellulaire, un domaine « récepteur Toll/Interleukine 1 » (TIR). C'est le domaine LRR, qui a cette forme particulière ressemblant à un fer à cheval, qui permet les interactions avec leurs ligands spécifiques (Kobe *et al.*, 2001). Chacun des TLRs reconnaissent des ligands spécifiques, qui permettent de conférer une protection contre la majorité des agents pathogènes rencontrés, bactéries, virus, parasites ou champignons (**Tableau 1.1**). Le TLR4 permet de détecter principalement le LPS présent à la surface des bactéries à Gram négatif. C'est un facteur fortement inflammatoire qui est impliqué dans les septicémies (Spiller *et al.*, 2008). Mais de nombreuses études montrent que le TLR4 est capable de reconnaître plusieurs autres motifs d'agents pathogènes comme des protéines d'enveloppe de virus (Rassa *et al.*, 2002), l'acide teichuronique des bactéries à Gram positive (Yang *et al.*, 2001) mais aussi des protéines endogènes telles que HSP70 (Vabulas *et al.*, 2002) ou le fibrinogène (Smiley *et al.*, 2001). Le TLR9 a été originellement découvert pour détecter l'ADN bactérien et en particulier les motifs CpG non méthylés qui lui permettraient de distinguer l'ADN bactérien ou viral de l'ADN des mammifères. Ainsi le TLR9 peut détecter des virus comme celui du virus de la vaccine (Samuelsson *et al.*, 2008) mais aussi des parasites comme *L. major* (Abou Fakher *et al.*, 2009). Le TLR9 est également capable de reconnaître des séquences oligonucléotidiques CpG de synthèse, qui sont largement utilisées pour induire une stimulation spécifique du TLR9. Cependant, il a été démontré que ce serait plutôt la structure 2' desoxyribose phosphate de l'ADN qui serait reconnu plutôt que le motif CpG spécifiquement (Haas *et al.*, 2008). Cela est soutenu par le fait que la translocation endosomale d'ADN de vertébré est tout autant capable

d'induire l'activation des cellules dendritiques via la voie du TLR9 (Yasuda *et al.*, 2005) et que le TLR9 est impliqué dans le développement de maladies auto-immunes comme le lupus (Means *et al.*, 2005), suggérant que sa localisation endosomale soit le principal mécanisme pour éviter son activation par de l'ADN du soi. Enfin, le TLR7 est connu pour reconnaître de l'ARN simple brin, mais également des composés synthétiques dérivés de l'imidazoquinoléine comme l'imiquimod. Ce dernier est utilisé pour stimuler spécifiquement la voie du TLR7. Une large gamme d'agents pathogènes sont reconnus à travers le TLR7, tels que des virus comme le VIH (Lepelley *et al.*, 2011), les bactéries comme les streptocoques du groupe B (Mancuso *et al.*, 2009) ou des protozoaires comme *L. donovani* (Paun *et al.*, 2011). De la même manière que pour le TLR9, le TLR7 est capable de reconnaître de l'ARN du soi et est aussi impliqué dans le développement de maladies auto-immunes comme le SLE (Barrat *et al.*, 2005), ou l'arthrite rhumatoïde (Roelofs *et al.*, 2005).

Lorsque le ligand s'est lié au TLR, le domaine intracellulaire TIR permet la transduction du signal à travers le recrutement de protéines adaptatrices, de kinases et d'ubiquitinasés (**Figure 1.1**). Il existe deux voies de signalisation principales parmi les TLRs, dépendamment de la protéine adaptatrice utilisée, MyD88 ou TRIF. La voie dépendante de TRIF est utilisée par les TLR3 et TLR4. L'activation de la voie dépendante de TRIF entraîne le recrutement des protéines TRAF6, TBK1 et IKK ϵ . TBK1 et IKK ϵ permettent l'activation d'IRF-3 (Fitzgerald *et al.*, 2003) alors que TRAF6 induit également l'activation de NF- κ B (Sato *et al.*, 2003). Quant à la voie dépendante de Myd88, elle est utilisée par le reste des TLRs mais également par le TLR4. Lors de l'activation d'un des TLRs associé à cette voie, MyD88 est capable de recruter les kinases IRAK-1 et IRAK-4 (Lin *et al.*, 2010). Ces kinases induisent l'activation de l'ubiquitinasé TRAF6 qui aboutie à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, IRF-5 et IRF-7 et à une production massive d'interféron de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires comme dans le cas des cellules dendritiques plasmacytoïdes qui expriment les TLR7 et TLR9 à de hauts niveaux (Honda *et al.*, 2005). On peut distinguer les TLRs à la surface de la cellule (TLR1/2/4/5/6/10) et les TLRs endosomaux (TLR3/7/8/9/11/12/13). La plus part des TLRs endosomaux reconnaissent des motifs d'acides nucléiques menant à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type I. Leur localisation cellulaire est importante car elle permet de limiter de potentiels contacts avec des nucléotides du soi. Cependant, au cours du processus de maturation des TLRs endosomaux sont tout d'abord exprimés au niveau du réticulum endoplasmique et sont pris en charge par la protéine UNC93B1, avant de rejoindre le golgi (Kim *et al.*, 2008). À la suite de quoi, UNC93B1 régule différenciellement le transport des TLRs, puisque le TLR9 est envoyé à la surface cellulaire avant d'être endocyté et de rejoindre

les endosomes, alors que les autres TLRs endosomaux sont directement envoyés aux endosomes (Lee *et al.*, 2013). Il est important de noter que lorsque le TLR9 est à la surface cellulaire, il n'est pas fonctionnel et ne peut donc pas reconnaître ses ligands. Pour cela, il faut attendre son arrivée dans les endosomes et le clivage protéolytique par des enzymes telles que les cathepsines ou l'asparaginyle endopeptidase qui le rendent fonctionnel (Ewald *et al.*, 2011). Il en est de même, au moins, pour les TLR3, 7 et 8. Ce mécanisme de clivage permet de réguler l'activation et de ce fait, la signalisation des TLRs endosomaux, mais d'autres mécanismes sont également impliqués dans la régulation de leur activité. Par exemple, le CD14 a été montré comme favorisant l'endocytose d'acides nucléiques d'une part, et agit en tant que co-récepteur d'autre part pour les TLR7 et 9 (Baumann *et al.*, 2010). La protéine cytoplasmique A20 peut également réguler l'activation des TLRs en enlevant les motifs ubiquitinés de type K63 sur TRAF6, une protéine effectrice en aval dans la voie de signalisation, qui sont des motifs essentiels à son activation (Boone *et al.*, 2004). La protéine A20 est d'ailleurs requise pour l'arrêt de la signalisation des TLRs puisque des souris déficientes pour la protéine A20 développent spontanément des signes d'inflammation (Boone *et al.*, 2004).

Tableau 1.1 : TLRs et leurs ligands. **Extrait de** (Savva *et al.*, 2013)

| <i>Récepteur</i> | <i>Localisation cellulaire</i> | <i>Molécule adaptatrice</i> | <i>Ligand</i> | <i>Origine</i> | <i>Espèce</i> | |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|-----------------------------|--------|
| <i>TLR1 (avec TLR2)</i> | Membrane cellulaire | MyD88/TIRAP | Lipopeptide triacyl | Bactérie Mycobactérie | Humain | |
| | | | Facteurs solubles | | Souris | |
| <i>TLR2 (avec TLR1 ou TLR6)</i> | Membrane cellulaire | MyD88/TIRAP | Lipoprotéine, lipopeptide | Pathogènes variés | Humain | |
| | | | Acide lipoteichoïque | Bactéries gram-positif | Souris | |
| | | | Peptidoglycane | Bactéries | | |
| | | | Lipoarabinomannose | Mycobactérie | | |
| | | | Porine | <i>Neisseria</i> | | |
| | | | LPS atypique | <i>Leptospira interrogans</i> | | |
| | | | Glycoinositolphospholipide | <i>Trypanosome, Toxoplasme</i> | | |
| | | | Glycolipide | <i>Plasmodium</i> | | |
| | | | Beta glucane, mannose | Champignons | | |
| | | | Glycoprotéine | CMV | | |
| HSP70 | Hôte | | | | | |
| <i>TLR3</i> | Endolysosome | TRIF | ARN double brin | Virus | Humain | |
| | | | | | Souris | |
| <i>TLR4</i> | Membrane cellulaire et endolysosome | MyD88/TIRAP | LPS | Bactéries gram-négatif | Humain | |
| | | | TRIF/TRAM | Mannose O-glycosylé | Champignons | Souris |
| | | | | Taxol | Plantes | |
| | | | | Protéines d'enveloppe et de fusion | Virus | |
| | | | | HSP60 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | |
| | | | | HMGB1, HSP70, fibronectine, fibrinogène | Hôte | |
| <i>TLR5</i> | Membrane | MyD88 | Flagelline | Bactéries flagellées | Humain | |

| | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|-------------|---|------------------------------|--------|
| | cellulaire | | | | Souris |
| <i>TLR6 (avec TLR2)</i> | Membrane cellulaire | MyD88/TIRAP | Lipopeptide diacyl | Mycoplasme | Humain |
| | | | Acide lipoteichoique | Bactéries gram-négatif | Souris |
| | | | β-glucane | Champignons | |
| <i>TLR7</i> | Endolysosome | MyD88 | ARN simple brin | Virus, bactéries | Humain |
| | | | Imidazoquinoline, loxoribine, bropirimine | Composés synthétiques | Souris |
| <i>TLR8</i> | Endolysosome | MyD88 | ARN simple brin | Virus, bactéries | Humain |
| | | | Imidazoquinoline | Composés synthétiques | Souris |
| <i>TLR9</i> | Endolysosome | MyD88 | Motifs CpG de l'ADN | Virus | Humain |
| | | | | Bactéries | Souris |
| | | | Homozoïne | <i>Plasmodium falciparum</i> | |
| <i>TLR10 (± TLR1 ou TLR2)</i> | Membrane cellulaire | MyD88 | Lipopeptide (prédiction) | | Humain |
| <i>TLR11</i> | Endolysosome | MyD88 | Flagelline | Bactéries flagellées | Souris |
| <i>TLR12</i> | Endolysosome | MyD88 | Profiline | Parasites apicomplexés | Souris |
| <i>TLR13</i> | Endolysosome | MyD88 | ARN 23S | Bactéries | Souris |

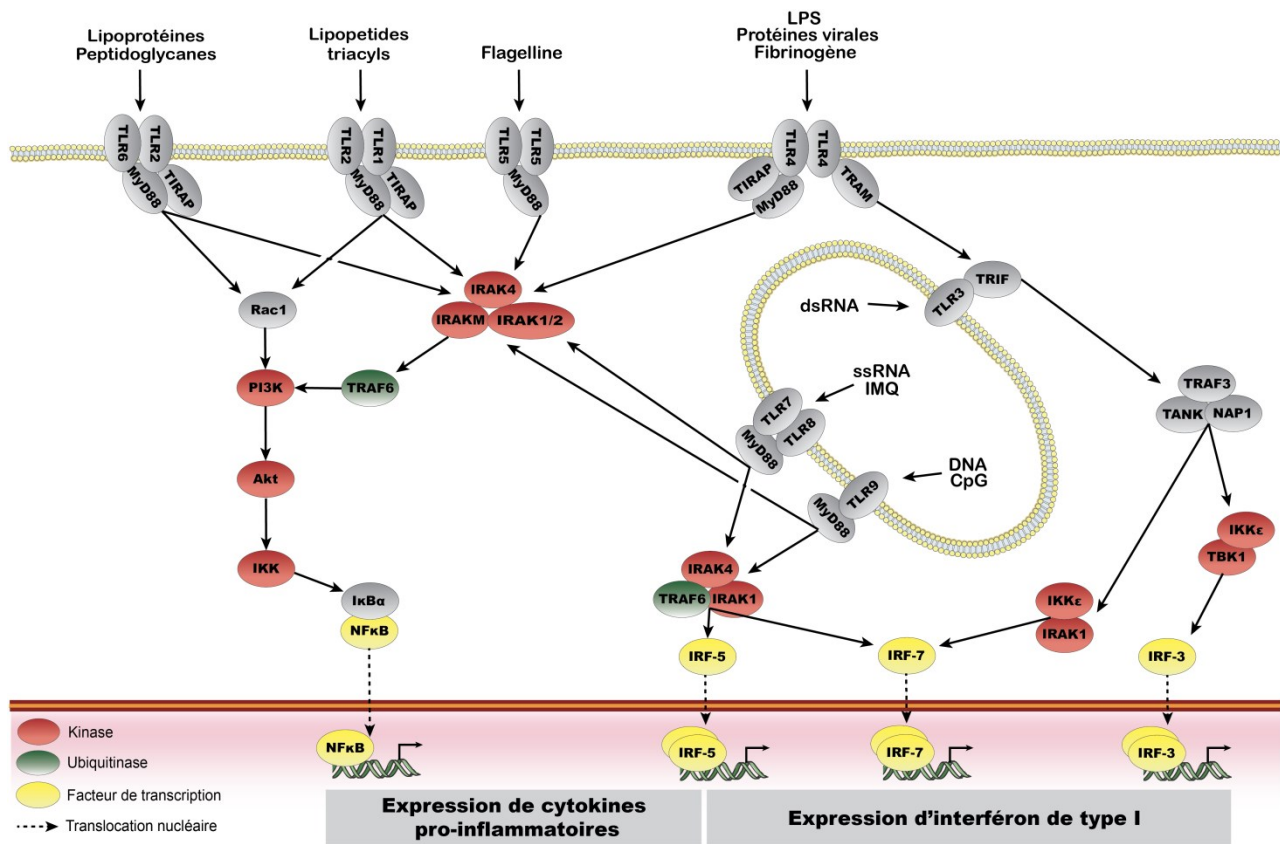


Figure 1.1 : Voies de signalisation des différents TLRs.

Représentation des voies de signalisation des TLRs suite à leur activation. Les TLR de surface 1/2/5/6 recrutent la protéine MyD88 menant à l'activation de NF-κB. Le TLR4 retrouvé à la surface peut aussi bien recruter la protéine MyD88 que la protéine TRIF menant à l'activation de NF-κB, IRF-3 et IRF-7. Le TLR3 retrouvé dans les endosomes recrute la protéine TRIF pour activer IRF-3 et IRF-7. Les autres TLR endosomaux, les TLR7/8/9 recrutent la protéine MyD88 et sont capables d'activer NF-κB, IRF-3, IRF-5 et IRF-7.

1.3.4 Les motifs moléculaires associés aux dommages

Les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) proviennent de composés intracellulaires ou de composés de la matrice extracellulaire qui, en temps normal, ne sont pas détectables dans le microenvironnement cellulaire. Cependant, en réponse à divers stimuli comme par exemple la perte de l'intégrité membranaire ou les activités protéolytiques dans l'espace extracellulaire, on observe la dissémination de nombreux composés qui sont détectés et reconnus en partie par les TLRs et les NLRPs. Il existe différentes causes menant à ces observations, que ce soit au travers d'un dommage tissulaire stérile ou bien par la présence d'un agent pathogène. De nombreux DAMPs ont été répertoriés à ce jour, et ils sont dérivés de nombreux compartiments cellulaires différents. On peut citer le HMGB1, protéine nucléaire, qui lorsqu'elle se retrouve dans le milieu extracellulaire peut être détectée par le TLR4 et le TLR2 (Yu *et al.*, 2006), l'ARN et l'ADN des cellules de l'hôte détectés respectivement par les TLR3 et TLR9 (Cavassani *et al.*, 2008) ou encore l'acide urique qui sera détectée par la protéine NLRP3 (Martinon *et al.*, 2006). La détection de ces DAMPs mène à une réponse inflammatoire, qui sera dite stérile dans le cas où elle n'est pas associée à une infection et qui se caractérise par les mêmes phénomènes de sécrétions de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement cellulaire. Cependant ils sont également impliqués dans le développement de certains cancers (Liu *et al.*, 2011) mais aussi dans la réparation tissulaire (Tamai *et al.*, 2011).

1.3.5 Les PRR et l'inflammation

Comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, l'activation des PRR des cellules de l'immunité innée est le déclencheur de l'inflammation. Mais il y a plusieurs manières de définir l'inflammation, et selon Medzhitov cela correspond à une réaction biologique suite à une perturbation de l'homéostasie d'un tissu (Medzhitov, 2008). Ces perturbations peuvent prendre différentes formes que ce soit des infections, des traumatismes ou des expositions à des produits chimiques. Le phénomène d'inflammation a pour but d'éliminer la source de la perturbation pour, au final, revenir à un état d'équilibre. La majorité du temps l'inflammation est bénéfique pour l'organisme, mais dans certains cas un excès d'inflammation peut avoir des effets dévastateurs, qui mènent souvent à la destruction tissulaire et au développement de pathologies.

D'un point de vue cellulaire on peut distinguer plusieurs étapes dans la mise en place de l'inflammation. La première étape est la reconnaissance par les cellules de l'immunité innée, de signaux moléculaires évoquant un danger qu'ils soient d'origine externe (PAMPs) ou interne (DAMPs). Et comme nous l'avons déjà vu, ces signaux sont reconnus par des classes de récepteurs particuliers, les RLRs, les NLRs et les TLRs. L'activation de ces voies de signalisation se fait principalement au travers de trois familles NF- κ B, les caspases et les IRFs (Jimenez Fernandez *et al.*, 2015, Lawrence, 2009, Zhao *et al.*, 2015). NF- κ B et les IRFs sont des facteurs de transcriptions qui sont transloqués au niveau du noyau et activent la transcription de gènes pro-inflammatoires comme l'interleukine 6, l'interleukine 12 ou le TNF. L'effet des caspases se fait par l'activation de facteur pro-inflammatoire qui correspondent au clivage de formes immatures de cytokines, respectivement de la pro-interleukine 1 β et la pro-interleukine 18, en forme biologiquement active interleukine 1 β et en interleukine 18, grâce à la mise en place d'un complexe multiprotéique appelé inflammasome. La sécrétion de ces cytokines, couplée à la sécrétion de chimiokines induit des modifications dans l'environnement direct des cellules notamment en induisant une vasodilatation et en augmentant la perméabilisation des vaisseaux sanguins, facilitant ainsi le recrutement de nouvelles cellules immunitaires sur le site de l'infection, dont les neutrophiles et les monocytes dans un premier temps (Turner *et al.*, 2014). En parallèle, les cellules dendritiques vont migrer vers les ganglions drainant le site de l'infection et ainsi activer les lymphocytes T, qui seront à leur tour recrutés sur le site de l'inflammation. En ce qui concerne les lymphocytes T CD4, ils seront polarisés en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement, et vont participer à maintenir cet état d'inflammation. Enfin, dans des conditions physiologiques, la dernière étape sera la résolution de l'inflammation qui est essentielle pour éviter tout emballement du système et ainsi limiter les dommages collatéraux (Ortega-Gomez *et al.*, 2013).

1.3.6 L'inflammation chronique dans les lymphocytes T

Suite à la phase d'inflammation aiguë, si l'agent pathogène ou l'élément déclencheur de l'inflammation n'est pas éliminé, le système persiste dans un état menant à une inflammation chronique. La persistance de l'antigène entraîne de nombreuses perturbations et modifications du microenvironnement qui mènent à une destruction tissulaire, au développement d'un milieu anti-inflammatoire ainsi qu'à l'épuisement des lymphocytes T.

Lors d'une inflammation chronique, la grande quantité de cytokines pro-inflammatoires produites va entraîner des dommages collatéraux en induisant une destruction tissulaire. La présence continue de l'antigène mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent être responsable de dommages tissulaires, mais l'agent pathogène peut aussi les induire par lui-même. Par exemple, le VIH est capable d'agir via certaines de ses protéines virales, Tat et Nef, pour induire l'apoptose (Acheampong *et al.*, 2005) mais de manière générale, c'est le TNF qui est le principal agent responsable de la destruction tissulaire. À long terme, l'exposition au TNF peut induire la destruction de la muqueuse intestinale dans le cas du VIH (Hunt *et al.*, 2014, Stockmann *et al.*, 2000) ou des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Slebioda *et al.*, 2014) et entraîne également dans notre modèle de leishmaniose viscérale la destruction de la zone marginale de la rate ainsi que la perte des cellules stromales gp38⁺ situées dans la pulpe blanche (Kaye *et al.*, 2004). La forte production de TNF durant une inflammation chronique aboutie à la production de cytokines anti-inflammatoires, dont l'interleukine 10, qui amorceront le début de la suppression de la réponse immunitaire.

Afin de tenter de limiter les dégâts induits par la destruction cellulaire, une réponse immunosuppressive se met en place au travers de cytokines majoritairement anti-inflammatoires mais aussi parfois pro-inflammatoires. Parmi les cytokines anti-inflammatoires on peut citer l'interleukine 10 et le TGF- β . En effet, les phases chroniques des différentes infections résultent en une forte augmentation d'interleukine 10 (Brooks *et al.*, 2006, Murphy *et al.*, 2001) qui peut s'avérer bénéfique comme nous allons le voir. Les principaux effets induits par cette cytokine anti-inflammatoire sont de réduire la production de cytokines pro-inflammatoires, d'altérer les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes ou encore de limiter les réponses des lymphocytes T (Bankoti *et al.*, 2012, Mittal *et al.*, 2015). L'interleukine 10 peut être sécrétée par diverses populations que ce soit des cellules dendritiques, des monocytes, des lymphocytes B ou des lymphocytes T CD4 (Ng *et al.*, 2012, Richter *et al.*, 2013) et se retrouvent dans de nombreuses infections chroniques que ce soit lors d'infection par le VIH (Brockman *et al.*, 2009), par le VHC (Kaplan *et al.*, 2008) ou encore par *L. donovani* (Stager *et al.*, 2006). Mais, dans le cas de certaines infections chroniques où la présentation antigénique reste soutenue, l'interleukine 10 peut être associée à une forte inflammation (Kwon *et al.*, 2010). De plus il a été démontré que le fait de bloquer l'interleukine 10 par l'injection d'anticorps neutralisants lors d'une infection avec le clone 13 de la souche LCMV est capable de réduire le titre viral, de diminuer l'expression de PD-1 et d'améliorer les fonctions des lymphocytes T CD8 spécifiques pour le virus (Brooks *et al.*, 2006, Ejrnaes *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2018). Dans le cas de la leishmaniose viscérale, l'injection d'anticorps neutralisant

l'interleukine 10 améliore la réponse granulomateuse, augmente la production d'interleukine 12, d'oxyde nitrique et favorise le développement de la réponse Th1 (Murray *et al.*, 2002). Une récente étude, a mis en évidence que l'interleukine 10 peut agir directement sur les lymphocytes T CD8 en diminuant la sensibilité du TCR pour l'antigène (Smith *et al.*, 2018). Le rôle du TGF- β dans ce phénomène a été moins étudié, mais on sait que la voie de signalisation du TGF- β intrinsèque aux lymphocytes T CD8 est impliquée dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes T CD8 spécifiques, mais n'agit pas directement sur leur épuisement (Tinoco *et al.*, 2009). En revanche, le blocage du TGF- β par des anticorps ne permet que d'améliorer légèrement les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8 et n'a pas d'impact sur l'élimination de l'agent pathogène (Garidou *et al.*, 2012). De manière surprenante, les interférons de type I sont également associés au phénomène d'immunosuppression. Bien qu'ils soient nécessaires durant la phase aiguë dans le développement de la réponse immunitaire, leur présence en continue pendant la phase chronique entraîne des effets opposés, puisque le fait de les bloquer durant cette période permet de contrôler l'infection (Teijaro *et al.*, 2013).

C'est dans ce contexte de stimulation persistante, que la présence continue de l'antigène amène les lymphocytes T à atteindre un état d'épuisement fonctionnel (Bucks *et al.*, 2009, Wherry *et al.*, 2003). Mais le simple fait de retirer une cellule épuisée de son environnement ne suffit pas à lui rendre tout son potentiel fonctionnel (Angelosanto *et al.*, 2012). Plusieurs caractéristiques sont associées à cet état, comme la perte graduelle des fonctions effectrices, l'expression de récepteurs inhibiteurs ou encore des changements dans l'expression de facteurs de transcription et des voies métaboliques. En effet, au cours des dernières années, plusieurs études ont montrés que la régulation de l'épuisement des lymphocytes T était dû notamment à des modifications épigénétiques. Les régions ouvertes de la chromatine vont être modifiées. On peut citer par exemple une fermeture du locus codant pour l'interféron gamma, comparativement à des lymphocytes effecteurs ou mémoires, ainsi qu'une ouverture de la région codant pour le récepteur inhibiteur PD-1 (Pauken *et al.*, 2016). De plus, il a été démontré que l'ADN méthyltransférase 3A (DNMT3A) est impliquée dans ces changements épigénétiques menant à l'épuisement des lymphocytes T (Ghoneim *et al.*, 2017). L'épuisement des lymphocytes T CD8 a été observé en premier lieu dans le cas d'une infection chronique par LCMV, comme des lymphocytes qui avaient une production limitée de cytokines (Zajac *et al.*, 1998). Cette défaillance fonctionnelle se fait graduellement et commence par la perte de production d'interleukine 2, de leurs capacités de prolifération et cytotoxiques, puis finalement par la perte de production de TNF et d'interféron gamma (Virgin *et al.*, 2009). Outre

la présence prolongée de l'antigène, d'autres facteurs entrent en jeu dans le processus d'épuisement cellulaire. Bien que certains récepteurs inhibiteurs comme PD-1 sont exprimés lors de l'activation des lymphocytes T, lors de l'épuisement ces récepteurs sont exprimés bien plus fortement. Parmi ces récepteurs inhibiteurs on peut citer PD-1, TIM3, CTLA-4 ou encore LAG3 (Blackburn *et al.*, 2009) et bien entendu plus une cellule va exprimer fortement ces récepteurs, plus l'épuisement sera sévère. Et bien que l'expression individuelle de ces récepteurs ne reflète pas l'état d'épuisement de la cellule, l'expression simultanée fait partie du phénotype d'épuisement classique. Le fait de venir bloquer une de ces voies d'inhibition va très nettement améliorer les fonctions effectrices des lymphocytes T lors d'une infection par *L. donovani* (Joshi *et al.*, 2009). Cependant, il a été montré que ces récepteurs sont co-exprimés au cours de différentes infections. De plus, il est à noter que leurs mécanismes d'action ne sont pas redondants (Parry *et al.*, 2005) et que le fait d'agir sur plusieurs d'entre eux en même temps apporte un réel effet de synergie (Butler *et al.*, 2011, Kaufmann *et al.*, 2007). En plus des récepteurs inhibiteurs, la dégradation de certaines molécules adaptatrices peut participer au dysfonctionnement des lymphocytes T. Par exemple, il a été montré que la diminution des quantités de TRAF1 dans les lymphocytes T CD8 participe à leur perte de fonction durant une infection chronique (Wang *et al.*, 2012).

Tout comme les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4 sont aussi sujets à l'épuisement et se retrouvent dans de nombreuses pathologies. L'épuisement des lymphocytes T CD4 a été reporté lors de divers infections virales par le VIH (Day *et al.*, 2006), le LCMV (Fletcher *et al.*, 2005), le VHC (Kasprovicz *et al.*, 2008) mais aussi lors d'une infection par *L. donovani* (Valadares *et al.*, 2018). Bien que certaines caractéristiques soient communes entre les deux types cellulaires, on retrouve également des différences majeures. Au niveau des caractéristiques communes, on retrouve la perte graduelle des fonctions effectrices en particulier la perte de sécrétion d'interféron gamma et de TNF (Crawford *et al.*, 2014), le défaut de prolifération (Iyasere *et al.*, 2003) mais aussi l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou TIM3 (Rallon *et al.*, 2018). Contrairement aux lymphocytes T CD8, l'épuisement des lymphocytes T CD4 entraîne la production d'interleukine 10 et d'interleukine 21 (Campos *et al.*, 2001, Crawford *et al.*, 2014, Fahey *et al.*, 2011). Ce changement de sécrétion va avoir plusieurs conséquences, en limitant la réponse Th1 et favorisant le développement de Tfh (Fahey *et al.*, 2011, Osokine *et al.*, 2014). Mais il a aussi été montré que l'interleukine 21 va être importante dans le maintien de la réponse des lymphocytes T CD8 lors d'une infection chronique, puisqu'elle permet de soutenir la prolifération cellulaire ainsi que la production de cytokines

(Frohlich *et al.*, 2009, Yi *et al.*, 2009). Le développement des Tfh va permettre de soutenir la réponse des lymphocytes B lors de certaines infections (Fahey *et al.*, 2011).

1.4 Les cellules de la réponse adaptative

Les cellules de la réponse immunitaire adaptative constituent le troisième et dernier rempart de l'organisme face aux agents pathogènes. La mise en place de la réponse adaptative dépend avant tout du système immunitaire inné et est composée de cellules capables de répondre à un antigène en particulier, mais surtout de générer une mémoire immunologique qui assure une protection à long terme contre un agent pathogène donné. On compte dans ses rangs les lymphocytes B ainsi que les lymphocytes T CD4 et T CD8.

1.4.1 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont un groupe cellulaire hétérogène composé des lymphocytes B folliculaires, des lymphocytes B de la zone marginale, des lymphocytes B1 et des lymphocytes B régulateurs. Ces populations sont réparties à travers la moelle osseuse, les organes lymphoïdes secondaires et les cavités péritonéales et pleurales. La sous-population la plus nombreuse est constituée par les lymphocytes B folliculaires que l'on retrouve majoritairement dans la rate et les ganglions. Ces derniers sont capables d'être activés par les lymphocytes T ce qui leur permet de se différencier en plasmocytes dont la principale caractéristique est de sécréter des anticorps spécifiques de l'agent pathogène, pourvus d'une forte affinité. Alors que les populations de lymphocytes B1 et de la zone marginale peuvent être activés directement par les TLRs, sans la présence d'antigène, ce qui induit l'expression des facteurs de transcriptions Blimp1 et XBP1 connus pour être impliqués dans la différenciation en plasmocytes (Genestier *et al.*, 2007). Mais leur rôle ne se limite pas à la simple sécrétion d'anticorps pour contrer une infection. Des études ont montré qu'ils sont importants pour la mise en place de la structure de la rate par exemple, notamment à travers la sécrétion de lymphotoxine et de TNF qui permettent le développement des cellules dendritiques folliculaires (Endres *et al.*, 1999). De même, la production de lymphotoxine participe à la mise en place de la zone marginale (Tumanov *et al.*, 2002) et de la zone des lymphocytes T (Ngo *et al.*, 2001). La production de cytokines joue également un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire que ce soit positivement ou négativement. Dans le cas d'une infection par *T. gondii* les lymphocytes B activés produisent du TNF qui soutient la réponse de type Th1 (Menard *et al.*, 2007) alors que lors d'une infection par *L. donovani*, d'une part l'activation des TLRs par les amastigotes induit la production d'interleukine 10 et d'autre part la polyactivation des lymphocytes B mène à la sécrétion de grandes quantités d'anticorps de faible affinité, participant tous deux à l'exacerbation de la maladie (Silva-Barrios *et al.*, 2016).

1.4.2 Les lymphocytes T CD4

Le terme de lymphocytes T CD4 regroupe différentes sous-populations dont entre autres les lymphocytes T « helper », abrégés en Th, qui modulent la réponse immunitaire, les lymphocytes Tfh, ou « T follicular helper », qui participent à la maturation des lymphocytes B au niveau des centres germinatifs et les lymphocytes T régulateurs, avec entre autres les Treg et les Tr1, sont capables de freiner la réponse immunitaire. La plupart de ces populations sont obtenues suite à l'activation des lymphocytes T CD4 par des CPA, et c'est le signal cytokinique qui va permettre de les polariser en différentes populations de lymphocytes. Les cytokines vont se lier à leur récepteur et mettre en jeu des facteurs de transcription dont les STAT et les « master regulators », tels que T-bet, GATA3 ou FoxP3, qui vont être spécifiques à une population donnée (**Figure 1.2**). Les lymphocytes T CD4 tiennent donc une place centrale dans la fonction du système immunitaire. En effet, leur rôle de soutien pour les autres cellules en fait un des acteurs incontournables. Ils sont impliqués dans le processus d'activation des lymphocytes B, dans le développement et le maintien de la réponse T CD8, peuvent réguler l'activité des macrophages et des cellules dendritiques mais également inhiber la réponse immunitaire. Au travers de ces fonctions, ils assurent un équilibre en combattant différentes infections, le développement de cancers, mais aussi en évitant le développement de maladie auto-immunitaires.

Suite à l'activation par une CPA, un lymphocyte T CD4 naïf peut se différencier en plusieurs populations de cellules effectrices qui sont caractérisées par les facteurs de transcription exprimés mais aussi par les cytokines sécrétées. Le choix de la population dans laquelle un lymphocyte T CD4 se différencie dépend des signaux environnementaux qu'il recevra, provenant en grande partie des cytokines présentes dans le microenvironnement. On distingue ainsi les populations Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, cytotoxiques, Tr1 et iTreg (**Figure 1.2**).

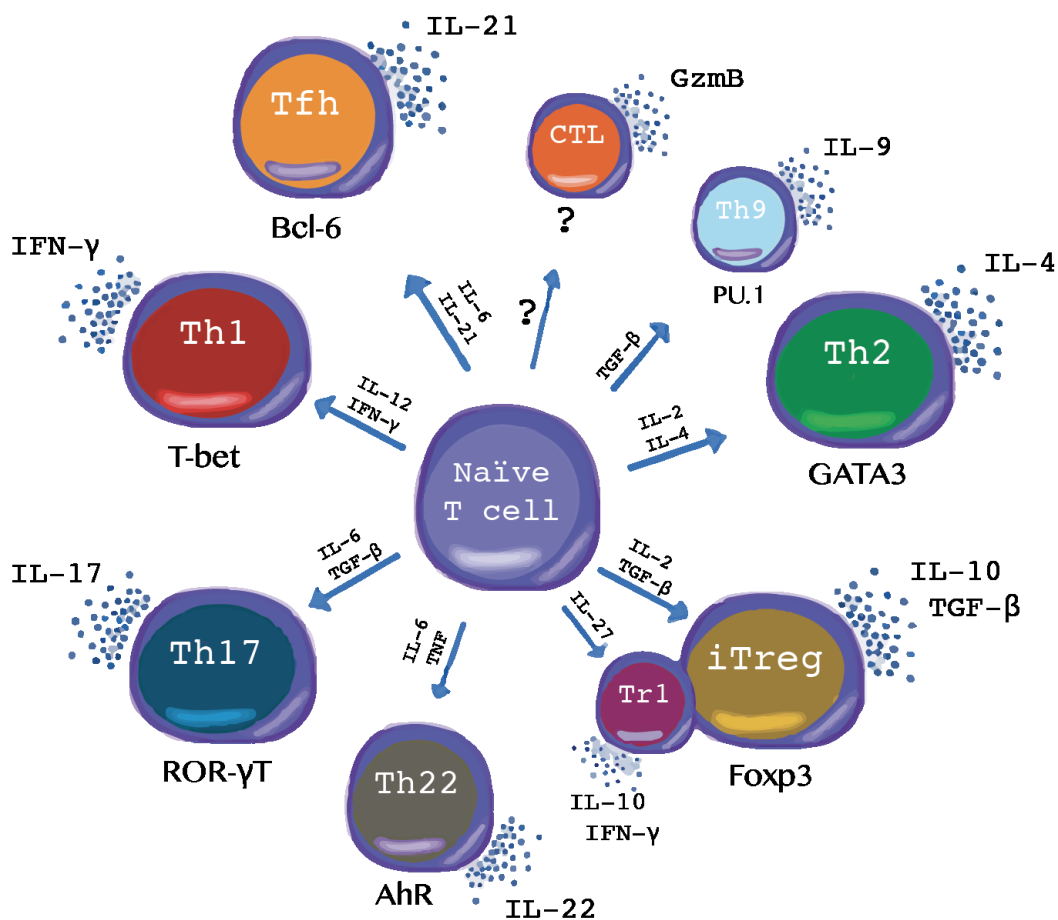


Figure 1.2 : Polarisation des lymphocytes T CD4.

Représentation des populations T helper de type 1 (Th1), type 2 (Th2), type 9 (Th9), type 17 (Th17), type 22 (Th22), folliculaires (Tfh), régulateurs inducibles (iTreg), régulateurs de type 1 (Tr1) et cytotoxiques (CTL). Pour les cas connus, les populations cellulaires sont représentées avec les cytokines nécessaires à leur polarisation, leur facteur de transcription clef et les principaux agents sécrétés. Adaptée de (Carbo *et al.*, 2014).

Historiquement, les premières populations de lymphocytes T CD4 qui ont été mise en évidence sont les Th1 et Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Les Th1 sont induits par la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 12 et l'interféron- γ , qui sont généralement produites par les cellules dendritiques, les macrophages ou les natural killers. La détection de ces cytokines par leurs récepteurs respectifs entraîne une activation du facteur de transcription STAT1 qui peut induire l'expression de T-bet, qui permet la différenciation en Th1 et réprime la différenciation en Th2. De plus, T-bet est responsable de la production d'interféron- γ , qui est la cytokine signature des Th1, bien qu'ils soient également capables de sécréter du TNF, de

l'interleukine 2 et de la lymphotoxine. L'interféron- γ produit par les Th1 permet d'activer les macrophages qui vont lutter contre les pathogènes intracellulaires et ainsi mener à leur élimination. Cependant, un excès de réponse Th1 peut mener à une hyper-inflammation responsable des symptômes de certaines maladies chroniques comme les maladies inflammatoires de l'intestin (Davidson *et al.*, 1996).

Les Th2 quant à eux ont besoin de l'interleukine 2 et de l'interleukine 4 pour pouvoir se différencier (Swain *et al.*, 1990). Ces cytokines induisent la voie de signalisation impliquant le facteur de transcription STAT6 et son facteur de transcription principal GATA3 (Zhang *et al.*, 1997). IRF-4 est également impliqué dans le développement des Th2 en permettant la production d'interleukine 4. La réponse Th2 est caractérisée par la production des interleukines 4, 5, et 13. La production de ces cytokines oriente la commutation isotypique des lymphocytes B vers les IgG1 et IgE, et permet également le recrutement de neutrophiles. La réponse de type Th2 est importante dans la défense contre les pathogènes extracellulaires comprenant les helminthes et les nématodes. Cependant, une production de ces cytokines en trop grande quantité peut entraîner le développement de pathologie des voies aériennes, notamment de l'asthme ou des réactions allergiques exacerbées.

Les lymphocytes Th9 ont des fonctions similaires aux Th2, car ils sont impliqués dans la réponse immunitaire face aux helminthes (Khan *et al.*, 2003). Cependant, leur polarisation est induite par le TGF- β et ils ont une expression plus forte du facteur de transcription PU.1, bien que IRF-4 soit également nécessaire à leur différenciation. Les Th9 sont ainsi caractérisés par une sécrétion d'interleukines 9 et 10.

La population des Th17 est induite par la présence d'interleukine 6 et de TGF- β . Ces cytokines permettent l'induction du facteur de transcription clef pour cette population, ROR- γ t, au travers de la signalisation de STAT3 (Ivanov *et al.*, 2006). Les Th17 produisent de l'interleukine 17, qui semble impliquée dans la résistance à l'infection de certains pathogènes dont *Toxoplasma* (Lieberman *et al.*, 2004). Cependant, peu d'infections se montrent sensibles à une réponse Th17. En contre partie, l'interleukine 17 a été décrite comme un acteur important dans le développement de maladie auto-immunes, spécialement dans les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et d'arthrite rhumatoïde (Komiyama *et al.*, 2006, Nakae *et al.*, 2003).

La population de Th22 est induite par la présence d'interleukine 6 et de TNF, et nécessite l'expression de son facteur de transcription spécifique, AhR (Baba *et al.*, 2012). Les

Th22 produisent de grandes quantités d'interleukine 22, bien qu'ils puissent également produire de l'interleukine 13 et du TNF (Trifari *et al.*, 2009). Ces cellules se retrouvent, entre autre, au niveau de la peau grâce à l'expression du récepteur CCR4 et participent à la défense contre les pathogènes, au remodelage et à la réparation des tissus. Mais ils sont aussi impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires de la peau comme le psoriasis.

Les Treg se divisent en deux populations : les nTreg (natural Treg) et les iTreg (induced Treg). Les nTreg se développent dans le thymus et se retrouvent dans la périphérie en exprimant des marqueurs caractéristiques comme le CD25, GITR ou CTLA-4, contrairement aux iTreg qui se différencient en périphérie à partir d'un lymphocyte T CD4 naïf activé en présence de TGF- β et d'interleukine 2. En revanche, tous les Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 et sont à même de sécréter de l'interleukine 10 et du TGF- β et ainsi agir en tant qu'agents immunosuppresseurs (Fontenot *et al.*, 2003, Nakamura *et al.*, 2001, Weiner, 2001). Leurs principales fonctions sont le maintien de la tolérance périphérique et la régulation de l'homéostasie immunitaire. Un défaut de Treg engendre de graves troubles menant au développement de maladies auto-immunes et à des maladies inflammatoires (Bennett *et al.*, 2001).

Les lymphocytes Tr1 sont une autre population de lymphocytes T régulateurs qui se distingue des Treg par l'absence d'expression du facteur de transcription Foxp3. À ce jour, aucun facteur de transcription principal ou marqueur de surface spécifique n'est associé aux Tr1. Ils sont caractérisés par leur capacité à produire de l'interféron- γ et de l'interleukine 10 (Groux *et al.*, 1997). Leur fonction immunosuppressive s'effectue par la sécrétion d'interleukine 10. Les Tr1 sont impliqués dans la régulation de la tolérance périphérique, mais sont également impliqués dans le développement de plusieurs maladies dont la leishmaniose viscérale (Stager *et al.*, 2006).

Les Tfh sont des lymphocytes qui se retrouvent principalement dans le centre germinatif, dans les organes lymphoïdes secondaires. Leur différenciation se fait grâce aux interleukines 6 et 21 (Nurieva *et al.*, 2008). Le facteur de transcription essentiel à son développement est Bcl-6, mais l'expression du récepteur CXCR5 est un autre marqueur indispensable qui permet leur migration aux côtés des lymphocytes B. Ils sont des acteurs essentiels pour la maturation d'affinité des lymphocytes B et le développement de la mémoire des B (Reinhardt *et al.*, 2009).

La dernière population appartenant à la famille des lymphocytes T CD4 est celle des cytotoxiques (CTL). Bien que leur découverte remonte à plusieurs dizaines d'années (Billings *et al.*, 1977), cette population n'a été que très peu étudiée. À l'heure actuelle on ne connaît pas

exactement les facteurs qui sont impliqués dans son développement, néanmoins toutes les populations de lymphocytes CD4 différenciés pourraient se différencier en CTL en perdant l'expression des facteurs de transcription ThPOK, TCF1 ou Bcl-6 et exprimant certains gènes retrouvés chez les lymphocytes T CD8 CTL comme *Crtam* ou *Eomes* (Donnarumma *et al.*, 2016, Mucida *et al.*, 2013, Takeuchi *et al.*, 2016). Cependant, on peut définir leur phénotype par l'expression de la protéine membranaire CRTAM et par la production de matériel cytotoxique comme le granzyme et la perforine (Takeuchi *et al.*, 2016). Les CD4 CTL participent à la clairance de certains virus puisque l'on les retrouve lors de certaines infections, notamment lors d'une infection par le LCMV ou certains virus de l'herpès (Jellison *et al.*, 2005, Stuller *et al.*, 2009).

1.4.3 Les lymphocytes T CD8

Lorsque les lymphocytes T CD8 naïfs sont activés par les CPA, le processus de la réponse primaire peut être découpé en trois phases distinctes, la phase d'expansion, la phase de contraction et la phase mémoire. Les lymphocytes T CD8 jouent un rôle important dans la clairance de nombreux pathogènes grâce à leur capacité à se différencier en cellules effectrices, mais ils sont aussi impliqués dans la réponse mémoire lors d'une nouvelle rencontre avec un même pathogène en se différenciant en lymphocytes T CD8 mémoires, assurant ainsi une protection à long terme.

La phase d'expansion correspond aux premiers instants faisant suite à l'activation d'un lymphocyte T CD8. Tout comme dans le cas des lymphocytes T CD4 on retrouve les trois signaux nécessaires, à savoir l'interaction entre le CMH de classe I et le TCR, l'interaction entre le CD28 et le CD80 et enfin la présence de cytokines, principalement des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 12 ou l'interféron de type I, et également l'interleukine 2. Ces signaux sont cruciaux pour la survie, la prolifération et la différenciation en lymphocytes effecteurs. Une fois activés, de nombreux gènes sont mis en jeu et induisent des différences majeures par rapport aux lymphocytes T naïf. On peut citer par exemple l'induction de l'expression de la glycoprotéine CD44 ou la diminution d'expression de la L-sélectine CD62L. Ces changements d'expression de marqueurs de surfaces sont aussi accompagnés de changements au niveau de la sécrétion de cytokines et d'agents cytolytiques, avec une production de l'interleukine 2, d'interféron gamma, de TNF, d'interféron de type I, de perforine et de granzyme. Les modifications d'expressions de plusieurs gènes permettent également de différencier plusieurs populations de lymphocytes T activés (**Figure 1.3**). Parmi ces

changements, la présence du récepteur KLRG1 (« killer cell lectin-like receptor G1 ») et de la chaîne α du récepteur à l'interleukine 7 (CD127) nous permet de différencier quatre populations. Les lymphocytes T activés qui expriment faiblement KLRG1^{low} et CD127^{low} représentent les EEC (« Early Effector Cells »), qui sont les précurseurs des autres populations dont les SLEC KLRG1^{hi}, CD127^{low} (« Short Lived Effector Cells »), les MPEC KLRG1^{low}, CD127^{hi} (« Memory Precursor Effector Cells ») et les DPEC KLRG1^{hi}, CD127^{hi} (« Double Positive Effector Cells »). Les SLEC sont des cellules effectrices à courte durée de vie qui meurent par apoptose une fois l'agent pathogène éliminé alors que les MPEC survivent et permettent l'établissement d'une mémoire immunitaire à long terme (Joshi *et al.*, 2007, Obar *et al.*, 2011).

La différenciation des lymphocytes T en SLEC ou MPEC se fait à travers une expression différentielle d'une série de facteurs de transcription qui permettent l'acquisition d'un phénotype particulier. Certains de ces facteurs sont mutuellement exclusifs, ou tout du moins, dépendent de leur expression relative.

Les facteurs de transcription appartenant à la famille des facteurs de transcription T-Box que sont T-bet et EOMES (eomesodermine), sont exprimés différemment entre les SLEC et les MPEC à partir du signal du TCR (Intlekofer *et al.*, 2005). T-bet est plus exprimé par les SLEC alors que les MPEC expriment d'avantage EOMES. On retrouve ce même schéma d'expression au sein de la population de lymphocytes mémoires ou les effecteurs (Tem) expriment plus fortement T-bet que EOMES, alors que cela est inversé pour les centraux mémoire (Tcm). L'expression de T-bet est nécessaire pour l'acquisition du phénotype des SLEC en induisant l'expression du KLRG1 et en réprimant l'expression du CD127. EOMES est nécessaire dans l'acquisition du phénotype des MPEC puisqu'il permet d'induire l'expression de la chaîne β du récepteur à l'interleukine 15 et l'interleukine 2 (CD122) nécessaire pour la survie de ces précurseurs mémoire (Banerjee *et al.*, 2010). Cependant, les deux facteurs de transcriptions sont impliqués dans l'acquisition des fonctions effectrices, c'est à dire qu'ils collaborent pour permettre l'expression d'interféron- γ , de granzyme et de perforine. En effet, il a été montré que seule une double délétion de T-bet et EOMES pouvait induire un défaut dans l'expression de l'interféron ou dans leurs activités cytolytiques (Joshi *et al.*, 2007).

Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) et Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) sont un autre couple de facteurs de transcription qui jouent un rôle dans le développement de la réponse T. Contrairement à T-bet et EOMES, ceux-là ne vont pas avoir de fonctions redondantes puisqu'ils sont strictement antagonistes, l'expression de l'un inhibant l'expression de l'autre. L'interleukine 2 et l'interleukine 12, entre autres, sont capables d'induire l'expression

de Blimp-1 et donc son expression se fait majoritairement dans la population des SLEC et favorise leur différenciation (Kallies *et al.*, 2009). Blimp-1 permet d'induire l'expression d'interféron- γ , de TNF et de granzyme, participant également à l'établissement des fonctions effectrices des lymphocytes. De plus, il influence directement l'expression de Bcl-6 et d'EOMES en la régulant négativement, mais favorise l'expression de T-bet. Enfin, des études démontrent l'implication de Blimp-1 dans la régulation négative des gènes *il2ra* et *cd27* à des temps tardifs, entre jour 7 et jour 9 post-infection, ce qui participera à l'induction de l'apoptose durant la phase de contraction, limitant l'accès aux signaux de survie (Rutishauser *et al.*, 2009). Bcl-6 est directement impliqué dans le développement des lymphocytes mémoires, puisque sa délétion ou sa surexpression induisent respectivement une diminution ou une augmentation de la formation lymphocytes T mémoires (Ichii *et al.*, 2004).

Le dernier couple de régulateurs est celui de Id2 et Id3 (Inhibitor of DNA binding), qui ne sont pas des facteurs de transcription, mais qui sont capables d'inhiber la liaison entre des facteurs de transcription et l'ADN. Leur expression est également induite suite à l'activation du lymphocyte T. Id2 joue un rôle dans la survie des lymphocytes lors de la phase d'expansion, puisque des souris déficientes pour Id2 voient leurs nombres de lymphocytes T réduit au pic de la réponse (Cannarile *et al.*, 2006). En fait, Id2 module l'expression de protéines impliquées dans la survie cellulaire telles que Bcl2 et BimEL. Cela se traduit par une diminution du nombre de SLEC suite à l'infection de souris ayant une déficience pour Id2 (Cannarile *et al.*, 2006). Bien que Id3 se retrouve en plus grande quantité dans les MPEC, il n'a pas d'impact direct sur Id2. Id3 est impliqué dans l'expression de protéines nécessaires pour la réplication et la réparation de l'ADN, rendant ainsi les cellules plus résistantes à l'apoptose. Ainsi, des souris déficientes pour Id3 ont une quantité de lymphocytes mémoires fortement diminuée (Ji *et al.*, 2011).

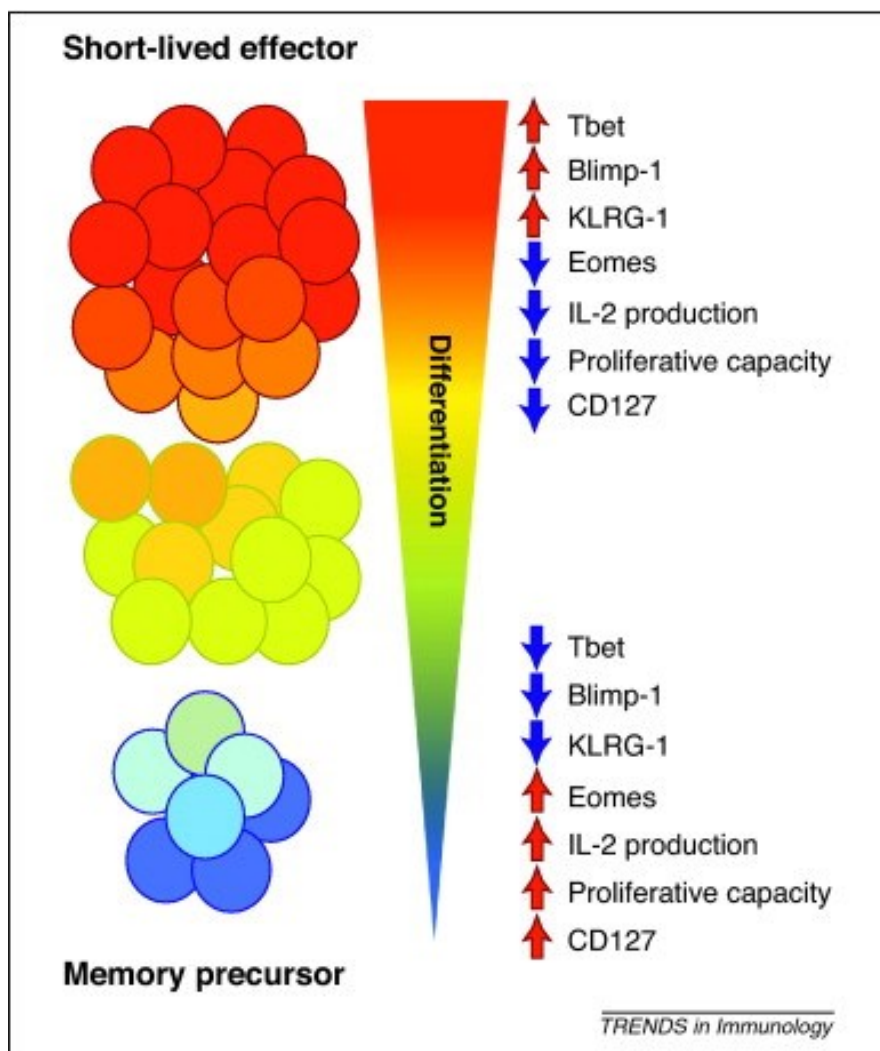


Figure 1.3 : Différentiation des lymphocytes T CD8.

Différences d'expression des facteurs de transcriptions, de la production d'interleukine-2, de la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2 ainsi que des capacités prolifératives entre les SLEC et les MPEC. Extrait de (Cox *et al.*, 2011).

Une fois l'agent pathogène éliminé, on assiste à la phase de contraction qui correspond à une mort massive par apoptose de la majorité des lymphocytes T effecteurs, mais à la survie d'une petite fraction de précurseurs de la mémoire qui permettront l'établissement d'une mémoire à long terme. Il existe différents facteurs impliqués dans ce phénomène d'apoptose, qui peuvent agir de manière directe ou indirecte. D'un côté on retrouve les facteurs impliqués directement dans l'apoptose, qui correspondent aux récepteurs de mort cellulaire retrouvés à la surface des cellules que sont Fas, TRAILR1/R2 et TNFR1. En effet, leur activation par leurs

ligands respectifs FasL, TRAIL et TNF entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) au niveau des motifs DD (Death Domain). La protéine FADD recrute ensuite les pro-caspases 8 et 10 et induit leur protéolyse pour avoir des caspases actives. Les caspases 8 et 10 peuvent agir de deux manières différentes, soit en activant directement les caspases 3, 6 et 7, soit en clivant la protéine BID (BH3-interacting-domain death associated) pour donner la forme tBID (truncated BID) qui induit le relargage du cytochrome C de la mitochondrie dans le cytosol, induisant à son tour l'apoptosome menant finalement à l'activation des caspases 3, 6 et 7 (Crowder *et al.*, 2012, Krammer *et al.*, 2007). De l'autre côté, l'apoptose peut être induite de manière indirecte à travers la privation de signaux de survie. Parmi ces signaux on peut citer les interleukines 2 et 15, qui sont impliqués dans la survie des lymphocytes T (Blattman *et al.*, 2003, Yajima *et al.*, 2006). Cette induction de la mort cellulaire est également nommée ACAD (Activation Cell-Autonomous Death). Dans ce cas, l'apoptose va également se faire au travers du relargage du cytochrome C. En effet, des travaux ont montrés qu'un apport exogène de ces cytokines permet de limiter l'apoptose lors de la phase de contraction. Bien que la cinétique de contraction ne soit affectée ni par la dose de pathogène utilisée, ni par l'élimination de l'agent pathogène suite à un traitement dans les premiers suivant l'inoculation (Badovinac *et al.*, 2002).

Les cellules ayant survécus à la phase de contraction vont alors pouvoir se différencier en lymphocytes T mémoires, qui seront responsables de la réponse secondaire si une réexposition à ce même pathogène devait se produire. Bien qu'il existe plusieurs populations de cellules mémoires, elles partagent des caractéristiques communes comme le fait qu'elles aient une prolifération homéostatique importante, qu'elles n'aient pas besoin du signal du TCR pour survivre ou encore qu'elles puissent acquérir des capacités effectrices très rapidement à la suite d'une nouvelle rencontre avec leur antigène. Classiquement on distingue trois populations principales, les lymphocytes mémoires centraux, les lymphocytes mémoires effecteurs et les lymphocytes mémoires résidant dans les tissus. Chacune de ces populations peut être différenciée grâce à des marqueurs de surface qui déterminent également leurs localisations anatomiques (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2 : Les différentes populations de lymphocytes T CD8 mémoires, incluant leurs principaux marqueurs et leurs localisations anatomiques. Adapté de (Mueller *et al.*, 2013)

| Sous-population | Phénotype | Localisation |
|-----------------------|---|--|
| T_{CM} | CD44 ^{high} , CD62L ⁺ , CCR7 ⁺ , CD127 ⁺ , CD69 ⁻ , CD103 ⁻ | Ganglions, rate (pulpe blanche > pulpe rouge) , sang et moelle osseuse |
| T_{EM} | CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD127 ⁺ , CD69 ⁻ , CD103 ⁻ | Rate (pulpe rouge > pulpe blanche) ; moins dans les ganglions, le sang, les poumons, le foie, le tractus intestinal, le tractus génital, le rein, le tissu adipeux et le cœur |
| T_{RM} | CD44 ^{high} , CD62L ⁻ , CCR7 ⁻ , CD11a ^{high} , CD69 ⁻ , CD103 ⁺ | CD8 : épithélium de la peau, de l'intestin et du vagin ; glandes salivaires et voies respiratoires ; cerveau et ganglions CD4 : parenchyme pulmonaire, tractus génital, muqueuse utérine |

La survie des lymphocytes T mémoires est dépendante de deux cytokines principalement, l'interleukine 7 et l'interleukine 15 (Becker *et al.*, 2002, Schluns *et al.*, 2000). La signalisation de l'interleukine 7 via son récepteur entraîne l'expression de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique (Carrio *et al.*, 2007). De son côté, l'interleukine 15 induit la prolifération homéostatique, ce qui permet de maintenir la population de lymphocytes mémoires à un niveau constant, permettant de garder cette mémoire pendant des dizaines d'années (Becker *et al.*, 2002).

Il y a plusieurs raisons qui permettent aux lymphocytes T mémoires de répondre plus rapidement lors d'une seconde infection. Ils sont capables de répondre à la présence de cytokines sans avoir besoin de reconnaître un antigène (Raue *et al.*, 2013). De plus les cytokines pro-inflammatoires augmentent la sensibilité des lymphocytes T mémoires à l'antigène ainsi que la signalisation du TCR, permettant une réponse optimale des cellules mémoires (Richer *et al.*, 2013, Richer *et al.*, 2015). Ils sont également capables de migrer plus

efficacement vers les cellules présentatrices d'antigène dû à leur niveau d'expression de CXCR3 plus élevé (Sung *et al.*, 2012) et aux modifications de glycosylations, en particulier les O-glycosylations, observées à leur surface (Nolz *et al.*, 2014, Zelkowitz *et al.*, 2004). Enfin, les cellules mémoires sont plus promptes à produire des molécules effectrices comme l'interféron gamma et la perforine car les ARNm nécessaires pour leur traduction sont déjà présents dans le cytoplasme (Bachmann *et al.*, 1999).

1.5 Les rôles des PRR sur les cellules du système adaptatif

La majorité des études qui ont caractérisé le rôle des PRR se sont concentrées uniquement sur les cellules innées du système immunitaire. Or, on sait aujourd'hui qu'ils ont des fonctions importantes dans les cellules de l'immunité adaptative, et que ces fonctions sont très différentes de celles découvertes jusqu'ici.

1.5.1 RIG-I Like Receptors

Très récemment plusieurs équipes ont mis en évidence le rôle du senseur cytosolique aux dinucléotides cycliques STING (Stimulator of interferon genes), dans les lymphocytes T. En effet, STING joue un rôle important dans l'expression de l'interféron de type I et de gènes pro-inflammatoires dans la réponse immunitaire innée, cependant une étude a démontré l'effet intrinsèque de STING qui est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. Classiquement, l'activité de STING est due au recrutement de TBK1 et IRF-3, mais dans les lymphocytes T l'effet observé est indépendant de ces deux effecteurs et requiert un domaine C-terminal distinct, qui n'est impliqué ni dans l'interaction avec TBK1, ni avec IRF-3 (Cerboni *et al.*, 2017). Les autres études montrent que l'activation de STING dans les lymphocytes T va plutôt induire une mort cellulaire par apoptose, qui est dépendante de sa force d'activation, en induisant un stress du réticulum endoplasmique (Gulen *et al.*, 2017, Larkin *et al.*, 2017). De manière intéressante, les mêmes observations ont été faites avec des lignées de lymphocytes B tumoraux, où l'activation de STING va induire l'apoptose via le stress du réticulum endoplasmique (Tang *et al.*, 2016). Également on peut citer les effets d'un autre senseur intracellulaire IFI16 (Interferon- γ -inducible protein 16) qui est capable de détecter l'ADN double brins et d'induire l'interféron de type I dans les cellules innées (Unterholzner *et al.*, 2010). Son activation dans les lymphocytes T CD4 entraîne la mort cellulaire par pyroptose lors d'une infection par le VIH (Monroe *et al.*, 2014).

1.5.2 NOD-Like Receptors

Ces dernières années, certains NLRs ont été mis en évidence dans les lymphocytes et en particulier dans les lymphocytes T. Par exemple, NOD1 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD8 en coopérant avec le TLR2, et joue donc le rôle de costimulateur (Mercier *et al.*, 2012). Mais NOD1 est également impliqué dans la production d'interféron gamma par les lymphocytes T dans un modèle d'induction de colite (Zhan *et al.*, 2016) alors que dans les lymphocytes B il a un effet positif sur leur développement, promouvoir la survie des cellules matures et peut être utilisé comme un marqueur de survie (Hayakawa *et al.*, 2017). En ce qui concerne NOD2, la principale étude sur le sujet a montré que lors d'une infection par le parasite *T. gondii* son absence entraîne un défaut dans la production d'interféron gamma dans les lymphocytes T CD4 et CD8 mais également un défaut de production d'interleukine 2 par les lymphocytes T CD4 (Shaw *et al.*, 2009). Enfin, dans une récente étude une équipe a découvert un rôle inattendu pour NLRP3 dans les lymphocytes T CD4. Son activation serait nécessaire au bon développement de la réponse Th1 en participant à la production d'interféron gamma ainsi qu'à leur différenciation (Arbore *et al.*, 2016).

1.5.3 Toll-Like Receptors

Bien que les TLRs soient principalement décrits dans les cellules immunitaires innées, de plus en plus d'études démontrent la présence de ces récepteurs dans les lymphocytes et leurs découvrent de nouveaux rôles.

Les lymphocytes B sont maintenant bien connus pour exprimer des TLRs et leur expression a été largement étudiée. Ainsi, l'activation des TLRs *in vitro* des lymphocytes B permet, dans la majorité des cas, à lui seul d'induire leur activation puisque l'on retrouve une expression de certains marqueurs d'activation comme le CD80 et le CD86, une induction de la prolifération, de la recombinaison de classe ainsi que la sécrétion d'anticorps (Browne, 2012). Cette activation par les TLRs amène également à la sécrétion de cytokines que ce soit par les mémoires ou les naïves (Agrawal *et al.*, 2011). Dans le contexte d'infections virales, l'activation des TLRs peut jouer un rôle de costimulation en amplifiant la réponse antivirale au niveau des centres germinatifs (Hou *et al.*, 2011). Mais dans d'autres cas cette activation des TLRs peut s'avérer délétère, comme dans le cas de la leishmaniose viscérale, puisqu'elle mène à la production de cytokines anti-inflammatoires et particip à l'établissement d'une

hypergammaglobulinémie (Silva-Barrios *et al.*, 2016). De plus, il y a aussi des évidences qui montrent que les TLRs sont capables d'induire l'activation de lymphocytes B autoréactifs et donc de mener à la sécrétion d'anticorps autoréactifs (Leadbetter *et al.*, 2002).

En revanche, les lymphocytes T sont moins souvent associés à l'activation de TLRs alors qu'il a été montré que les lymphocytes T CD4 et CD8 exprimeraient de nombreux TLRs, bien que ces expressions diffèrent en fonction des sous-populations considérées. Leurs effets sur les lymphocytes T semblent parfois contradictoires. Beaucoup de travaux mettent en avant leur implication dans la survie et la différenciation, par exemple la survie des lymphocytes T CD4 est augmentée en présence d'agoniste pour les TLR3 et TLR9 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Gelman *et al.*, 2004). Dans une autre étude c'est l'activation du TLR2 *in vivo*, conjointement avec celle du TCR, qui permet de favoriser une réponse spécifique contre *Mycobacterium tuberculosis* (Reba *et al.*, 2014) alors que la stimulation *in vitro* de CD4 naïfs avec un agoniste du TLR2 favorise plutôt la différenciation en Th9, notamment en induisant la transcription de certains facteurs de transcription tels que BATF et PU.1 qui sont impliqués dans le développement des Th9 (Karim *et al.*, 2017). Mais récemment d'autres équipes commencent à mettre en avant un effet inhibiteur des TLRs. Le TLR7 est impliqué dans l'induction de l'anergie des CD4 dans un contexte d'infection par le VIH. De manière intéressante, dans ce cas-ci, l'effet du TLR7 n'est pas dépendant de la voie NF- κ B ou de la voie des IRFs mais implique le calcium comme messager secondaire qui induit la transcription du gène NFATc2 (Dominguez-Villar *et al.*, 2015). En ce qui concerne les lymphocytes T CD8, peu d'études mettent en avant les effets des TLRs dans ces cellules, mais il semblerait que l'activation du TLR2 faciliterait l'activation des lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques en diminuant la force du signal de costimulation requise (Cottalorda *et al.*, 2006), en favorisant le développement de la réponse mémoire après une stimulation sous-optimale du TCR (Mercier *et al.*, 2009) ou encore en facilitant l'expansion clonale lors d'une infection par le virus de la vaccine (Quigley *et al.*, 2009). Dans le contexte d'une infection par le VIH, l'activation du TLR7 sur les lymphocytes T CD8 induirait une sécrétion d'interféron gamma et participerait à une augmentation de leurs capacités effectrices (Song *et al.*, 2009).

Ainsi, de nouvelles fonctions de ces récepteurs sur les lymphocytes T sont régulièrement découvertes. Nous permettant de mieux comprendre toute leur importance lors de la mise en place d'une réponse immunitaire (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3 : Effets des PRRs sur les lymphocytes T.

| Récepteurs | Cellules | Effets | Références |
|------------|------------|--|--|
| RLR | | | |
| STING | CD4 et CD8 | Inhibe la prolifération Induit l'apoptose | (Cerboni <i>et al.</i> , 2017) (Gulen <i>et al.</i> , 2017) |
| IFI16 | CD4 | Induit l'apoptose | (Monroe <i>et al.</i> , 2014) |
| MDA5 | CD8 | Production de cytokine et survie | (Lazear <i>et al.</i> , 2013) |
| LGP2 | CD8 | Survie | (Suthar <i>et al.</i> , 2012) |
| NLR | | | |
| NOD1 | CD8 | Récepteur de co-stimulation Production de cytokines | (Mercier <i>et al.</i> , 2012) (Zhan <i>et al.</i> , 2016) |
| NOD1/NOD2 | CD8 | Survie | (Kasimsetty <i>et al.</i> , 2017) |
| NOD2 | CD4 et CD8 | Production de cytokines | (Shaw <i>et al.</i> , 2009) |
| | CD4 | Limite la réponse Th17 | (Napier <i>et al.</i> , 2018) |
| NLRP3 | CD4 | Induit la réponse Th1 Différentiation des Th2 | (Arbore <i>et al.</i> , 2016) (Bruchard <i>et al.</i> , 2015) |
| TLR | | | |
| TLR1 | CD8 | Récepteur de co-stimulation | (Joseph <i>et al.</i> , 2016) |
| TLR2 | CD8 | Expansion clonale et formation de la mémoire | (Quigley <i>et al.</i> , 2009) |
| | CD4 et CD8 | Récepteur de co-stimulation | (Komai-Koma <i>et al.</i> , 2004) |
| | CD4 | Régule la différenciation en Th17 | (Reynolds <i>et al.</i> , 2010) |
| TLR3 | CD8 | Récepteur de co-stimulation | (Tabiasco <i>et al.</i> , 2006) |
| | CD4 | Survie | (Gelman <i>et al.</i> , 2004) |
| TLR4 | CD8 | Production de cytokines | (Tripathy <i>et al.</i> , 2017) |
| | CD4 | Régule l'activation du TCR Survie et prolifération | (Gonzalez-Navajas <i>et al.</i> , 2010) (Reynolds <i>et al.</i> , 2012) |
| TLR5 | CD4 | Module la réponse des Treg Production de cytokine et prolifération | (Crellin <i>et al.</i> , 2005) (Caron <i>et al.</i> , 2005) |
| TLR7 | CD8 | Production de cytokine et capacités effectrices | (Caron <i>et al.</i> , 2005) (Caramalho <i>et al.</i> , 2003) |
| | CD4 | Production de cytokine et prolifération Induit l'anergie | (Dominguez-Villar <i>et al.</i> , 2015) |
| TLR9 | CD4 | Survie | (Gelman <i>et al.</i> , 2004) |

2 LA PROTÉINE IRF-5

2.1 La famille des IRFs

2.1.1 Généralités

À ce jour, la famille des « Interferon Regulatory Factors » (IRFs), qui sont des facteurs de transcription, compte neuf membres, de IRF-1 à IRF-9. Bien qu'ils appartiennent à la même famille leurs expressions et leurs fonctions diffèrent grandement de l'un à l'autre. Néanmoins, ils sont tous régulés à l'aide de modifications post-traductionnelles qui permettent de contrôler leur activation et sont capables, en tant que facteurs de transcription et grâce à un domaine d'interaction avec l'ADN, de se lier sur des séquences spécifiques appelées les « Interferon Stimulated Response Element » (ISRE) (Fujii *et al.*, 1999). Les IRFs sont exprimés dans la majorité des tissus et des cellules, et ont un rôle important à jouer au niveau du système immunitaire. Originellement, les IRFs ont été découverts en tant que régulateurs de la transcription des gènes de l'interféron lors de l'infection virale (Miyamoto *et al.*, 1988). Aujourd'hui on sait que leur rôle ne se limite pas à la régulation des gènes de l'interféron, mais couvre un large pan des processus impliqués dans la vie cellulaire tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, le développement et bien d'autres. À travers ces effets, ils sont très importants dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, de nombreux membres de cette famille participent aux voies de signalisation des PRR, aux processus de développement des cellules du système immunitaire, à l'oncogenèse et sont également impliqués dans le développement des maladies auto-immunes.

Bien que les IRFs soient impliqués dans de nombreux processus ils sont souvent associés à deux en particulier, le développement des cellules immunitaires et la réponse antivirale. Un des membres de cette famille le plus étudié en ce qui concerne le développement des cellules du système immunitaire est probablement IRF-4. Parmi les cellules immunitaires, il est classiquement exprimé par les myéloïdes, les lymphocytes B et T. Au niveau des cellules myéloïdes ce sont principalement les cellules dendritiques et les macrophages qui l'expriment. En effet, en dehors des cellules dendritiques CD8⁺, IRF-4 est nécessaire pour la différenciation des autres sous-types via l'action du GM-CSF (Tamura *et al.*, 2005). De plus, il est impliqué dans l'expression des molécules de costimulation telles que le CD80 et le CD86 et il a été montré que des souris déficientes pour IRF-4 dans les cellules myéloïdes ont aussi un défaut dans la présentation antigénique du CMH II et donc dans l'activation des lymphocytes T CD4 (Vander

Lugt *et al.*, 2014). Il a également été récemment démontré que les monocytes ont besoin d'exprimer IRF-4 pour se différencier en cellules dendritiques dérivées des monocytes capables d'activer les lymphocytes T CD8 (Briseno *et al.*, 2016). Pour les macrophages l'expression d'IRF-4 est nécessaire pour la polarisation en type M2, comme dans le cas d'infection par des helminthes (Sato *et al.*, 2010). Mais il peut aussi être un médiateur de l'inflammation au travers de l'action du GM-CSF sur les macrophages qui induit la production de CCL17 par ces derniers (Achuthan *et al.*, 2016). Dans les lymphocytes B, IRF-4 est connu pour être nécessaire non seulement à leur développement mais aussi à leur activité. En effet, IRF-4 induit la transcription de plusieurs facteurs de transcription qui sont essentiels au bon développement des lymphocytes B, notamment Ikaros et Aiolos (Ma *et al.*, 2008). Mais il va aussi être important pour la différenciation en cellules plasmacytoïdes ainsi que pour la recombinaison de classe isotypique puisqu'il permet l'expression d'une enzyme essentielle à ce processus l'AID (Klein *et al.*, 2006). Enfin IRF-4 est très bien connu pour participer à la différenciation des différentes lignées de lymphocytes T CD4, que ce soit les Th2 (Tominaga *et al.*, 2003), les Th9 (Staudt *et al.*, 2010), les Th17 (Brustle *et al.*, 2007) ou les Tfh (Bollig *et al.*, 2012) directement en participant à l'expression de certains facteurs de transcription clefs que sont GATA3 ou ROR γ t ou indirectement. Il participe aussi à la différenciation des Treg en périphérie (Cretney *et al.*, 2011) mais également à l'induction des Treg thymique grâce aux cellules épithéliales thymiques (Haljasorg *et al.*, 2017).

En ce qui concerne la réponse antivirale les premiers membres de la famille des IRFs impliqués dans la transcription des gènes de l'interféron de type I sont l'IRF-3 et l'IRF-7 (Au *et al.*, 1998, Au *et al.*, 1995). IRF-3 est retrouvé de manière ubiquitaire et sera activé lorsque la cellule sera infectée via les voies de signalisation du TLR3 ou des senseurs cytosoliques RIG-I et MDA-5. L'activation d'IRF-3 est possible grâce à la phosphorylation induite par les kinases TBK1 et IKK ϵ (Fitzgerald *et al.*, 2003), qui induit sa dimérisation et autorise sa translocation au niveau du noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles. Bien que IRF-3 tout seul soit suffisant pour induire la transcription des gènes de l'interféron, le complexe de transcription contient également IRF-7 (Sato *et al.*, 2000). IRF-7 est un facteur de transcription spécifique des cellules immunitaires puisqu'on le retrouve principalement dans les lymphocytes B, les monocytes mais surtout dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Son activation passe à travers les voies de signalisation des TLR4, 7, 8 et 9 ainsi que par les RLRs, qui permettent le recrutement des kinases IRAK-1 et IRAK-4 en plus de la E3 ubiquitine ligase TRAF6 (Ning *et al.*, 2008, Uematsu *et al.*, 2005). Ces modifications post-traductionnelles mènent à sa dimérisation et sa translocation dans le noyau, pour induire la transcription des gènes de

l'interféron de type I. Cependant l'IRF-3 et l'IRF-7 ne possèdent pas complètement les mêmes gènes cibles et agissent de manière synergique (Morin *et al.*, 2002). Ces deux IRFs sont donc requis pour une production optimale d'interféron de type I lors d'une infection, IRF-3 étant plutôt impliqué dans la production initiale d'interféron du fait de son expression ubiquitaire alors qu'IRF-7 va être impliqué dans l'amplification des interférons de type I à travers une boucle de régulation positive notamment dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

2.1.2 IRF-5

IRF-5 est lui-même impliqué dans plusieurs processus en fonction des cellules considérées. Il est connu pour être exprimé dans les cellules dendritiques, les macrophages ainsi que dans les lymphocytes B et T.

Dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse IRF-5 est connu pour induire la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6, l'interleukine 12 ou le TNF lors de la stimulation des cellules avec des agonistes de la voie des « Toll Like Receptors » (TLRs) (Takaoka *et al.*, 2005). Chez l'humain aussi, IRF-5 permet la sécrétion de TNF par les cellules dendritiques dérivées de monocytes, que ce soit en agissant directement au niveau de promoteurs ou en formant un complexe de transcription avec le facteur RelA (Krausgruber *et al.*, 2010).

Dans les macrophages, lorsque IRF-5 est induit par un environnement inflammatoire, il permet de polariser les macrophages en type M1 (macrophages pro-inflammatoires) et active directement la transcription de gènes pro-inflammatoires dont ceux de l'interleukine 12 et de l'interleukine 23 et réprime la transcription du gène codant pour l'interleukine 10, anti-inflammatoire, bien que d'autres membres de cette famille puissent être impliqués dans ce phénomène (Gunthner *et al.*, 2013, Krausgruber *et al.*, 2011). De la même manière que dans les cellules dendritiques, IRF-5 interagit avec RelA pour pouvoir se lier à l'ADN (Saliba *et al.*, 2014).

Les neutrophiles présents dans le liquide synovial de souris arthritiques sont aussi capables d'exprimer IRF-5 après stimulation *in vitro* avec un agoniste du TLR9. IRF-5 est nécessaire pour la production de plusieurs cytokines (IL-10, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , et TNF) (Weiss *et al.*, 2015).

La différenciation des lymphocytes B est dépendant d'IRF-5, puisque des souris déficientes pour IRF-5 ont une accumulation de lymphocytes CD19⁺ B220⁻ qui montrent des dysfonctionnements (Lien *et al.*, 2010). En effet, les lymphocytes B déficients pour IRF-5 n'effectuent pas de recombinaison de classe isotypique efficace envers les immunoglobulines de type IgG2, qui est un isotype impliqué dans la réponse antivirale et les maladies auto-immunes (Fang *et al.*, 2012, Savitsky *et al.*, 2010).

Enfin, de récentes études au sein du laboratoire ont mise en évidence que les lymphocytes T expriment IRF-5 durant une infection par *L. donovani* (Paun *et al.*, 2011). Depuis d'autres travaux ont observés l'expression d'IRF-5 par les lymphocytes T que ce soit dans le cas de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (Stone *et al.*, 2012) ou lors d'infection de lignées cellulaires de lymphocytes T par le virus HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type 1) (Ishikawa *et al.*, 2015). Mais à ce jour, les fonctions d'IRF-5 dans les lymphocytes T sont encore inconnues.

2.2 Les voies d'activation d'IRF-5

2.2.1 Les TLRs

Bien qu'il existe plusieurs voies d'activation d'IRF-5 (**Figure 1.4**), la voie d'activation la plus étudiée est probablement celle mettant en jeu les TLRs, et plus particulièrement le TLR7 et le TLR9. Lors de l'activation des TLR7/9, la protéine adaptatrice MyD88 et l'ubiquitine ligase TRAF6 interagissent avec IRF-5. Contrairement à IRF-7 qui interagit avec MyD88 au niveau du domaine de mort, IRF-5 se lie à la partie centrale de MyD88 qui est le domaine intermédiaire, faisant partie du domaine « Toll/Interleukine-1 Receptor » (TIR) (Negishi *et al.*, 2005). Il s'en suit l'activation d'IRF-5, qui se traduit par différentes modifications post-traductionnelles et son homodimérisation, puis sa translocation au niveau du noyau (Takaoka *et al.*, 2005). Une fois dans le noyau, IRF-5 se lie à des séquences consensus ISRE qui se situent dans les régions promotrices de gènes cibles tels que les gènes codant pour l'interleukine 6 ou le TNF (Krausgruber *et al.*, 2010).

2.2.2 Les senseurs cytosoliques

Comme nous l'avons déjà vu, la super-famille des senseurs cytosoliques regroupe plusieurs familles, dont entre autre les RLRs et les NLRs. Certains éléments présents dans la chaîne de transduction du signal des TLRs sont aussi communs à d'autres voies, comme TRAF6 qui est aussi impliqué dans la voie de signalisation de NOD2 (Abbott *et al.*, 2007). À travers TRAF6, NOD2 a également été montré comme étant un activateur potentiel d'IRF-5 (Chang Foreman *et al.*, 2012, Pandey *et al.*, 2009). Bien que l'activation d'IRF-5 par la famille des RLRs ne soit pas la plus efficace, certaines études ont démontré que la voie de signalisation de RIG-I était impliquée dans son activation (Paun *et al.*, 2008).

2.2.3 L'interféron de type I et les virus

Outre les activations classiques à travers des récepteurs membranaires ou cytosoliques il existe des voies d'activation alternatives. Certains virus sont capables d'induire la production d'interféron alpha en activant spécifiquement IRF-5, dont le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). Cependant, tous les virus n'ont pas cette capacité, puisque le virus Sendai par exemple dans les mêmes conditions, n'induit pas l'activation IRF-5 (Barnes *et al.*, 2002, Barnes *et al.*, 2001). D'autres passent par l'interféron de type I, qui est capable d'induire directement la transcription du gène codant pour IRF-5 (Barnes *et al.*, 2001).

2.2.4 Les complexes immuns et le matériel apoptotique

Enfin, une autre source d'activation d'IRF-5 viendrait des complexes immuns ou des complexes formés de matériels apoptotiques ou nécrotiques. Les complexes immuns, qui sont composés d'immunoglobulines et d'ARN, ont la capacité d'induire la production d'interféron de type I dans des cellules dendritiques murines via l'activation d'IRF-5. Les complexes immuns peuvent se lier aux FcγR qui sont internalisés et l'ARN contenu dans les complexes immuns peut interagir avec le TLR7 (Yasuda *et al.*, 2007). En ce qui concerne les complexes formés par le matériel apoptotique/nécrotique des observations ont été faites chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique. Leur sérum contiendrait des débris de cellules mortes

permettant l'activation d'IRF-5 dans les monocytes circulant dans le sang. Cependant, la voie d'activation impliquée dans ce processus n'a pas encore été décrite (Stone *et al.*, 2012).

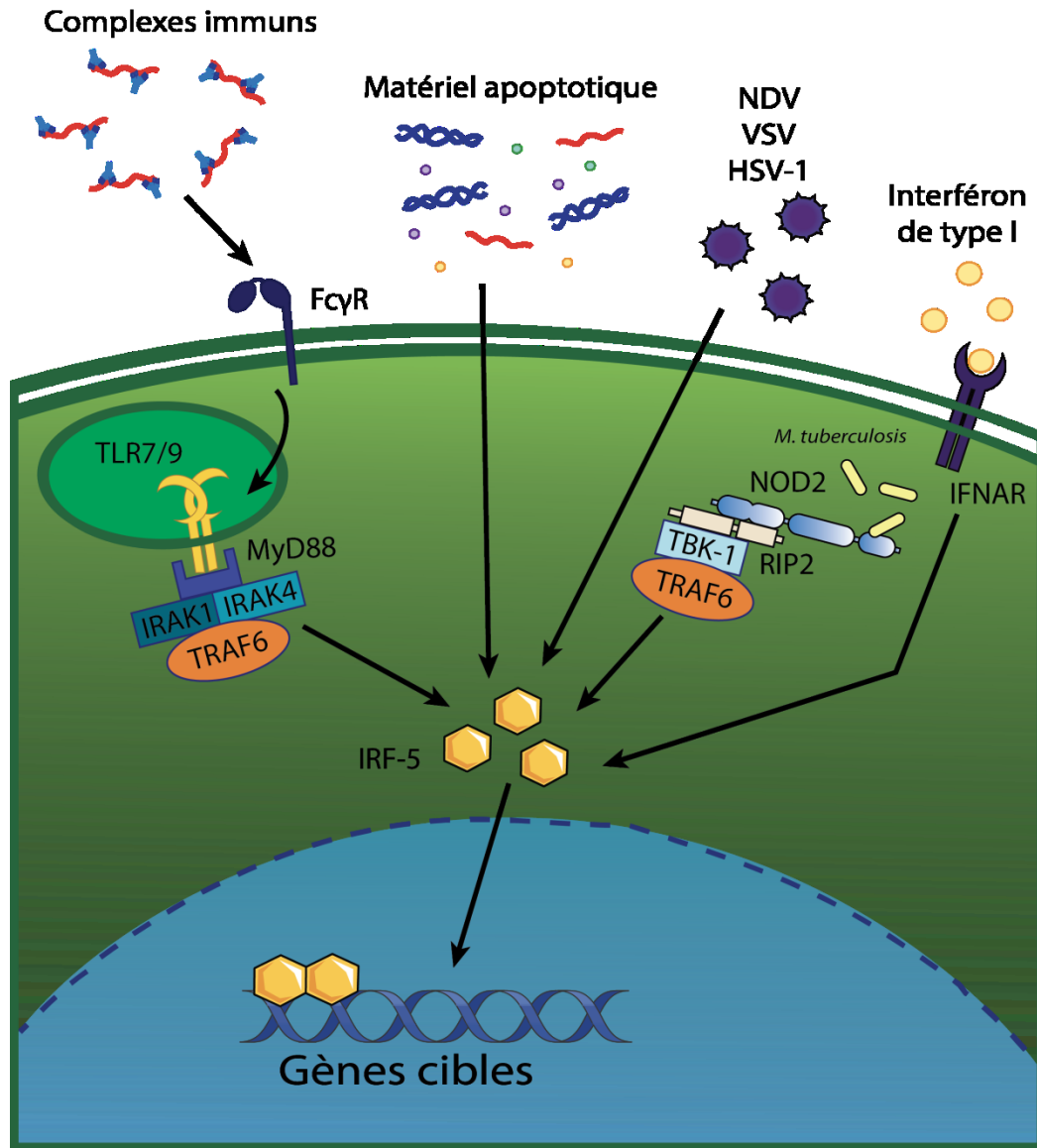


Figure 1.4 : Les voies d'activation d'IRF-5.

Représentation schématique des différentes voies d'activation possible pour IRF-5. IRF-5 peut être activé par la voie des TLRs (TLR7/9) qui recrutent la protéine adaptatrice MyD88, ce qui active les kinases IRAK1 et 4 ainsi que l'ubiquitineuse TRAF6, nécessaires à l'activation d'IRF-5 qui permet sa translocation au noyau et d'activer la transcription de gènes cibles. La voie des TLRs peut être directement activée par la détection de PAMPs ou via une interaction avec les FcγR endocytés ayant préalablement fixés des complexes immuns. La détection de *M. tuberculosis* par NOD2 entraîne également l'activation d'IRF-5 à travers la voie RIP2/TBK-1/TRAF6. Enfin, l'activation d'IRF-5 peut se faire par l'interaction de l'interféron de type 1 avec IFNAR, ou directement par des agents pathogènes ou du matériel apoptotique.

2.3 Régulation et activation d'IRF-5

2.3.1 Les régulations négatives

Toutes les modifications post-traductionnelles ou les interactions d'IRF-5 avec d'autres protéines ne sont pas forcément synonyme d'activation. En effet, une régulation négative est nécessaire pour éviter tout emballement du système. Il y a pour cela plusieurs moyens possibles, comme la compétition de liaison que ce soit au niveau de la protéine MyD88 ou au niveau du promoteur de gènes cibles (**Figure 1.5**). Par exemple, l'activation des TLRs induit l'expression d'IRF-4 qui entre en compétition avec IRF-5 pour se lier sur la protéine Myd88, de ce fait les souris déficientes pour IRF-4 ont une sensibilité accrue au choc endotoxique (Negishi *et al.*, 2005). Dans le cas d'IRF-3 activé par la voie des RLRs, il entre en compétition avec IRF-5 activé par la voie du TLR7 au niveau du gène codant pour la sous-unité p40 de l'interleukine 12 (Negishi *et al.*, 2012). Une autre manière de réguler l'activité d'IRF-5 passe à travers les modifications post-traductionnelles, la protéine ubiquitine ligase E3 « TRIPartite Motif-containing protein 21 » (TRIM21) qui peut induire une ubiquitination de type K48 ou K63 induit la dégradation d'IRF-5 suite à son activation par le TLR7 (Lazzari *et al.*, 2014). D'autres protéines peuvent interagir directement avec IRF-5 et mener à une régulation négative de son activité. La kinase Lyn, qui fait partie de la famille des Src kinases, est recrutée au niveau du complexe formé par MyD88, parmi d'autres kinases ou ubiquitinases. De par son interaction, elle pourrait masquer les résidus qui sont la cible des modifications post-traductionnelles ou même séquestrer certaines de ces enzymes. Cette régulation par Lyn semble essentielle puisque dans le cas de souris déficientes pour *Lyn*, on observe une hyperactivation des cellules dendritiques jumelée à une très forte production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation de différents TLRs, ainsi que le développement de symptômes similaires à un lupus (Ban *et al.*, 2016).

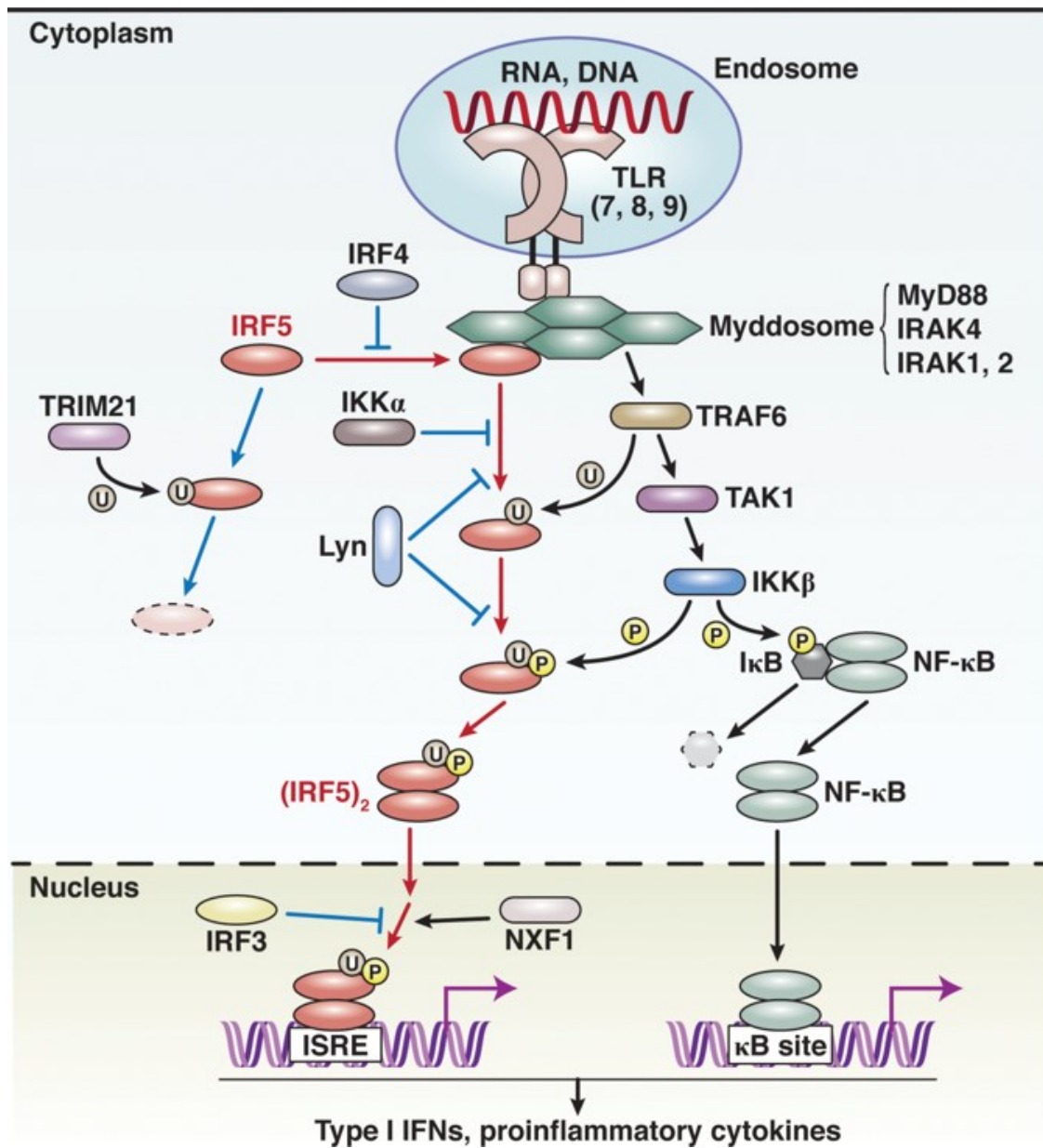


Figure 1.5 : Régulation de l'activité d'IRF-5 dans les voies des TLR7/8/9.

Dans la voie de signalisation en aval de ces TLR, l'activité d'IRF5 est régulée par plusieurs mécanismes. Les flèches rouges indiquent les événements de la voie d'activation IRF5, à savoir l'association avec MyD88, l'ubiquitination, la phosphorylation, la dimérisation, la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de gènes cibles. Les flèches bleues et les barres bleues indiquent la régulation négative de l'activité d'IRF5: l'IRF4 est en compétition avec l'IRF5 pour son interaction avec MyD88; IRF3 interfère avec la liaison IRF5 à ISRE; TRIM21 ubiquitine l'IRF5 et régule sa dégradation lors de la stimulation du TLR; IKK α phosphoryle IRF5 pour inhiber son ubiquitination par TRAF6; Lyn se lie directement à IRF5 et supprime son activité en inhibant les modifications post-traductionnelles d'IRF5 (à la fois l'ubiquitination et la phosphorylation) d'une manière indépendante de son activité kinase. Extrait de (Ban *et al.*, 2018).

2.3.2 La phosphorylation

Lors de son activation IRF-5 subit plusieurs modifications post-traductionnelles (**Figure 1.6**). Parmi ces modifications on retrouve les phosphorylations et les ubiquitinations. Les différents sites de phosphorylations ont été largement investigués et différentes études ont décrit plusieurs résidus porteurs de ces modifications ainsi que les changements fonctionnels qui sont associés. Les sites phosphorylés sont dépendants du mode d'activation, par exemple lors d'une infection avec le NDV les résidus sérine S427 et S430 vont être phosphorylés, mais pas dans le cas d'un dommage à l'ADN (Cheng *et al.*, 2006, Hu *et al.*, 2005). Ces sérines S427 et S430 se situent dans la région riche en sérine qui est un domaine d'interaction avec d'autres protéines. Les sérines S156 et S158 sont quant à elles impliquées dans la translocation d'IRF-5 au noyau puisqu'elles font partie du domaine intermédiaire, dont fait partie la séquence d'exportation au noyau (NES). La mutation de ces sérines en alanines entraîne une translocation constitutive d'IRF-5 dans le noyau (Lin *et al.*, 2005). Alors que la sérine S436 est impliquée dans la stabilisation des homodimères d'IRF-5 (Chen *et al.*, 2008b), elle est phosphorylée par la kinase « Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase beta » (IKK β) et participe donc à l'activation d'IRF-5 (Lopez-Pelaez *et al.*, 2014, Ren *et al.*, 2014). Plusieurs autres sites ont été mis en évidence basé sur un alignement de séquence polypeptidiques ainsi que sur de la spectrométrie de masse mais leurs fonctions ne sont pas encore toutes découvertes (Chang Foreman *et al.*, 2012).

2.3.3 L'ubiquitination

Comme beaucoup d'autres voies de signalisation, la E3 ubiquitine ligase « TNF Receptor Associated Factor 6 » (TRAF6) est impliquée dans l'ubiquitination d'IRF-5. Les résidus lysine K401 et K402 reçoivent une ubiquitination de type K63, qui est important pour la régulation de sa translocation au noyau. Les principaux sites d'ubiquitination sont les lysines K401 et K402 (Balkhi *et al.*, 2008). Il semblerait que la protéine « Interleukine-1 Receptor-Associated Kinase 1 » (IRAK1) soit indispensable à ce processus. Bien que sa fonction dans ce mécanisme en particulier ne soit pas clairement établie, les souris déficientes pour la protéine IRAK1 montrent des défauts d'ubiquitination d'IRF-5. Ces ubiquitinations sont requises pour l'adressage d'IRF-5 dans le compartiment nucléaire (Balkhi *et al.*, 2008).

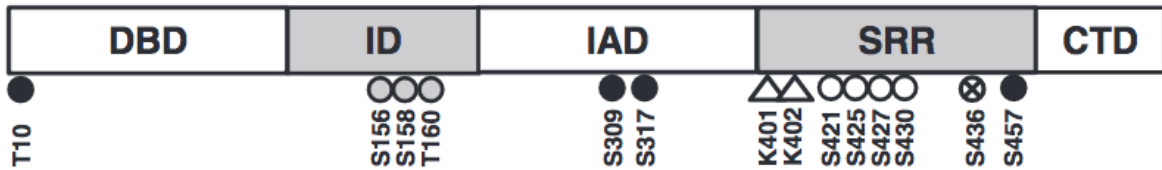


Figure 1.6 : Sites de phosphorylation et d'ubiquitination sur la protéine IRF-5.

Les cercles représentent des sites de phosphorylations, les blancs permettent les interactions protéiques, les gris permettent la translocation nucléaire, le barré permet la stabilisation de dimères et les noirs ont des fonctions inconnues. Les triangles blancs représentent des sites d'ubiquitination impliqués dans la translocation nucléaire. DBD : DNA Binding Domain, ID : Intermediate Domain, IAD : IRF-Associated Domain, SRR : Serine-Rich Region and CTD : C-Terminal Domain, extrait de (Ryzhakov *et al.*, 2015).

2.3.4 Dimérisation et translocation nucléaire

IRF-5, tout comme les autres IRFs, se dimérise après avoir subi les modifications post-traductionnelles. Cela entraîne un changement de conformation dans la partie C-terminale, permettant les interactions avec d'autres protéines que ce soient des IRFs ou des co-facteurs. IRF-5 est par exemple capable de former des homodimères et d'interagir avec la protéine CBP/p300 qui est un co-facteur de transcription (Chen *et al.*, 2008b). Mais pour se rendre jusqu'au noyau IRF-5 doit être pris en charge par des transporteurs nucléaires. Il a été démontré que IRF-5 peut être transporté dans le noyau grâce à la protéine karyophérine (KAP) $\alpha 1$ et $\beta 1$ (Yeon *et al.*, 2008) et plus récemment que la protéine « RNA export Factor 1 » (NXF1) semblerait elle aussi impliquée dans le transport d'IRF-5 vers le compartiment nucléaire (Fu *et al.*, 2017).

2.4 Les fonctions d'IRF-5

2.4.1 L'inflammation

Le rôle d'IRF-5 dans l'inflammation est très bien documenté, et une des démonstrations de l'importance d'IRF-5 dans le mécanisme de réponse inflammatoire est la résistance des souris déficientes pour *Irf5* à un choc endotoxique léthal (Takaoka *et al.*, 2005). En effet, l'injection de CpG (agoniste de TLR9) ou de LPS (agoniste de TLR4) à des doses létales, entraîne une inflammation tellement forte que les souris meurent à environ 10h post-injection. On retrouve de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum (interleukine 6, interleukine 12 et TNF). Cependant, les souris déficientes pour *Irf5* ne meurent pas après l'injection de la même dose de CpG ou de LPS et les quantités de cytokines pro-inflammatoires sont beaucoup plus faibles. L'implication d'IRF-5 dans d'autres mécanismes liés à la réponse inflammatoire est venue étayer ces résultats. En effet, lors d'une infection virale les mêmes cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées ainsi que l'interféron de type I, et participent au phénomène d'inflammation que ce soit à travers l'activation d'IRF-5 par la voie de signalisation des TLRs ou bien directement par certains virus (Barnes *et al.*, 2001, Barnes *et al.*, 2004, Paun *et al.*, 2008, Schoenemeyer *et al.*, 2005). De plus, IRF-5 peut agir directement ou indirectement sur le contrôle d'une infection. Lors d'une infection par *L. donovani* l'activation d'IRF-5 amène à une réponse protectrice contre le parasite, en favorisant la production d'oxyde nitrique par les macrophages mais aussi en induisant la production d'interleukine 12 par les cellules dendritiques. En effet, il a été démontré qu'une délétion totale d'*Irf5* amène à une incapacité à contrôler l'infection par *L. donovani*. La production d'interleukine 12 étant indispensable au développement et au maintien de la réponse de type Th1, qui est essentielle pour lutter efficacement contre une infection par *L. donovani* (Paun *et al.*, 2011). Mais de manière contradictoire, il est intéressant de noter que IRF-5 participe à l'induction du facteur HIF-1 α dans les cellules dendritiques, ce qui a pour effet de diminuer la production d'interleukine 12 et d'augmenter celle d'interleukine 10. Cela a pour conséquence de limiter l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ durant la phase aigüe de la maladie. Une délétion spécifique de HIF-1 α dans les cellules dendritiques permet de mieux contrôler l'infection. (Hammami *et al.*, 2015). En parallèle, d'autres études ont montré que l'induction d'IRF-5 dans les macrophages, de par l'environnement inflammatoire, induit la transcription de l'interleukine 12 et de l'interleukine 23, qui sont toutes deux des cytokines pro-inflammatoires mais répriment la transcription de l'interleukine 10 qui est une cytokine anti-inflammatoire favorisant de ce fait les réponses de type Th1 et Th17 (Krausgruber *et al.*, 2011).

Cependant l'inflammation induite par IRF-5 n'est pas forcément bénéfique. Elle peut être délétère dans plusieurs tissus et mener à différentes pathologies, comme dans le tissu adipeux où elle provoque une croissance plus importante des adipocytes et une perte de sensibilité à l'insuline (Dalmás *et al.*, 2015). L'activation d'IRF-5 dans les macrophages du foie, par le virus de l'hépatite C ou durant une stéatose hépatique non alcoolique, induit une fibrose du tissu. Alors que les souris dont les macrophages sont déficients pour *Irf5* ne présentent plus de signes de fibrose hépatique après divers traitements (Alzaid *et al.*, 2016), la diminution d'expression d'IRF-5 dans les macrophages présents au niveau du cœur après un infarctus via des siRNA facilite la résolution de l'inflammation créée, en favorisant la polarisation des macrophages en macrophages de type M2 (anti-inflammatoires) essentiels pour la cicatrisation des blessures (Courties *et al.*, 2014).

2.4.2 Les maladies auto-immunes

IRF-5 étant impliqué dans plusieurs facettes du développement des cellules immunitaires, il n'est pas étonnant d'apprendre qu'il est également impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies auto-immunes. Dans le cas du lupus érythémateux systémique (SLE), il a été démontré que les souris déficientes pour *Irf5* ne développent pas la maladie dans un modèle d'induction au pristane. En effet, la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th2 est favorisée, diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et en particulier d'interféron alpha qui est largement impliqué dans la pathogénèse du SLE (Xu *et al.*, 2012). De plus, l'altération de la migration de monocytes Ly6C^{hi} dans la cavité péritonéale dû à une diminution de l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR2 est un autre facteur limitant la pathogénèse (Yang *et al.*, 2012). Enfin, IRF-5 est impliqué dans le développement du SLE en permettant la différenciation des lymphocytes B ainsi que la commutation de classe isotypique. Ceci engendre la production potentielle d'autoanticorps dirigés contre les éléments du noyau (ADN, histone ou nucléosome), qui font partie des caractéristiques de la maladie (Fang *et al.*, 2012, Feng *et al.*, 2012, Savitsky *et al.*, 2010).

L'arthrite rhumatoïde est une autre maladie auto-immune caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires au niveau des articulations, dans la capsule synoviale. Les symptômes en résultant sont des douleurs et des gonflements des articulations (en particulier au niveau des mains, des pieds et des genoux) ainsi qu'une sensibilité accrue aux infections et aux maladies cardio-vasculaires. Plusieurs mutations du locus d'*Irf5* ont été associées au développement de

la maladie dans les populations européennes (Dawidowicz *et al.*, 2011). La présence d'auto-anticorps dirigés contre les peptides cycliques citrullinés (CCP) est un marqueur spécifique de cette maladie. Mais il a aussi été démontré que le principal médiateur de l'inflammation au niveau de la capsule synoviale est le TNF. En effet, lorsque l'on isole des cellules immunitaires provenant de la synovie, on détecte une grande quantité de TNF produit, qui est capable d'induire la production d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 β (Brennan *et al.*, 1989). Cependant les études avec différents modèles murins d'arthrite semblent montrer des résultats contradictoires puisque dans le modèle d'arthrite induite par antigène les souris déficientes pour *Irf5* ont un défaut d'afflux de neutrophiles vers la capsule synoviale, bien que la capacité de migration des neutrophiles soit intacte (Weiss *et al.*, 2015) alors que dans le modèle d'arthrite induite par collagène ne montre pas d'effets pour les souris déficientes en *Irf5* (Savitsky *et al.*, 2010).

Le terme de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD) regroupe plusieurs maladies dont la cause n'est pas forcément connue et qui affectent le système gastro-intestinal. Parmi elles, on peut citer la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse. L'inflammation au niveau de l'intestin peut résulter d'un défaut de tolérance périphérique par manque de lymphocytes T régulateurs (Hadis *et al.*, 2011), ce qui aboutit à un défaut dans l'équilibre de la réponse immunitaire face aux bactéries commensales. Chez l'Homme, des mutations de gain de fonction ont été trouvées dans le locus d'*Irf5* et sont associées avec une augmentation du risque de développer une IBD (Dideberg *et al.*, 2007). Bien qu'IRF-5 n'est jamais été formellement identifié dans le développement ou le maintien de ces maladies, son rôle connu dans les voies de signalisation des TLRs et des NLRs pourrait être à la base de l'inflammation en induisant une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse à la détection des bactéries.

2.4.3 Le cycle cellulaire

Du fait que certains membres de la famille des IRFs sont connus pour avoir un impact sur le cycle cellulaire, il était intéressant de vérifier si IRF-5 pouvait lui aussi être impliqué. Les premières observations ont été faites dans des cellules cancéreuses primaires. Ces cellules n'exprimant pas d'IRF-5, celui-ci pourrait intervenir dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire. De plus, une expression ectopique d'IRF-5 dans une lignée de lymphocytes B cancéreux induisait un arrêt du cycle cellulaire à la phase G₂-M du cycle cellulaire et donc inhibait la croissance cellulaire. D'un point de vue moléculaire, IRF-5 induit la transcription de p21, qui appartient à la famille des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines, et en

parallèle empêcher la transcription de la cycline B1 (Barnes *et al.*, 2003). Cependant d'autres études ont eu des résultats inverses. En effet, des travaux menés avec des lymphocytes B primaires ont montré que lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* pour induire une prolifération (avec un anti-IgM, du CpG, du CD40L et de l'interleukine 21), ceux qui sont transduits avec des ARN interférents pour IRF-5 prolifèrent moins bien comparativement au contrôle (De *et al.*, 2017). De même il a été observé que dans le cas de cancers de la thyroïde, IRF-5 aurait un effet protecteur et améliorerait la prolifération des cellules tumorales en les protégeant des effets cytotoxiques des agents chimio-thérapeutiques causant des dommages à l'ADN (Massimino *et al.*, 2012). Les effets contradictoires observés dans ces différentes études pourraient s'expliquer par le fait que les cellules utilisées dans les expériences ne sont pas les mêmes (lignées cancéreuses et cellules primaires), et que les voies de signalisation menant à l'expression ou l'activation d'IRF-5 ne sont pas non plus les mêmes pour chaque modèle d'étude.

2.4.4 L'apoptose

En plus d'être impliqué dans la régulation de la prolifération, IRF-5 peut également être impliqué dans le phénomène d'apoptose. Dans un modèle d'étude avec une lignée de lymphocytes B cancéreux, IRF-5 via son activité de régulation de transcription peut induire la transcription de certains gènes pro-apoptotiques dont *Bak*, *Bax* et *Caspase 8*. Son effet est indépendant et partiellement redondant à celui du facteur de transcription p53. L'augmentation de transcription de tels gènes mène à une sensibilisation des cellules à la mort cellulaire par apoptose et lui conférer des propriétés anti-tumorales (Barnes *et al.*, 2003). Par la suite, d'autres études sont venues confirmer ce point. Toujours de manière p53 indépendante, IRF-5 est capable de sensibiliser à l'apoptose des cellules du cancer du côlon après traitement avec l'irinotécan qui est un inhibiteur de la topoisomérase I (Hu *et al.*, 2005). Cet effet pro-apoptotique se retrouve également durant une infection virale, alors que l'infection de fibroblastes embryonnaires de souris par le VSV entraîne la mort de ces derniers, les mêmes fibroblastes déficients pour *Irf5* sont plus résistants à l'apoptose suite à l'infection (Yanai *et al.*, 2007). Mais des études plus récentes ont mises à jour le rôle d'IRF-5 suite à l'induction de l'apoptose par certains récepteurs membranaires. Les souris déficientes pour *Irf5* montrent un taux de mortalité très faible après injection d'un anticorps activant le récepteur Fas. Ce sont en particulier les hépatocytes et les cellules dendritiques qui sont normalement les plus sensibles à l'apoptose après ce traitement (Couzinet *et al.*, 2008). IRF-5 peut aussi sensibiliser différentes

lignées de cellules tumorales à la mort cellulaire en induisant l'expression du récepteur de mort (DR5) ainsi que celle de la caspase 8, mais il serait aussi nécessaire pour induire l'apoptose à travers la voie de signalisation de TRAIL-DR5 (Hu *et al.*, 2009).

3 LEISHMANIA

3.1 La *Leishmania*

Leishmania est un parasite de type protozoaire qui, selon les espèces, peut se révéler pathogène pour l'être humain. La première identification remonte à 1901 par le pathologiste William B. Leishman qui observa les parasites dans un prélèvement de rate d'un soldat britannique mort d'une forte fièvre et les nomma « corps de Leishman ». Quelques années plus tard en 1903, le docteur Charles Donovan identifia les « corps de Leishman » comme l'agent causatif du Kala-azar (la fièvre noire), et seront finalement classifiés sous le nom de *Leishmania donovani*. Au fil des années, de nouvelles espèces de *Leishmania* seront découvertes et associées à différentes maladies, aussi bien chez l'Homme que chez la plupart des animaux.

3.1.1 Les différents types de leishmaniose

Les parasites de types *Leishmania* sont donc les agents causatifs de différentes pathologies, qui dépendent de l'espèce de *Leishmania* concernée mais également de la réponse immunitaire de l'hôte (Grevelink *et al.*, 1996). Chez l'être humain, il existe différentes formes de la maladie, la leishmaniose cutanée, la leishmaniose muco-cutanée, la leishmaniose cutanée diffuse, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose dermique post-Kala Azar (Evans, 1993a, Evans, 1993b, Roberts *et al.*, 2000). Ces maladies sont réparties dans de nombreux pays à travers le monde, bien qu'en ce qui concerne la leishmaniose viscérale, 90% des nouveaux cas sont recensés dans seulement six pays à savoir le Brésil, le Soudan, le Soudan du sud, la Somalie, l'Éthiopie et l'Inde (WHO, 2017) (**Figure 1.7 et 1.8**).

La leishmaniose cutanée peut être due à un grand nombre d'espèces de *Leishmania* différentes telles que *L. mexicana*, *L. major*, *L. tropica* ou *L. aethiopica*. La lésion se développe autour du point d'injection du parasite par le vecteur infecté sous la forme d'une papule prurigineuse rouge sombre. Quelques jours à quelques mois après la morsure, la lésion devient ulcéreuse et se recouvre de fines squames. La guérison est spontanée, mais il est nécessaire d'attendre plusieurs mois, voir plusieurs années, avant qu'elle ne soit complète et qu'elle ne laisse des cicatrices indélébiles.

La leishmaniose muco-cutanée, causée par exemple par *L. braziliensis* ou *L. panamensis*, peut se développer après la dissémination du parasite de la peau vers les

muqueuses dans les un à cinq ans suivant la guérison d'une leishmaniose cutanée, ou simultanément à celle-ci. Dans ce cas, les tissus sont rapidement atteints entraînant d'importantes lésions qui peuvent aboutir à leur nécrose. Ce sont principalement les muqueuses naso-buccales qui sont touchées, pouvant complètement défigurer le patient suivant l'importance des lésions.

La leishmaniose cutanée diffuse est une forme rare de leishmaniose qui a été décrite au Venezuela dans les années 40 ainsi qu'en Éthiopie dans les années 60. Se sont les espèces qui sont à l'origine de la leishmaniose cutanée qui peuvent mener à une leishmaniose cutanée diffuse (Hashiguchi *et al.*, 2016). De ce fait, cette forme de leishmaniose ne dépend pas de l'espèce considérée, mais plutôt des particularités immunologiques de l'hôte. Il semblerait qu'un défaut de la réponse immunitaire soit à la base de cette pathologie, qui se caractérise par l'apparition de nombreuses papules qui peuvent soit rester localisées, soit se distribuer à travers tout le corps mais qui ont la particularité d'être riche en parasites (Ashford, 2000).

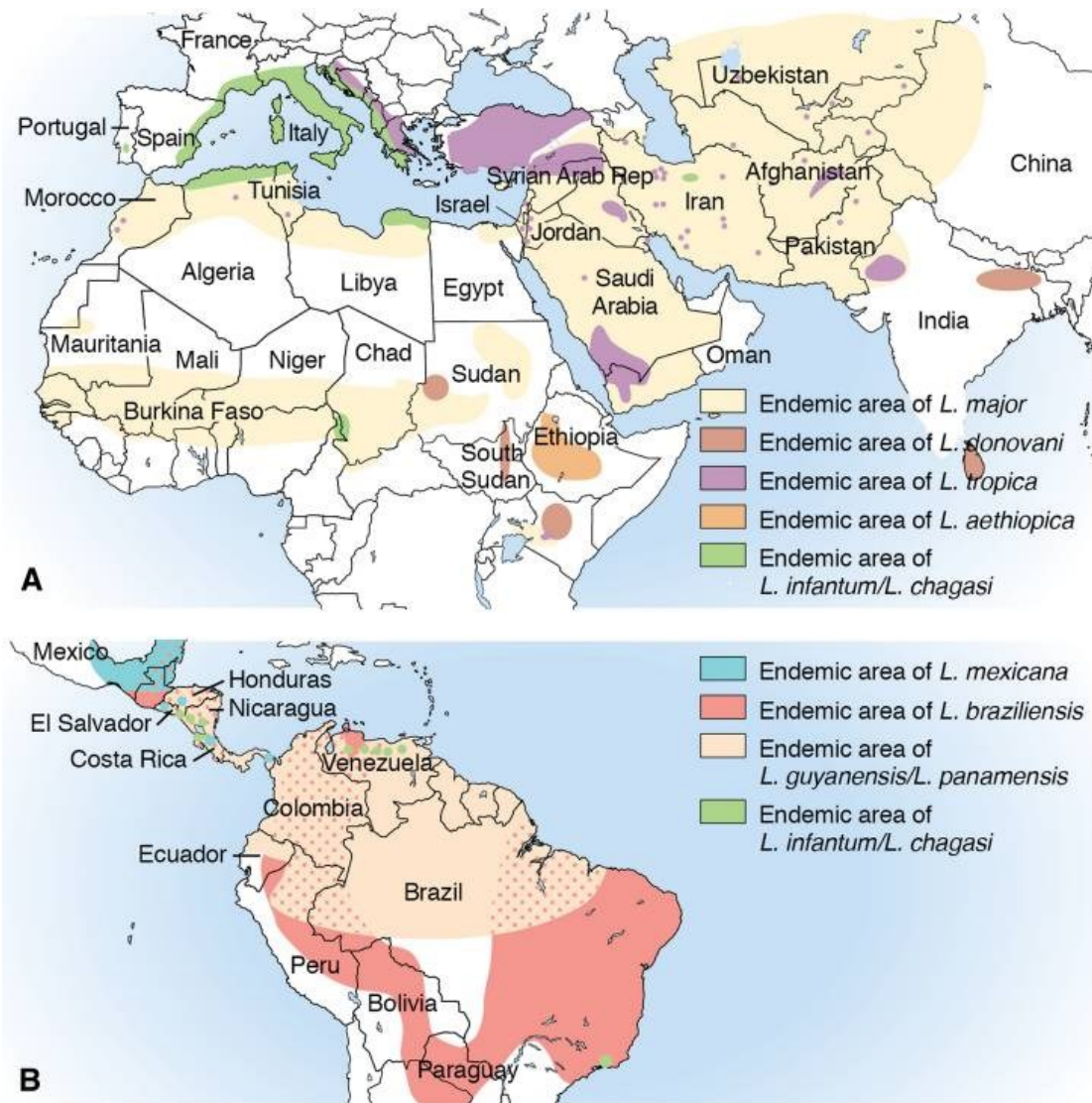


Figure 1.7 : Aires de répartition des différentes espèces de *Leishmania* à travers le monde. Extrait de (Aronson *et al.*, 2017).

La leishmaniose viscérale aussi connue sous le nom de Kala-azar, est causée principalement par *L. donovani* et *L. infantum/chagasi*. C'est la forme la plus sévère de leishmaniose caractérisée par de fortes fièvres irrégulières, une pancytopénie, une hypergammaglobulinémie, une immunodéficience et une hépato-splénomégalie. La majorité des cas sont létales s'ils ne sont pas pris en charge à temps, notamment à cause des infections secondaires qui se développent à la suite de l'immunodéficience acquise.

La dernière forme est la leishmaniose dermique post Kala-Azar qui peut survenir à la suite d'une leishmaniose viscérale, de quelques mois à quelques années après que cette dernière fut complètement guérie (Ashford, 2000). Ce sont essentiellement l'Inde et le Soudan

qui sont touchés par cette forme de la maladie, qui se caractérise également par l'apparition d'éruptions cutanées ou de lésions maculopapuleuses. Bien que cette forme ne soit pas létale, elle représente tout de même un enjeu de santé publique car les lésions contiennent de fortes concentrations de parasites, jouant ainsi le rôle de réservoir, et tient probablement un rôle important durant les périodes inter épidémiques (Zijlstra *et al.*, 2003).

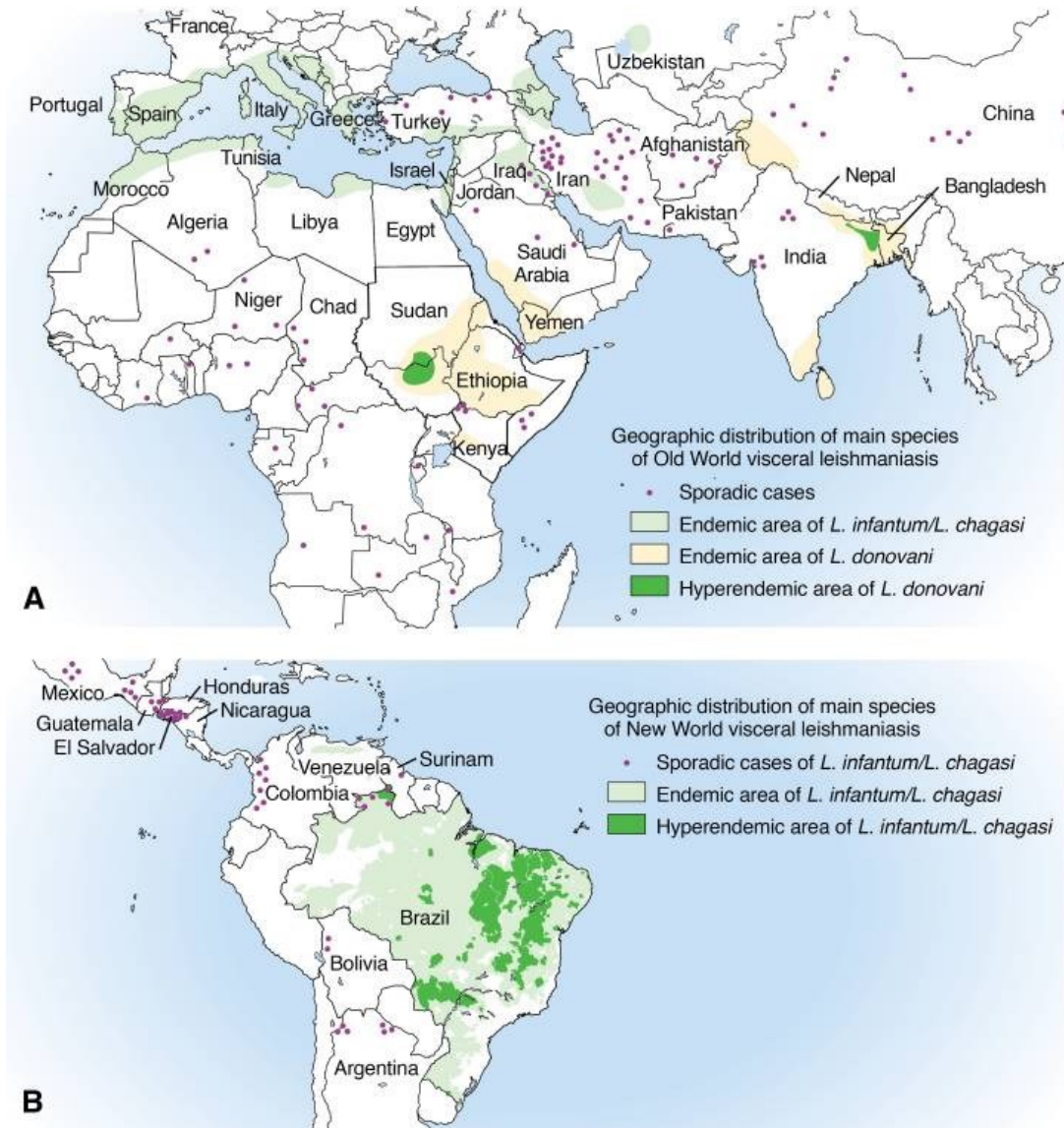


Figure 1.8 : Aires de répartition des espèces responsables de la leishmaniose viscérale à travers le monde. Extrait de (Aronson *et al.*, 2017)

3.1.2 Les traitements

Avant de pouvoir entamer la phase de traitement, il est nécessaire de diagnostiquer la forme de leishmaniose ainsi que l'espèce de parasite concernée. Pour ce faire, il existe plusieurs techniques de diagnostic que ce soit par l'analyse histologique des tissus, la culture de parasites, la détection d'ADN par PCR ou encore la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum du patient. La plupart de ces tests doivent être effectués sur des biopsies des organes infectés, que ce soit des morceaux de tissus collectés d'une lésion de leishmaniose cutanée ou muco-cutanée, ou par prélèvement de moelle osseuse dans les cas de leishmaniose viscérale ou à l'aide de tests sérologiques (Aronson *et al.*, 2017). D'une manière générale, les cas de leishmaniose viscérale ou muco-cutanée sont automatiquement traités alors que dans le cas de leishmaniose cutanée, tous ne feront pas l'objet de traitement dépendamment du parasite et de la zone géographique concernée. Par exemple, le traitement de la leishmaniose cutanée sera préconisé pour prévenir le développement d'une leishmaniose muco-cutanée ou pour accélérer la guérison des lésions. Les traitements classiquement utilisés pour combattre les différentes formes de leishmanioses sont à base de dérivés d'antimoine, d'amphotéricine B et de miltéfosine. Dans les cas de leishmaniose muco-cutanée on ajoutera des corticostéroïdes afin d'éviter l'obstruction des voies respiratoires supérieures. Enfin, il est possible d'utiliser les médicaments de la famille des « azoles » tels que le kétoconazole et le fluconazole, qui peuvent être prescrits lors de l'infection par certaines espèces comme *L. mexicana*, *L. panamensis* ou *L. major* bien que leur efficacité soit variable. À l'heure actuelle il n'existe aucun traitement ou vaccin prophylactique permettant de prévenir les leishmanioses. Les mesures préventives consistent donc à limiter le contact avec le vecteur en portant des vêtements protégeant des morsures et en appliquant, aussi bien sur les vêtements que sur les zones de peau exposées, des produits repoussant les insectes. Enfin, dormir dans des espaces protégés par des écrans anti-moustiques enduits d'insecticides (Aronson *et al.*, 2017, Brunette, 2017).

3.2 Développement des promastigotes chez le vecteur

Les principaux vecteurs pour les leishmanioses sont les phlébotomes et les lutzomyias, appartenant tous les deux à l'ordre des diptères, regroupés sous le nom de mouche des sables (Dostalova *et al.*, 2012). Ce sont de petits insectes ne dépassant pas les 2mm de long, répartis principalement dans les zones tropicales et subtropicales à travers le monde, mais des observations de transmission de *Leishmania* par ces insectes ont déjà été reporté jusqu'en Allemagne (Naucke *et al.*, 2008).

Les parasites de type *Leishmania* ont un cycle de vie dimorphique qui nécessite une alternance entre son vecteur et l'hôte pour être complété. Quand il se trouve dans le vecteur, le parasite est sous forme de promastigotes au niveau de l'appareil digestif. Les promastigotes se présentent sous la forme d'un corps allongé qui ont une taille comprise entre 15 et 20 μm avec un long flagelle situé à l'arrière du corps qui peut être aussi long que le corps lui-même. Le flagelle leur donne la possibilité de se déplacer facilement dans leur environnement extracellulaire. Une autre caractéristique du promastigote est de pouvoir survivre en-dehors d'une cellule. Mais le terme promastigote est un terme générique qui regroupe plusieurs stades de développement. Le premier stade de développement est celui du promastigote procyclique, qui correspond à la première forme répliquative du parasite très tôt après le repas sanguin du vecteur. Après 48h à 72h, la réplication du parasite diminue et il se différencie en long promastigote nectomonade (Rogers *et al.*, 2002). Puis le parasite migre vers l'intestin antérieur et se différencie en promastigote leptomonade (Rogers *et al.*, 2002), qui subit un second cycle de réplication (Gossage *et al.*, 2003). La migration continue au niveau de la valve stomodéale avec la forme promastigote haptomonade, qui s'avère essentielle pour le bon déroulement de l'infection (**figure 1.9**). Finalement, l'ultime stade de différenciation est celui du promastigote métacyclique, qui sera la forme infectieuse du parasite (Sacks *et al.*, 1985).

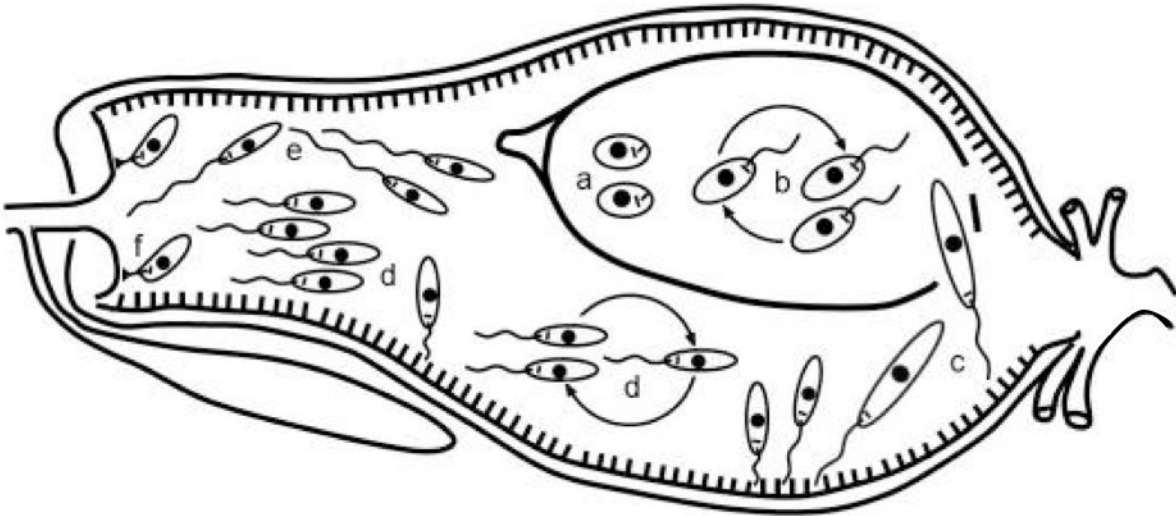


Figure 1.9 : Développement du parasite *Leishmania* dans l'intestin du vecteur.

(a) amastigotes ingérés lors du repas sanguin, (b) réplication des promastigotes procycliques, (c) migration des promastigotes nectomonades dans l'intestin moyen, (d) réplication des promastigotes leptomonades, (e) attachement des promastigotes haptomonades à la valve stomodéale, modifié de (Dostalova *et al.*, 2012).

3.3 Infection de l'hôte et maturation en amastigote

Lors du repas sanguin d'un vecteur infecté, les promastigotes métacycliques sont inoculés dans le derme, via la salive, à l'endroit de la morsure. La salive est un facteur important dans la transmission du parasite puisqu'elle contient un certain nombre de facteurs qui aident à sa dissémination. Il a été démontré que la salive du phlébotome a de nombreux rôles qui vont exacerber la pathogénèse, dont entre autres la capacité à diminuer la production d'oxyde nitrique des macrophages, la diminution de la présentation antigénique des cellules dendritiques, l'inhibition de la production d'interféron gamma et d'interleukine 12, l'augmentation de la production d'interleukine 10 et l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose parmi les neutrophiles (Abdeladhim *et al.*, 2011, Carregaro *et al.*, 2008, Katz *et al.*, 2000, Norsworthy *et al.*, 2004, Prates *et al.*, 2011). De plus, l'importance de la salive du phlébotome dans l'exacerbation de la maladie a été mis en avant dans un modèle murin d'infection avec *L.braziliensis*. Lorsque les souris sont pré-exposées à un homogénat de glande salivaire de *Lutzomya*, cela module la réponse de l'hôte en induisant une migration accrue de macrophages

et de neutrophiles, en diminuant l'expression de CXCL10 et augmentant celle d'interleukine 10. Ce recrutement cellulaire couplé à ce profil cytokinique favorise le développement du parasite (de Moura *et al.*, 2010). Cependant, d'autres études tendent à montrer que certains composants de la salive des phlébotomes pourraient être bénéfique pour l'hôte en permettant de lutter contre l'infection. En effet, certaines protéines issues de la salive du phlébotome *P. papatasi* modulent la réponse à une infection par *L. major*. Alors qu'une immunisation avec la protéine salivaire PpSP15 améliore la protection de l'hôte, une immunisation avec PpSP44 rend au contraire l'hôte plus susceptible à l'infection, en modifiant la réponse Th1 (Oliveira *et al.*, 2008). Le travail sur ces protéines représente un intérêt certain puisque très récemment, certaines de ces protéines salivaires de phlébotomes ont été étudiées pour être utilisées dans le développement de vaccin contre la leishmaniose cutanée afin de stimuler la production d'interféron gamma (Tlili *et al.*, 2018).

Une fois que les parasites se retrouvent dans l'hôte, ils doivent faire face à de nombreuses menaces venant du système immunitaire. Parmi les premières cellules du système immunitaire à répondre à l'infection on retrouve les neutrophiles qui infiltrent rapidement le site de la morsure (Muller *et al.*, 2001, Peters *et al.*, 2008). Et bien que les premières études ont mis en évidence un rôle protecteur des neutrophiles qui sont capables de tuer le parasite (Pearson *et al.*, 1981), d'autres études tendent à montrer un effet délétère de ces mêmes neutrophiles qui induiraient la sécrétion d'interleukine 4 et donc une différenciation des lymphocytes T CD4 en Th2, favorisant la survie du parasite (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Dans ce contexte de double jeu, certains auteurs ont également proposé une hypothèse plaçant les neutrophiles au centre de l'infection, en jouant le rôle de « cheval de Troie ». En effet, les neutrophiles infectés meurent rapidement par apoptose, après deux ou trois jours (Aga *et al.*, 2002). Ces cellules apoptotiques sont reconnues et prises en charge par les macrophages (Savill *et al.*, 1989). La phagocytose des neutrophiles par les macrophages n'entraîne pas l'activation de fonctions antimicrobiennes (Meagher *et al.*, 1992). Mais ces neutrophiles apoptotiques contiennent encore des parasites, ce qui permettrait ainsi au parasite d'infecter rapidement et efficacement les macrophages, qui ne pourraient pas les détecter via des interactions directes avec des récepteurs membranaires. De manière concomitante à l'arrivée des neutrophiles, les monocytes sont également recrutés au niveau du site de la morsure (Goncalves *et al.*, 2011). Les monocytes sont capables de phagocyter les parasites, et de les tuer, grâce à la fabrication de radicaux libres oxygénés (Novais *et al.*, 2014). Cependant, le parasite peut venir interagir directement avec les macrophages via un certain nombre de récepteurs dont les Fc récepteurs, les récepteurs du complément CR3, les récepteurs mannose-fucose ou encore le CD11b avant

d'être endocyté (Blackwell *et al.*, 1985, Guy *et al.*, 1993, Rosenthal *et al.*, 1996, Wilson *et al.*, 1986). Une fois rendu à l'intérieur de la cellule, le parasite se développe dans la vacuole parasitophore qui lui permet de se différencier en amastigotes, de favoriser leur survie et leur prolifération. L'établissement de ce milieu de vie favorable se fait à travers divers mécanismes, notamment en limitant l'acidification de son microenvironnement en excluant l'ATPase-proton vésiculaire (Vinet *et al.*, 2009) ou en inhibant la présentation croisée pour échapper au système immunitaire (Matheoud *et al.*, 2013). Finalement, les amastigotes peuvent s'échapper du macrophage, soit par éclatement du macrophage dû à la présence en trop grand nombre de parasite (Handman *et al.*, 1977) ou par un mécanisme similaire à l'exocytose (Rittig *et al.*, 1998) et ainsi infecter de nouveaux macrophages.

La dissémination des amastigotes est dépendante de l'espèce considérée. Dans le cas des espèces provoquant une leishmaniose cutanée leur dissémination est limitée aux tissus adjacents à la zone d'infection, tant dis que dans le cas des espèces provoquant une leishmaniose viscérale les amastigotes migrent plus profondément principalement vers le foie, la rate et la moelle osseuse.

Lorsqu'une nouvelle mouche des sables viendra prendre son repas sanguin sur un hôte infecté, les amastigotes seront ingérés, pourront se différencier en promastigote au niveau l'intestin et ainsi boucler le cycle de vie du parasite.

3.4 La leishmaniose viscérale

L. donovani et *L. infantum/chagasi* sont les deux espèces responsables de la leishmaniose viscérale. Les principaux organes cibles de l'infection sont le foie, la rate et la moelle osseuse, mais ils ne réagissent pas tous à l'infection de la même manière. En fonction des organes on retrouve des réponses immunitaires différentes qui mènent soit à la résolution de l'infection, soit à sa persistance. Il est à noter que le modèle expérimental murin reflète très bien les réponses immunitaires retrouvées chez l'être humain. La principale différence concerne la réponse au niveau du foie. Un patient infecté ne développe pas de réponse granulomateuse comme nous le verrons chez la souris, mais plutôt nodulaire. Cette réponse permet tout de même le contrôle et l'élimination du parasite (Seixas Duarte *et al.*, 2008).

3.4.1 Le foie

Dans un modèle expérimental d'infection murin par *L. donovani*, les macrophages résidents du foie sont la cible principale des parasites. Dans cet organe, l'infection est sous contrôle au bout de six à huit semaines. Ceci est dû principalement à la formation de granulomes qui sont capable de maintenir et de limiter l'infection (Murray *et al.*, 1999). Lors des premières semaines de l'infection, le parasite est capable de proliférer dans les macrophages résidents et contribue à la forte augmentation de la charge parasitaire. Cependant, la réponse granulomateuse se met en place au fur et à mesure en s'organisant autour de macrophages infectés qui vont fusionner, entourés par des monocytes, des lymphocytes T CD4 et CD8. Cette réponse immunitaire est initiée par les cellules dendritiques qui sécrètent de l'interleukine 12, cytokine essentielle aux premières étapes de développement des granulomes (Gorak *et al.*, 1998). Il s'en suit la sécrétion d'interféron gamma et de la chimiokine CXCL10 qui permet de recruter les lymphocytes T CD4 et CD8. Les lymphocytes T sont essentiels à la maturation du granulome, notamment en produisant de l'interféron gamma qui permet l'activation des macrophages et ainsi induit leurs effets leishmanicides, qui se traduisent entre autre par la production de radicaux libres oxygénés et d'oxyde nitrique (McElrath *et al.*, 1988, Stern *et al.*, 1988). Le TNF est une autre cytokine essentielle non seulement à la formation du granulome, mais également nécessaire pour l'acquisition des fonctions impliquées dans l'élimination du parasite par les macrophages infectés (Murray, 2001). Bien que le niveau de sécrétion du TNF soit un élément déterminant dans la formation et la maturation du granulome, cette cytokine ne

doit pas être présente à des concentrations trop importantes pour avoir un effet bénéfique (Tumang *et al.*, 1994). L'ensemble de ces acteurs mènent au bon développement et à la maturation des granulomes, qui permettent l'élimination du parasite et ainsi faire diminuer la charge parasitaire (Murray, 2001).

3.4.2 La rate

Contrairement au foie, l'infection au niveau de la rate se divise en deux phases, une phase aiguë et une phase chronique, qui ne permettent pas le contrôle de la croissance parasitaire. Les premières cellules qui rentrent en contact avec les parasites sont surtout les macrophages. Il existe différentes populations de macrophages au niveau de la rate, les macrophages de la pulpe rouge, les macrophages de la zone marginale et les macrophages métallophiliques. Les macrophages de la zone marginale et métallophiliques, sont les principales cellules qui phagocytent les parasites dans les premières heures suivant leur arrivée dans la rate et sont capable de les tuer rapidement (Gorak *et al.*, 1998). En effet, dans le cas d'un modèle d'infection expérimental, les amastigotes sont directement injectés dans le sang par injection intraveineuse. Le parasite rejoint donc les organes cibles par le biais de la circulation sanguine et peut être capté par les macrophages. En ce qui concerne les infections naturelles, les amastigotes se disséminent également depuis le site d'infection primaire vers les organes cibles à travers le système vasculaire, mais également à l'aide du système lymphatique (Chappuis *et al.*, 2007). En parallèle, les cellules dendritiques récupèrent les débris de parasites engendrés par les macrophages, voir phagocytés des macrophages infectés (Stanley *et al.*, 2007), ce qui entraîne leur migration vers la zone riche en lymphocyte T (PALS), où elles commencent la production d'interleukine 12 et induisent une réponse protectrice des lymphocytes T (Engwerda *et al.*, 2002, Gorak *et al.*, 1998).

En réponse à l'interleukine 12 les lymphocytes T CD8 expriment les facteurs de transcription T-bet et EOMES qui leur permettent de se différencier et d'exprimer certaines cytokines essentielles, dont l'interféron gamma et le TNF, mais aussi d'induire la production de molécules telles que le granzyme ou la perforine, nécessaires à leurs activités cytotoxiques (Tsagozis *et al.*, 2003, Tsagozis *et al.*, 2005). Cependant, l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 durant la phase aiguë est limitée par le parasite suite à la stabilisation de la protéine HIF-1 α qui limite entre autre la production d'interleukine 12 (Hammami *et al.*, 2015). De plus ces lymphocytes T CD8 ne sont plus fonctionnels durant la phase chronique de la maladie (Joshi *et*

al., 2009). En effet, durant la phase chronique de l'infection les lymphocytes T CD8 acquièrent un phénotype de cellules épuisées qui se traduit par la perte graduelle de leur capacité à produire l'interféron gamma, le TNF, l'interleukine 2 et le granzyme B. Au final les lymphocytes T CD8 meurent par apoptose, qui est dépendante de l'expression du récepteur PD-1 (Joshi *et al.*, 2009). Il a été montré que le fait de bloquer la voie de signalisation de PD-1 améliore la fonction de ces cellules et contribue à la diminution de la charge parasitaire (Joshi *et al.*, 2009, Murphy *et al.*, 1998). De plus, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 qui sont spécifiques pour *Leishmania* améliore la résistance de l'hôte à l'infection en diminuant très fortement la charge parasitaire (Polley *et al.*, 2006). En plus du défaut d'expansion et de l'épuisement des lymphocytes T CD8, d'autres facteurs viennent interférer avec la réponse CD8. Notamment l'interleukine 10 qui peut être sécrétée par plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes B (Bankoti *et al.*, 2012) et les lymphocytes Tr1 (Stager *et al.*, 2006), ce qui affecte le développement de la réponse mémoire. Enfin, les lymphocytes B sont extrêmement délétères pour la réponse protectrice de l'hôte limitant le potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8 et altérant la formation de lymphocytes effecteurs mémoires (Bankoti *et al.*, 2012). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'absence de lymphocytes B fonctionnels entraîne une élimination plus rapide du parasite dans le foie et empêche l'établissement d'une infection chronique au niveau de la rate (Smelt *et al.*, 2000). Le rétablissement fonctionnel des lymphocytes T CD8 constitue une piste pour développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de la leishmaniose viscérale.

Les cellules dendritiques qui produisent de l'interleukine 12 sont également à l'origine de la polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes T CD4 Th1, qui est une réponse protectrice (Engwerda *et al.*, 1998). Et bien que la sécrétion d'interleukine 4 par les lymphocytes T CD4 Th2 soit délétère dans le cas de la leishmaniose cutanée (Heinzel *et al.*, 1995, Mattner *et al.*, 1996), il a été démontré que, au contraire, dans le cas de la leishmaniose viscérale l'interleukine 4 est nécessaire au bon développement des granulomes dans le foie (Stager *et al.*, 2003). Après l'infection il faut cinq heures pour que les cellules dendritiques activées se rendent jusqu'à la PALS, et sécrètent fortement de l'interleukine 12 mais de manière transitoire (Gorak *et al.*, 1998). Cependant, bien que l'interleukine 12 entraîne une polarisation des lymphocytes T CD4 en Th1, il a été démontré que, dans la rate, l'interleukine 12 n'est pas requise pour contrôler la croissance parasitaire durant la phase aiguë, mais est essentielle durant la phase chronique (Engwerda *et al.*, 1998). En effet, la réponse Th1 est détectable à de faibles niveaux pendant la phase aiguë et atteint une réponse maximale durant la phase chronique (Kaye *et al.*, 2004, Paun *et al.*, 2011). Cependant la réponse Th1 de la rate n'est pas

suffisante pour contrôler la croissance parasitaire, notamment à cause de sérieux dysfonctionnements immunitaires. Cela se traduit entre autre par une sensibilisation des lymphocytes T à l'apoptose médiée par Fas (Alexander *et al.*, 2001) ou par un défaut d'expression des molécules de co-stimulation par les cellules présentatrices d'antigènes infectées par *L. donovani* (Kaye *et al.*, 1994). Mais tout comme pour les lymphocytes T CD8, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine 10 et le TGF- β (Stager *et al.*, 2006, Wilson *et al.*, 1998) vient également altérer les fonctions des lymphocytes T CD4. Comme nous l'avons dit, l'interleukine 10 est sécrétée par plusieurs populations cellulaires au niveau de la rate, parmi elles on retrouve les cellules dendritiques (Svensson *et al.*, 2004), les macrophages (Miles *et al.*, 2005), les « natural killers » (Maroof *et al.*, 2008), les lymphocytes B (Bankoti *et al.*, 2012) et les lymphocytes T CD4 Tr1 (Stager *et al.*, 2006). L'interleukine 10 agit soit en diminuant directement la réponse des lymphocytes T CD4 Th1 spécifiques pour le parasite (Bankoti *et al.*, 2012), soit en inhibant l'expression du récepteur CCR7 sur les cellules dendritiques entraînant un défaut de migration de la zone marginale vers la PALS (« periarteriolar lymphoid sheaths »), limitant ainsi l'activation des lymphocytes T (Ato *et al.*, 2002). Cette sécrétion d'interleukine 10 entraîne une suppression de la réponse immunitaire locale et participe à l'exacerbation de la maladie. D'autres facteurs peuvent également participer à l'aggravation de l'infection, car en plus d'inhiber la réponse Th1, les lymphocytes B peuvent interagir directement avec le parasite qui est détecté par les TRLs endosomaux, menant à la sécrétion d'interleukine 10 et d'interféron de type I. L'activation des TLRs ainsi que l'interféron de type I sont deux éléments indispensables au développement de l'hypergammaglobulinémie, qui est un autre facteur participant à l'exacerbation de la maladie (Silva-Barrios *et al.*, 2016). En effet des études ont montré que des souris déficientes pour le gène de l'interleukine 10 ou n'ayant pas de lymphocytes B fonctionnels, sont plus résistantes lors d'une infection par *L. donovani* (Murphy *et al.*, 2001, Smelt *et al.*, 2000). L'expression de TGF- β inhibe également la sécrétion d'interféron gamma par les lymphocytes T CD4 Th1 (Gomes *et al.*, 2000, Murphy *et al.*, 1998). Enfin, les cellules myéloïdes présentant un phénotype de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), ont la capacité d'inhiber les fonctions des lymphocytes Th1, rendant les souris plus susceptibles à une infection par *L. donovani* (Hammami *et al.*, 2017). L'ensemble de ces études permettent de mettre en évidence que la réponse Th1 est une réponse efficace et nécessaire pour lutter contre l'infection, mais qu'elle ne se développe que tardivement, lors de la phase chronique de l'infection. De plus, c'est une réponse de faible envergure qui est insuffisante pour mener à l'élimination du parasite,

du fait qu'elle soit fortement altérée par de nombreux éléments présents dans son microenvironnement.

Bien que la sécrétion de TNF soit cruciale pour le développement et la maintenance de la réponse immunitaire dans le foie, c'est un facteur clef dans l'établissement de la chronicité de la maladie. En plus d'induire la production d'interleukine 10, la production en excès de TNF about à un remodelage complet de la zone marginale à travers la perte de ses macrophages (Engwerda *et al.*, 2002). Le TNF entraîne également la perte des cellules stromales gp38⁺ qui se situent dans la PALS (Ato *et al.*, 2002). Ces cellules sont importantes car elles sécrètent les chimiokines CCL19 et CCL21 qui sont essentielles pour la migration des cellules dendritiques et de certaines populations de lymphocytes T, en particulier les lymphocytes T naïfs et mémoires. De plus, les cellules dendritiques vont réguler à la baisse l'expression du récepteur de ces chimiokines, CCR7, dû aux effets combinés du TNF et de l'interleukine 10 (Ato *et al.*, 2002). Ce défaut de migration des cellules dendritiques vers la PALS entraîne une séparation physique entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T, réduisant la probabilité qu'ils soient activés et participant de ce fait, à la pathogénèse de la maladie et aux symptômes d'immunodéficience.

3.4.3 La moelle osseuse

Bien que l'infection de la moelle osseuse par *L. donovani* soit connu depuis longtemps, très peu d'étude se sont intéressées à son impact sur l'hématopoïèse. Cependant il a été démontré que le parasite n'infecte pas directement les HSC ou les progéniteurs mais plutôt les macrophages résidants dans la moelle (Cotterell *et al.*, 2000b). Cette infection induit une rapide augmentation dans la fréquence des progéniteurs myéloïdes que l'on retrouve dans le sang (Cotterell *et al.*, 2000a), de plus la production de GM-CSF et de TNF augmente et concorde avec une myélopoïèse soutenue (Cotterell *et al.*, 2000b). Cette production de TNF induit, entre autre, l'expansion de lymphocytes T CD4 sécrétant de l'interféron gamma qui vont altérer les fonctions des cellules souches hématopoïétiques en induisant leur épuisement (Pinto *et al.*, 2017). De plus, *L. donovani* va induire l'expansion de progéniteurs de cellules myéloïdes, constitués majoritairement de monocytes avec un phénotype régulateur, qui sont plus permissif à l'infection et contribueraient à la persistance de l'infection (Abidin *et al.*, 2017).

3.4.4 Le cerveau

Parmi les symptômes peu courants qui sont reliés à la leishmaniose viscérale, on retrouve les neuropathies (Hashim *et al.*, 1995). Très récemment, une étude a mis en évidence que *L. donovani* était capable d'infecter le cerveau de souris BALB/c bien que la manière dont le parasite traverse la barrière hémato-encéphalique reste à déterminer (Melo *et al.*, 2017). La réponse immunitaire au niveau du cerveau est découpé en deux vagues d'inflammation, tout d'abord une phase aiguë qui englobe les deux premières semaines suivant l'infection, puis une phase de « re-inflammation » qui démarre au jour 90 après l'infection. La phase aiguë au niveau du cerveau est caractérisée par une augmentation de la sécrétion de la chimiokine CXCL10, qui a déjà été associé avec la neuropathogénèse d'autres infections parasitiques (Amin *et al.*, 2009, Wen *et al.*, 2010), d'interféron gamma, d'interleukine 1 β , d'interleukine 10 et de TGF- β . Durant la phase de « re-inflammation », qui ne correspond pas à une persistance de l'infection mais à un nouveau stimulus qui proviendrait de cellules infectées provenant de la moelle osseuse par la circulation sanguine, on retrouve les mêmes cytokines pro-inflammatoires avec également la sécrétion de TNF et de MMP9 mais aucune cytokine anti-inflammatoire (Melo *et al.*, 2017).

4 LE VIRUS DE LA VACCINE

4.1 Généralités

Le virus de la vaccine est un virus appartenant à la famille des *Poxviridae*, à la sous-famille des *Chordopoxviridae* et au genre *Orthopoxvirus*. Son génome est composé d'ADN double brin d'une longueur de 130 à 160 Kpb. Bien que ce soit un virus à ADN, l'ensemble de son processus de réplication se fait dans le cytoplasme de la cellule infectée. C'est le virus de la famille des *Poxviridae* le plus étudié, et il est aujourd'hui largement utilisé pour étudier la réponse des lymphocytes T CD8. De plus, ce fut le virus utilisé dans le cadre d'une grande campagne de vaccination contre la variole menée par l'OMS et dont l'éradication de la surface de la terre fut prononcée en 1980 selon des rapports de l'OMS.

Le virus de la vaccine ne possède pas de tropisme particulier et peut d'infecter un grand nombre de cellules différentes que ce soit les kératinocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires (He *et al.*, 2014, Rodriguez *et al.*, 1991, Sanchez-Puig *et al.*, 2004, Sottnek *et al.*, 1975). En plus de cette absence de tropisme spécifique pour un type cellulaire particulier, il est capable d'infecter une grande variété d'hôtes parmi les mammifères.

Contrairement au virus de la variole, celui de la vaccine ne présente que très peu de danger pour l'Homme. Lors d'une infection, on verra apparaître une lésion localisée qui évoluera en croûte et finira par se résorber d'elle même au bout de deux semaines. Cependant, d'autres symptômes peuvent accompagner ce type d'infection notamment la fièvre, des éruptions cutanées, une adénopathie, de la fatigue, des myalgies et des maux de tête. Dans de très rares cas, la maladie peut évoluer vers des complications plus graves qui peuvent s'avérer fatales dont la vaccine oculaire, la myopéricardite ou des troubles neurologiques.

Il existe deux formes virales infectieuses différentes qui se distinguent de par leurs compositions mais aussi de par leurs localisations. En effet, le virus mature intracellulaire (IMV) est composé d'un génome d'ADN entouré par un core protéique, le tout enveloppé dans une membrane lipidique dans la quelle on retrouve des glycoprotéines. Le virus arbore une forme typique rectangulaire qui est dite « en brique ». Cette forme virale constitue la forme dominante retrouvée lors de la lyse cellulaire qui survient à la fin du cycle viral. La seconde forme virale se différencie par la présence de membranes lipidiques additionnelles, ce qui lui vaut le nom de virion enveloppé, qui peuvent aussi bien être retrouvés à l'intérieur de la cellule (IEV) que fixés

sur la membrane à l'extérieur de la cellule (EEV). Cette seconde forme virale est quant à elle relâchée dans le milieu extracellulaire avant la mort de la cellule (Roberts *et al.*, 2008).

Comme de nombreux virus, la réplication du génome du virus de la vaccine s'effectue dans le cytoplasme (**Figure 1.10**) (Prescott *et al.*, 1971). Le début de la réplication s'observe très rapidement, dans les premières heures suivant l'infection (Salzman, 1960). La réplication peut commencer après l'infection d'une cellule hôte par la forme IMV ou EEV des virions, qui se fait via l'attachement du virion à la membrane plasmique grâce à la présence de glycosaminoglycanes (Lin *et al.*, 2000). Il s'en suit une étape de fusion des membranes pour libérer le core protéique, incluant le génome du virion, dans la cellule. C'est à ce moment que va commencer la première vague de transcription des gènes viraux, avec celle des gènes précoces (Broyles, 2003). Par un mécanisme encore mal défini, on assiste à une dissolution du core protéique pour ne se retrouver qu'avec le génome viral, permettant ainsi de nouvelles vagues de transcription pour les gènes intermédiaires et tardifs (Broyles, 2003). En parallèle, les particules virales s'assemblent pour former les IMV. Les IMV restent à ce stade en attendant la lyse cellulaire ou peuvent migrer à l'aide du réseau de microtubules vers le golgi pour s'envelopper de membranes dérivées du golgi et donner le IEV. Finalement, les IEV fusionnent avec la membrane plasmique, perdant une couche lipidique au passage, et se retrouvent dans le milieu extracellulaire sous la forme de EEV, prêt à infecter les cellules avoisinantes (Smith *et al.*, 2004).

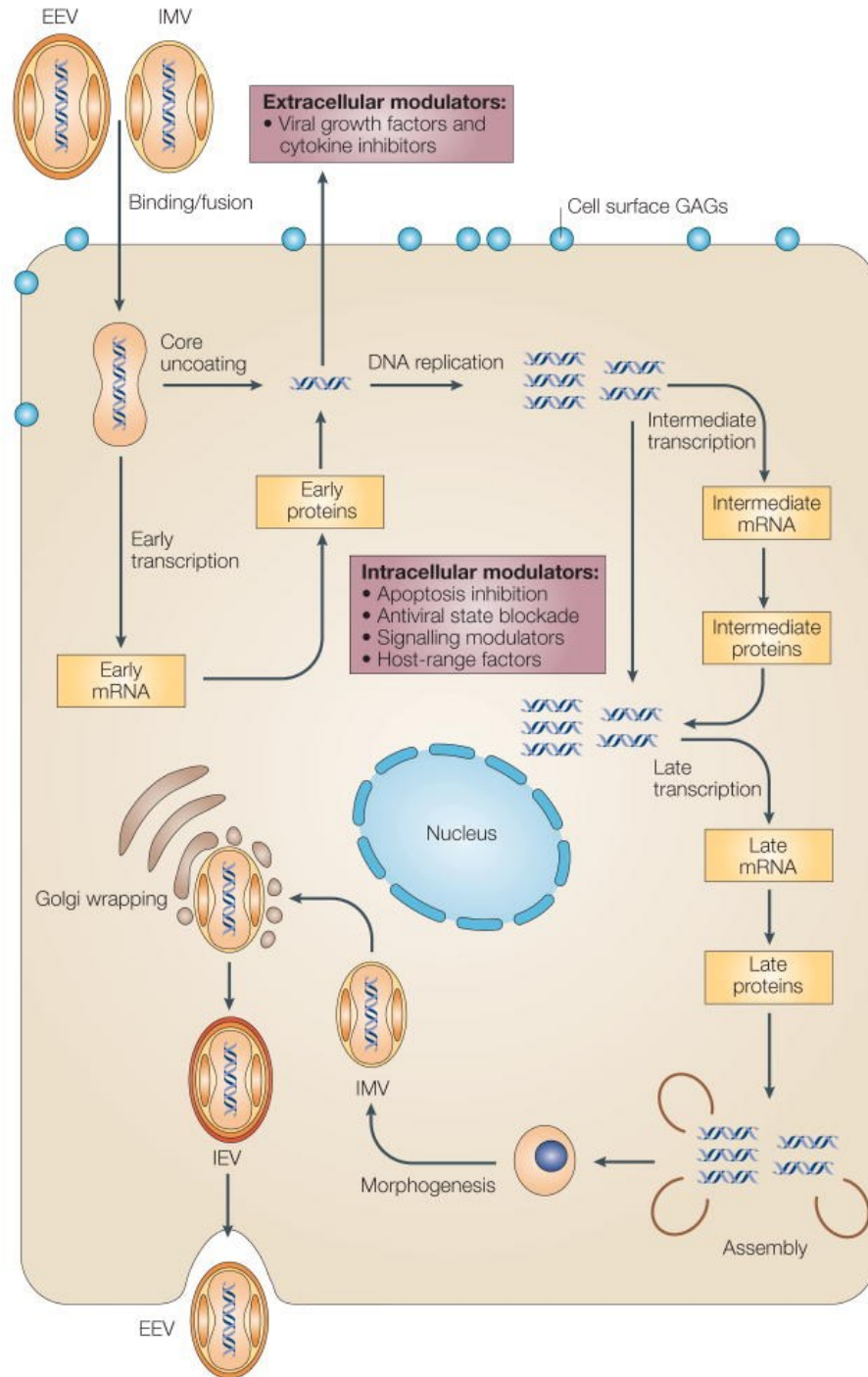


Figure 1.10 : Cycle de réplication du virus de la vaccine.

Le virus de la vaccine se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. Il existe deux particules virales infectieuses distinctes, le virus mature intracellulaire (IMV) et le virus enveloppé extracellulaire (EEV). La réplication virale est caractérisée par trois vagues de synthèse d'ARNm et de protéines virales (précoces, intermédiaires et tardives), suivies d'une morphogenèse des particules infectieuses. Le virus mature intracellulaire initial (IMV) est enveloppé avec une membrane dérivée de Golgi, après quoi il est appelé virus enveloppé intracellulaire (IEV). L'IEV fusionne avec la membrane de surface cellulaire former un EEV libre. Extrait de (McFadden, 2005).

4.2 La réponse immunitaire anti-vaccin

4.2.1 Cinétique de la réponse immunitaire

La cinétique de la réponse des lymphocytes T CD8 lors d'une infection par le virus de la vaccin est au cœur d'une réponse antivirale efficace et suit un schéma de réponse classique comprenant la phase d'expansion où les clones spécifiques pour un épitope du pathogène prolifèrent massivement, suivi par la phase de contraction qui est caractérisée par une mort importante par apoptose de la majorité des lymphocytes T CD8 ayant subi l'expansion clonale puisque 90% à 95% vont mourir à cette période. Enfin, la phase mémoire va permettre l'établissement d'une mémoire immunologique via la survie de lymphocytes T mémoires qui seront aptes à répondre plus rapidement dans le cas d'une future réinfection (**Figure 1.11**).

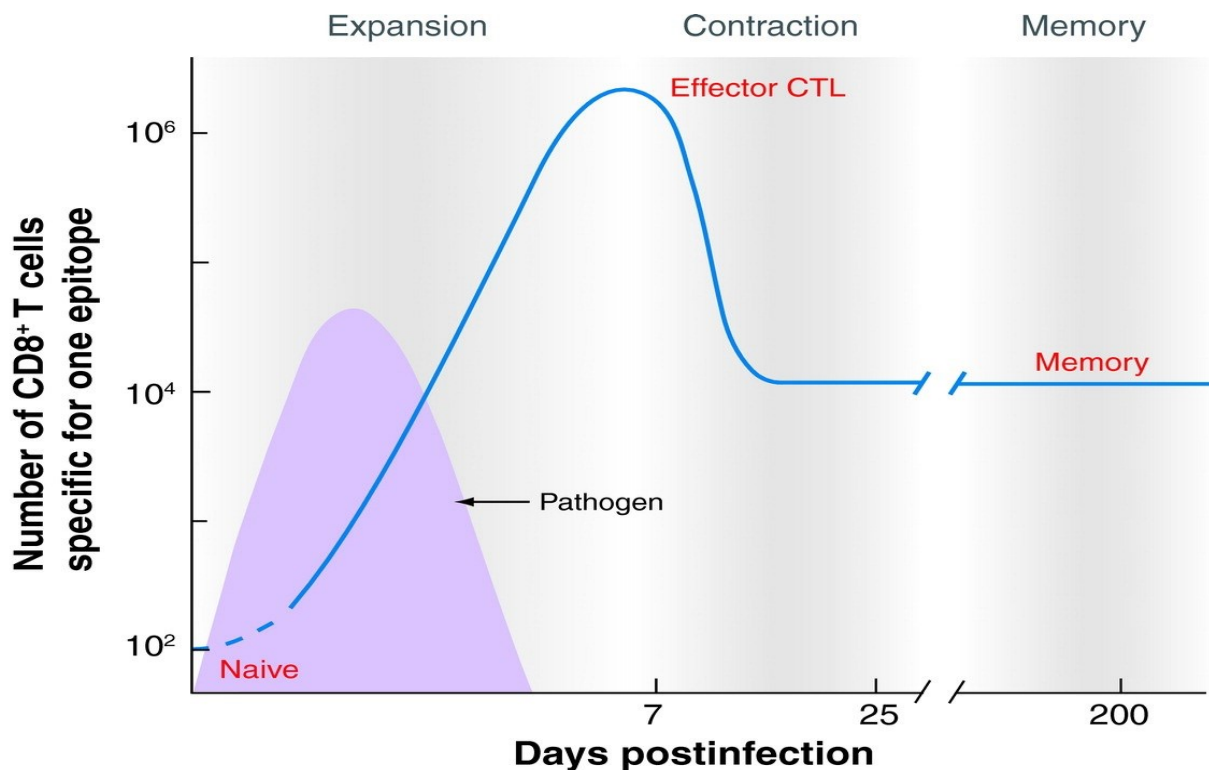


Figure 1.11 : Illustration de la cinétique de la réponse CD8 après infection avec un pathogène virulent.

Réponse des lymphocytes T CD8⁺ à une infection par un agent pathogène virulent tel que le virus de la vaccin. Après l'activation et la phase d'expansion clonale, une souris peut générer des millions de lymphocytes T CD8 effecteurs, au jour 7-8 après l'infection. Lorsque l'agent pathogène est éliminé, la majorité des effecteurs meurent par apoptose, ne laissant que les lymphocytes T CD8⁺ mémoire. Extrait de (Williams *et al.*, 2007).

4.2.2 L'aide des lymphocytes T CD4 lors de la réponse CD8

La réponse effectrice amenée par les lymphocytes T CD8 lors d'une infection virale, et en particulier celle du virus de la vaccine, est essentielle pour éliminer rapidement le pathogène. Dépendamment du contexte et de l'infection considérée, pour que cette réponse soit optimale les lymphocytes T CD8 ont besoin du soutien des lymphocytes T CD4, qui peuvent être requis pour assurer le bon développement de la réponse primaire (Keene *et al.*, 1982) mais qui sont essentiels à la mise en place d'une réponse mémoire CD8 efficace (Janssen *et al.*, 2003). Dans le cas du virus de la vaccine, plusieurs études ont démontré l'importance des lymphocytes T CD4 dans le développement de la réponse CD8 que ce soit pour la réponse primaire ou pour la réponse mémoire (Novy *et al.*, 2007, Obar *et al.*, 2010). De ce fait, l'absence ou le développement d'une aide CD4 anormale pourrait aboutir à une limitation de la réponse CD8 ou à un défaut de la réponse mémoire. De manière plus général, l'aide fournie par les lymphocytes T CD4 n'est pas une aide directe. Cela passe par l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4 par le biais des récepteurs CD40 et CD40L (Schoenberger *et al.*, 1998). Cela permet la maturation des cellules dendritiques qui augmentent leur expression de co-récepteurs d'une part, mais aussi induit la sécrétion d'interleukine 2 par les lymphocytes T CD4 facilitant ainsi le développement d'une réponse CD8 cytotoxique (Bennett *et al.*, 1997, Schoenberger *et al.*, 1998). En ce qui concerne la réponse mémoire, les lymphocytes T CD4 sont essentiels à sa formation mais également à son maintien (Janssen *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2003). Et bien que les mécanismes mis en jeu pour garder la mémoire CD8 intacte soient encore peu connus, il semblerait que ces effets soient aussi dépendant des interactions entre les récepteurs CD40/CD40L et la sécrétion d'interleukine 2 (Borrow *et al.*, 1996, Bourgeois *et al.*, 2002, Feau *et al.*, 2011).

4.2.3 L'environnement cytokinique

L'environnement cytokinique est primordial pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8 activés. Ce sont les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine 12 et l'interféron de type I, mais aussi l'interleukine 2 qui influencent en partie le devenir des lymphocytes T CD8.

L'interleukine 12 est produite lorsqu'un agent pathogène est détecté par les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes B. C'est une molécule composée de deux

sous-unités la p35 et la p40, qui se lie ensuite sur son récepteur IL-12R et induit la voie de signalisation de STAT4 (Vignali *et al.*, 2012). Dans un modèle d'infection avec *L. monocytogenes* l'interleukine 12 participe à l'expansion clonale ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes effecteurs en SLEC. Il a été démontré que lorsque le récepteur à l'interleukine 12 (IL-12R) est non fonctionnel, la population de lymphocytes T CD8 effecteurs est plus faible (Takemoto *et al.*, 2006). Cependant, l'interleukine 12 n'a pas la même importance en fonction de l'agent pathogène considéré. Dans le cas d'une infection par le virus de la vaccine, le transfert adoptif de lymphocytes OT-I déficients pour l'IL-12R n'induit pas d'effets sur la génération de lymphocytes effecteurs mais va légèrement limiter la formation des lymphocytes mémoires (Keppler *et al.*, 2009, Xiao *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que l'interleukine 12 ne joue pas un rôle essentiel dans le développement de la réponse immunitaire lors d'une infection par le virus de la vaccine. D'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron de type I, pourraient être impliquées dans le développement de la réponse effectrice.

Le terme d'interféron de type I regroupe l'interféron- β et les interférons- α , et se lie tous sur le même récepteur nommé IFNAR. La liaison de l'interféron sur son récepteur entraîne l'activation des STAT1, STAT4 ainsi que de l'IRF-9. De nombreuses cellules du système immunitaire sont capables, en réaction à la détection d'un agent pathogène, de sécréter de l'interféron de type I et notamment les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Des études utilisant un transfert adoptif de lymphocytes T CD8 déficients pour le récepteur IFNAR lors d'une infection par le virus de la vaccine ont permis de mettre en évidence son rôle dans le développement de la réponse CD8. En effet, sans l'action de l'interféron de type I les lymphocytes montrent une expansion clonale diminuée et un défaut dans la génération de la mémoire (Aichele *et al.*, 2006, Kolumam *et al.*, 2005). L'interféron de type I n'intervient pas dans la prolifération elle-même mais plutôt dans la survie des lymphocytes T durant la phase d'expansion et régule également la sensibilité à l'antigène (Richer *et al.*, 2013). Il préviendrait la mort cellulaire par apoptose de la majorité des lymphocytes T activés, expliquant l'apparente faible expansion clonale ainsi que le défaut de génération de cellules mémoires des lymphocytes T CD8 déficients pour IFNAR (Kolumam *et al.*, 2005). Cependant, l'altération de la réponse CD8 n'étant que partielle en l'absence d'une stimulation par l'interféron de type I, cela suggère que d'autres facteurs participent à son développement.

L'interleukine 2 peut se lier à un récepteur dimérique de faible affinité composé de la chaîne γ , le CD132, et de la chaîne β , le CD122 ou à un récepteur trimérique de haute affinité

composé en plus de la chaîne α , CD25. Cette cytokine est un signal important lors d'une infection par le virus de la vaccine pour la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur différenciation en SLEC lors de la réponse primaire, mais aussi durant la réponse secondaire (Obar *et al.*, 2010). Il est à noter que le niveau d'expression du CD25 permet de définir deux populations, la population qui expriment fortement le CD25 se différencie en SLEC et est plus prompt à mourir par apoptose ultérieurement, alors que la population qui l'exprime plus faiblement se différencie préférentiellement en MPEC (Kalia *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces données permettent de mieux comprendre les cytokines qui sont impliquées dans le développement de la réponse des lymphocytes T CD8 lors d'une infection par le virus de la vaccine. Alors que l'interleukine 12 n'est pas nécessaire au développement de cette réponse, l'interféron de type I et l'interleukine 2 participent tous deux à la mise en place d'une réponse effectrice efficace. En absence de l'une ou de l'autre la réponse n'est pas totalement inhibée suggérant un effet synergique entre ces deux cytokines, ou l'implication d'autres facteurs.

4.2.4 La détection du virus de la vaccine

Le virus de la vaccine étant un virus à ADN double brin qui reste exclusivement dans le cytoplasme de la cellule, il n'est pas surprenant que les principaux mécanismes qui permettent sa détection passe par les senseurs cytoplasmiques. À ce jour, il y a deux senseurs principaux qui ont été mis en cause dans la détection du virus. Le premier senseur cytosolique à être mis en jeu est DNA-PK (la protéine kinase dépendante de l'ADN), qui reconnaît donc l'ADN, et qui est impliqué dans la signalisation d'IRF-3 (Ferguson *et al.*, 2012). Le deuxième est le senseur cGAS, qui via la production de cGAMP active STING et induire les voies d'IRF-3 et de NF- κ B (Ablasser *et al.*, 2013). Ces deux voies de détection mènent à la production d'interféron de type I qui est essentiel dans le développement de la réponse immunitaire face à ce virus. Cependant, le virus de la vaccine a mis en place des mécanismes de défense qui lui permettent de limiter la réponse immunitaire en inhibant les voies de signalisation NF- κ B et IRF-3. En effet, les protéines virales B14 et C4 seraient capables d'interagir avec le complexe IKK pour inhiber la signalisation (Chen *et al.*, 2008a). Alors que la protéine virale C6 inhiber la voie de signalisation menant à l'activation d'IRF-3 en se liant aux protéines adaptatrices de TBK1 (Unterholzner *et al.*, 2011).

5 PROBLÉMATIQUE

La famille des Interferon Regulatory Factors (IRFs) jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisations associées à l'inflammation. Parmi ses membres, IRF-5 est connu pour participer à la transcription de gènes cibles tels que l'interféron de type I ou des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF, l'interleukine 6 et l'interleukine 12. Le rôle d'IRF-5 a été largement étudié dans les cellules présentatrices d'antigènes mais récemment, une étude menée au sein du laboratoire a démontré que les lymphocytes T sont également capables d'exprimer IRF-5 durant la phase chronique lors d'une infection par *L. donovani* (Paun *et al.*, 2011), cependant, les fonctions d'IRF-5 dans ces cellules sont inconnues à ce jour et doivent encore être déterminées.

Dans la première partie de ce projet, c'est tout naturellement que nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait avoir IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 lors d'une infection par *L. donovani*. Basé sur les résultats précédents, nous savions donc que les souris WT sont capables d'exprimer l'ARNm d'IRF-5 dans les lymphocytes T durant la phase chronique de la maladie. Des souris totalement déficientes pour le TLR7 montrent le même défaut de réponse des lymphocytes Th1, de plus l'expression d'ARNm d'IRF-5 dans les lymphocytes T durant la phase chronique est abrogée, signifiant qu'elle est dépendante du TLR7 (Paun *et al.*, 2011). À l'aide de la génération de souris déficiente pour IRF-5 spécifiquement des lymphocytes T (*Irf5^{flx/flx} Lck-Cre⁺*) grâce au système Cre-Lox, nous avons cherché à déterminer quelles sont les voies de signalisation participant à l'activation d'IRF-5, quelles molécules pourraient participer à l'activation de ces différents voies dans les lymphocytes T CD4, quelles populations particulières de lymphocytes T CD4 expriment IRF-5 durant la phase chronique de l'infection et enfin quels sont les gènes cibles induits par IRF-5 dans les lymphocytes T CD4. Ces résultats sont présentés dans le second chapitre, dédié aux résultats publiés.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes penchés sur le rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8. Pour ce faire, nous avons dû changer de modèle d'étude puisque lors d'une infection par *L. donovani*, bien que la réponse des lymphocytes T CD8 soit primordiale pour le contrôle de la charge parasitaire, le parasite est capable de limiter leur expansion et d'induire un épuisement fonctionnel des lymphocytes T CD8 menant à leur mort par apoptose (Joshi *et al.*, 2009). Nous avons donc utilisé le modèle d'étude du virus de la vaccine (VV), qui induit une réponse CD8 prototypique, pour répondre à cette question. Dans un premier temps nous avons infectés des souris WT pour évaluer la cinétique d'expression d'IRF-5 dans les

lymphocytes T CD8 au cours de l'infection avec VV. Après avoir confirmé son expression, nous sommes intéressés au profil de la réponse CD8 entre des souris WT et *Irf5^{flax/flax} Lck-Cre⁺*, en comparant l'expansion des lymphocytes T CD8 totaux ainsi que l'acquisition des marqueurs indiquant la différenciation en SLEC ou en MPEC. Mais sachant que dans notre lignée de souris, IRF-5 est invalidé aussi bien dans les lymphocytes T CD8 que dans les lymphocytes T CD4, et que les lymphocytes T CD4 sont impliqués dans le développement de la réponse CD8 lors d'une infection par VV, nous avons décidé de mettre en place un modèle nous permettant de diminuer l'expression d'IRF-5 uniquement dans les lymphocytes T CD8. Pour cela, nous avons construits des shRNA (short hairpin RNA), capables de cibler spécifiquement les ARNm d'IRF-5, associés à l'Amétrine utilisée comme fluorochrome rapporteur, pour pouvoir détecter les cellules exprimant le shRNA par cytométrie en flux. Ces puissants outils ouvrent la voie à des analyses plus poussées du rôle intrinsèque d'IRF-5 dans le développement de la réponse des lymphocytes T CD8. Ces résultats seront abordés dans le troisième chapitre, traitant des résultats préliminaires.

CHAPITRE 2 :
PREMIÈRE PUBLICATION

Résumé

Le facteur de transcription « Interferon regulatory factor 5 » (IRF-5) a des fonctions importantes au niveau de la réponse immunitaire innée et initie la réponse pro-inflammatoire lors d'infections par des agents pathogènes. IRF-5 est constitutivement exprimé dans plusieurs types cellulaires dont les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les monocytes et les lymphocytes B. Nous avons précédemment montré qu'IRF-5 est également exprimé dans les lymphocytes T au cours d'une infection par *L. donovani*. Cependant, le rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T est encore inconnu. Dans cette étude, nous démontrons que l'expression d'IRF-5 est augmentée dans les lymphocytes T CD4 (IFN)- γ^+ durant l'infection avec *L. donovani*. Ce facteur de transcription est induit par le matériel de cellules apoptotiques à travers la voie du « Toll-like receptor 7 » (TLR7) et promeut l'expression du « death receptor 5 » (DR5). L'activation d'IRF-5 sensibilise les lymphocytes T CD4 à la mort cellulaire. La destruction tissulaire et l'inflammation chronique étant des caractéristiques communes aux infections persistantes, l'activation d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 pourrait représenter un mécanisme d'action général menant à la suppression des réponses protectives des lymphocytes T CD4, favorisant ainsi l'établissement d'une infection chronique.

IRF-5 promotes cell death in CD4 T cells during chronic infection

Fabie, A., Mai, L. T., Dagenais-Lussier, X., Hammami, A., van Grevenynghe, J., & Stager, S. (2018).

IRF-5 Promotes Cell Death in CD4 T Cells during Chronic Infection.
Cell Reports, 24(5), 1163-1175. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.107

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, H7V 1B7, Canada

A.F. a réalisé les expériences, analysé les données et écrit le manuscrit; S.S. a conçu le projet, les approches expérimentales, interprété les données et écrit le manuscrit; X.D.-L. a aidé à la réalisation des expériences de transferts adoptifs; L.T.M. and A.H. ont réalisés l'enrichissement des lymphocytes T CD4, les restimulations in vitro ainsi que l'acquisition en cytométrie et l'analyses de données; et J.v.G. a fourni son expertise et interprété les données.

*Address correspondence to: Simona Stäger

INRS – Institut Armand-Frappier

531, Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

Canada

Phone: +1- 450-687-5010, ext. 4403

Fax: +1- 450-686-5501

simona.stager@iaf.inrs.ca

§Lead contact: simona.stager@iaf.inrs.ca

Abstract

The transcription factor interferon regulatory factors 5 (IRF-5) plays an important function in innate immunity and in initiating pro-inflammatory responses against pathogens. IRF-5 is constitutively expressed in several cell types, including plasmacytoid dendritic cells, monocytes and B cells. We have previously reported that IRF-5 is also expressed in T cells during infection. The role of IRF-5 in T cells is yet unknown. Here we demonstrate that IRF-5 is increasingly expressed in IFN- γ ⁺ CD4 T cells over the course of *L. donovani* infection. This transcription factor is induced by apoptotic material via TLR7 and promotes the expression of death receptor 5 (DR5). IRF-5 activation sensitizes CD4 T cells to cell death. Because tissue disruption and chronic inflammation are common characteristics of persistent infections, activation of IRF-5 in CD4 T cells may represent a common pathway that leads to suppression of protective CD4 T cell responses, favouring the establishment of chronic infection.

Keywords: chronic infection, CD4 T cells, IRF-5, TLR7, DR5, cell death, *Leishmania*

Introduction

The transcription factor interferon regulatory factors 5 (IRF-5) has been implicated in the antiviral immune response, because of its involvement in the transcriptional activation of both Type I IFN genes and genes encoding key pro-inflammatory cytokines in antigen-presenting cells (Barnes et al., 2001; Barnes et al., 2004; Takaoka et al., 2005). Besides its important role in innate immunity, IRF-5 also appears to be a critical regulator of DNA-damage-induced apoptosis and tumor suppression (Bi et al., 2014; Couzinet et al., 2008). In human, various *IRF5* polymorphisms are also linked to autoimmune diseases, including lupus erythematosus (Graham et al., 2006), rheumatoid arthritis (Dieguez-Gonzalez et al., 2008), and inflammatory bowel disease (Dideberg et al., 2007). IRF-5 is constitutively expressed by several cell types, such as plasmacytoid dendritic cells, monocytes and B cells. Activation of IRF-5 occurs after phosphorylation, following which this transcription factor delocalizes from the cytoplasm to the nucleus. IRF-5 can be activated by TLR7 and TLR9 via the MyD88 signaling pathway, directly by viral infections and Type I interferon (Schoenemeyer et al., 2005), and/or by apoptotic/necrotic material (Stone et al., 2012).

Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially lethal chronic disease that causes hepatosplenomegaly, anemia, cachexia, hypergammaglobulinemia, and immunosuppression (Kaye et al., 2004). Mice infected with the protozoan parasite *Leishmania donovani*, a causative agent of VL, also develop hepatosplenomegaly (Kaye et al., 2004). While infection in the liver is self-resolving, the parasite persists in the spleen of infected mice. Chronic infection in the spleen is associated with disruption of the splenic architecture and massive recruitment of pro-inflammatory cells. INF- γ -producing CD4 T cell responses are essential for controlling parasite

growth, but only develop 2-3 weeks after infection and gradually show signs of functional exhaustion soon thereafter. CD8 T cells also contribute to protection; however, these cells undergo very limited expansion and become dysfunctional during chronic infection (Hammami et al., 2015; Joshi et al., 2009). Protective T cell responses are also suppressed by IL-10 derived from IFN- γ ⁺IL-10⁺ CD4 T cells (Ranatunga et al., 2009; Stager et al., 2006) and B cells (Bankoti et al., 2012), and by myeloid-derived suppressor cells (Hammami, 2017).

We have previously reported that *Irf5*^{-/-} mice are more susceptible to *L. donovani* infection. Susceptibility was associated with a significant reduction of inflammatory cell infiltration in the liver and spleen, and with a severe impairment in the development of Th1 cells (Hammami et al., 2015; Paun, 2011). IRF-5 was indeed required for inducing IL-12 production by dendritic cells and sustaining Th1 responses. Our results were in agreement with Krausgruber *et al.* that demonstrated the critical role of this transcription factor in determining lineage commitment of inflammatory macrophages by promoting IL-12 while repressing IL-10 (Krausgruber et al., 2011). Interestingly, we noticed that IRF-5 mRNA was also upregulated in total splenic T cells mainly during chronic infection (Paun, 2011). The role of IRF-5 in T cells is yet unknown.

Here we show that IRF-5 is upregulated and activated in CD4 T cells during chronic VL. This transcription factor is induced by TLR7 triggering. IRF-5 activation results in the upregulation of death receptor 5 (DR5) and, ultimately, in CD4 T cell death.

Results

IRF-5 is activated in splenic CD4 T cells during chronic VL.

We have previously reported that IRF-5 mRNA is expressed in splenic T cells in *L. donovani* infected mice (Paun, 2011). Because effector CD8 T cells are not functional (Hammami et al., 2015; Joshi et al., 2009) and do not express IRF-5 during chronic VL (data not shown), we decided to concentrate our analysis on CD4 T cells. Splenic CD4 T cells upregulated IRF-5 mRNA from d21 p.i. on (Figure 2.1A). Image Stream flow cytometry analysis revealed that about 5-12% of splenic CD4 T cells expressed IRF-5 on the protein level (Figure 2.1B) and that this transcription factor was increasingly translocated to the nucleus over the course of infection (Figures 2.1C and G (upper rows), Supplemental Figures 2.S1A and B), indicating that it was activated. Although a significant percentage of CD4 T cells expressed IRF-5 in the liver (Figures 2.1D and E), this transcription factor remained in the cytoplasm and was not translocated to the nucleus (Figures 2.1F and G (lower rows), Supplemental Figures 2.S1A and B). Next, we wanted to identify splenic CD4 T cell subpopulations expressing IRF-5. As shown in Figure 2.1H, effector and memory cells, but not naïve CD4 T cells were positive for IRF-5 during chronic VL (Supplemental Figure 2.S1C). A closer analysis of subpopulations expressing IRF-5 revealed that 40-50% of IFN- γ -producing CD4 T cells were expressing this transcription factor at d21 and 28 p.i. (Figure 2.1I). Hence, IRF-5 appears to be active in splenic but not hepatic IFN- γ -producing CD4 T cells during chronic *L. donovani* infection.

Figure 2.1

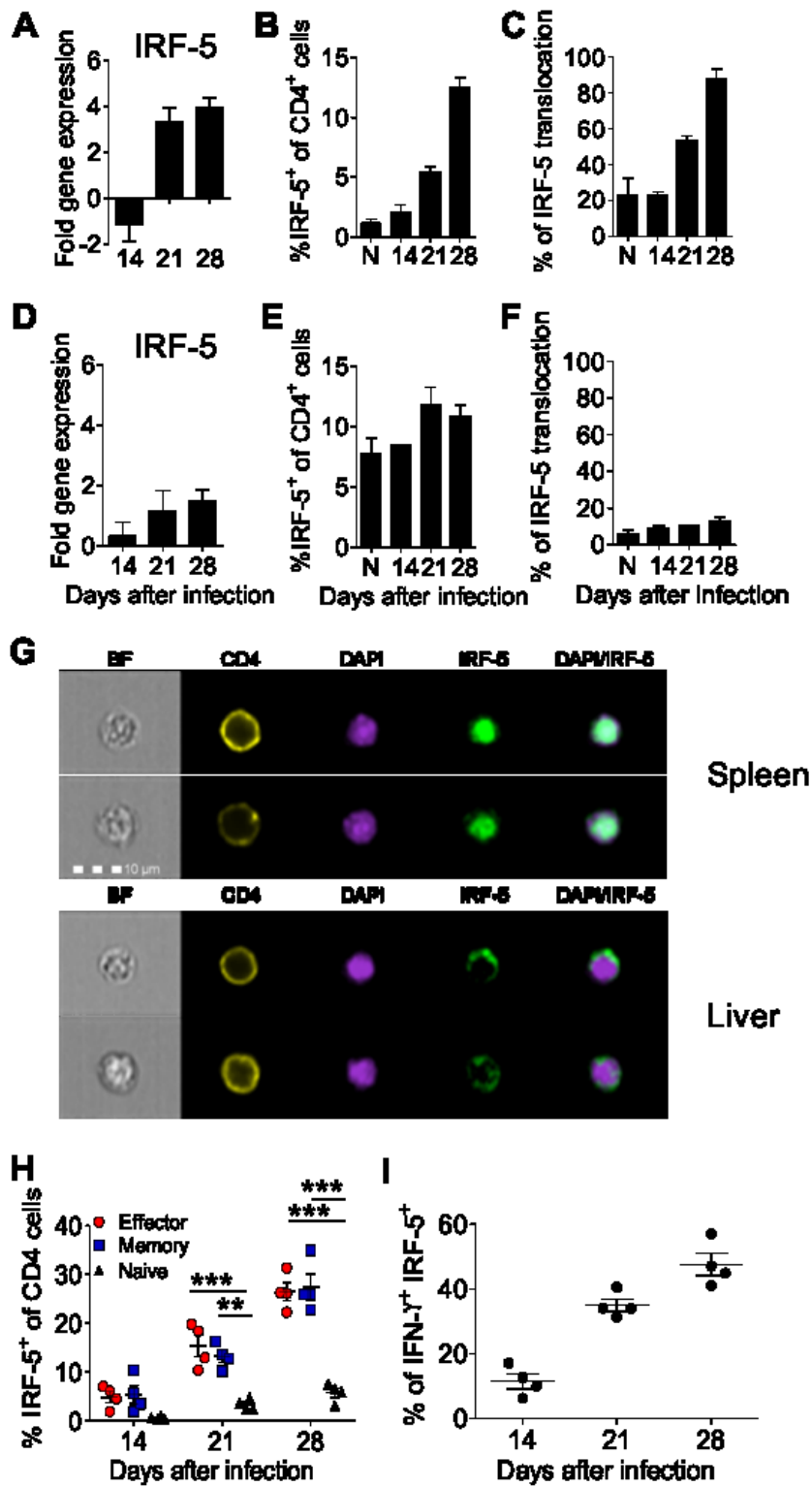


Figure 2.1. IRF-5 is activated in splenic CD4 T cells during chronic visceral leishmaniasis.

Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. (A) Real time PCR analysis of splenic CD4 T cells from *L. donovani* infected mice measuring mRNA for IRF5. (B) Percentage of splenic CD4 T cells expressing IRF5 after *L. donovani* infection. (C) Percentage of IRF5 nuclear translocation in splenic CD4 T cells. (D) Real time PCR analysis of IRF-5 mRNA expression levels in hepatic CD4 T cells. (E) Percentage of hepatic CD4 T cells expressing IRF5 and (F) percentage of hepatic CD4 T cells showing IRF5 nuclear translocation. (G) Representative images of CD4 T cells expressing IRF5: CD4 (yellow), nucleus (purple) and IRF5 (green). The last column represents co-expression of nuclear staining and IRF5. Upper row: examples of IRF-5 nuclear localisation, spleen; lower row, examples cytoplasmic localisation, liver. (H) Percentage of splenic effector ($CD44^+ CD62L^-$), memory ($CD44^+ CD62L^+$) and naïve ($CD44^- CD62L^+$) CD4 T cells expressing IRF5 over the course of infection. (I) Percentage of IRF-5⁺ within the IFN- γ^+ CD4 T population. Data represents mean \pm SEM of one of 3-4 independent experiments, n=3-5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Cell-specific IRF-5 ablation in T cells results in higher frequencies of IFN- γ -producing CD4 T cells during VL.

To better characterize the function of IRF-5 in CD4 T cells, we generated T cell-specific *Irf5*^{-/-} mice. We first compared the frequency of CD4 T cells and T cell precursors in the thymus of naïve *Irf5*^{fllox/fllox}-*Cre*⁺ (IRF-5 deficient) to that of *Cre*⁻ (IRF-5 sufficient) littermate controls to ensure that the absence of IRF-5 did not alter T cell development. The percentage of various precursors and of CD4 T cells present in the thymus was comparable in both groups of mice (Figure 2.2A, Supplemental Figures 2.S2A and B), as it was the frequency of CD4 T cells in the spleen (Figure 2.2B, Supplemental Figure 2.S2C). This confirmed that T cell development was normal in our T cell-specific IRF-5-deficient mice and that we could use these mice to investigate IRF-5 function in T cells during VL. Because total *Irf5*^{-/-} mice develop defective Th1 responses following *L. donovani* infection (Paun, 2011), we sought to determine if this transcription factor were required for IFN- γ production by CD4 T cells. Hence we stimulated naïve CD4 T cells from *Cre*⁺ and *Cre*⁻ mice with anti-CD3/CD28 in the presence of recombinant IL-12 and monitored IFN- γ production. The absence of IRF-5 did not seem to affect the differentiation into IFN- γ -producing Th1 cells (Figure 2.2C), suggesting that defective Th1 responses in *L. donovani* infected total *Irf5*^{-/-} mice was more a consequence of APC malfunction rather than an intrinsic T cell effect, in agreement with Krausgruber *et al.* (Krausgruber *et al.*, 2011).

We then infected *Cre*⁺ and *Cre*⁻ mice with *L. donovani* and monitored CD4 T cell responses over the course of infection. Interestingly, similar frequencies of splenic IFN- γ ⁺ CD4 T cells were detected in both groups of mice at d14p.i.; however, at d21 and 28 p.i. IFN- γ -producing CD4 T cells were significantly more abundant in the spleen of T cell-specific *Irf5*^{-/-} mice (Figure 2.2D,

Supplemental Figure 2.S2D). We next investigated whether this increase was a consequence of fewer CD4 T cells becoming exhausted during chronic VL. The frequency of exhausted PD-1⁺ TIM3⁺ CD4 T cells did not vary between both groups of infected mice (Figure 2.2E). To rule out the possibility that IRF-5 was affecting the survival of regulatory T cells and that this had an indirect impact on the frequencies of IFN- γ ⁺ CD4 T cells, we examined Tr1 and Tregs responses. No differences were observed in the percentage of IFN- γ ⁺ IL-10⁺ Tr1 cells (Stager et al., 2006) (Figure 2.2F) or Foxp3⁺ CD4 T cells (Figure 2.2G and Supplemental Figure 2.S2D), concurring with our previous observation that IRF-5 was mainly active in IFN- γ ⁺ CD4 T cells. Overall, these results indicate that IRF-5 may be involved in regulating the survival of IFN- γ ⁺ CD4 T cells.

Since Th1 responses are required to control parasite growth (Bankoti and Stager, 2012), it was not surprising that *Cre*⁺ mice displayed a significantly lower splenic and hepatic parasite burden (Figure 2.2H).

Figure 2.2

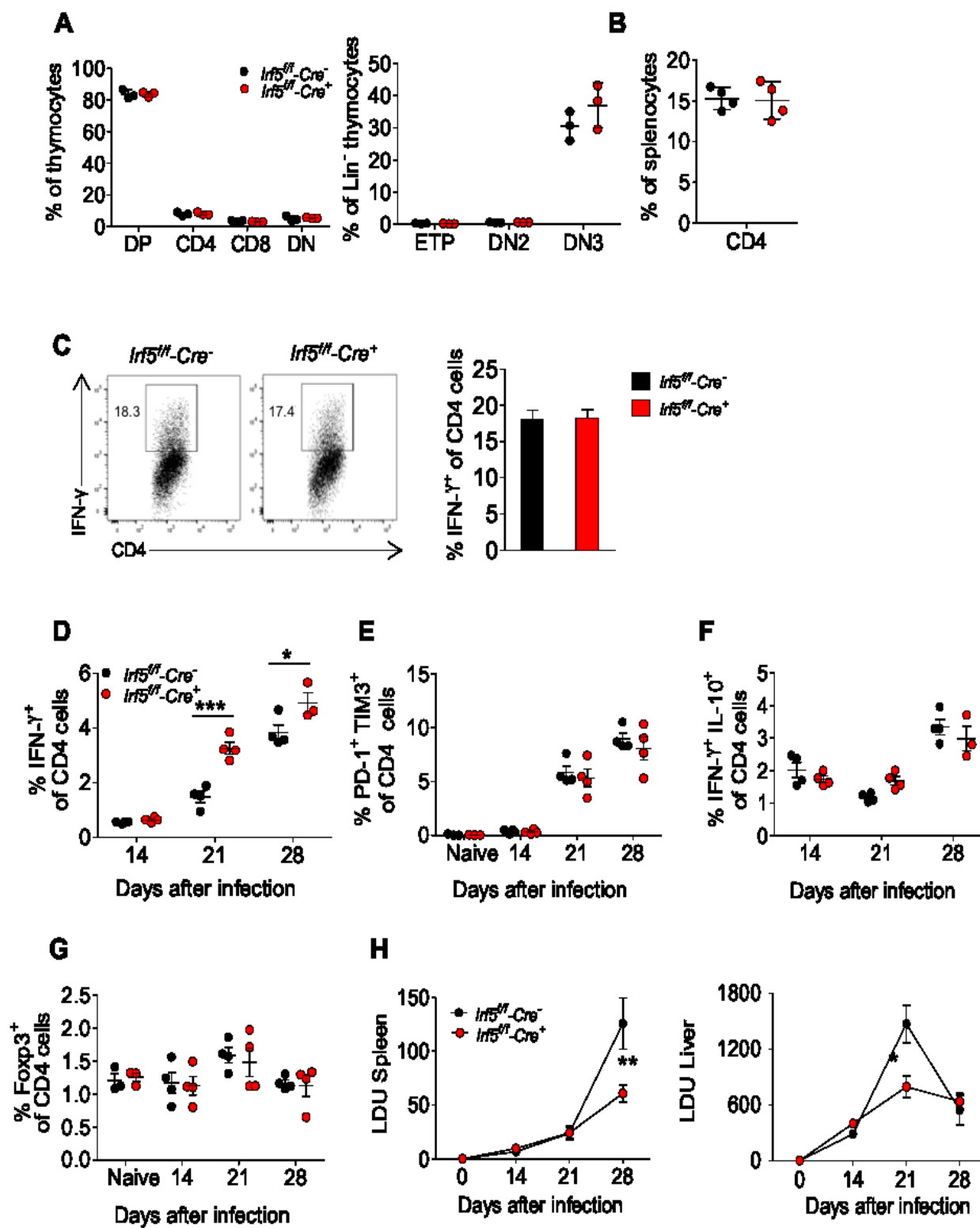


Figure 2.2. Cell-specific IRF-5 ablation in T cells results in higher frequencies of IFN- γ -producing CD4 T cells during VL.

Thymus and spleen from naïve *Irf5^{fl/fl}Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}Cre⁺* mice were harvest to assess T cells development. (A) Percentage of thymic T cells in *Irf5^{fl/fl}Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}Cre⁺* mice, showing CD4⁺CD8⁺ double positive (DP), CD4⁺ or CD8⁺ single positive and CD4⁻ CD8⁻ double negative (DN) cells (left panel). T cell progenitors were first gated on Lin⁻ lineage negative (B220, CD3 ϵ , CD11b, GR1, Ter119, CD8 α) and then separated according to c-Kit (CD117) and CD25 expression as follows: c-Kit⁺ CD25⁻ ETP, c-Kit⁺ CD25⁺ DN2, and c-Kit⁻ CD25⁺ DN3 (right panel). (B) Percentage of splenic CD4 T cells in naïve *Irf5^{fl/fl}Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}Cre⁺* mice. (C) CD4⁺ T cells from *Irf5^{fl/fl}Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}Cre⁺* mice were stimulated with anti CD3/CD28 in the presence of IL-12. Representative FACS plots and percentage of IFN- γ ⁺ CD4 T cells. (D-G) Mice were infected with 2x10⁷ amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. Graphs show frequency of (D) IFN- γ ⁺CD3⁺ CD4⁺, (E) PD-1⁺ TIM3⁺CD3⁺ CD4⁺, (F) IFN- γ ⁺ IL-10⁺CD3⁺ CD4⁺, and (G) FoxP3⁺CD3⁺ CD4⁺ T cells in infected *Irf5^{fl/fl}Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}Cre⁺* mice. (H) Graphs represent the splenic (left) and hepatic (right) parasite burden at different times of *L. donovani* infection. Data is shown as the mean \pm SEM of one of 3 independent experiments, n=3-5. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

TLR7 is required to induce IRF-5 in CD4 T cells during VL

In the following experiment, we wanted to identify which pathway was responsible for IRF-5 upregulation in IFN- γ ⁺ CD4 T cells, to better understand the role this transcription factor might have in these cells. IRF-5 can be induced, among others, by IFN-I and TLR7. IFN-I is upregulated during chronic VL (Silva-Barrios et al., 2016) and TLR7 can be triggered by the parasite (Paun, 2011; Silva-Barrios et al., 2016). Hence, we performed adoptive transfer experiments using *Ifnar*^{-/-} and *Tlr7*^{-/-} CD4 T cells and monitored the expression of IRF-5 in endogenous and adoptively transferred cells during the course of *L. donovani* infection. When we transferred *Ifnar*^{-/-} CD4 T cells into congenic mice, we noticed that IRF-5 was upregulated (Figure 2.3A) and translocated (Figure 2.3B) at similar levels as endogenous WT CD4 T cells. Moreover, no differences were observed in the percentage of IFN- γ -producing cells between WT and *Ifnar*^{-/-} CD4 T cells (Figure 2.3C). In contrast, adoptively transferred *Tlr7*^{-/-} CD4 T cells failed to upregulate IRF-5 (Figure 2.3D), suggesting that TLR7 is upstream of IRF-5 in CD4 T cells. Similarly to *Irf5*^{-/-} cells (Figure 2.2D), significantly more *Tlr7*^{-/-} CD4 T cells expressed IFN- γ at d28 p.i. (Figure 2.3E).

Figure 2.3

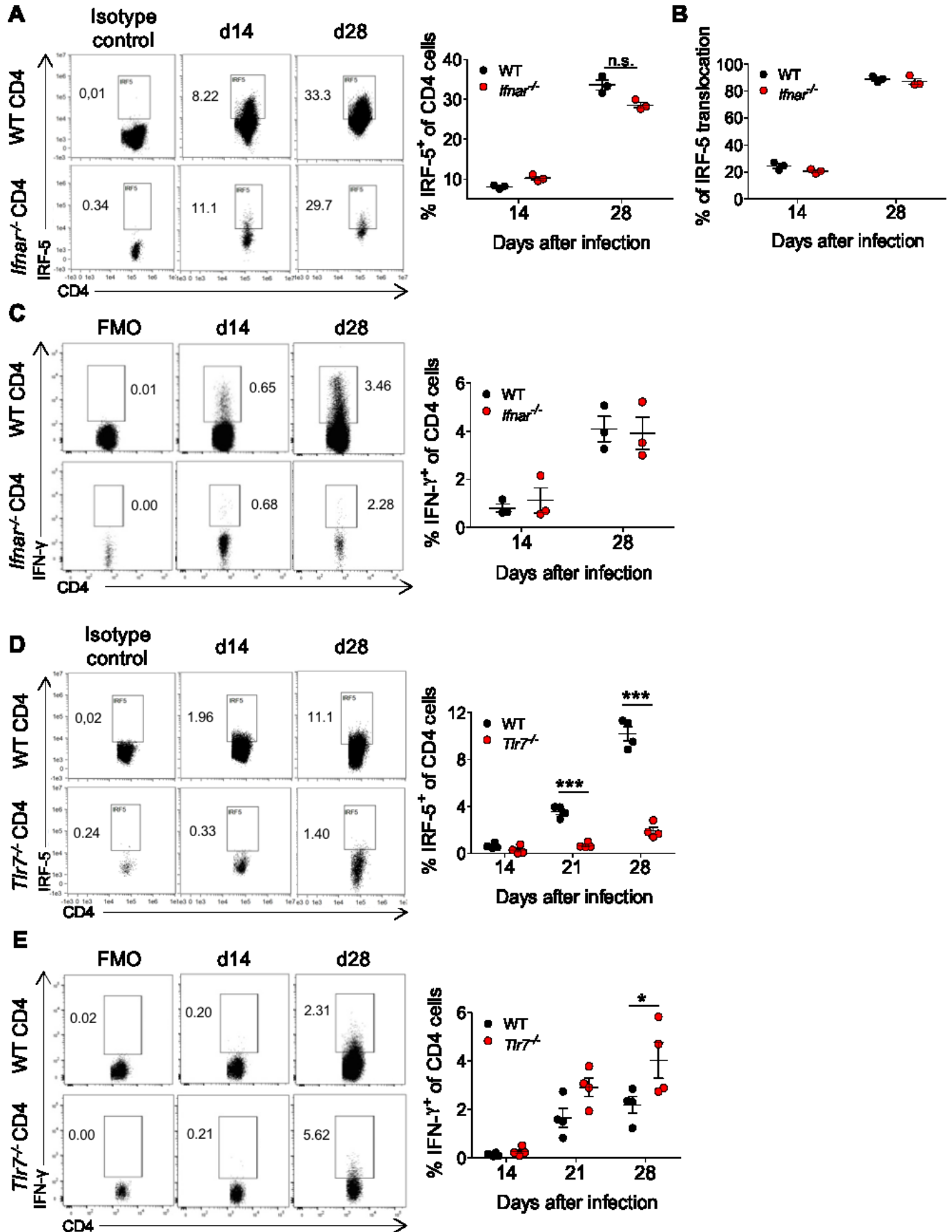


Figure 2.3. TLR7 is required to induce IRF-5 in CD4 T cells during VL.

CD4 T cells from *Ifnar*^{-/-} and *Tlr7*^{-/-} mice were adoptively transferred into CD45.1 congenic mice a day prior to infection with 2×10^7 *L. donovani* amastigotes. Graphs show (A) the percentage of endogenous (WT) and adoptively transferred (*Ifnar*^{-/-}) CD4 T cells expressing IRF5, (B) the percentage of IRF5 nuclear translocation, and (C) the frequency of splenic IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD4⁺ T cells over the course of **L. donovani** infection. Graphs represent (D) the percentage of endogenous (WT) and adoptively transferred (*Tlr7*^{-/-}) CD4 T expressing IRF5 and (E) the percentage of splenic IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD4⁺ T cells over the course of **L. donovani** infection. Data is shown as the mean \pm SEM of one of 3 independent experiments, n=3-4. **p* < 0.05, ****p* < 0.001.

TLR7-induced IRF-5 promotes the upregulation of DR5 and induces cell death in CD4 T cells from *L. donovani* infected mice.

Several studies have reported the expression of various TLR, including TLR7, on murine T cell subsets (Caramalho et al., 2003; Fukata et al., 2008; Gelman et al., 2004; Tomita et al., 2008). To better identify the role of TLR7 in inducing IRF-5, we first assessed its expression on CD4 T cells over the course of *L. donovani* infection. The expression kinetics of TLR7 mRNA was similar to the one observed for IRF-5: at d14p.i., it was expressed at similar levels as in CD4 T cells from naïve mice; however, by d21 and 28 p.i., CD4 T cells from infected mice significantly upregulated TLR7 (Figure 2.4A). We next investigated whether TLR7 was responsible for IRF-5 induction in CD4 T cells during VL. CD4 T cells were purified from the spleen of *L. donovani* infected mice at d14, 21, and 28 p.i. and treated in vitro with the TLR7 agonist imiquimod (IMQ). IRF-5 mRNA expression was evaluated 24 and 30 hours after stimulation (Figure 2.4B). As expected, treatment with IMQ did not induce IRF-5 in CD4 T cells purified from the spleen at d14 p.i., since the cells do not yet express TLR7 (Figure 2.4B). In contrast, when we stimulated cells enriched at d21 and 28 p.i., we saw an upregulation of IRF-5 at 24 and 30h post treatment (Figure 2.4B).

When we perform adoptive transfer experiments using CD4 T cells, we notice that a large percentage of adoptively transferred wild type CD4 T cells down regulates CD4 (Figure 2.4C). About 70% respectively 50% of the adoptively transferred CD4 T cells present in the spleen are CD4^{lo/neg} at d21 and 28 p.i. Most of these cells also down regulated CD3 (Supplemental Figure 2.S3A) and about 30% of the cells were DR5 and annexinV positive (Supplemental Figure 2.S3B and C). Interestingly, the majority of the CD4^{lo/neg} T cells upregulated B220 (Supplemental

Figure 2.S3D), a marker that has been associated with pre-apoptotic stages in T cells (Oka et al., 2000; Park et al., 2002; Renno et al., 1998).

Surprisingly, adoptive transfer of *Tlr7*^{-/-} or *Irf5*^{-/-} CD4 T cells does not lead to the same results and only a small percentage of cells down regulate CD4 at d21 and 28 p.i. (Figure 2.4C).

IRF-5 has been described to transcriptionally regulate death receptor 5 (DR5 or TRAIL receptor 2) in human colorectal carcinoma cell lines, sensitizing cells to TRAIL-induced apoptosis (Hu and Barnes, 2009). Thus, we were wondering if DR5 and cell death were also promoted following TLR7 stimulation of CD4 T cells. We first assessed whether DR5 was expressed on CD4 T cells during VL and we noticed that this molecule was upregulated on CD4 T cells from d21 p.i. on (Figure 2.4D and Supplemental Figure 2.S4A). We also monitored the expression of Fas receptor (FasR), another known IRF-5 target (Hu and Barnes, 2009), on CD4 T cells from *L. donovani* infected *Irf5*^{fllox/fllox}-*Cre*⁺ and *Cre*⁻ mice. No differences were observed between *Cre*⁺ and *Cre*⁻ mice (Figure 2.4E and Supplemental Figure 2.S4B). Similar results were obtained when we assessed TNF receptor-I (TNFR-I) expression (Figure 2.4F and supplemental Figure 2.S4C and D), suggesting that DR5, but not FasR or TNFR-I, may possibly be a target of IRF-5 in CD4 T cells.

Indeed, DR5 was also upregulated on CD4 T cells purified at d21 and 28 p.i., but not on those from d14p.i. following TLR7 stimulation with IMQ (Figure 2.4G), implying that the TLR7-IRF-5-DR5 pathway could predispose CD4 T cells to cell death. Hence, we monitored the expression of Annexin V on CD4 T cells in *L. donovani* infected *Cre*⁺ and *Cre*⁻ mice (Figure 2.4H and Supplemental Figure 2.S4E). CD4 T cells in IRF-5-sufficient mice increasingly showed signs of apoptosis over the course of VL, while the frequency of CD4 T cells expressing Annexin V was significantly lower at d28 p.i. in *Cre*⁺ mice. Moreover, apoptosis was also induced in CD4 T

cells purified at d21 and 28 p.i. following incubation with IMQ (Figure 2.4I), while Annexin V expression was not altered in CD4 T cells from d14 p.i. infected mice. To determine whether IRF-5 induction in CD4 T cells made cells more prone to TRAIL-mediated death, we treated CD4 T cells purified at d14 and 21p.i. from *L. donovani* infected mice with recombinant TRAIL. Cell death was assessed after 6h by FACS. As shown in Figure 4J, treatment with rTRAIL did not alter cell survival rate in CD4 purified at d14p.i., when DR5 is still expressed at low levels (Figure 2.4D). In contrast, when we incubated CD4 T cells from d21-infected mice, we noticed a significant increase in cell death in rTRAIL-treated cells.

Taken together, these results indicate that the TLR7-IRF-5-DR5 axis sensitizes splenic CD4 T cells to TRAIL-induced cell death during VL.

Figure 2.4

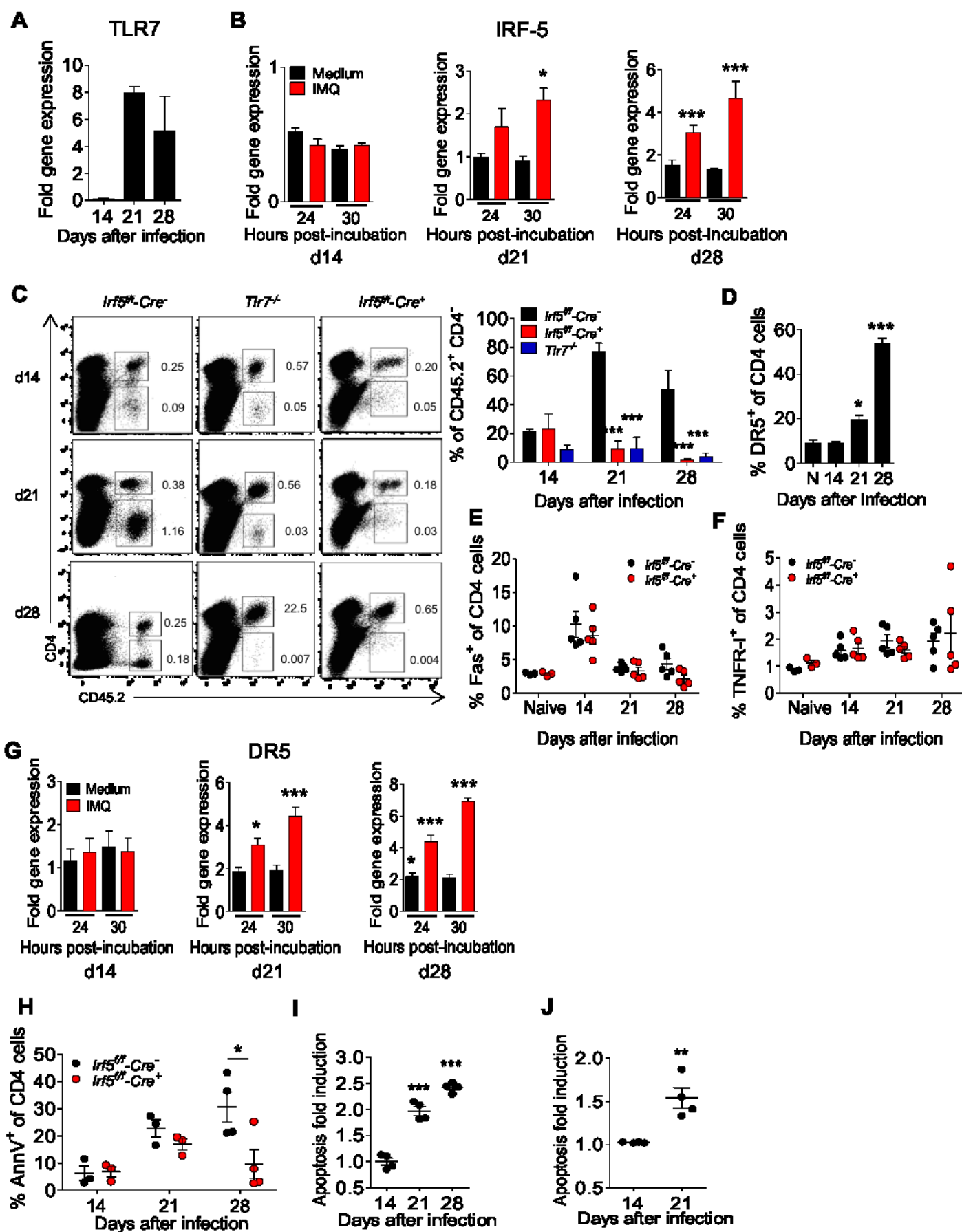


Figure 2.4. TLR7-induced IRF-5 promotes the upregulation of DR5 and induces cell death in CD4 T cells from *L. donovani* infected mice.

Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. (A) Real time PCR of splenic CD4 T cells from infected mice measuring mRNA for TLR7. (B) Purified CD4 T cells from infected mice were incubated with medium or imiquimod. Real time PCR analysis of IRF5 mRNA levels in CD4 T cells from infected C57BL/6 mice. (C) *Irf5^{fl/fl}-Cre⁺*, *Irf5^{fl/fl}-Cre⁻*, and *Tlr7^{-/-}* CD4 T cells were adoptively transferred into congenic CD45.1 mice a day prior to *L. donovani* infection. Representative dot plots (left panels) and percentages (right panel) of adoptively transferred CD45.2⁺ cells from the various donors. (D-I) Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. Graphs show frequency of (D) DR5⁺, (E) Fas⁺ and (F) TNFR- Γ ⁺ CD4 T cells in the spleen of naïve and *L. donovani* infected mice. (G) Real time PCR analysis of DR5 mRNA levels in CD4 T cells purified from the spleen of infected mice and incubated with medium or IMQ. (H) Percentage of apoptotic CD4⁺ T cells in infected *Irf5^{fl/fl}-Cre⁻* or *Irf5^{fl/fl}-Cre⁺* mice. (I) Apoptosis fold induction in splenic CD4 T cells from infected mice 30h after IMQ treatment. Apoptosis fold induction was calculated as follows: (cell death in IMQ treated sample – ex-vivo cell death)/ (medium control cell death – ex-vivo cell death). (J) Apoptosis fold induction in CD4 T cells from d21 infected mice following a 6h-incubation with recombinant TRAIL; fold induction was calculated as: (cell death in rTRAIL treated sample –ex-vivo cell death)/ (medium control cell death –ex-vivo cell death). Data represents the mean \pm SEM of one of 3 independent experiments, n=4. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

IRF-5 does not affect CD4 T cell proliferation

IRF-5 was reported to be involved in cell cycle regulation in tumor cells (Barnes et al., 2003). Thus, we assessed, whether there was a difference in the proliferative capacity between *Cre*⁻ and *Cre*⁺ CD4 T cells. CFSE-labelled naïve *Cre*⁻ and *Cre*⁺ CD4 T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 in vitro for 5 days. No differences in the percentage of CFSE^{lo/int} cells were observed between the two groups over the 5-days period (Figure 2.5A), indicating that IRF-5 deficiency did not confer a proliferative advantage. To test whether *Cre*⁻ and *Cre*⁺ CD4 T cell had a similar proliferative capacities during *L. donovani* infection, we performed a double adoptive transfer experiment, in which IRF-5 sufficient CD45.1 and IRF-5 deficient CD45.2 CD4 T cells were co-transferred into CD45.1/CD45.2 recipients a day prior to *L. donovani* infection. The proliferative capacity was monitored based on the Ki67 expression. As shown in Figure 5B, IRF-5 sufficient and deficient cells had similar Ki67 expression levels, suggesting that the absence of IRF-5 did not alter cell division in CD4 T cells in vivo as well. Interestingly, though, the number of IRF-5 deficient CD4 T cells present in the spleen at d21 and 28 p.i. was significantly higher than that of IRF-5 sufficient cells (Figure 2.5C). Because both cell types had similar proliferative capacities (Figure 2.5B), this implies that wild type CD4 T cells were dying.

Figure 2.5

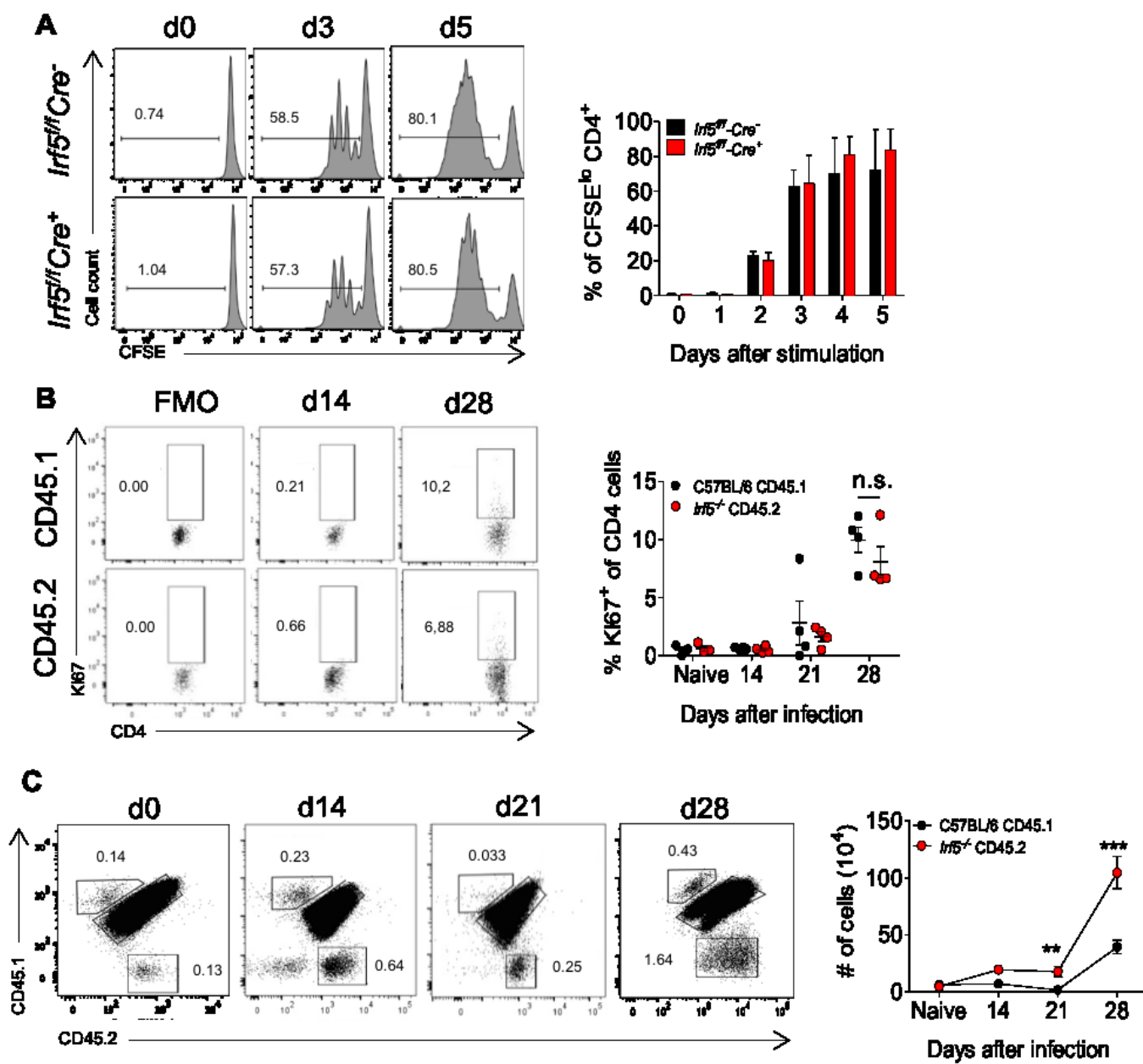


Figure 2.5. IRF-5 does not affect CD4 T cell proliferation during *L. donovani* infection.

(A) CFSE labeled, IRF-5-sufficient and -deficient CD4 T cells were stimulated with anti-CD3/CD28; CFSE dilution was used as readout for proliferation. Representative histograms (left panel) and percentages (right panel) of CFSE^{lo} CD4 T cells are shown.

(B-C) 5x10⁶ CD45.1 C57BL/6 and *Irf5*^{-/-} CD4 T cells were co-transferred into CD45.1/CD45.2 recipients a day prior to *L. donovani* infection. Mice were then euthanized at various time points after infection. (B) Representative dot plots (left panel) and percentages (right panel) of Ki67⁺ CD4 T cells; (C) representative dot plots (left panel) and average numbers (right panel) of CD45.1 WT (*Irf5*^{fl/fl}-*Cre*⁻) and CD45.2 *Irf5* deficient (*Irf5*^{fl/fl}-*Cre*⁺) CD4 T cells. Data represents the mean ± SEM. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

TLR7-mediated IRF-5 activation and CD4 cell death are not a consequence of microbial sensing.

The next important question that arose was to determine whether TLR7 on CD4 T cells was directly triggered by *L. donovani* and whether other pathways were also involved in inducing IRF-5. Hence, we incubated CD4 T cells purified from d14, 21, and 28 p.i. with CpG, LPS, parasites, and parasite RNA or DNA, and monitored IRF-5 and DR5 expression by flow cytometry. Because apoptotic/necrotic material has also been described to induce IRF-5 in monocytes of SLE patients (Stone et al., 2012) and splenic tissue disruption occurs during chronic VL (Smelt et al., 1997), we incubated CD4 T cells with supernatant (SN) of apoptotic splenocytes previously incubated with staurosporine. As for IMQ, cells purified at d14p.i. did not upregulate IRF-5 (Figure 2.6A) or DR5 (Figure 2.6B) with any of the stimuli. Only IMQ and the supernatant of apoptotic splenocytes induced IRF-5 and DR5 expression 30h after incubation on CD4 T cells enriched at d21 and 28 p.i. (Figure 2.6A and B, and Supplemental Figures 2.S5A and B). Similarly, only the incubation of CD4 T cells with IMQ and the SN of apoptotic splenocytes led to an increase in cell death (Figure 2.6C), while all other treatments did not alter the survival of the cells at any time point observed. This suggests that microbial sensing or TLR9 and 4 were not involved in inducing IRF-5 expression and cell death in CD4 T cells during VL, but this pathway was rather triggered by tissue disruption and TLR7.

Figure 2.6

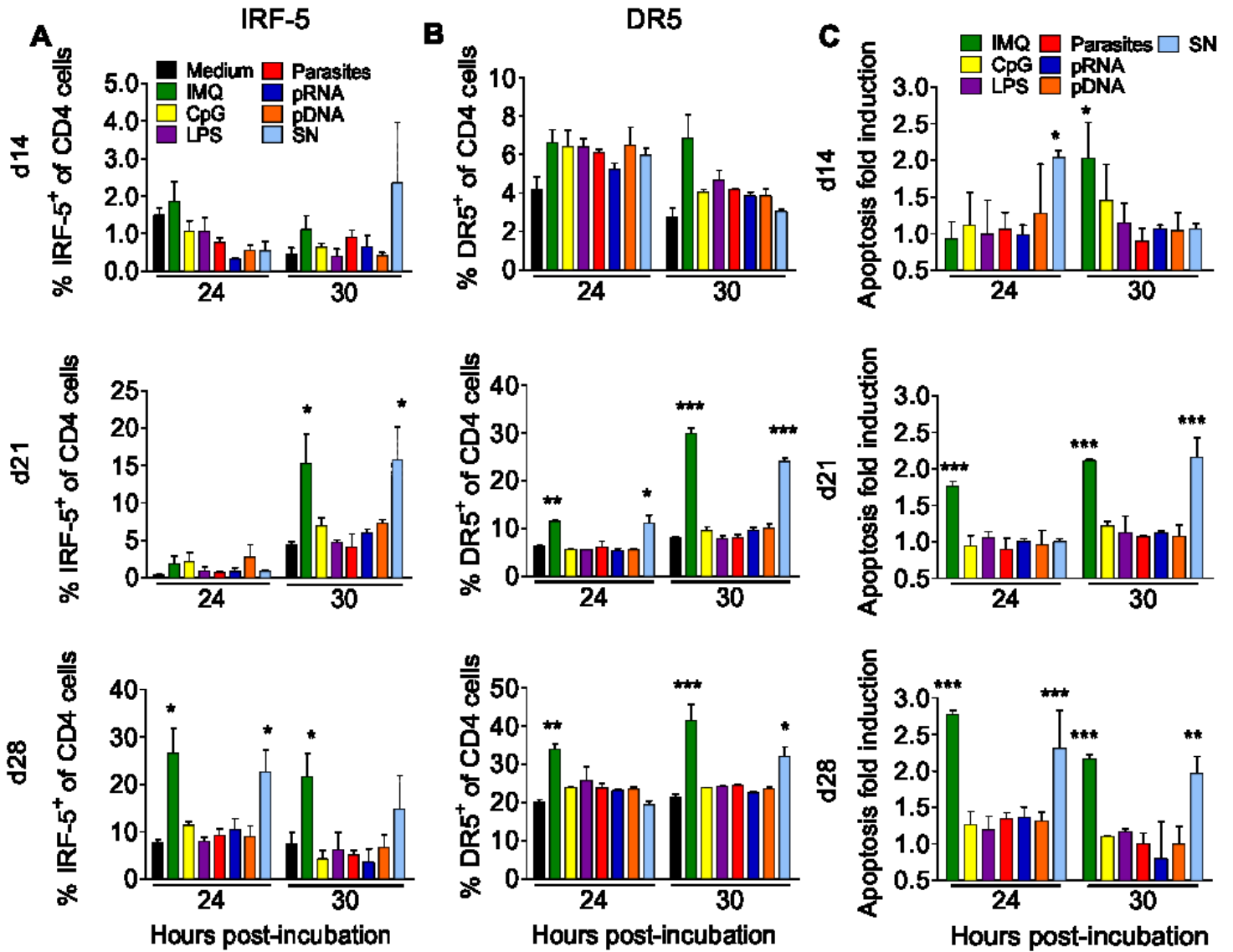


Figure 2.6. TLR7-mediated IRF-5 activation and CD4 cell death are not a consequence of microbial sensing.

Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. CD4 T cells were purified from the spleen of infected mice and incubated with medium, IMQ, CpG, LPS, living parasites (P), parasite RNA (pRNA), parasite DNA (pDNA), or supernatant from apoptotic cells (SN). Graphs show the percentage of splenic CD4 T cells from infected mice expressing (A) IRF5 and (B) DR5, and (C) the fold induction of apoptosis in CD4 T cells from infected mice after treatments. Data represents the mean \pm SEM of one of 3 independent experiments, n=4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Apoptotic cell material induces IRF-5 via TLR7

Our results indicate that TLR7 and tissue disruption can both induce IRF-5 in CD4 T cells from *L. donovani* infected mice. Hence, we next investigated if the SN from apoptotic cells was inducing IRF-5 via TLR7. CD4 T cells were purified from *L. donovani* infected C57BL/6 mice at d14 and 21p.i. and incubated with medium alone, IMQ, or SN from apoptotic cells. Cells were also treated or not with synthetic oligodeoxynucleotides with immunoregulatory sequences (IRS) that specifically block signaling via TLR-7, IRS661 (Barrat et al., 2005). Thirty hours later, IRF-5 expression was assessed by Image Stream. As expected, IRF-5 induction following IMQ treatment of d21 p.i. CD4 T cells was inhibited by IRS661 (Figure 2.7A). Interestingly, the TLR7 antagonist also prevented the upregulation of IRF-5 following incubation of CD4 T cells purified at d21p.i. with SN from staurosporine-treated cells (Figure 2.7A), suggesting that apoptotic material also signals via TLR7. No differences in the level of IRF5 expression were detected after any treatment of CD4 T cells purified at d14p.i.

To identify the SN component(s) that triggers TLR7, we purified RNA and DNA (Supplemental Figure 2.S6) from the SN of apoptotic cells and analysed whether IRF-5 was induced by these two components. As expected, treatment of splenic *Cre*⁻ CD4 T cells from d21 infected mice with IMQ or SN resulted in the upregulation of IRF-5 mRNA, which was abrogated by the TLR7 agonist IRS661 ODN (Figure 2.7B). In contrast, IRF-5 mRNA levels did not change when RNA or DNA purified from the SN of apoptotic cells was added to the same *Cre*⁻ CD4 T cells (Figure 2.7B), suggesting that pure RNA or DNA from apoptotic cell material is not involved in the TLR7-dependent IRF-5 induction in CD4 T cells.

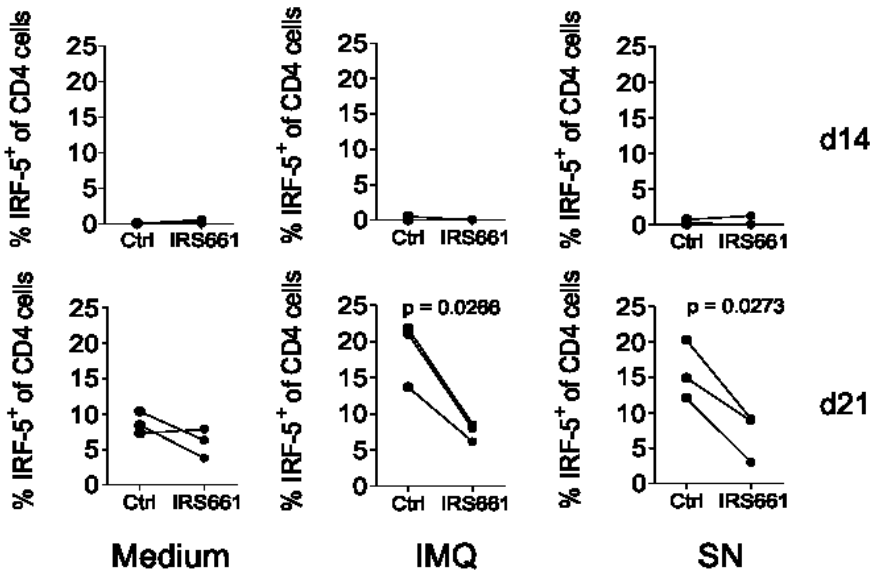
Similarly to IRF-5, DR5 expression was also not induced following incubation of *Cre*⁻ CD4 T cells with RNA or DNA purified from the SN of apoptotic cells, but it was induced, as expected,

by IMQ and the SN in cells purified at d21p.i. (Figure 2.7C). Treatment with IRS661 ODN abrogated DR5 induction. To note, DR5 was not upregulated in CD4 from *Cre*⁺ mice even when treated with IMQ and SN, confirming that IRF-5 is required in this pathway. We next determined the level of caspase 8 mRNA expression (Figure 2.7D). Caspase 8 is another reported downstream target of IRF-5 (Hu and Barnes, 2009) and is part of the TRAIL-mediated cell death signalling pathway. Treatment of CD4 T cells purified from d21 infected *Cre*⁻ mice with IMQ or SN resulted in a significant caspase 8 induction, which was blocked by IRS661 ODN. No effect on caspase 8 mRNA expression levels was observed when the same cells were incubated with RNA or DNA purified from the SN of apoptotic cells (Figure 2.7D). As for DR5, *Cre*⁻ CD4 T cells and IRF-5-deficient CD4 T cells purified from infected mice at d14 or d14 and 21p.i. respectively did not upregulate caspase 8 expression under any condition tested (Figure 2.7D). Taken together, our results suggest that RNA or DNA from staurosporine-treated cells cannot trigger TLR7 to induce IRF-5 in CD4 T cells and that IRF-5 is a crucial component in this pathway.

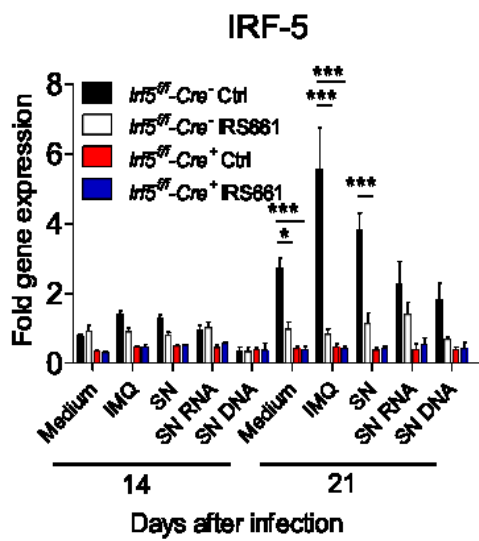
We finally sought to understand whether the lack of IRF-5 was somehow altering TLR7 expression on CD4 T cells and this would additionally contribute to the reduced cell death observed in IRF-5-deficient CD4 T cells. To this end, we monitored TLR7 expression on CD4 T cells at d14, 21, and 28p.i. in *L. donovani* infected *Cre*⁻ and *Cre*⁺ mice. As shown before (Figure 2.4A), TLR7 expression was increasingly upregulated over the course of infection in *Cre*⁻ CD4 T cells (Figure 2.7E). In contrast, TLR7 mRNA was maintained on a stable level in IRF-5-deficient CD4 T cells (Figure 2.7E), suggesting that IRF-5 is not only directly involved in the TLR7-IRF-5-DR5 pathway, but it also participates in a feedforward loop to upregulate TLR7 expression.

Figure 2.7

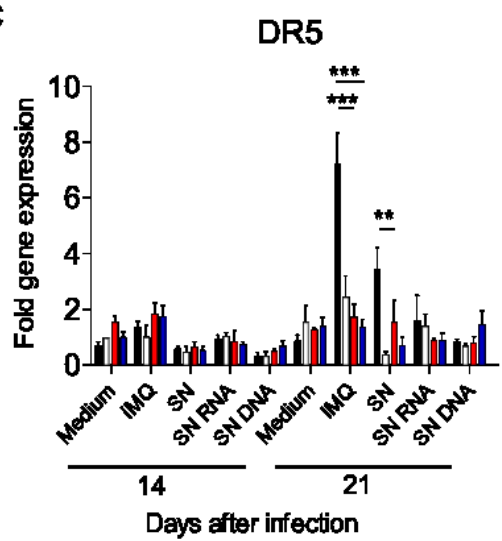
A



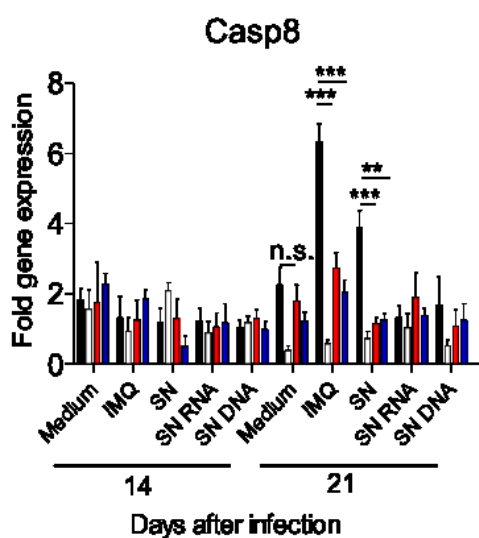
B



C



D



E

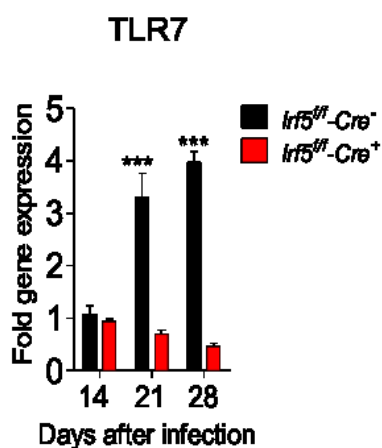


Figure 2.7. Inhibition of TLR7 impairs IRF-5-mediated cell death pathway.

(A-D) CD4 T cells from infected mice were treated with IRS661 or ODN control for 30 min prior to a 30h-incubation with medium alone, IMQ, supernatant from apoptotic cells, RNA or DNA purified from the supernatant of apoptotic cells. Graphs represent (A) expression of IRF-5, (B-D) real time PCR measuring (B) IRF-5, (C) DR5 and (D) Caspase 8 mRNA expression levels. (E) TLR7 mRNA expression levels in Cre^- and Cre^+ CD4 T cells over the course of *L. donovani* infection. Data is shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Discussion

Chronic infections are typically associated with anti-inflammatory responses aimed at regulating T cell responses and limiting tissue injuries. However, these responses often favour pathogen persistence and may result in immune suppression. In the present study, we propose IRF-5 as an important player in the regulation of pro-inflammatory CD4 T cells. We show that TLR7-mediated IRF-5 activation is enhancing DR5-dependent induction of apoptosis of protective IFN- γ -producing CD4 T cells in *L. donovani* infected mice. T cell-specific IRF-5 ablation resulted in stronger IFN- γ responses and ultimately lower parasite burden. Our results also suggest that this pathway is triggered by tissue disruption.

Inflammation is essential for controlling intracellular pathogen growth. However, excessive and/or chronic inflammation often leads to tissue damage and initiates anti-inflammatory tissue-protecting pathways. In the case of VL, disruption of the splenic microarchitecture occurs from d14 p.i. on and leads to an impaired capacity of naïve T cells and dendritic cells to migrate to T cell area (Ato et al., 2002) and a progressive loss of B cell germinal centers (Smelt et al., 1997). TNF is largely responsible for initiating this process as well as for inducing IL-10 (Ato et al., 2002; Engwerda et al., 2002). Tissue damage is accompanied by a massive infiltration of inflammatory cells and by splenomegaly (Hammami, 2017). In this environment, we observed a gradual upregulation and activation of IRF-5 in IFN- γ ⁺ CD4 T cells. Increased IRF-5 expression was paralleled by an upregulation of TLR7 and DR5. Although high IFN-I levels have been linked to DR5 and lymphocytes death (Hardy et al., 2007; Herbeuval et al., 2006), we did not see a direct effect of IFN-I on IRF-5 upregulation and CD4 T cell death in *L. donovani* infected mice. In contrast, IRF-5 appeared to be induced by TLR7, TLR9 and 4, which are both expressed

in T cells (Rahman et al., 2009), do not seem to promote IRF-5 expression in CD4 T cells. The function of innate sensors in cells of adaptive immunity is still a fairly unexplored field. TLR signalling pathways in T cells were shown to be necessary for effective clonal expansion, in that they act synergistically with TCR-induced signals to enhance proliferation, survival and cytokine production in effector cells (Rahman et al., 2009). Nevertheless, TLR7 was reported to induce energy in human CD4 T cells (Dominguez-Villar et al., 2015). A similar antiproliferative activity was also recently attributed to Stimulator of IFN genes (STING) in T lymphocytes (Cerboni et al., 2017). We also observed a reduction in proliferation of CD4 T cells from *L. donovani* infected mice in the presence of IMQ (data not shown); however, the most remarkable effect of TLR7 triggering was the induction of IRF-5 and subsequently DR5, a known target of IRF-5 (Hu and Barnes, 2009). The TLR7-IRF-5 pathway was sensitizing CD4 T cells to TRAIL-mediated cell death. Interestingly, IRF-5 and DR5 were mainly expressed in IFN- γ ⁺ CD4 T cells, suggesting that induction of apoptosis via IRF-5 preferentially affected pro-inflammatory cells. This observation prompted us to believe that this pathway may be in place to protect inflammation-mediated tissue injuries.

A major question that arose during our study pertained to the nature of the ligand responsible for triggering TLR7 in CD4 T cells: is the TLR7 pathway activated following microbial sensing? *Leishmania* typically resides in parasitophorous vacuoles inside macrophages (Arango Duque et al., 2014). While parasites have been seen inside or on various cells other than macrophages (Abidin et al., 2017; Bankoti et al., 2012; Ribeiro-Gomes et al., 2012; Romano et al., 2017; Silva-Barrios et al., 2016), they were never reported to be internalized by T cells. However, there is still the remote possibility, though, that dead parasites or RNA from dead parasites could be internalized by T cells and trigger TLR7. Our results refute this possibility: *Leishmania* or

leishmanial DNA/RNA does not trigger TLR7 to induce IRF-5 in T cells, suggesting that IRF-5-induced cell death during VL is not a consequence of microbial sensing.

Because splenic tissue disruption is a characteristic feature of VL (Silva-Barrios et al., 2016) and, in SLE patients, IRF-5 can be induced by apoptotic/necrotic material (Stone et al., 2012), we were not surprised to observe that the supernatant of apoptotic splenocytes induced IRF-5 expression and consequently cell death of CD4 T cells from *L. donovani* infected mice. Interestingly, RNA and DNA released by apoptotic cells were not involved in this induction, suggesting that other, yet unidentified supernatant components may trigger the TLR7 pathway in T cells. Hence, local tissue damage mediated by persistent inflammation leads to suppression of protective T cell responses during chronic VL. The fact that IRF-5 is not activated in hepatic CD4 T cells supports our conclusions. Indeed, this organ clears *L. donovani* infection by generating a very efficient granulomatous response without major disruption of the hepatic microarchitecture. It is well documented that dying cells can regulate adaptive immunity by the release of damage-associated molecular pattern (DAMP). However, DAMPs are mainly known for promoting inflammation and provide immunogenic signals enhancing T cell priming (Yatim et al., 2017). In our model of chronic infection, tissue damage appears to dampen pro-inflammatory CD4 T cell responses rather than promoting inflammation. This discrepancy probably depends on the cell and receptor recognising DAMPs and on the stage of infection; innate sensors may have very different functions in T cells in a chronic inflammatory environment.

Although the activation of the TLR7-IRF-5-DR5 axis in T cells protects the spleen by reducing inflammation, it is also beneficial to the establishment of persistent *L. donovani* infection. Indeed, IFN- γ ⁺ CD4 T cells are essential for controlling parasite growth during chronic VL

(Engwerda et al., 1998). In *L. donovani* infected mice, IFN- γ -producing CD4 T cells are first detectable at d14 p.i. and reach maximal expansion at d28 p.i. In the liver, high frequencies of parasite-specific IFN- γ^+ CD4 T cells are observed (Paun, 2011); in contrast, small percentages of IFN- γ -producing CD4 T cells are typically detected in the spleen. Because progressive tissue damage and upregulation of TLR7 also occur during this time in the spleen, we believe that IRF-5-mediated CD4 T cell death severely undermines the expansion and, later, the maintenance of protective responses in this organ. This highlights a tissue-specific inhibition of CD4 T cell responses in *L. donovani* infected mice. It remains to determine though, whether IRF-5-mediated death of effector CD4 T cells is restricted to *Leishmania*-specific responses or it extends to all effector CD4 T cells present in the spleen and therefore be accountable for the general immune suppression observed in VL patients.

Another observation that requires further investigation concerns the regulation of TLR7 expression in CD4 T cells. Our results indicate that IRF-5 is involved in the upregulation of this receptor. However, we do not yet know the exact role of IRF-5 in this feed-forward loop or the initial signal(s) responsible for inducing and activating IRF-5. Because TLR7 is also upregulated on T cells during chronic viral infections in humans (Dominguez-Villar et al., 2015; Hammond et al., 2010), dissecting the dynamic of IRF-5 and TLR7 induction in T cells could help identify potential therapeutic targets aimed at reversing suppression of protective T cell responses during persistent infections.

In conclusion, we propose IRF-5 as an important player in the regulation of IFN- γ^+ CD4 T cell responses during chronic VL. Activation of this transcription factor is TLR7-dependent and appears to be induced by apoptotic/necrotic material. In IFN- γ^+ CD4 T cells, IRF-5 promotes the

expression of DR5 and caspase 8, sensitizing these cells to TRAIL-mediated cell death. Because tissue disruption is a common characteristic of persistent infections, this regulatory pathway may not only be activated during VL, but could be a generalized mechanism present in other chronic infectious diseases.

Material and Methods

Mice and parasites

B6.129S7-*Rag1^{tm1Mom}* and congenic B6-Ly5.1 mice were purchased from The Jackson Laboratory. C57BL/6-*Tlr7^{-/-}* mice and *Ifnar^{-/-}* mice were a kind gift from Drs. Alain Lamarre (INRS-Institut Armand Frappier) and Jörg Hermann Fritz (McGill University). Mice with a targeted IRF-5 mutation in T cells were generated by crossing *Irf5^{flox/flox}* mice (Hammami et al., 2015) with mice expressing the cre-recombinase under the Lck promoter. All mice were housed at the INRS animal facility under specific pathogen-free conditions and used at 6-10 weeks of age. *Leishmania donovani* (strain LV9) were maintained by serial passage in B6.129S7-*Rag1^{tm1Mom}* mice, and amastigotes were isolated from the spleen of infected animals. Mice were infected by injecting 2×10^7 amastigotes intravenously via the lateral tail vein. Splenic parasite burden were determined by examining methanol-fixed, Giemsa stained tissue impression smears. Data are presented as Leishmania Donovanii Units (LDU) (Silva-Barrios et al., 2016).

Study approval

Experiments involving mice were carried out under protocols approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux of the INRS-Institut Armand Frappier (1510-02, 1602-02). These protocols respect procedure on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care. No differences in the course of *L. donovani* infection were observed between male and female mice; so male and female mice were used indiscriminately. Nevertheless, male mice were always matched and compared to male mice for the various experimental groups.

In vivo Th1 polarization

CD4 T cells were enriched by magnetic cell sorting (MACS) using a CD4 T cell isolation kit (Miltenyi Biotech) and activated for 5 days with plate-bound 1 μ g/ml anti-CD3 (Clone 145-2C1C, eBioscience) and 2 μ g/ml anti-CD28 (Clone 37.51, eBioscience) in the presence of 2ng/ml IL-2 and 30ng/ml IL-12 (PeproTech). Cells were then restimulated for 4 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin in the presence of Brefeldin A (Sigma), harvested, and analysed by flow cytometry as detailed below.

In vitro CD4 T cell proliferation

CD4 T cells were enriched by magnetic cell sorting (MACS) using a CD4 T cell isolation kit (Miltenyi Biotech), then stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) as previously described (Joshi et al., 2009). CFSE-labelled CD4 T cells were activated with plate-

bound 1µg/ml anti-CD3 (Clone 145-2C1C, eBioscience) and 2µg/ml anti-CD28 (Clone 37.51, eBioscience) in the presence of 2ng/ml IL-2 and analysed by flow cytometry as detailed below.

Adoptive transfer experiments

C57Bl/6, C57Bl/6-Ly5.1, *Irf5*^{-/-}, *Tlr7*^{-/-}, and *Ifnar*^{-/-} mice were used as CD4 T cells donors. CD4 T cells were enriched by MACS from splenocytes of naïve animals using a CD4 T cell isolation kit (Miltenyi Biotech). 5x10⁶ donor CD4 T cells were injected into the lateral tail vein of congenic B6-Ly5.1 or B6-Ly5.1-Ly5.2 mice the day prior to infection with *L. donovani* amastigotes. Mice were sacrificed at the indicated time points.

Flow cytometry

The following antibodies were used for surface staining: BV421-conjugated anti-CD3 (Clone 145-2C11, BD Biosciences), BV421-conjugated anti-CD4 (Clone GK1.5, BD Biosciences), FITC-conjugated anti-CD4 (Clone GK1.5, BD Biosciences), PE-conjugated anti-CD4 (Clone GK1.5, BD Biosciences), FITC-conjugated anti-CD45.2 (Clone 104, BD Biosciences), APC-conjugated anti-CD8 (Clone 53-6.7, BD Biosciences), APC-conjugated streptavidin (BD Biosciences), APC-R700-conjugated anti-CD117 (Clone 2B8, BD Biosciences), APC-conjugated annexin V (BD Biosciences), PE-conjugated anti-PD-1 (Clone J43, eBioscience), biotin-conjugated anti-DR5 (Clone MD5.1, eBioscience), PE-conjugated anti-CD25 (Clone PC61.5, eBioscience), PE-Cy7-conjugated anti-TIM3 (Clone B8.2C12, Biolegend), PE-conjugated anti-Fas (Clone SA367H8, Biolegend), APC-conjugated anti-CD120a (TNFR-I) (Clone 55R-286, Biolegend), BV650-conjugated CD45.2 (Clone 104, BD Biosciences),

Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend). Intracellular staining was performed as previously described (Hammami et al., 2015). Briefly, splenocytes were either restimulated with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) pulsed with fixed parasites or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin in the presence of Brefeldin A (BD Biosciences). After fixation, cells were permeabilized and stained with the following antibodies: APC-conjugated anti-IFN γ (Clone XMG1.2, BD Biosciences), PE-conjugated anti-IL10 (BD Biosciences), AF488-conjugated anti-FoxP3 (Clone FJK-16s, eBioscience), PE-Cy7-conjugated anti-Ki67 (Clone 16A8, Biolegend); propidium iodide (Sigma). Flow cytometric analysis was performed with a BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson). Samples were analyzed with Flowjo and DIVA software.

ImageStream flow cytometry

The following antibodies were used for surface staining: PE-conjugated anti-CD4 (Clone GK1.5), biotin-conjugated anti-CD4 (Clone GK1.5), biotin-conjugated anti-CD45.2 (Clone 104, cat 553771), PE-Cy7-conjugated streptavidin, APC-conjugated streptavidin, PE-conjugated anti-CD62L (Clone MEL-14), APC-conjugated anti-CD44 (Clone IM7), and biotin-conjugated anti-CD3 (Clone 145-2C11) from BD Biosciences. For intracellular staining, cells were stimulated with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) pulsed with fixed parasites in the presence of Brefeldin A (BD Biosciences), and stained with surface antibodies. After fixation, cells were permeabilized and stained with APC-conjugated anti-IFN γ (Clone XMG1.2, BD Biosciences) and AF488-conjugated anti-IRF5 (R&D Systems). DAPI (InVitroGen) was used to stain the nucleus of cells immediately before acquisition. Samples were acquired using the ImageStreamX MKII flow cytometer and analyzed with IDEAS software (Amnis Corporation, Seattle, WA,

USA). 200,000-500,000 gated cell singlets were analyzed for each sample. Nuclear localization of IRF5 was measured using a morphology mask to determine a similarity score, which quantifies the correlation of pixel values of the DAPI and IRF5 images on a per cell basis. A similarity score >1 was used as a cut-off for nuclear-localization. Cells in individual bins were visually inspected to confirm subcellular localization (values < or >1).

Quantitative real-time PCR analysis

RNA from isolated CD4 T cells from in vitro or in vivo experiments was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN) as per manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) following as previously described (Hammami et al., 2015). Real-time PCR analysis was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). *Dr5*, *Irf5*, *Tlr7* and *Hprt* were amplified using the following primers: **Hprt**, 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3' and 5'-GAT TCA ACC TTG CGC TCA TCT TAG GC-3'; **Tnfrsf10b (DR5)** 5'-TGA CGG GGA AGA GGA ACT GA-3' and 5'-GGC TTT GAC CAT TTG GAT TTG- 3'; **Irf5**, 5'-TAG AGG CTA CCC AGG AGC AA-3' and 5'-GCC CAC TCC AGA ACA CCT TA-3'; **Tlr7**, 5'-GGC ATT CCC ACT AAC ACC AC-3' and 5'-TTG GAC CCC AGT AGA ACA GG -3'; *Casp8*, 5'-CTC CGA AAA ATG AAG GAC AGA-3' and 5'-CGT GGG ATA GGA TAC AGC AGA-3'. All PCRs were carried out with the Stratagene mx3005p real-time PCR system. Data were normalized to HPRT and expressed as fold gene regulation compared to naive controls.

In vitro CD4 T cell stimulation and recombinant TRAIL treatment.

CD4 T cells were purified following manufacturer's instructions from splenocytes of infected and naïve mice by magnetic cell sorting (MACS) using a CD4 isolation kit (Miltenyi Biotech). Purified CD4 T cells (purity >95%) were incubated at 37°C for 24h or 30h with 5µg/ml imiquimod (InVivoGen), 3µg/ml CpG (InVivoGen), 10µg/ml LPS (Sigma), amastigotes at a MOI of 1:10, 500ng/ml parasite RNA, 500ng/ml parasite DNA, 10% v/v supernatant of staurosporine-treated cells, 500ng/ml RNA or 500ng/ml DNA purified from supernatant of staurosporine-treated cells. Oligodeoxynucleotides (ODN) IRS661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') were used as TLR7 antagonist; 5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3' ODN were used as control (Barrat et al., 2005). ODN were prepared in sterile water and utilized at 5.6 µg/ml. Cells were treated with IRS661 30 min before to receive others treatments. For TRAIL treatment, CD4 T cells were purified as mentioned above and incubated at 37°C for 6h with 100ng/ml recombinant murine TRAIL (Peprotech). Cells were cultured in RPMI-1640 (Gibco, InVitroGen) supplemented with 10% FBS.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using paired Student's t-test or multi-way ANOVA. Statistical analysis was conducted using Graphpad Prism (GraphPad Software). Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$. All experiments were conducted independently at least three times.

Acknowledgments

The authors thank the Canadian Institutes of Health Research (MOP-123293 to SS) for financial support. JvG is a recipient of the Banting Research Foundation award.

Author contributions

AF performed experiments, analyzed data, wrote the manuscript; SS conceived the project, designed the experimental approach, interpreted data, and wrote the manuscript; XDL, performed experiments; LMT and AH performed experiments and analyzed data; JVG provided key expertise and interpreted data.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

References

- Abidin, B.M., Hammami, A., Stager, S., and Heinonen, K.M. (2017). Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* *13*, e1006422.
- Arango Duque, G., Fukuda, M., Turco, S.J., Stager, S., and Descoteaux, A. (2014). Leishmania promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. *J Immunol* *193*, 2363-2372.
- Ato, M., Stager, S., Engwerda, C.R., and Kaye, P.M. (2002). Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* *3*, 1185-1191.
- Bankoti, R., Gupta, K., Levchenko, A., and Stager, S. (2012). Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol* *188*, 3961-3971.
- Bankoti, R., and Stager, S. (2012). Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with *Leishmania donovani*. *J Trop Med* *2012*, 639304.
- Barnes, B.J., Kellum, M.J., Pinder, K.E., Frisancho, J.A., and Pitha, P.M. (2003). Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer research* *63*, 6424-6431.
- Barnes, B.J., Moore, P.A., and Pitha, P.M. (2001). Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *The Journal of biological chemistry* *276*, 23382-23390.
- Barnes, B.J., Richards, J., Mancl, M., Hanash, S., Beretta, L., and Pitha, P.M. (2004). Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *The Journal of biological chemistry* *279*, 45194-45207.
- Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* *202*, 1131-1139.
- Bi, X., Feng, D., Korczeniewska, J., Alper, N., Hu, G., and Barnes, B.J. (2014). Deletion of *Irf5* protects hematopoietic stem cells from DNA damage-induced apoptosis and suppresses gamma-irradiation-induced thymic lymphomagenesis. *Oncogene* *33*, 3288-3297.
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., and Demengeot, J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* *197*, 403-411.
- Cerboni, S., Jeremiah, N., Gentili, M., Gehrman, U., Conrad, C., Stolzenberg, M.C., Picard, C., Neven, B., Fischer, A., Amigorena, S., *et al.* (2017). Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *J Exp Med* *214*, 1769-1785.

- Couzinet, A., Tamura, K., Chen, H.M., Nishimura, K., Wang, Z., Morishita, Y., Takeda, K., Yagita, H., Yanai, H., Taniguchi, T., and Tamura, T. (2008). A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2556-2561.
- Dideberg, V., Kristjansdottir, G., Milani, L., Libioulle, C., Sigurdsson, S., Louis, E., Wiman, A.C., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Belaiche, J., *et al.* (2007). An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* *16*, 3008-3016.
- Dieguez-Gonzalez, R., Calaza, M., Perez-Pampin, E., de la Serna, A.R., Fernandez-Gutierrez, B., Castaneda, S., Largo, R., Joven, B., Narvaez, J., Navarro, F., *et al.* (2008). Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* *58*, 1264-1274.
- Dominguez-Villar, M., Gautron, A.S., de Marcken, M., Keller, M.J., and Hafler, D.A. (2015). TLR7 induces anergy in human CD4(+) T cells. *Nat Immunol* *16*, 118-128.
- Engwerda, C.R., Ato, M., Cotterell, S.E., Mynott, T.L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P.M., and Kaye, P.M. (2002). A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* *161*, 429-437.
- Engwerda, C.R., Murphy, M.L., Cotterell, S.E., Smelt, S.C., and Kaye, P.M. (1998). Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* *28*, 669-680.
- Fukata, M., Breglio, K., Chen, A., Vamadevan, A.S., Goo, T., Hsu, D., Conduah, D., Xu, R., and Abreu, M.T. (2008). The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* *180*, 1886-1894.
- Gelman, A.E., Zhang, J., Choi, Y., and Turka, L.A. (2004). Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* *172*, 6065-6073.
- Graham, R.R., Kozyrev, S.V., Baechler, E.C., Reddy, M.V., Plenge, R.M., Bauer, J.W., Ortmann, W.A., Koeth, T., Gonzalez Escribano, M.F., Pons-Estel, B., *et al.* (2006). A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* *38*, 550-555.
- Hammami, A., Abidin, B.M., Charpentier, T., Fabié, A., Duguay, A.P., Heinonen, K.M., and Stäger, S. (2017). HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathogens* *13*, e1006616.
- Hammami, A., Charpentier, T., Smans, M., and Stager, S. (2015). IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1 α and Impairing Dendritic Cell Functions during *Leishmania* Infection. *PLoS Pathog* *11*, e1004938.

- Hammond, T., Lee, S., Watson, M.W., Flexman, J.P., Cheng, W., Fernandez, S., and Price, P. (2010). Toll-like receptor (TLR) expression on CD4+ and CD8+ T-cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Cell Immunol* *264*, 150-155.
- Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 17453-17458.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., and Shearer, G.M. (2006). Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7000-7005.
- Hu, G., and Barnes, B.J. (2009). IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* *284*, 2767-2777.
- Joshi, T., Rodriguez, S., Perovic, V., Cockburn, I.A., and Stager, S. (2009). B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* *5*, e1000431.
- Kaye, P.M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., and Engwerda, C.R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* *201*, 239-253.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* *12*, 231-238.
- Oka, S., Mori, N., Matsuyama, S., Takamori, Y., and Kubo, K. (2000). Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology* *100*, 417-423.
- Park, S., Murray, D., John, B., and Crispe, I.N. (2002). Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol* *80*, 74-83.
- Paun, A., Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P.M., and Stäger, S. (2011). Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog*, *7*, e1001246.
- Rahman, A.H., Taylor, D.K., and Turka, L.A. (2009). The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunol Res* *45*, 25-36.
- Ranatunga, D., Hedrich, C.M., Wang, F., McVicar, D.W., Nowak, N., Joshi, T., Feigenbaum, L., Grant, L.R., Stager, S., and Bream, J.H. (2009). A human IL10 BAC transgene reveals tissue-specific control of IL-10 expression and alters disease outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 17123-17128.
- Renno, T., Attinger, A., Rimoldi, D., Hahne, M., Tschopp, J., and MacDonald, H.R. (1998). Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* *28*, 540-547.

- Ribeiro-Gomes, F.L., Peters, N.C., Debrabant, A., and Sacks, D.L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8, e1002536.
- Romano, A., Carneiro, M.B.H., Doria, N.A., Roma, E.H., Ribeiro-Gomes, F.L., Inbar, E., Lee, S.H., Mendez, J., Paun, A., Sacks, D.L., and Peters, N.C. (2017). Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLoS Pathog* 13, e1006479.
- Schoenemeyer, A., Barnes, B.J., Mancl, M.E., Latz, E., Goutagny, N., Pitha, P.M., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2005). The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 17005-17012.
- Silva-Barrios, S., Smans, M., Duerr, C.U., Qureshi, S.T., Fritz, J.H., Descoteaux, A., and Stager, S. (2016). Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell Rep* 15, 2427-2437.
- Smelt, S.C., Engwerda, C.R., McCrossen, M., and Kaye, P.M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* 158, 3813-3821.
- Stager, S., Maroof, A., Zubairi, S., Sanos, S.L., Kopf, M., and Kaye, P.M. (2006). Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 36, 1764-1771.
- Stone, R.C., Feng, D., Deng, J., Singh, S., Yang, L., Fitzgerald-Bocarsly, P., Eloranta, M.L., Ronnblom, L., and Barnes, B.J. (2012). Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons. *Arthritis and rheumatism* 64, 788-798.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., and Taniguchi, T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249.
- Tomita, T., Kanai, T., Fujii, T., Nemoto, Y., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Totsuka, T., Sakamoto, N., Akira, S., and Watanabe, M. (2008). MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. *J Immunol* 180, 5291-5299.
- Yatim, N., Cullen, S., and Albert, M.L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol* 17, 262-275.

Figure 2.S1

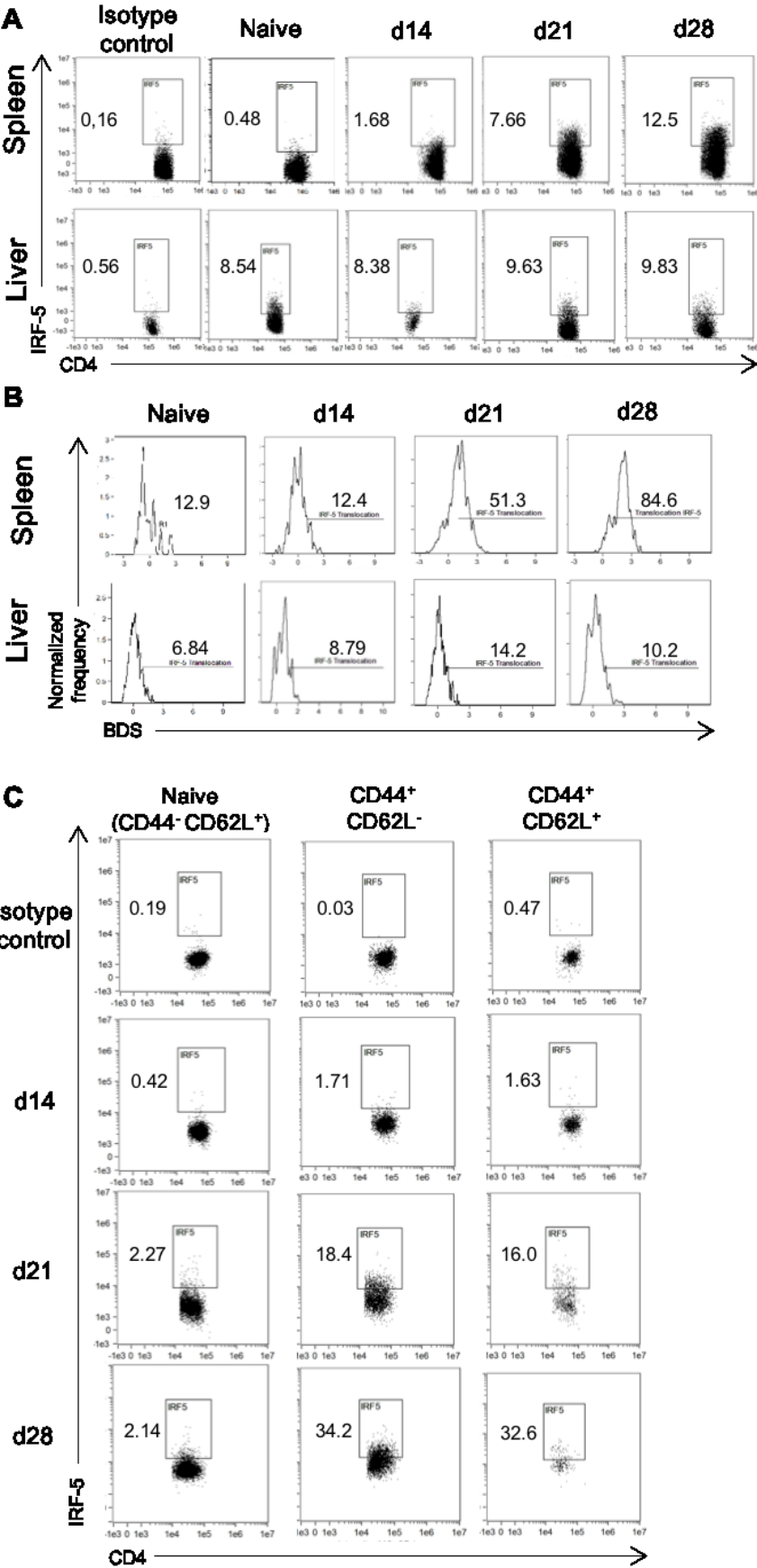


Figure 2.S1

Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. (A) Representative dot plots of splenic CD4 T cells expressing IRF5; (B) representative histograms of IRF5 nuclear translocation; and (C) representative dot plots of splenic effector ($CD3^+ CD4^+ CD44^+ CD62L^-$), memory ($CD3^+ CD4^+ CD44^+ CD62L^+$) and naïve ($CD3^+ CD4^+ CD44^- CD62L^-$) CD4 T cells expressing IRF5 over the course of **L. donovani** infection.

Figure 2.S2

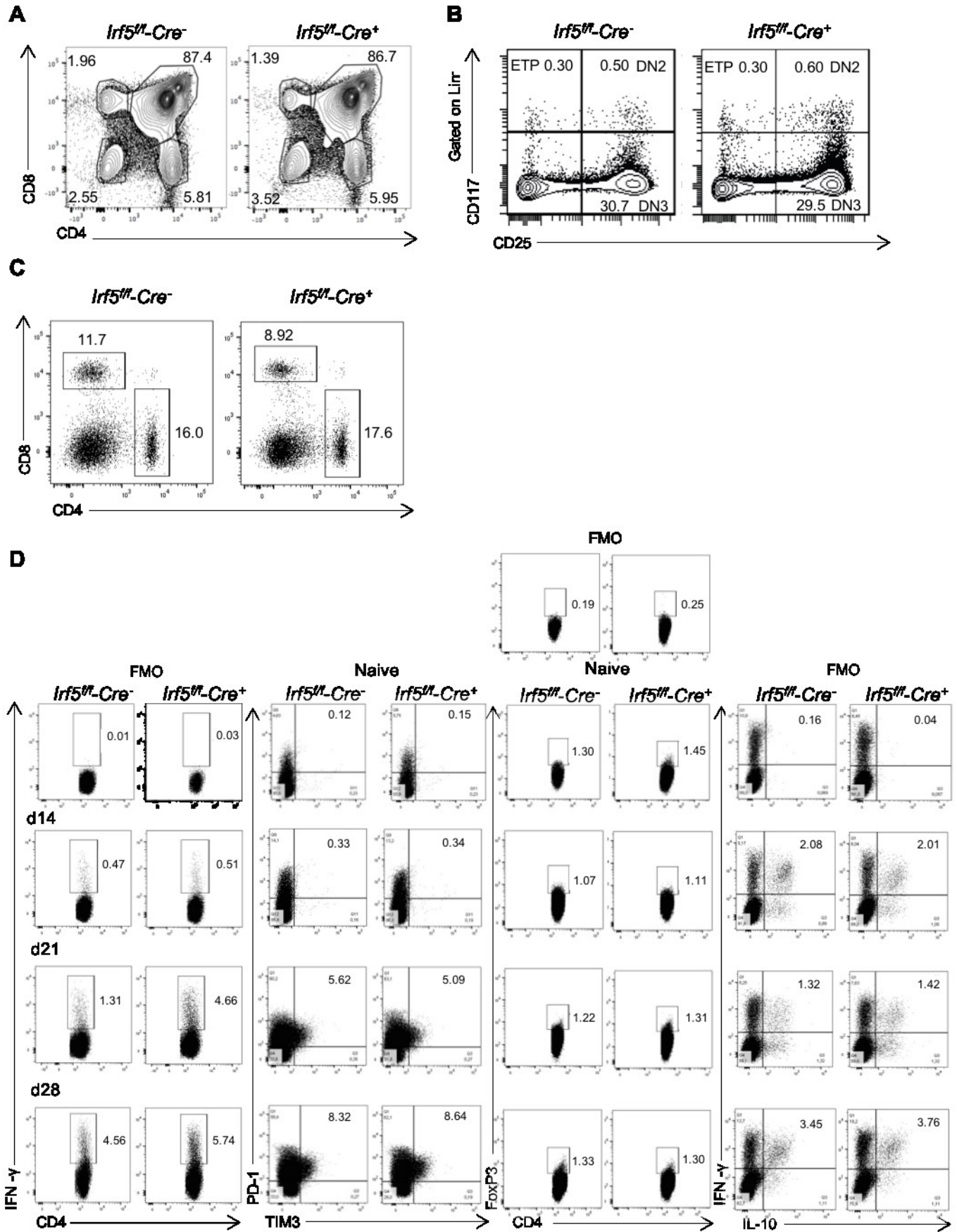


Figure 2.S2

(A) Representative dot plots of thymic T cells from naïve *Irf5^{fl/fl}-Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}-Cre⁺* mice, showing CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP), CD4⁺ or CD8⁺ single positive and CD4⁻ CD8⁻ double negative (DN) T cells. (B) Gating strategy for ETP (early thymic progenitors) and DN2 and 3. T cell progenitors were first gated on Lin⁻ (B220, CD3ε, CD11b, GR1, Ter119, CD8α) and then separated according to c-Kit (CD117) and CD25 expression as follows: c-Kit⁺ CD25⁻ ETP, c-Kit⁺ CD25⁺ DN2, and c-Kit⁻ CD25⁺ DN3. (C) Representative dot plots of splenic CD4 and CD8 T cells from naïve *Irf5^{fl/fl}-Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}-Cre⁺* mice. (D) Representative dot plots for IFNγ⁺ CD3⁺ CD4⁺, PD-1⁺ TIM3⁺ CD3⁺ CD4⁺, IFNγ⁺ IL-10⁺CD3⁺ CD4⁺, and FoxP3⁺ CD3⁺ CD4⁺ cells present in the spleen of *L. donovani* infected *Irf5^{fl/fl}-Cre⁻* and *Irf5^{fl/fl}-Cre⁺* mice.

Figure 2.S3

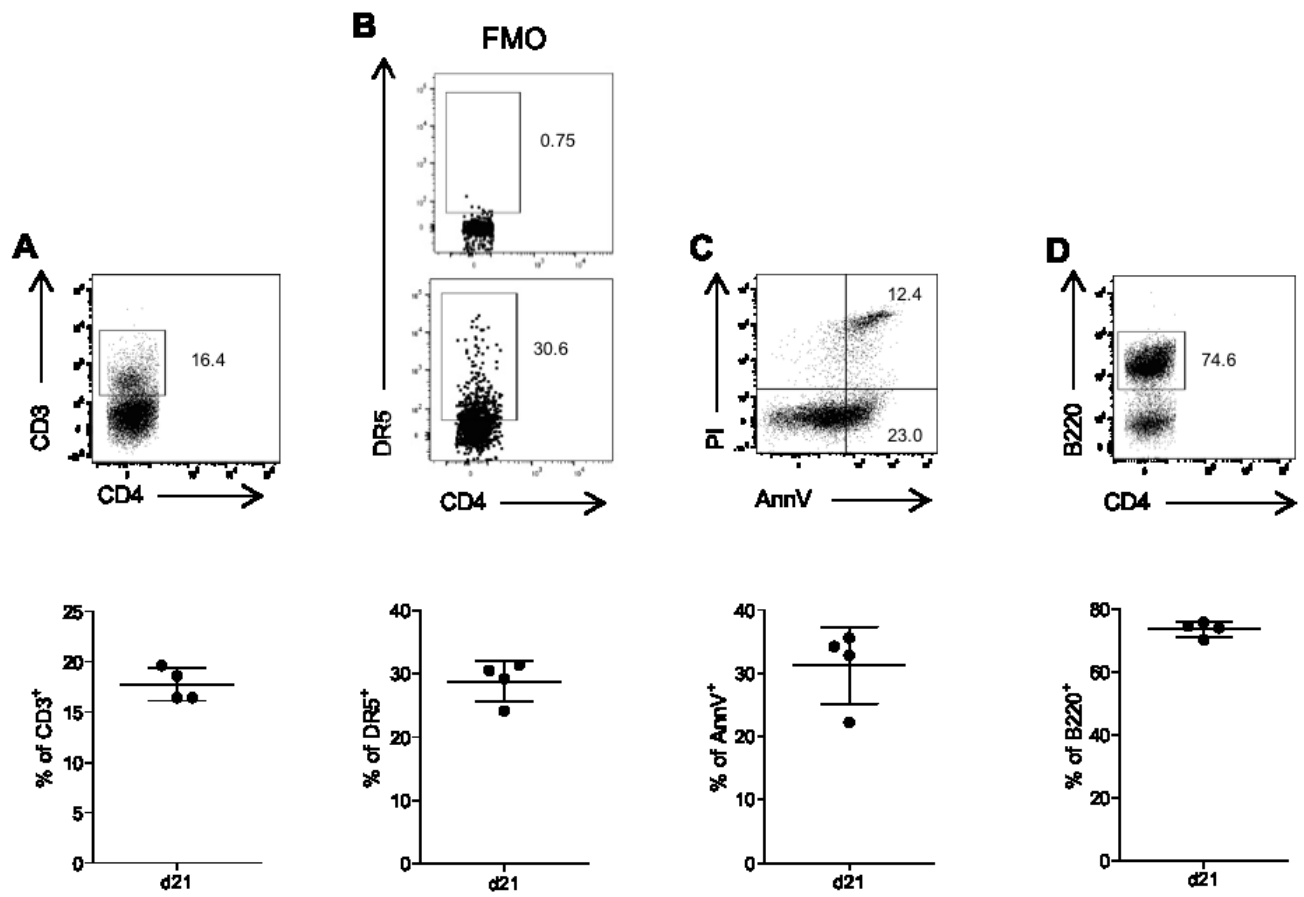


Figure 2.S3

CD45.1 CD4 T cells were adoptively transferred into C57BL/6 mice prior to *L. donovani* infection. Mice were euthanized at d21 p.i. and adoptively transferred CD45.1 cells that have down regulated CD4 were analysed for CD3, DR5 and Annexin V expression. Graphs show representative dot plots (upper panels) and percentages (lower panels) of CD3, DR5 and Annexin V positive cells.

Figure 2.S4

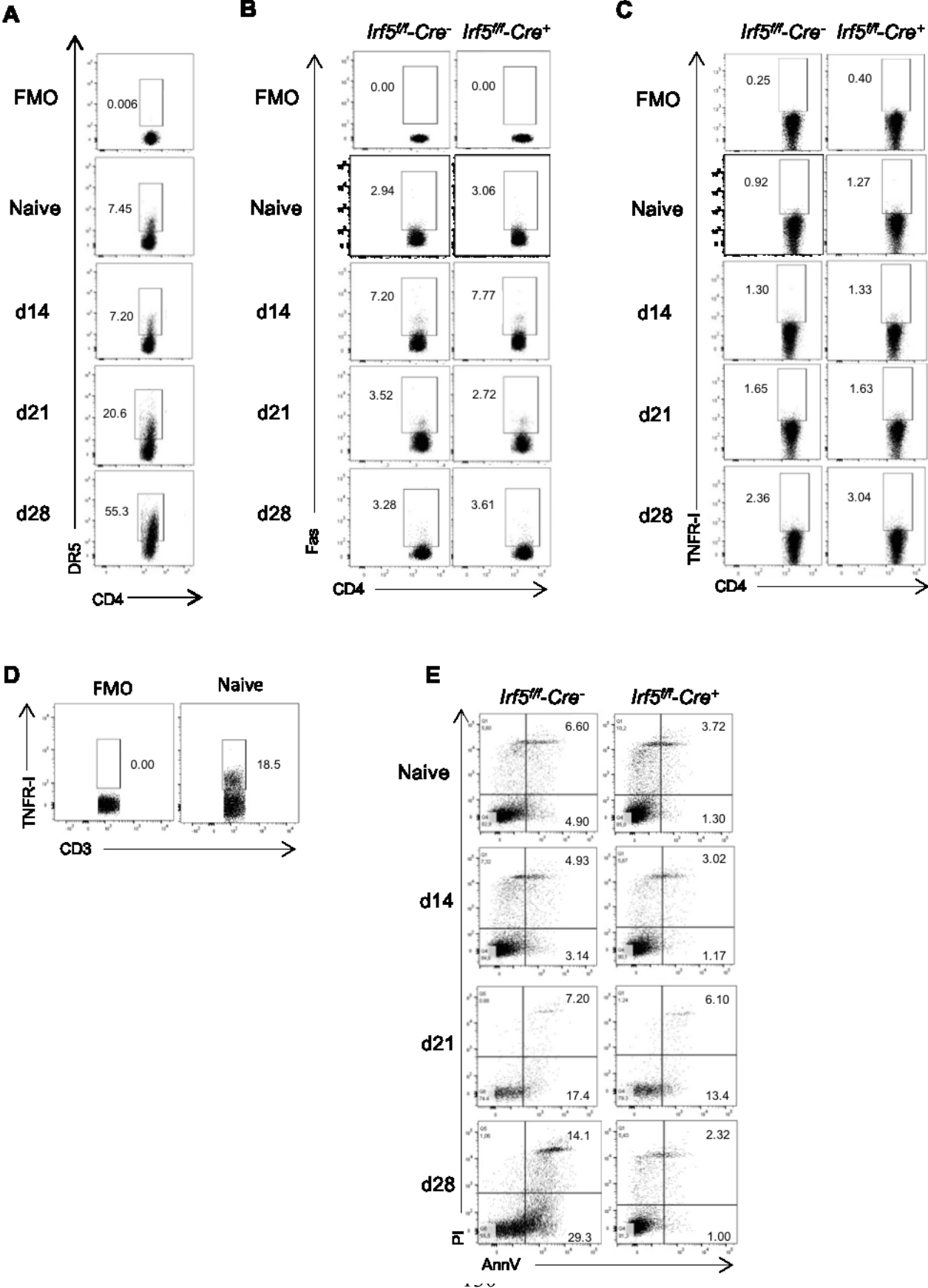


Figure 2.S4

Representative dot plots for (A) DR5, (B) Fas and (C) TNFR-I expression in splenic CD4 T cells from naïve and *L. donovani* infected mice. (D) Positive control for TNFR-I staining; PBMC from naïve mice. (E) Representative dot plots for Annexin V staining of CD4 T cells from *L. donovani* infected *Irf5^{f/f}-Cre⁻* and *Irf5^{f/f}-Cre⁺* mice.

Figure 2.S5

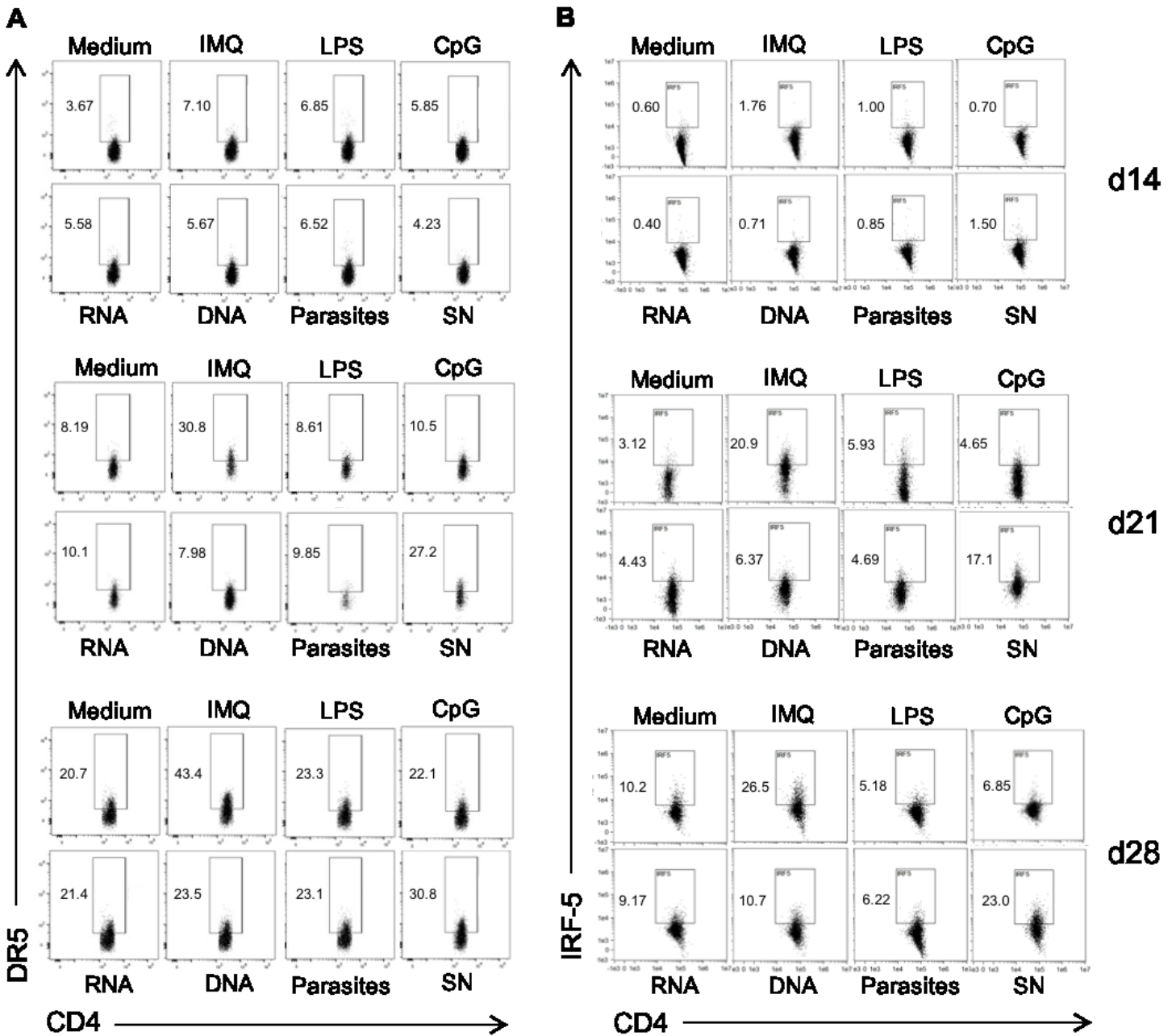


Figure 2.S5

Mice were infected with 2×10^7 amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. CD4 T cells were purified at d14, 12, and 28 p.i. from the spleen of infected mice and incubated for 30h with medium, IMQ, CpG, LPS, living parasites, parasite RNA, parasite DNA, or supernatant from apoptotic cells. Graphs show representative dot plots of splenic CD4 T cells expressing (A) DR5 and (B) IRF5 after treatments.

Figure 2.S6

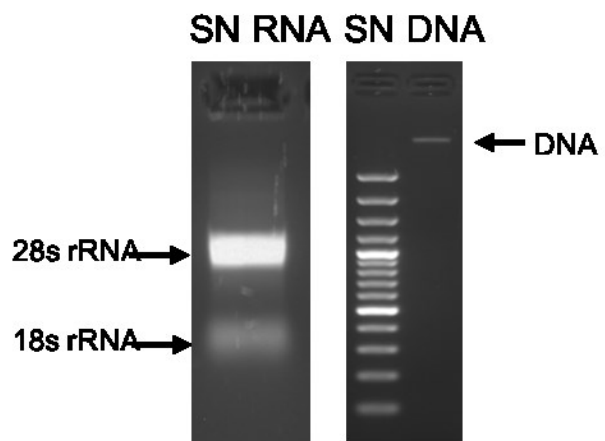


Figure 2.S6

Agarose gel electrophoresis of RNA (left panel) and DNA (right panel) purified from the supernatant of apoptotic cells.

CHAPITRE 3 :
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Étude du rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8

Aymeric Fabié. a réalisé les expériences et analysé les données ; Simona Stäger a conçu le projet, les approches expérimentales et interprété les données; Audrey Connolly a réalisé la production des shRNA et des vecteurs; Étienne Gagnon a fourni son expertise.

Résumé

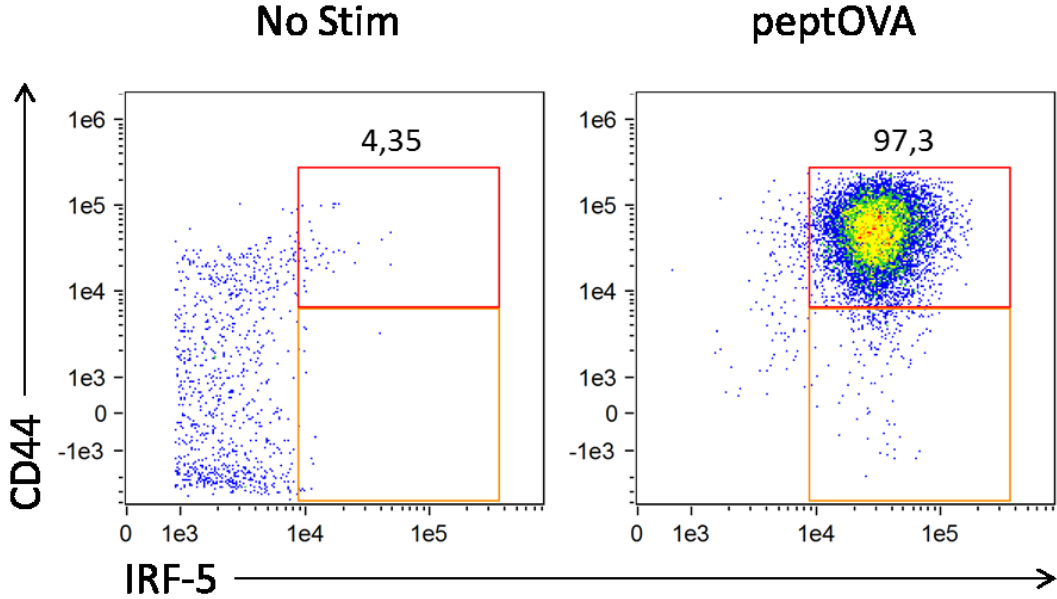
Le facteur de transcription « Interferon regulatory factor 5 » (IRF-5) a des fonctions importantes au niveau de la réponse immunitaire innée et initie la réponse pro-inflammatoire lors d'infections par des agents pathogènes. IRF-5 est constitutivement exprimé dans plusieurs types cellulaires dont les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les monocytes et les lymphocytes B. Nous avons précédemment montré qu'IRF-5 est également exprimé dans les lymphocytes T au cours l'infection. Cependant, le rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T est encore inconnu. Ces travaux nous permettent de montrer que que l'expression d'IRF-5 est augmentée dans les lymphocytes T CD8 lors d'une infection par le virus de la vaccine. L'activation d'IRF-5 est nécessaire lors de la phase d'expansion, en particulier pour pour la différenciation des lymphocytes T CD8 en effecteurs à courte durée de vie (SLEC). Cependant notre modèle d'étude ne permet pas d'exclure un effet d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4. C'est pourquoi nous avons développé des ARN interférents afin de réduire l'expression d'IRF-5 spécifiquement dans les lymphocytes T CD8. L'approfondissement de cette étude permettra de déterminer plus précisément les mécanismes impliqués dans ces observations, que ce soit les populations cellulaires impliquées, les voies d'actions en aval ou bien les gènes ciblés. Donc, ces résultats préliminaires montrent que l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 est nécessaire au bon développement d'une réponse primaire en favorisant leur expansion clonale et leur différenciation en effecteurs

1. Étude de l'expression d'IRF-5 *in vitro*

Nos précédentes études ont montré une expression d'ARNm d'IRF-5 dans les lymphocytes T. Pour confirmer sa présence protéique, nous avons commencé par mettre en place un système *in vitro* pour évaluer l'expression d'IRF-5. IRF-5 n'étant pas exprimé par les lymphocytes T CD8 naïfs, nous avons dû stimuler des lymphocytes T CD8 transgéniques OT-I *in vitro* à l'aide de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) que nous avons préalablement chargé avec le peptide, spécifique aux OT-I, SIINFEKL. Ensuite nous avons évalué l'expression d'IRF-5 au jour 3 après la stimulation à l'aide d'un cytomètre en flux de type ImageStream, ce qui nous a permis de constater qu'une grande majorité des lymphocytes T CD8 OT-I expriment IRF-5, puisque l'on trouve qu'environ 95% des cellules activées après la stimulation expriment bien IRF-5 alors que seulement 2~3% des cellules non stimulées l'expriment (Figure 3.1A). De plus, nous avons évalué la translocation d'IRF-5 au noyau, qui nous permet de déterminer son activation, et nous avons constaté que dans le cas où les lymphocytes T sont stimulés *in vitro*, on retrouve une translocation nucléaire d'IRF-5 pour 50% d'entre eux (Figure 3.1B). Ces résultats nous permettent de mettre en évidence la présence d'IRF-5 sous forme protéique dans les lymphocytes T CD8 lorsqu'ils sont activés et sa présence au noyau nous permet également de démontrer qu'IRF-5 est activé dans ces cellules.

Figure 3.1

A



B

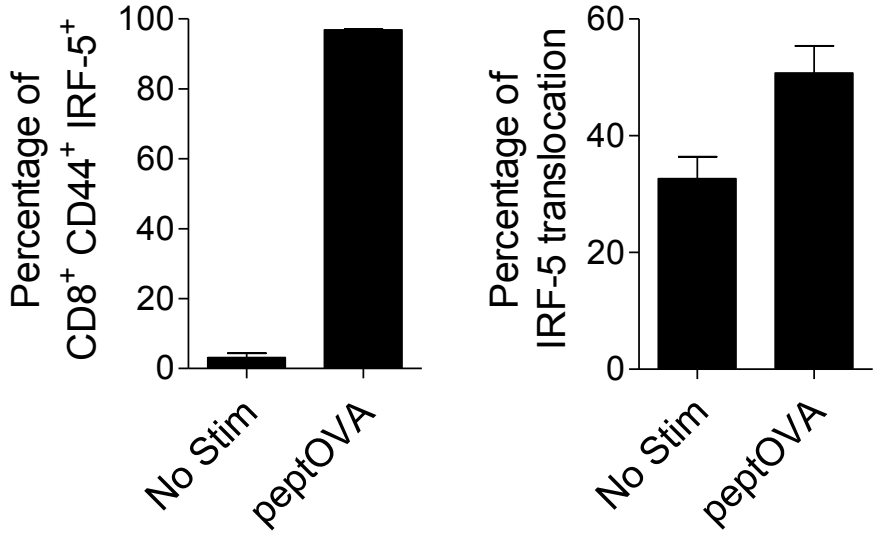


Figure 3.1 : IRF-5 est exprimé *in vitro* après stimulation de lymphocytes T CD8 OT-I

Les lymphocytes T CD8 OT-I ont été purifiées par tri magnétique (MACS) à partir d'une rate naïve et ont été stimulés *in vitro* avec des BMDC pendant trois jours avant d'analyser (**A**) le pourcentage de lymphocytes T CD8 OT-I exprimant IRF-5 et (**B**) le pourcentage de cellules exprimant IRF-5 au noyau.

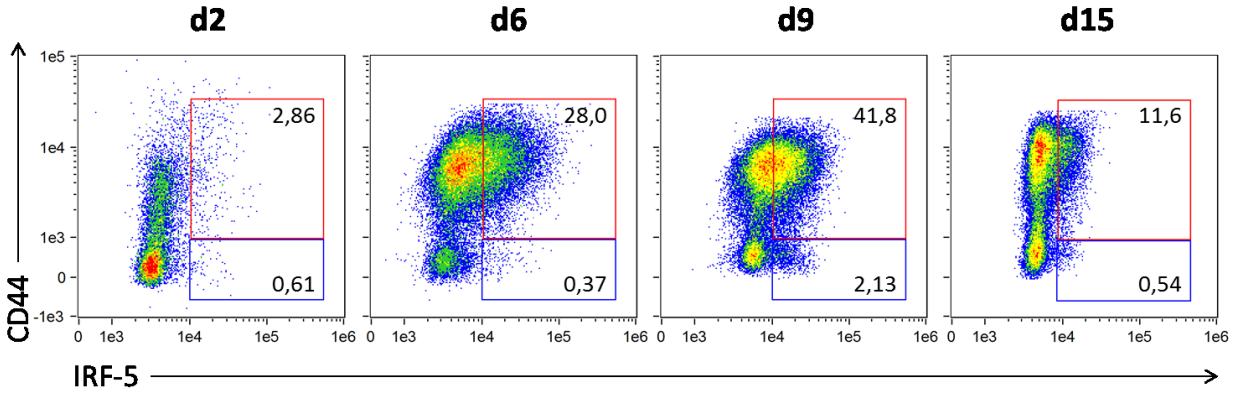
2. Étude de l'expression d'IRF-5 *in vivo*

Puisque d'après nos premiers résultats *in vitro* les lymphocytes T CD8 sont capables d'exprimer IRF-5 pendant leur activation nous avons choisi d'utiliser un modèle plus adapté que celui de l'infection par *L. donovani* pour étudier le rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8. Pour cela nous avons opté pour le modèle d'infection par le virus de la vaccine (VV) qui induit une réponse CD8 prototypique. L'analyse par un cytomètre en flux de type ImageStream nous permet de montrer que les lymphocytes T CD8 expriment IRF-5 au niveau protéique lors de l'infection avec VV, et plus particulièrement autour du pic de la réponse. Aux jours 6 et 9 post-infection, entre 35% et 45% des lymphocytes T CD8 totaux expriment IRF-5, et parmi eux ce sont majoritairement les cellules CD44⁺ qui l'expriment (Figure 3.2A-B). De plus, on retrouve une très forte proportion d'IRF-5 nucléaire, puisque IRF-5 est retrouvé au niveau du noyau pour 90% des cellules l'exprimant (Figure 3.2B). Il est intéressant de remarquer que l'activation d'IRF-5 est plus forte dans un contexte d'infection *in vivo* plutôt que lors d'une activation *in vitro*, suggérant que des facteurs présents dans le microenvironnement vont participer à la translocation nucléaire d'IRF-5. Nous nous sommes ensuite intéressés à savoir si IRF-5 est nécessaire dans le développement de la réponse primaire contre VV. Nous avons infecté par injection intraveineuse des souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻* et *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺*, et suivi dans un premier temps l'expansion de la population totale des lymphocytes T CD8. Comme attendu, dans les souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻* l'activation des lymphocytes T CD8 est accompagnée d'une phase d'expansion clonale, à la suite duquel on observe le pic de la réponse au jour 6 post-infection avec 30% de lymphocytes T CD8. Ceci est suivi par une phase de contraction qui va se traduire par une diminution de la fréquence de lymphocytes T CD8 qui diminue à près de 20% de la population totale de splénocytes au jour 15 post-infection. En revanche, dans les souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺* les lymphocytes T CD8 montrent un défaut d'expansion clonale puisqu'au jour 6 post-infection la population de lymphocytes T CD8 est toujours à 10% de la population totale de splénocytes, et va augmenter graduellement pour atteindre le même niveau que les souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻*, 20% au jour 15 post-infection (Figure 3.3A). On observe la même tendance entre les deux lignées murines lorsque l'on compare le nombre absolu de lymphocytes T CD8 au cours de l'infection (Figure 3.3B). À la suite de ces observations, nous avons voulu savoir si la différenciation des lymphocytes T CD8 en SLEC et MPEC était altérée en absence d'IRF-5. Nous avons donc évalué l'acquisition des marqueurs de surface KLRG1 et CD127 pour déterminer respectivement la fréquence des populations SLEC et MPEC parmi les cellules effectrices, ainsi que leur nombre total. L'absence d'IRF-5 va modifier le développement

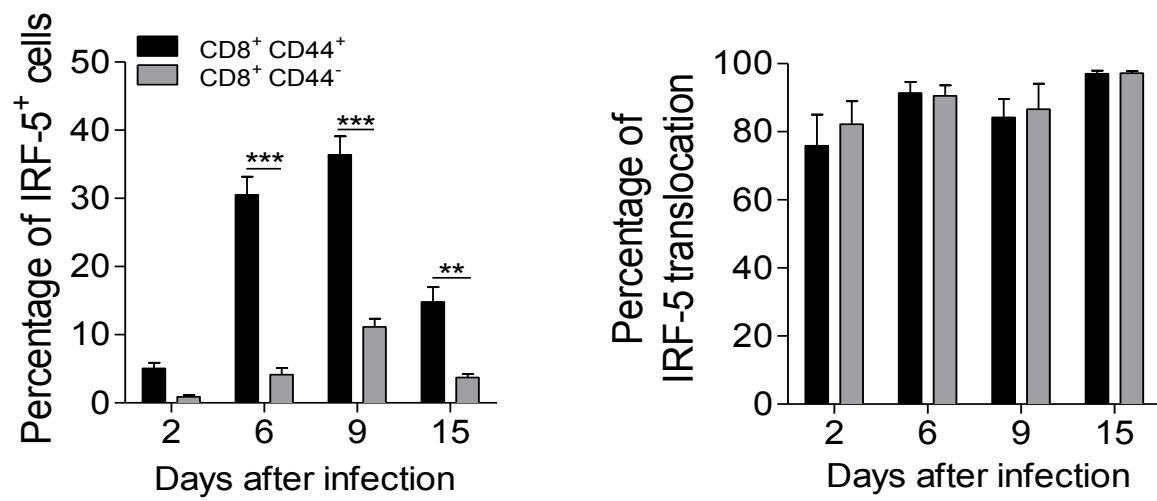
de la réponse des lymphocytes T CD8, puisque l'on observe chez les souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺*, comparativement aux souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻*, une diminution aussi bien dans la fréquence que dans le nombre, de la population des SLEC. Cette différence est particulièrement marquée au jour 6 post-infection et reste prononcée jusqu'au jour 15 pour la fréquence, alors que le nombre de SLEC tend à atteindre le même niveau à partir du jour 9 (Figure 3.4A-B). En revanche quand on regarde la population de MPEC, on va observer une légère hausse de leur fréquence dans les souris déficientes pour IRF-5 spécifiquement dans les lymphocytes T à partir du jour 9 post-infection. Cette différence va devenir plus importante au jour 15 post-infection et va également s'observer au niveau du nombre de cellules (Figure 3.4C). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'IRF-5 est impliqué dans l'expansion des lymphocytes T CD8, et qu'il puisse possiblement jouer un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD8 durant une infection avec VV. Cependant on ne peut pas exclure que ce soit uniquement le défaut d'expansion de la population des SLEC qui induise ce phénotype.

Figure 3.2

A



B



C

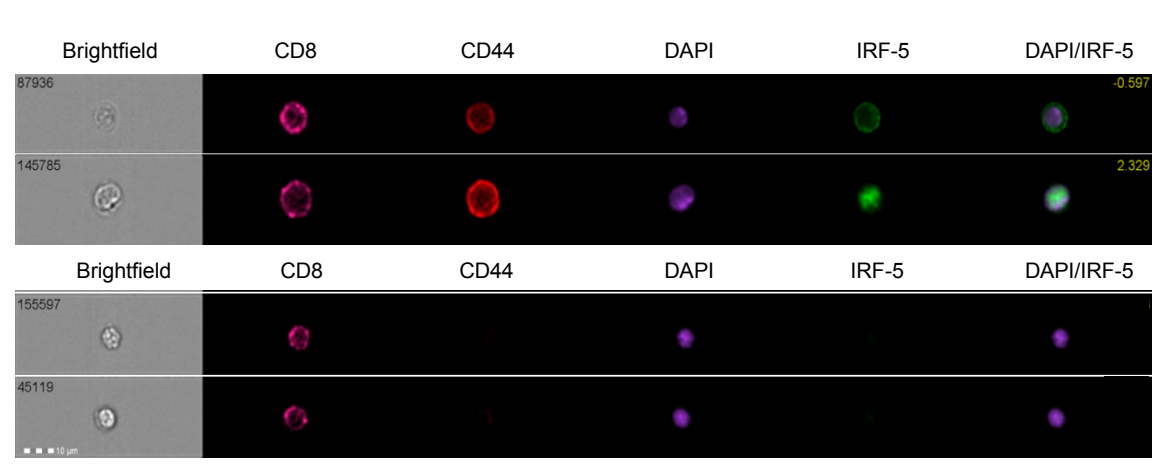
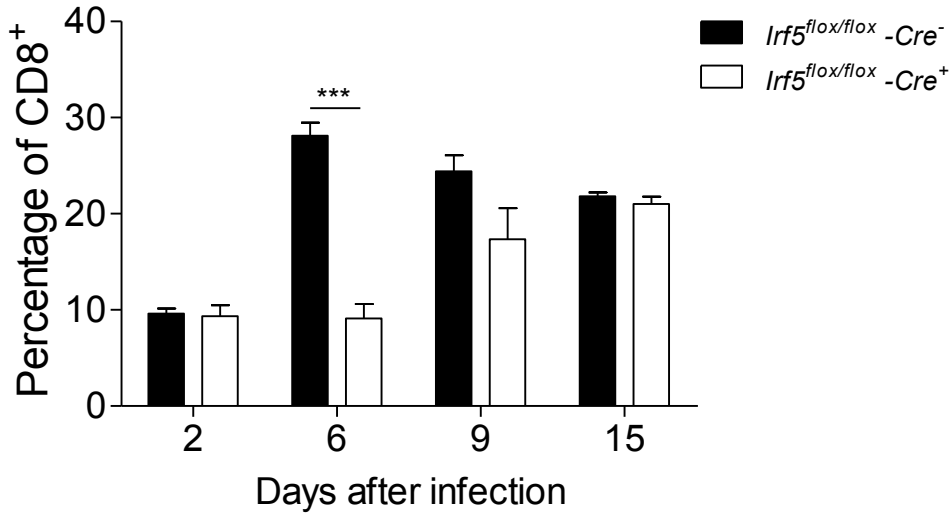


Figure 3.2 : IRF-5 est exprimé par les lymphocytes T CD8 *in vivo* pendant une infection avec le virus de la vaccine

Des souris ont été infectées par injection intraveineuse de 1×10^6 PFU de virus de la vaccine et euthanasiées à différents temps après l'infection. **(A)** Dot plot représentatif de l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 de la rate. **(B)** Graphiques représentant (panneau de droite) le pourcentage de lymphocytes T CD8 activés ($CD44^+$) et naïfs ($CD44^-$) de la rate exprimant IRF-5, provenant de souris infectées avec VV et (panneau de gauche) le pourcentage de translocation nucléaire d'IRF-5. **(C)** Images représentatives (panneau du haut) de lymphocytes T CD8 activés exprimant IRF-5 et (panneau du bas) de lymphocytes T CD8 naïfs n'exprimant pas IRF-5. CD8 (rose), CD44 (rouge), noyau (violet) et IRF-5 (vert). La dernière colonne représente la co-expression du marquage nucléaire et d'IRF-5. Les données sont montrées comme la moyenne \pm SEM, $n=3$. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Figure 3.3

A



B

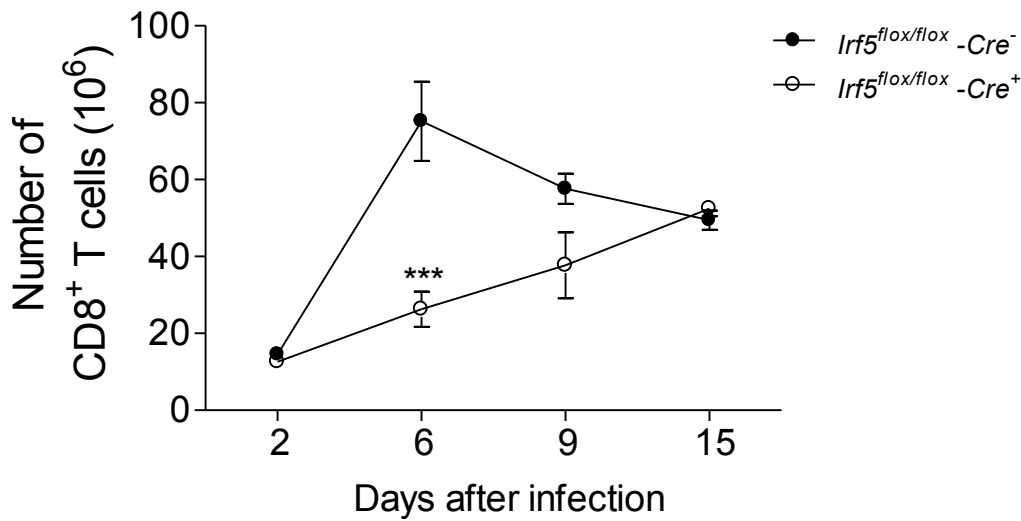


Figure 3.3 : La déficience en IRF-5 dans les lymphocytes T entraîne un défaut pendant la phase d'expansion clonale

Des souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻* et *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺* ont été infectées par injection intraveineuse de 1×10^6 PFU avec le virus de la vaccine et euthanasiées à différents temps après l'infection. Graphiques représentant (A) le pourcentage de lymphocytes T CD8 totaux dans la rate et (B) le nombre total de lymphocytes T CD8 présents dans la rate au cours de l'infection. Les données sont montrées comme la moyenne \pm SEM, $n=3$. *** $p < 0.001$.

Figure 3.4

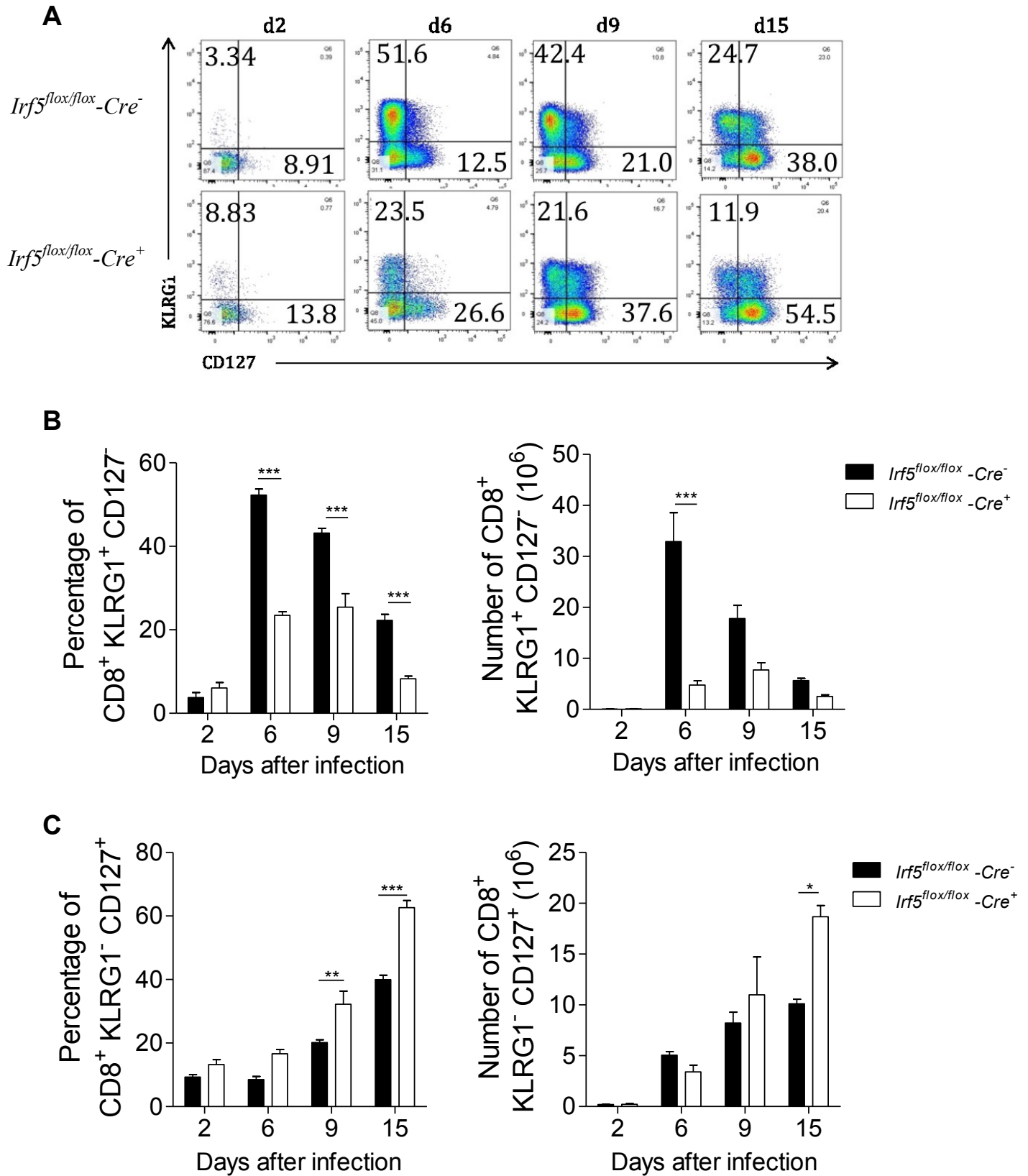


Figure 3.4 : Les populations SLEC et MPEC sont affectées par la déficience en IRF-5

Des souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁻* et *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺* ont été infectées par injection intraveineuse de 1×10^6 PFU avec le virus de la vaccine et euthanasiées à différents temps après l'infection. **(A)** Dot plot représentatif montrant l'expression des marqueurs KLRG1 et CD127 dans les lymphocytes T CD8 activés au cours de l'infection par VV. Graphiques représentants **(B)** (panneau de gauche) le pourcentage de cellules effectrices à courte durée de vie (SLEC) ($KLRG1^+ CD127^-$) ainsi que (panneau de droite) leur nombre total dans la rate au cours de l'infection. Graphiques représentants **(C)** (panneau de gauche) le pourcentage de cellules effectrices précurseurs de mémoire (MPEC) ($KLRG1^- CD127^+$) ainsi que (panneau de droite) leur nombre total dans la rate au cours de l'infection. Les données sont montrées comme la moyenne \pm SEM, $n=3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

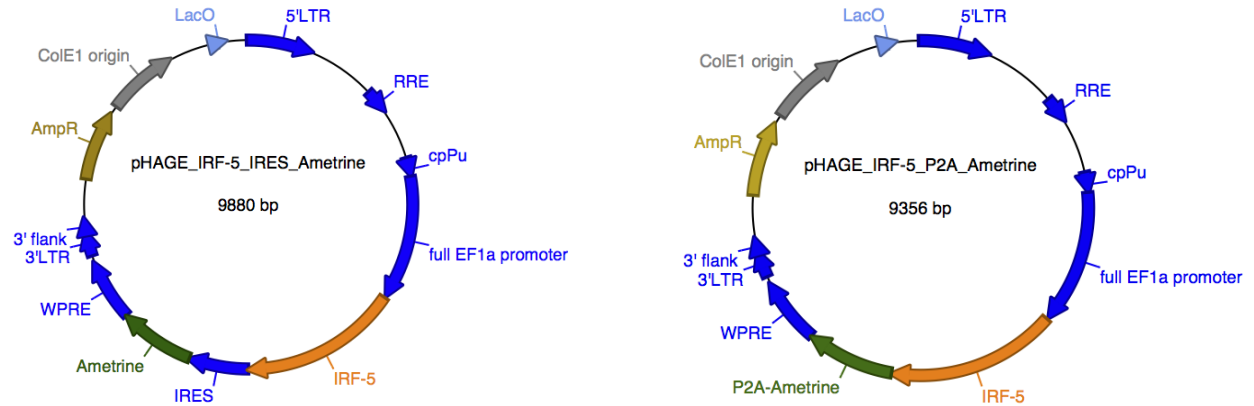
3. Établissement d'un modèle pour réduire l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 OT-I

Du fait que dans les souris *Irf5^{flox/flox} Lck-Cre⁺* le gène pour IRF-5 soit invalidé dans les lymphocytes T CD8 et T CD4, il est important de s'assurer que les effets observés soient bien des effets intrinsèques aux lymphocytes T CD8 et non pas à un effet dû à un quelconque défaut des lymphocytes T CD4. Pour pallier à ce problème nous avons prévu d'utiliser des vecteurs qui vont nous permettre de modifier l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 OT-I, ce qui nous permettra de confirmer ou d'infirmer les effets précédemment observés lors de l'infection par le VV. Nous avons utilisé deux approches, la première basée sur la sur-expression d'IRF-5 et la seconde sur l'inhibition d'expression d'IRF-5, à l'aide de vecteurs lentiviraux. Pour cela nous avons commencé par reconstituer la séquence de l'IRF-5 murin à l'aide de PCR chevauchantes (gBlocks). Le gène codant pour IRF-5 a ensuite été inséré dans vecteur de type pHAGE incluant le fluorochrome de l'amétrine en tant que rapporteur (Figure 3.5A). Nous avons décidé de travailler avec deux constructions différentes, soit avec une protéine de fusion IRF-5-Amétrine, soit en deux protéines distinctes après le clivage du peptide 2A (P2A) qui les sépare. Ces deux options présentent chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Alors que la protéine de fusion permet de suivre de manière très précise l'expression spatio-temporelle d'IRF-5, il se peut que ses fonctions soient altérées que ce soit dû au masquage des sites de modifications post-traductionnels, à un défaut dans la dimérisation ou encore à l'impossibilité d'interagir avec le génome. En revanche, la protéine de clivage avec P2A permet de conserver IRF-5 dans sa structure originelle; cependant, l'expression d'amétrine ne sera pas forcément représentative de l'expression d'IRF-5 puisqu'elles vont être dégradées séparément. Ces vecteurs nous permettent donc de sur-exprimer IRF-5 dans les lymphocytes T CD8, ce qui va s'avérer utile spécialement dans un contexte d'infection avec *L. donovani* puisque les lymphocytes T CD8 montrent un défaut d'expansion ainsi qu'un défaut dans la différenciation en cellules effectrices. Nous nous sommes alors concentrés sur la construction de shRNA, pour être capable de diminuer l'expression d'IRF-5. Les séquences des shRNA utilisées sont extraites de la banque de données de Sigma. Nous avons inséré les shRNA dans un vecteur de type pLKO.1, qui comporte également l'amétrine en tant que rapporteur, mais qui ne peut pas être exprimé en protéine de fusion car cela créerait un encombre stérique diminuant drastiquement l'efficacité des shRNA (Figure 3.5B). Cinq shRNA spécifiques pour IRF-5 différents sont testés pour déterminer lequel est le plus efficace, en les comparant à un shRNA

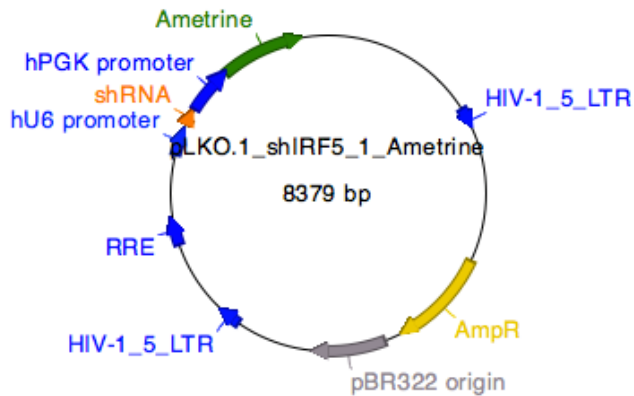
contrôle (Scr) qui n'est pas spécifique pour IRF-5 (Figure 3.5C). Pour cela, nous avons évalué l'efficacité de transduction des vecteurs contenant les shRNA et l'inhibition d'IRF-5 *in vitro*. Pour évaluer l'efficacité de la transduction de chacun de nos vecteurs testés, il suffit de mesurer par cytométrie en flux le pourcentage de cellules positives pour l'amétrine, notre fluorochrome rapporteur. Ensuite, nous avons comparé l'expression d'IRF-5 entre les cellules qui sont positives pour le marqueur amétrine, qui vont donc exprimer le shRNA, et les cellules qui n'expriment pas l'amétrine, qui vont se comporter comme des cellules WT. Ces résultats nous ont permis de déterminer que parmi les cinq shRNA utilisés, seul le shRNA-2 présente un taux de transduction quasi nul, alors que les autres shRNA ont une efficacité de transduction entre 70% et 95% après quatre jours de stimulation (Figure 3.6). En ce qui concerne l'efficacité d'inhibition d'IRF-5, on peut voir qu'après deux jours de stimulation IRF-5 n'est pas très fortement exprimé dans le contrôle et qu'il n'y a pas de différences avec les shRNA (Figure 3.7A). En revanche, au quatrième jour après la stimulation on peut observer une forte expression dans les cellules n'exprimant pas l'Amétrine, alors que celles qui l'exprime vont avoir une diminution plus ou moins important de l'expression d'IRF-5, en fonction des shRNA considérés (Figure 7B). Nous avons donc produit des outils efficaces qui vont nous permettre de mieux appréhender les effets d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8. Nous pourrons nous en servir aussi bien *in vitro* que *in vivo* grâce à l'utilisation d'un virus de la vaccine recombinant, exprimant à sa surface le peptide SIINFEKL, antigène spécifique des lymphocytes T CD8 OT-I.

Figure 3.5

A



B



C

| | | | | | | |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------|------|------|
| | 558 | 581 | 1406 | 1427 | 1928 | 1948 |
| mIRF5 : | GCACCCTATTCCTTACCCAAAGAA..... | CCACATGGTAGAGCAGTTTAAA..... | GCAGAGAATAACCCTGATTTA... | | | |
| shRNA1 : | | CACATGGTAGAGCAGTTTAAA..... | | | | |
| shRNA2 : | | | GCAGAGAATAACCCTGATTTA... | | | |
| shRNA3 : | ACCCTATTCCTTACCCAAAGAA..... | | | | | |
| shRNA4 : | | CCACATGGTAGAGCAGTTTAA..... | | | | |
| shRNA5 : | GCACCCTATTCCTTACCCAAA..... | | | | | |

Figure 3.5 : Cartes des vecteurs et sites spécifiques de liaison des shRNA

Représentation schématique des cartes de vecteurs utilisés (**A**) pour la sur-expression d'IRF-5 (pHAGE) avec une protéine de fusion (panneau de gauche) ou un peptide de clivage (panneau de droite) et (**B**) pour les shRNA (pLKO.1). (**C**) Alignement de séquences entre la séquence d'IRF-5 et les différentes séquences des shRNA, pour déterminer les sites de liaison spécifiques.

Figure 3.6

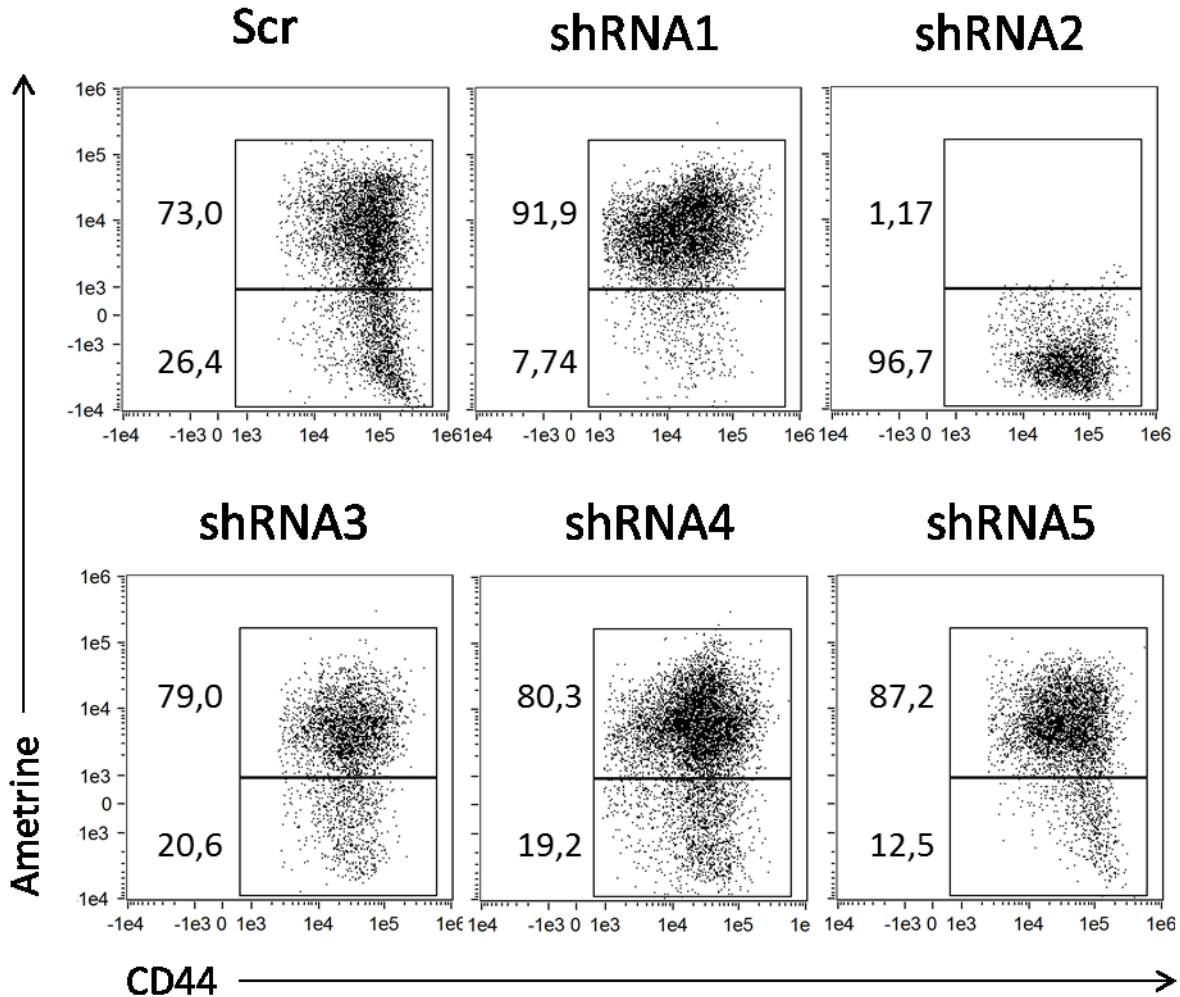
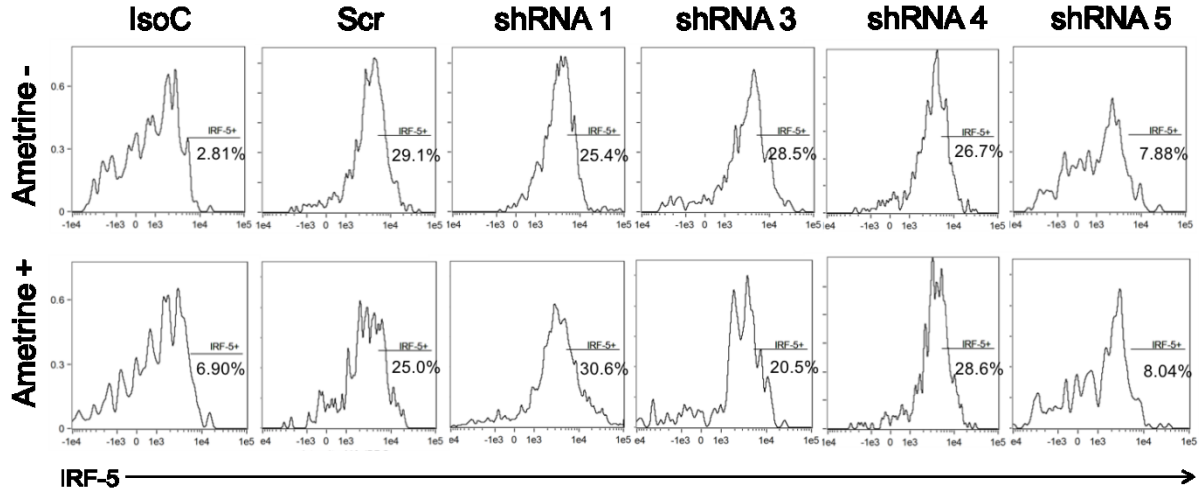


Figure 3.6 : Vérification de l'efficacité de transduction des shRNA spécifiques pour IRF-5

Les lymphocytes T CD8 OT-I ont été purifiés par tri magnétique (MACS) à partir d'une rate naïve et ont été transduits avec les différents shRNA (Scr = Scramble) puis stimulés *in vitro* avec des BMDC pendant quatre jours avant d'analyser par cytométrie en flux de type ImageStream l'expression du fluorochrome rapporteur (Ametrine) parmi les lymphocytes T CD8 OT-I.

Figure 3.7

A



B

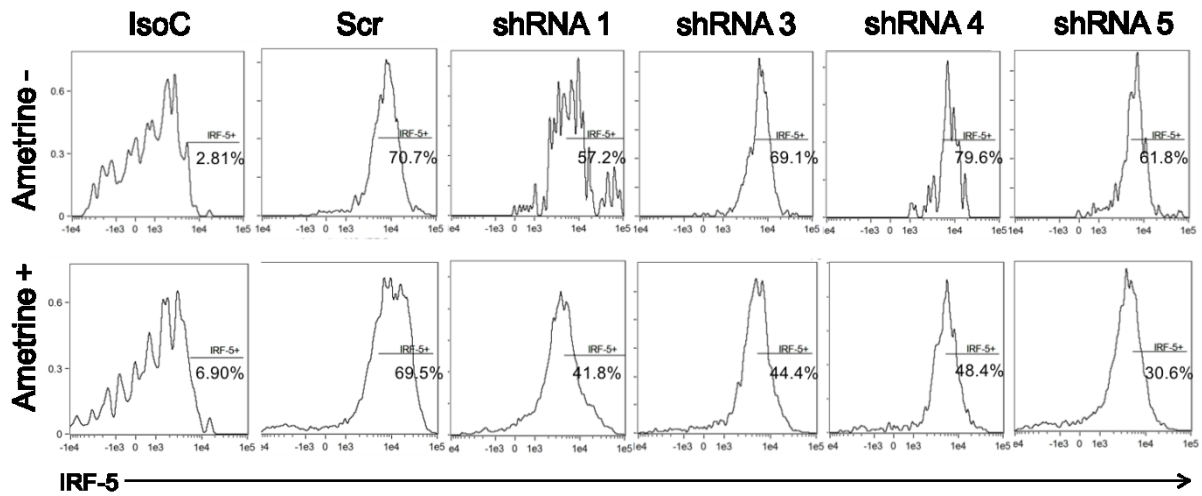


Figure 3.7 : Les shRNA sont capables de diminuer l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 *in vitro*

Les lymphocytes T CD8 OT-I ont été purifiées par tri magnétique (MACS) à partir d'une rate naïve et ont été transduits soit avec un shRNA contrôle non spécifique (Scr), soit avec différents shRNA spécifiques pour IRF-5, puis stimulés *in vitro* avec des BMDC pendant (A) deux ou (B) quatre jours avant d'analyser par cytométrie en flux de type ImageStream l'expression d'IRF-5 parmi les populations de lymphocytes T CD8 OT-I transduits (Amétrine⁺) et non transduits (Amétrine⁻), par rapport à l'isotype contrôle (IsoC).

Matériel et méthodes

Stimulation *in vitro* des lymphocytes T CD8 OT-I

Les cellules dendritiques sont dérivés de la moelle osseuse (BMDC) en dans un milieu conditionnant (IMDM, 10% FBS, 10% de milieu de culture de cellules X63-Ag8 contenant du GM-CSF). Au septième jour de culture les BMDC sont mises en plaque à une concentration de 5×10^4 cellules/puits, dans une plaque de 96 puits et chargées avec 0,1µg/ml de peptide SIINFEKL. Les lymphocytes T CD8 OT-I ont été enrichis à partir de rate de souris OT-I naïves à l'aide d'un tri cellulaire magnétique (MACS) en utilisant un kit d'isolation de lymphocytes T CD8 (Milteny Biotech). Les lymphocytes T CD8 OT-I sont ensuite rajoutés à une concentration 1×10^5 cellules dans les puits avec les BMDC. 2 ng/ml d'interleukine 2 recombinante humaine (PeproTech) est également ajoutée dans les puits. L'expression et la translocation d'IRF-5 est évaluée aux jours mentionnés par cytométrie en flux de type ImageStream comme détaillé ci-dessous.

shRNA

Les séquences shRNA (Sigma) suivantes ont été utilisées pour désigner les différents shRNA :

Scr) Fwd 5'- CCGGGTAAGG ATTCTGATGT GTATATTATA ACTATATACA CATCAGAATC CTTACTTTTT G -3' ; Rve 5'- AATTC AAAAAGTAA GGATTCTGAT GTGTATATAG TTATAATATA CACATCAGAA TCCTTAC -3'

shRNA1) Fwd 5'- CCGGCACATGG TAGAGCAGTTT AAATATAACTTTTAAA CTGCTCTACCA TGTGTTTTTG -3' ; Rve 5'- AATTCAAAAA CACATGGTAG AGCAGTTTAA AAGTTATATTT AAAGTCTCT ACCATGTG -3'

shRNA2) Fwd 5'- CCGGGCAGA GAATAACCC TGATTTATAT AACTTAAATC AGGGTTATT CTCTGCTTTTTG -3' ; Rve 5'- AATTCAAAAA GCAGAGAAT AACCTGAT TTAAGTTATA TAAATCAGG GTTATTCTCTGC -3'

shRNA3) Fwd 5'- CCGGCCC TATTCCTTA CCCAAAGA ATATAACTT TCTTTGGG TAAGGAAT AGGGTTTTTG -3' ; Rve 5'- AATTCAAAAA CCCTATTCCT TACCCAAAGA AAGTTATATT CTTTGGGTAA GGAATAGGG -3'

shRNA4) Fwd 5'- CCGGCCACA TGGTAGAGC AGTTTAATAT AACTTTAAAC TGCTCTACC ATGTGGTTT TTG -3' ; Rve 5'- AATTCAAAAA CCACATGGT AGAGCAGTT TAAAGTTATA TTAAACTGCT CTACCATGTGG -3'

shRNA5) Fwd 5'- CCGGGCACC CTATTCCTTA CCCAAATAT AACTTTTGG GTAAGGAAT
AGGGTGCTT TTTG -3'; Rve 5'- AATTCAAA AAGCACCC TATTCCTT ACCCAAAA
GTTATATT TGGGTA AGGAAT AGGGTGC -3'

Les séquences de shRNA complémentaires ont été diluées dans une solution de tampon Tris-EDTA et chauffées à 95°C pendant 10 min. Les shRNA sont ramenés lentement à température pièce. Enfin les séquences de shRNA ont été clonées dans un plasmide pLKO.1(Addgene).

Production de virus pour le shRNA

Au jour 0, utiliser trois plaques de 10cm de cellules HEK293 à confluence. Enlever le milieu et rajouter 4ml de tampon FACS à 37°Cx². Récolter les HEK293 et les centrifuger à 1200 RPM pendant 7 min. Resuspendre les HEK293 dans du milieu de pré-transfection (DMEM GlutaMAX-I (Gibco), 10% FBS, 1% pénicilline/streptomycine) et séparer en six plaques pour un volume final de 10ml. Au jour 1 les cellules sont transfectées en utilisant une triade de plasmides VSV-G, RRE et REV (Addgene). Lorsque les cellules sont à 70% de confluence préparer le mélange pour la transfection dans 1ml de RPMI avec 6µg de vecteur, 3µg de VSV-G, 1,5µg de RRE, 1,5µg de REV et 36µl de Trans-IT (Mirus) puis laisser incubé à température pièce pendant 20 minutes. Ensuite, ajouter le mélange de transfection goutte à goutte dans les plaques de HEK293 et les incubé à 37°C pendant 16h. Au jour 2, éliminer le surnageant des HEK293 et ajouter 12ml de milieu post-transfection (DMEM GlutaMAX-I (Gibco) 20% FBS, 1% pénicilline/streptomycine, 10mM HEPES pH 7.6) et incubé pendant 24h à 37°C. Au jour 3, récolter une première fois surnageant des cellules HEK293 et le stocker à 4°C, puis rajouter 12ml de milieu post-transfection et incubé pendant 12h à 37°C. Ensuite, récolter une seconde fois le surnageant et le rajouter avec le premier prélèvement de surnageant. Rajouter 12ml de milieu post-transfection et incubé pendant 12h à 37°C. Au jour 4, récolter une troisième fois le surnageant et le rajouter avec les deux premiers prélèvements de surnageant. Centrifuger les surnageants à 2000 RPM pendant 5 min puis filtrer le à l'aide d'un filtre SFCA 0,45µm. Transférer le surnageant dans des tubes à ultracentrifugeuse et centrifuger à 25 000 RPM pendant 1h30. Éliminer le surnageant puis rajouter 300µl de PBS froid stérile sur le culot de virus et garder à 4 °C toute la nuit avant de récolter le virus concentré et de le congeler rapidement dans de l'azote liquide.

Transduction

Les lymphocytes T CD8 OT-I ont été enrichis à partir de rate de souris OT-I naïves à l'aide d'un tri cellulaire magnétique (MACS) en utilisant un kit d'isolation de lymphocytes T CD8. Au jour 1, les cellules triées sont comptées mises en plaque 24 puits à 2×10^6 cellules/puits dans du milieu supplémenté, avec 25ng/ml d'interleukine 7 et 100ng/ml d'interleukine 15 (PeproTech), puis incubées pendant 48 heures. Au jour 2, rajouter 20ng/ml d'interleukine 2 recombinante humaine (PeproTech) dans les puits. Incuber de nouveaux puits avec 400µl de rétronectine (Takara Bio) à 20µg/ml dans du PBS pendant 16h à 4°C. Au jour 3, éliminer la solution de rétronectine par aspiration et ajouter 500µl de PBS 2% FBS, 10 min à température pièce, puis retirer la solution et laver avec du PBS. Ajouter le virus dans ces puits avant de rajouter 1×10^6 cellules/puits dans 1 ml. Ajouter de la protamine sulfate (Sigma) à 5µg/ml. Centrifuger pendant 1h30 à 1700 RPM, à 32°C, puis incuber 1h à 37°C. Rajouter ensuite 1ml d'interleukine 2 à 20ng/ml, puis incuber toute la nuit à 37°C. Au jour 4, changer le milieu en récoltant les cellules dans des tubes de 15ml et en complétant avec du milieu jusqu'à 10ml. Centrifuger à 1200 RPM pendant 7 min et éliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans du milieu supplémenté avec 12,5ng/ml d'interleukine 7, 50ng/ml d'interleukine 15 et 20ng/ml d'interleukine 2, puis incuber deux jours à 37°C.

Cytométrie en flux

Les anticorps suivant ont été utilisés pour effectuer les marquages de surface : anti-CD8 couplé au PB (Clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-CD62L couplé à l'AF700 (Clone MEL-14 BD Biosciences), anti-KLRG1 couplé à l'APC (Clone 2F1, BD Biosciences), anti-CD127 couplé au PE (Clone SB/199, BD Biosciences). Puis les cellules ont été fixées avec de la paraformaldehyde (Fisher Scientific) à 2%, et l'analyse a été effectuées avec un cytomètre BD LSRFortessa (Becton Dickinson). Les résultats sont ensuite analysés avec FlowJo.

Cytométrie en flux par ImageStream

Les anticorps suivant ont été utilisés pour effectuer les marquages de surface : anti-CD8 couplé à la biotine (BD Biosciences), anti-CD44 couplé à l'APC (Clone IM7 BD Biosciences), streptavidine conjuguée au PE-Cy7. Puis les cellules ont été fixées avec de la paraformaldehyde (Fisher Scientific) à 2% et perméabilisées à l'aide s'une solution de tampon FACS 0,1% saponine, avant d'être marquées avec l'anticorps anti-IRF5 couplé au AF488 (Clone IC8447G, R&D Systems). Enfin le DAPI (InvitroGen) a été utilisé pour marquer le noyau immédiatement avant l'acquisition, en incubant les échantillons 10 min à température pièce, à

l'obscurité. Les échantillons ont été acquis en utilisant le cytomètre en flux ImageStream MKII et analysés en utilisant le logiciel IDEAS (Amnis Corporation, Seattle, WA, USA). La localisation nucléaire a été mesurée en utilisant un masque de morphologie pour déterminer le score de similarité, qui quantifie la corrélation des valeurs de pixel des images du DAPI et d'IRF5 pour chaque cellule. Un score de similarité >1 a été utilisé comme limite pour déterminer la localisation nucléaire. Les cellules ont été inspectées visuellement pour confirmer la localisation cellulaire (valeurs $<$ or >1).

Souris et virus

Les souris avec une délétion spécifique d'IRF-5 dans les lymphocytes T ont été générées par des croisements entre des souris *Irf5^{flox/flox}* (Hammami et al, 2015 26046638) et des souris exprimant la recombinaison cre sous le contrôle du promoteur Lck. Toutes les souris ont été hébergées dans l'animalerie de l'INRS dans des conditions sans pathogènes spécifiques et utilisées à des âges compris entre 6 et 10 semaines. Les souris ont été infectées par le virus de la vaccine (VV) à des doses de 1×10^6 PFU, par injection intraveineuse dans la veine latérale de la queue.

Analyses statistiques

Un test ANOVA à deux facteurs avec comparaison multiples a été utilisé pour les analyses des données *in vivo*. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software). Les valeurs de $P < 0.05$ ont été considérées comme significatives.

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

1 IRF-5 PROMET LA MORT CELLULAIRE DES LYMPHOCYTES T CD4 PENDANT UNE INFECTION CHRONIQUE

Les êtres vivants ont besoin de se protéger des agressions provenant d'agents pathogènes à l'aide d'un système de détection efficace et rapide. Ce système de détection est possible grâce à la présence de plusieurs familles de récepteurs qui sont capables de détecter des motifs particuliers des agents pathogènes. L'ensemble de ces récepteurs sont regroupés sous le terme de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui regroupent entre autres les RLRs, les NLRs et les TLRs. Ils sont largement conservés au fil de l'évolution puisqu'on les retrouve chez une large gamme d'êtres vivants allant des mammifères jusqu'aux insectes en incluant également certaines plantes, qui bien que sensiblement différents de ceux retrouvés chez les animaux servent aussi à détecter des agents pathogènes et déclencher une réponse immunitaire. En effet, lorsqu'un PRR reconnaît un motif moléculaire associé à un agent pathogène, que l'on regroupe sous le terme générique de motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP), il s'en suit une cascade d'évènements cellulaires qui aboutit à la mise en place d'une défense face à l'agent pathogène en question. Les macrophages et les cellules dendritiques en particulier expriment fortement ces récepteurs, et pour cause ils sont parmi les premières cellules à intervenir en cas d'infections. Au travers de l'activation des voies de signalisation, principalement de NF- κ B et des IRFs, se met en place la réponse immunitaire. Cela se traduit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6, l'interleukine 12 ou l'interféron de type I, ce qui conduit directement à l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire. C'est ainsi que les PRR ont été largement cantonnés aux cellules de l'immunité innée et à leurs effets directs sur l'inflammation. Cependant de plus en plus d'études mettent à mal ce dogme et démontrent l'importance et les rôles insoupçonnés de ces récepteurs sur les cellules de l'immunité acquise, et en particulier sur les lymphocytes T.

Dans cette première étude, nous avons montré que lors de l'infection par *L. donovani*, l'activation du TLR7 présent sur les lymphocytes T CD4 sensibilise ces cellules à la mort cellulaire par apoptose. La signalisation du TLR7 se fait au travers d'IRF-5 et induit l'expression du récepteur de mort DR5 ainsi que celle de la caspase 8, ce qui a pour effet de sensibiliser les lymphocytes T CD4 à la mort cellulaire médiée par le ligand « Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand » (TRAIL). Bien que ce nouveau rôle du TLR7 dans les lymphocytes T CD4 soit inattendu, il n'en demeure pas un cas isolé puisque dans une récente étude de Dominguez-Villar *et al*, le TLR7 exprimé par les lymphocytes T CD4 mène à l'anergie de ces derniers en passant par la voie de signalisation de NFATc2 (Dominguez-Villar *et al.*, 2015).

Même si la voie de signalisation n'est pas la même, l'effet général va dans le même sens puisque dans notre cas l'activation du TLR7 limite la réponse Th1 anti-leishmanienne en induisant la mort des lymphocytes T CD4 produisant de l'interféron gamma, et dans leur cas le dysfonctionnement des lymphocytes T CD4 induit par l'anergie réduit la capacité des cellules à contrôler l'infection par le VIH. De plus, il a déjà été prouvé qu'IRF-5 était capable de sensibiliser des cellules tumorales à une apoptose dépendante du récepteur DR5 (Hu *et al.*, 2009). Mais d'autres facteurs ont été mis en avant comme potentiels inducteurs de l'expression de DR5 sur les lymphocytes T, en particulier l'interféron de type I. En particulier dans le cas d'une infection par le VIH, les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui détectent les particules virales sécrètent de l'interféron alpha qui induit l'expression du récepteur DR5 sur les lymphocytes T CD4 (Herbeuval *et al.*, 2006). L'expression de ce récepteur couplé à l'expression de son ligand TRAIL, par les cellules dendritiques environnantes, serait responsable de la mort des lymphocytes T CD4 par apoptose (Hardy *et al.*, 2007). L'interféron de type I peut avoir de nombreux effets sur les lymphocytes T, en plus de favoriser l'expression de DR5, il peut également sensibiliser à la mort cellulaire en augmentant l'expression de Fas et de Bak dans les lymphocytes T lors d'une infection par le HIV et contribuer à la déplétion des lymphocytes T (Cheng *et al.*, 2017, Fraietta *et al.*, 2013), mais cette mort cellulaire induite par l'interféron de type I concerne également d'autres infections comme celles avec la *Listeria* ou le LCMV (Carrero *et al.*, 2004, Wilson *et al.*, 2013). En revanche, ces études qui mettent en évidence le rôle pro-apoptotique de l'interféron de type I ne démontrent pas s'il s'agit d'un effet direct sur les lymphocytes T, ou non. Il est important de se souvenir que l'interféron de type I est capable d'induire directement IRF-5. Cependant, nous montrons dans notre étude grâce aux expériences de transferts adoptifs avec des lymphocytes T CD4 déficients pour le récepteur à l'interféron de type I, que IFNAR n'est pas impliqué dans le contrôle de l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T. En revanche, il serait quand même intéressant de considérer les effets d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 lors d'une infection par le VIH, qui présente des points communs intéressants avec une infection par *L. donovani*. En effet se sont deux infections chroniques qui, si elles ne sont pas prises en charge, mènent à une immunosuppression. De plus, on va assister dans les deux à une forte destruction tissulaire induite par l'inflammation, une augmentation de l'expression du TLR7 et de DR5 sur les lymphocytes T CD4. Et bien que l'interféron de type I soit en parti responsable de la mort par apoptose des lymphocytes T CD4, il n'est pas exclu qu'IRF-5 puisse également participer à la mort massive de ces cellules dans le cas d'une infection par le VIH.

Notre étude met en avant un effet négatif lors de l'activation du TLR7 sur les lymphocytes T CD4, alors que jusqu'à très récemment les TLRs semblaient jouer un rôle bénéfique dans la survie et le développement des lymphocytes T. Par exemple, il a été montré que lorsque l'on compare le potentiel de prolifération entre des lymphocytes T CD4 déficients pour la protéine adaptatrice MyD88 à celui de lymphocytes T CD4 WT, on s'aperçoit que *in vitro* et *in vivo* l'absence de MyD88 va se traduire par un défaut de prolifération (Fukata *et al.*, 2008). On peut également citer l'étude de Gelman *et al.*, qui montre que les lymphocytes T CD4 activés qui sont traités avec des agonistes du TLR3 ou du TLR9 ont un taux de survie supérieur. Ce mécanisme passerait par la voie de signalisation de NFkB qui est déjà connu pour favoriser la survie des lymphocytes T (Voll *et al.*, 2000). Enfin l'activation du TLR2 a aussi été montré comme étant bénéfique, puisqu'il jouerait un rôle important dans l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 (Quigley *et al.*, 2009), mais aussi dans le développement de la mémoire notamment en diminuant le seuil d'activation du TCR qui permet la génération de cellules mémoires avec un faible signal d'activation du TCR (Mercier *et al.*, 2009). Cependant, il faut noter que ces études utilisent soit des modèles MyD88 déficients qui empêchent donc la transduction du signal de plusieurs voies de signalisation de quasiment tous les TLRs, à l'exception, du TLR3 et d'une partie du TLR4, ainsi que de celles de plusieurs cytokines comme l'interleukine 1 et 18. Soit les effets observés n'impliquent pas que le TLR7. De plus, notre étude a été réalisée dans le cas d'une infection chronique plutôt que durant l'amorçage de la réponse immunitaire ce qui pourrait expliquer les différences dans les effets observés. En effet, il est intéressant de noter que suivant le contexte, l'effet d'un même TLR peut s'avérer tantôt bénéfique, tantôt néfaste. Dans le cas du TLR2, son rôle de co-stimulateur lors de l'activation des lymphocytes T pourrait être à la base du développement de certaines maladies inflammatoires chroniques (Sobek *et al.*, 2004).

Initialement décrit comme un récepteur pour l'ARN simple brin, on sait que le TLR7 est aussi capable de lier d'autres composés et notamment des composés synthétiques ne dérivant pas d'acides nucléiques comme l'imiquimod. Nos résultats montrent que l'imiquimod est capable d'activer *in vitro*, la voie de signalisation du TLR7 dans les lymphocytes T CD4. Cela nous a amené à nous demander quel pouvait en être le ligand *in vivo*. Deux possibilités s'offraient à nous, soit le TLR7 est activé directement par le parasite ou par des éléments provenant de parasites morts, comme des débris d'acides nucléiques, soit par des éléments de l'hôte provenant du matériel de cellules apoptotiques.

En effet, les TLRs sont sensibles à divers parasites tels que *Trypanosoma spp*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.* ou *Plasmodium falciparum* (Campos *et al.*, 2001, Magez *et al.*, 1998, Paun *et al.*, 2011, Silva-Barrios *et al.*, 2016, Yarovinsky *et al.*, 2005). Par exemple l'ancre GPI de *T. cruzi* est reconnue par le TLR2 des macrophages, ce qui a pour effet d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Campos *et al.*, 2001) , alors que reconnue par le TLR4 cela va induire la production de chimiokines qui vont permettre d'attirer les neutrophiles au niveau du site d'inflammation (Oliveira *et al.*, 2004). Il est également à noter que les ancres GPI de *Trypanosoma* et *P. falciparum* sont aussi capables d'induire une réponse pro-inflammatoire (Magez *et al.*, 1998, Schofield *et al.*, 1993). D'autres partie de parasites sont également reconnues, chez *T. gondii* une molécule qui s'apparente à la profiline et qui est impliquée dans la motilité du parasite est détectée par le TLR11 (Yarovinsky *et al.*, 2005). On peut également citer l'hémozoïne, qui n'est pas une molécule de l'espèce *Plasmodium* mais plutôt un produit de dégradation de l'hème présent dans les globules rouges infectés par le parasite, qui est reconnue par le TLR9 (Coban *et al.*, 2005). En ce qui concerne les espèces de *Leishmania*, plusieurs études montrent l'implication des TLRs dans la détection du parasite. Ainsi le TLR2 est impliqué dans la détection du lipophosphoglycane (LPG) de *L. major* par les cellules NK (Becker *et al.*, 2003), les TLR2 et TLR3 sont respectivement impliqués dans la phagocytose de *L. donovani* et l'acquisition d'activités leishmanicides des macrophages (Flandin *et al.*, 2006), le TLR4 contribue au contrôle *L. major* lors d'une infection (Kropf *et al.*, 2004), le TLR7 est requis pour le développement de la réponse Th1 lors d'une infection par *L. donovani* (Paun *et al.*, 2011), le TLR9 est impliqué dans l'activation des cellules dendritiques par *L. braziliensis* et *L. major* (Abou Fakher *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2012, Weinkopff *et al.*, 2013) et collectivement, les TLRs endosomaux sont impliqués dans l'activation des lymphocytes B par *L. donovani* (Silva-Barrios *et al.*, 2016). Cependant l'activation des TLRs endosomaux nécessite la phagocytose ou au moins un contact étroit avec le parasite, ce qui a été démontré pour de nombreux types cellulaires mais jamais pour les lymphocytes T. Bien qu'il n'existe pas d'évidence montrant un contact entre le parasite et les lymphocytes T CD4, ces derniers sont capables d'internaliser des particules puisque dans le cas d'infections bactériennes ils sont capables de transphagocyter des bactéries, ce qui va leur permettre de les tuer, voire de présenter des antigènes pour activer des lymphocytes T CD8 (Cruz-Adalia *et al.*, 2014, Cruz-Adalia *et al.*, 2017) et il n'est donc pas inconcevable de penser que les lymphocytes T CD4 pourraient potentiellement internaliser des fragments de parasites menant à leur détection par les TLRs endosomaux.

Outre la détection du parasite, le TLR7 des lymphocytes T CD4 pourrait être activé par des débris provenant de l'apoptose de cellules environnantes. En effet, lors de la leishmaniose viscérale, la forte production de TNF dans la rate va mener à la destruction tissulaire de la zone marginale et à la désorganisation complète de sa microarchitecture (Engwerda *et al.*, 2002). Les lymphocytes T se retrouvent donc dans un microenvironnement rempli de matériel provenant de cellules apoptotiques, ce qui inclut évidemment les acides nucléiques qui seraient susceptibles d'activer le TLR7. Et bien que la mort cellulaire par apoptose soit généralement liée à une mort non-immunogène, qui entraîne un état anti-inflammatoire suite à leur phagocytose par les macrophages (Voll *et al.*, 1997), un excès de cellules mortes qui ne sont pas prises en charge a des effets néfastes et peut activer le système immunitaire, comme dans le cas du lupus érythémateux disséminé (SLE), où un défaut de la clairance des cellules mortes entraîne une stimulation du système immunitaire et la production d'anticorps auto-réactifs. Ce sont en partie des antigènes nucléaires, comme de l'ADN, qui sont à la base de cette stimulation. En fait, les antigènes présents dans le matériel de cellules apoptotiques provenant de patients atteints de SLE sont capables d'induire l'activation d'IRF-5 dans les monocytes, bien que l'implication des TLRs dans ce cas n'a pas été prouvée (Stone *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que l'activation du TLR7 dans les lymphocytes T CD4 n'est pas due à une détection directe du parasite, ou de ses acides nucléiques, puisque lors de co-incubation entre le parasite, de l'ARN purifié de parasite ou de l'ADN purifié de parasite et des lymphocytes T CD4, aucun d'entre eux n'induit l'activation du TLR7 ou d'IRF-5. En revanche, le matériel de splénocytes apoptotiques est capable d'activer le TLR7 et IRF-5, au même titre que l'imiquimod un agoniste de synthèse du TLR7. De manière intéressante, il semble que ce ne soit ni l'ARN, ni l'ADN relâchés par les cellules apoptotiques qui soient en cause. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour déterminer quel autre élément présent dans le matériel de cellules apoptotiques pourrait induire l'activation du TLR7.

Il est important de noter par rapport à ces résultats, que l'induction de l'apoptose par la voie du TLR7-IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 est dictée par la destruction tissulaire. Cela implique que la persistance de l'inflammation lors de la leishmaniose viscérale mène à une régulation négative de la réponse Th1 anti-leishmanienne et limite la réponse inflammatoire. Alors que le foie capable de générer une réponse plus efficace grâce à la formation de granulomes, ne va ni développer d'inflammation chronique ni subir de dommages tissulaires majeurs, on constate qu'IRF-5 n'est pas activé dans les lymphocytes T CD4 du foie, étayant le

fait que la destruction tissulaire puisse réguler la réponse pro-inflammatoire des lymphocytes T CD4. On peut donc se demander si ce mécanisme de protection tissulaire est un mécanisme général, qui pourrait se retrouver dans d'autres types d'infections chroniques ou lors de diverses maladies impliquant un état inflammatoire persistant. On pourrait penser à d'autres infections chroniques telles que celles par le VIH ou *Mycobacterium tuberculosis*. Comme nous l'avons déjà vu, lors d'une infection par le VIH les lymphocytes T CD4 expriment DR5 en réponse à une sécrétion d'interféron de type I. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'impact d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 lors de cette infection, puisque l'on retrouve également une forte inflammation associée à une destruction tissulaire (Zeng *et al.*, 2012). Le cas d'une infection par *M.tuberculosis* pourrait également s'avérer digne d'intérêt puisque l'on retrouve une réponse granulomateuse dans les cas où l'infection est contrôlée, et une forte inflammation induisant des dommages tissulaires lors d'une prolifération bactérienne (O'Garra *et al.*, 2013). Comme dans notre modèle de leishmaniose viscérale, cela devrait mener à une expression différente d'IRF-5 entre les lymphocytes T CD4 présents dans le granulome et ceux qui vont participer à une réponse inflammatoire excessive.

L'activation d'IRF-5 lors de la détection d'agents pathogènes est considérée comme un mécanisme participant à la mise en place de l'inflammation. Cependant, cela n'est vrai que si l'on prend en compte l'activation d'IRF-5 dans les cellules de l'immunité innée, puisqu'en considérant son rôle, notamment dans les lymphocytes T, les conclusions doivent être plus nuancées. Dans le cas de l'infection par *L. donovani*, l'activation d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 limite l'inflammation dans la rate durant la phase chronique de la maladie. En effet, les lymphocytes T CD4 producteurs d'interféron gamma soutiennent l'état d'inflammation chronique. La mort de ces cellules par apoptose participe donc à limiter l'inflammation et limite la réponse efficace contre le parasite puisque les souris dont les lymphocytes T sont déficients pour IRF-5 ont une charge parasitaire plus faible. De manière intéressante, IRF-5 a été montré comme permettant la mise en place d'une réponse protectrice grâce au développement de la réponse Th1, et également dans le développement de l'inflammation (Krausgruber *et al.*, 2011, Paun *et al.*, 2011). Cependant, l'inflammation induite par IRF-5 limite l'expansion des lymphocytes T CD8 (Hammami *et al.*, 2015). Cela met en avant la dualité du rôle d'IRF-5 qui peut induire une forte inflammation et être nécessaire au développement de la réponse Th1, mais également limiter cette même réponse Th1 ainsi que la réponse des lymphocytes T CD8 en utilisant des mécanismes différents en fonction des cellules qui vont l'exprimer. La régulation de la réponse Th1 est due à la sensibilisation de ces cellules à l'apoptose médiée par TRAIL, alors que l'expansion clonale des lymphocytes T CD8 est limitée par un effet indirect qui mène

à l'augmentation de la production d'interleukine 10 et à la diminution de production d'interleukine 12 par les cellules dendritiques (Hammami *et al.*, 2015). L'implication d'IRF-5 dans la régulation de la réponse inflammatoire est dépendante du type cellulaire concerné, de l'avancement de l'infection et plus généralement de l'environnement cellulaire.

2 LE RÔLE D'IRF-5 DANS LES LYMPHOCYTES T CD8

Les résultats préliminaires de cette seconde étude ont permis de mettre en évidence l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 lorsqu'ils sont activés *in vitro* et *in vivo*. Une des premières questions à la vue de ces résultats est de se demander par quel mécanisme IRF-5 est induit dans les lymphocytes T CD8 ? À première vue il semblerait que ce soit un mécanisme qui implique l'activation des lymphocytes T CD8. Bien que très peu d'études se soient penchées sur les différents facteurs menant à l'expression d'IRF-5, il est connu que la protéine p53 (Mori *et al.*, 2002), l'interféron de type I (Barnes *et al.*, 2001) et les TLRs (Paun *et al.*, 2011) sont de potentiels inducteurs de l'expression d'IRF-5. On peut donc se demander si l'expression d'IRF-5 que nous observons est due à l'interféron de type I ou aux TLRs. Lors d'une infection par le virus de la vaccine la quantité d'interféron de type I sécrétée au début de l'infection pourrait être suffisante pour induire l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8, bien que cette quantité soit faible (Waibler *et al.*, 2009). Les TLRs pourraient également être à la base de l'expression d'IRF-5, puisqu'ils sont capables de détecter le virus de la vaccine (Martinez *et al.*, 2010). Mais on ne peut cependant pas exclure le rôle que pourrait avoir le signal du TCR dans l'induction de l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8, puisque l'expression d'IRF-5 survient majoritairement dans les lymphocytes T CD8 activés. Cette question mériterait de plus amples investigations pour pouvoir y répondre clairement.

Une autre observation intéressante est la différence de translocation d'IRF-5 au noyau observée entre les conditions *in vitro* et *in vivo*. Alors que dans l'activation *in vitro* le taux de translocation est d'environ 50%, dans l'infection *in vivo* le taux de translocation est entre 90% et 95%. En ce qui concerne l'activation d'IRF-5, plusieurs voies de signalisation sont connues pour induire sa dimérisation puis sa translocation au noyau. Parmi ces voies, on peut penser à celles des TLRs, à l'activation spécifique par les virus ou à celle de l'interféron de type I. Le virus de la

vaccin étant un virus à ADN, les TLRs capables de reconnaître de l'ADN et impliqués dans l'activation d'IRF-5 se résument au TLR9. En effet, le TLR9 a déjà été montré comme étant important dans la détection et dans la protection contre le MVA (Modified Vaccinia Ankara) (Samuelsson *et al.*, 2008). En revanche, le virus de la vaccin n'a pas de tropisme particulier pour les lymphocytes T et n'a même tendance qu'à très peu les infecter (Sanchez-Puig *et al.*, 2004). Si la voie du TLR9 devait être impliquée, il serait plus probable que ce soit à travers l'endocytose de fragments d'ADN viraux se trouvant dans le milieu extracellulaire. Cependant, la voie de MyD88 est essentielle pour que la réponse T CD8 contre le virus de la vaccin se développe puisque Zhao *et al.*, montrent que des lymphocytes T CD8 déficients pour MyD88 ont un défaut lors de l'expansion clonale en réponse à l'infection (Zhao *et al.*, 2009). Le virus de la vaccin pourrait également spécifiquement activer IRF-5 à l'instar du virus de la maladie de Newcastle (Barnes *et al.*, 2001) ou de l'herpès simplex de type I (Barnes *et al.*, 2002). Les mécanismes impliqués dans ce type d'activation n'étant pas définis, il est difficile pour nous de pouvoir statuer quant au possible effet du virus de la vaccin sur l'activation d'IRF-5. Cependant, vu que ce virus à ADN ne passe pas par la voie endosomale, il est peu probable que les TLRs soient impliqués dans l'activation d'IRF-5. Enfin, l'interféron de type I serait un autre candidat pour l'activation d'IRF-5 même s'il est connu qu'une infection par le virus de la vaccin limite la production d'interféron de type I par différents mécanismes (Waibler *et al.*, 2009). Cependant, une récente étude a montré que l'activation d'IRF-5 dans le cas d'infections bactériennes va dépendre de la production d'interféron de type I qui est générée. Des bactéries comme les streptocoques de groupe B qui induisent une forte production d'interféron de type I induisent une plus grande translocation d'IRF-5 au noyau comparativement à *S. aureus* et *E. coli* qui induisent une production d'interféron de type I moindre (Ehrnstrom *et al.*, 2017). De manière intéressante, dans un modèle où un virus de la vaccin recombinant induit l'expression d'interféron de type I, cela permet de restaurer l'expansion des lymphocytes T CD8 dans une souris déficiente pour MyD88 (Sutherland *et al.*, 2011). Bien que la présence d'un second facteur pour induire la translocation au noyau d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 activés semble requise, il sera nécessaire de continuer à travailler sur ce sujet pour pouvoir apporter plus de précisions quant aux interactions nécessaires entre les TLRs et l'interféron de type I pour promouvoir le développement de la réponse CD8 lors d'une infection par le virus de la vaccin.

D'après les résultats que nous avons obtenus suite aux infections entre des souris de type sauvage et les souris déficientes pour IRF-5 dans les lymphocytes T, on observe un défaut d'expansion des lymphocytes T CD8. Ce problème d'expansion pourrait être la conséquence soit d'une prolifération diminuée, soit d'un problème dans la survie des lymphocytes. En effet, IRF-5 est capable de jouer sur ces deux aspects, mais les effets observés sont contradictoires en fonction des modèles utilisés. Ses effets sur la prolifération et le cycle cellulaire ont été mis en évidence dans des modèles de cellules tumorales, où dans un premier temps, des études définissent IRF-5 comme un médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules de lymphome B puisqu'il induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂-M (Barnes *et al.*, 2003). Mais plus récemment, de nouvelles études présentent IRF-5 comme nécessaire pour la prolifération (De *et al.*, 2017, Massimino *et al.*, 2012). Dans une étude utilisant des cellules issues de carcinome de la glande thyroïde, lorsque l'expression d'IRF-5 est diminuée à l'aide d'ARN interférents, la prolifération clonale des cellules tumorales est diminuée, alors que si IRF-5 est surexprimé dans ces mêmes cellules, la prolifération est nettement augmentée (Massimino *et al.*, 2012). Une autre étude démontre le rôle d'IRF-5 dans la prolifération de lymphocytes B primaires, puisqu'en régulant à la baisse l'expression d'IRF-5 suite à une stimulation du BCR et du TLR9, les lymphocytes B prolifèrent moins bien. Ces effets sont notamment dus à l'induction de la transcription de facteurs favorisant la prolifération cellulaire tel que le gène *MYC* (De *et al.*, 2017). Il est donc possible qu'IRF-5 contrôle en partie le programme de prolifération cellulaire des lymphocytes T CD8 suite à leur activation. Son rôle dans la survie cellulaire paraît moins évident, car en général IRF-5 est considéré comme un facteur menant à l'apoptose que ce soit suite à des dommages de l'ADN (Barnes *et al.*, 2003, Bi *et al.*, 2014), ou lorsque l'apoptose est induite par des récepteurs de mort cellulaire (Couzinet *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2009). Seule l'étude de De *et al.*, met en avant IRF-5 comme favorisant la survie des lymphocytes B mais de manière très indirecte (De *et al.*, 2017). Au vu de ces données, il est plus probable qu'IRF-5 ait un rôle pour activer la prolifération des lymphocytes T CD8, plutôt que de favoriser la survie cellulaire.

Si on regarde plus en détails quelles populations sont affectées par le défaut d'IRF-5, on observe une diminution drastique de la population des SLEC, alors que les MPEC sont légèrement augmentés. Il se pourrait qu'IRF-5, en plus des potentiels rôles cités plus haut, puisse réguler la différenciation des cellules effectrices. En effet, IRF-5 est capable de réguler la différenciation des lymphocytes B par le biais du facteur de transcription BLIMP-1 nécessaire à la maturation des lymphocytes B. Ainsi les lymphocytes B, en absence d'IRF-5, ne sont pas capable de se différencier en plasmacytoïdes qui requièrent l'expression de BLIMP-1 (Lien *et*

al., 2010). De la même manière, IRF-5 pourrait être nécessaire à l'expression de certains facteurs dans les lymphocytes T CD8, qui seraient nécessaires à la différenciation en SLEC ou qui permettraient de favoriser la survie et la prolifération des cellules l'exprimant. Cependant la nature de ces facteurs reste encore à déterminer.

Il est intéressant d'observer que la déficience d'IRF-5 entraîne des effets complètement opposés entre les lymphocytes T CD4 et T CD8. En effet, dans le cas de notre première étude on montre qu'IRF-5 est responsable de la mort cellulaire des lymphocytes T CD4 et limite leur expansion, alors que pour les lymphocytes T CD8 il semblerait nécessaire pour leur expansion et pour leur différenciation. Cependant, il faut noter que notre système de délétion d'IRF-5 n'est pas spécifique aux lymphocytes T CD4 ou T CD8 mais englobe tous les lymphocytes T. Sachant que l'aide des lymphocytes T CD4 est essentielle dans le contexte d'une infection avec le virus de la vaccine, et que l'aide fournie par les lymphocytes T CD4 permet entre autre de favoriser la survie (Novy *et al.*, 2007) et la différenciation des lymphocytes T CD8 (Obar *et al.*, 2010), il se peut que les effets que nous observons soient dus au rôle intrinsèque d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 mais aussi en partie dus à son rôle dans les lymphocytes T CD4. C'est dans cette optique que nous avons mis au point un système d'ARN interférents qui seront capables de réduire l'expression d'IRF-5 dans des lymphocytes T CD8, nous permettant de mieux apprécier le véritable rôle d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 lors d'une infection par le virus de la vaccine.

Ces travaux ont permis de démontrer que les lymphocytes T CD8 expriment IRF-5 lors d'une infection virale. Bien que de plus amples investigations soient nécessaires pour déterminer son rôle exact, sa voie d'activation ou encore déterminer ses gènes cibles, les premiers résultats que nous avons nous amènent à penser qu'IRF-5 est essentiel dans les lymphocytes T CD8 pour le bon développement d'une réponse primaire.

Il serait intéressant de déterminer si les effets d'IRF-5 que nous observons, aussi bien pour les lymphocytes T CD4 que CD8, sont dépendants de nos modèles d'infection ou si au contraire ce sont des mécanismes généraux qui pourraient être retrouvés dans d'autres types d'infection. A ce compte là, l'étude d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 pourrait se faire dans d'autres infections chroniques impliquant une forte inflammation et des dommages tissulaires, comme ce qui est observé lors d'infections par le VIH ou *M.tb*. En ce qui concerne les

lymphocytes T CD8, des études avec des infections telles que celles causées par le LCMV ou *L. monocytogenes* permettraient d'approfondir les mécanismes associés à l'expression d'IRF-5, notamment car les environnements cytokiniques de ces trois types d'infections sont différents.

Finalement, ces travaux suggèrent que la modulation d'IRF-5 par des agents pharmacologiques pourrait être bénéfique. L'inhibition d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 permettrait d'améliorer la réponse Th1 lors d'infection chronique. Il existe plusieurs manières de procéder, soit en ciblant la voie de signalisation en aval, soit en ciblant directement IRF-5. Bien que la première solution est la plus simple à réaliser, car il existe déjà des inhibiteurs capables d'interagir avec ces voies de signalisations, leur application *in vivo* pose des problèmes notamment au niveau de la spécificité d'action. Des molécules telles que MyD88, IRAK1/4 ou TRAF6 ne sont pas exclusives de la voie d'activation d'IRF-5. Inhiber leurs fonctions bloquerait de nombreuses autres voies et induirait sans aucun doute des effets non désirés. La seconde option semble donc plus adaptée, car elle agirait uniquement sur notre protéine d'intérêt. En ce sens, le développement de peptides inhibiteurs s'avèrera être une option prometteuse, en empêchant la formation de dimères et donc son activation. Dans le cas des lymphocytes T CD8, si par la suite les résultats se confirment, l'induction de l'expression d'IRF-5 permettrait d'améliorer la réponse immunitaire en favorisant leur expansion clonale et leur différenciation en effecteurs. Les méthodes pour parvenir à un tel résultat auraient recours à la thérapie génique. Cependant, et bien que le développement de telles thérapies soit séduisant, un des principaux problèmes à surmonter serait de diriger ces thérapies de manière cellule spécifique. Puisqu'IRF-5 est exprimé dans quasiment toutes les cellules du système immunitaire, induisant des effets bien distincts dans chaque type cellulaire.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux présentent IRF-5 comme un nouvel acteur important, régulant directement la réponse des lymphocytes T. D'un côté l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD4 va être impliquée dans la régulation du maintien de la réponse Th1 lors d'une infection chronique, puisqu'elle sensibilise les cellules à une mort cellulaire médiée par TRAIL. De l'autre, l'expression d'IRF-5 dans les lymphocytes T CD8 est nécessaire au bon développement d'une réponse primaire en favorisant leur expansion clonale et leur différenciation en effecteurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA & Cantley LC (2007) Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Molecular and cellular biology* 27(17):6012-6025.
- Abdeladhim M, Ben Ahmed M, Marzouki S, Belhadj Hmida N, Boussoffara T, Belhaj Hamida N, Ben Salah A & Louzir H (2011) Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8⁺ T cells and Th1-polarized CD4⁺ lymphocytes. *PLoS neglected tropical diseases* 5(10):e1345.
- Abidin BM, Hammami A, Stager S & Heinonen KM (2017) Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens* 13(8):e1006422.
- Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, Horvath GL, Schmidt T, Latz E & Hornung V (2013) Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* 503(7477):530-534.
- Abou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J & Doyen N (2009) TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol* 182(3):1386-1396.
- Acheampong EA, Parveen Z, Muthoga LW, Wasmuth-Peroud V, Kalayeh M, Bashir A, Diecidue R, Mukhtar M & Pomerantz RJ (2005) Molecular interactions of human immunodeficiency virus type 1 with primary human oral keratinocytes. *Journal of virology* 79(13):8440-8453.
- Achuthan A, Cook AD, Lee MC, Saleh R, Khiew HW, Chang MW, Louis C, Fleetwood AJ, Lacey DC, Christensen AD, Frye AT, Lam PY, Kusano H, Nomura K, Steiner N, Forster I, Nutt SL, Olshansky M, Turner SJ & Hamilton JA (2016) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *The Journal of clinical investigation* 126(9):3453-3466.
- Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17:593-623.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W & Laskay T (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169(2):898-905.
- Agrawal S & Gupta S (2011) TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *Journal of clinical immunology* 31(1):89-98.
- Aichele P, Unsoeld H, Koschella M, Schweier O, Kalinke U & Vucikuja S (2006) CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol* 176(8):4525-4529.
- Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C & Perretti M (1999) Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration

- in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* 162(3):1685-1691.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T & Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774):193-197.
- Alexander CE, Kaye PM & Engwerda CR (2001) CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. *European journal of immunology* 31(4):1199-1210.
- Alzaid F, Lagadec F, Albuquerque M, Ballaire R, Orliaguet L, Hainault I, Blugeon C, Lemoine S, Lehuen A, Saliba DG, Udalova IA, Paradis V, Fougelle F & Venteclef N (2016) IRF5 governs liver macrophage activation that promotes hepatic fibrosis in mice and humans. *JCI insight* 1(20):e88689.
- Amin DN, Rottenberg ME, Thomsen AR, Mumba D, Fenger C, Kristensson K, Buscher P, Finsen B & Masocha W (2009) Expression and role of CXCL10 during the encephalitic stage of experimental and clinical African trypanosomiasis. *The Journal of infectious diseases* 200(10):1556-1565.
- Angelosanto JM, Blackburn SD, Crawford A & Wherry EJ (2012) Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *Journal of virology* 86(15):8161-8170.
- Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, Dutow P, Woodruff TM, Yu ZX, O'Neill LA, Coll RC, Sher A, Leonard WJ, Kohl J, Monk P, Cooper MA, Arno M, Afzali B, Lachmann HJ, Cope AP, Mayer-Barber KD & Kemper C (2016) T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science* 352(6292):aad1210.
- Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, Carvalho E, Ephros M, Jeronimo S & Magill A (2017) Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96(1):24-45.
- Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology* 30(12-13):1269-1281.
- Ato M, Stager S, Engwerda CR & Kaye PM (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nature immunology* 3(12):1185-1191.
- Au WC, Moore PA, LaFleur DW, Tombal B & Pitha PM (1998) Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *The Journal of biological chemistry* 273(44):29210-29217.
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT & Pitha PM (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25):11657-11661.

- Baba N, Rubio M, Kenins L, Regairaz C, Woisetschlager M, Carballido JM & Sarfati M (2012) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naive CD4(+) Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human immunology* 73(8):795-800.
- Bachmann MF, Barner M, Viola A & Kopf M (1999) Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *European journal of immunology* 29(1):291-299.
- Badovinac VP, Porter BB & Harty JT (2002) Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature immunology* 3(7):619-626.
- Balkhi MY, Fitzgerald KA & Pitha PM (2008) Functional regulation of MyD88-activated interferon regulatory factor 5 by K63-linked polyubiquitination. *Molecular and cellular biology* 28(24):7296-7308.
- Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T & Tamura T (2016) Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* 45(2):319-332.
- Ban T, Sato GR & Tamura T (2018) Regulation and role of the transcription factor IRF5 in innate immune responses and systemic lupus erythematosus. *International immunology* 10.1093/intimm/dxy032.
- Banerjee A, Gordon SM, Intlekofer AM, Paley MA, Mooney EC, Lindsten T, Wherry EJ & Reiner SL (2010) Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 185(9):4988-4992.
- Bankoti R, Gupta K, Levchenko A & Stager S (2012) Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol* 188(8):3961-3971.
- Barbalat R, Lau L, Locksley RM & Barton GM (2009) Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology* 10(11):1200-1207.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE & Pitha PM (2002) Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Molecular and cellular biology* 22(16):5721-5740.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA & Pitha PM (2003) Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer research* 63(19):6424-6431.
- Barnes BJ, Moore PA & Pitha PM (2001) Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *The Journal of biological chemistry* 276(26):23382-23390.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L & Pitha PM (2004) Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *The Journal of biological chemistry* 279(43):45194-45207.

- Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O & Coffman RL (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 202(8):1131-1139.
- Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Bluml S, Grebien F, Bruckner M, Pasierbek P, Aumayr K, Planyavsky M, Bennett KL, Colinge J, Knapp S & Superti-Furga G (2010) CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *The Journal of experimental medicine* 207(12):2689-2701.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C & Isibasi A (2003) Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and biochemical parasitology* 130(2):65-74.
- Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A & Ahmed R (2002) Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* 195(12):1541-1548.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF & Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27(1):20-21.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF & Heath WR (1997) Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *The Journal of experimental medicine* 186(1):65-70.
- Bi X, Feng D, Korczeniewska J, Alper N, Hu G & Barnes BJ (2014) Deletion of Irf5 protects hematopoietic stem cells from DNA damage-induced apoptosis and suppresses gamma-irradiation-induced thymic lymphomagenesis. *Oncogene* 33(25):3288-3297.
- Billings P, Burakoff S, Dorf ME & Benacerraf B (1977) Cytotoxic T lymphocytes specific for I region determinants do not require interactions with H-2K or D gene products. *The Journal of experimental medicine* 145(5):1387-1392.
- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA & Wherry EJ (2009) Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature immunology* 10(1):29-37.
- Blackwell JM, Ezekowitz RA, Roberts MB, Channon JY, Sim RB & Gordon S (1985) Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. *The Journal of experimental medicine* 162(1):324-331.
- Blattman JN, Grayson JM, Wherry EJ, Kaech SM, Smith KA & Ahmed R (2003) Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature medicine* 9(5):540-547.
- Bollig N, Brustle A, Kellner K, Ackermann W, Abass E, Raifer H, Camara B, Brendel C, Giel G, Bothur E, Huber M, Paul C, Elli A, Kroccek RA, Nurieva R, Dong C, Jacob R, Mak TW & Lohoff M (2012) Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(22):8664-8669.

- Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C & Ma A (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* 5(10):1052-1060.
- Borrow P, Tishon A, Lee S, Xu J, Grewal IS, Oldstone MB & Flavell RA (1996) CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *The Journal of experimental medicine* 183(5):2129-2142.
- Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrerizo M, Tucci A, Hughes LD, Kong Y, Weinstein JS, Licona-Limon P, Schmid ET, Pelorosso F, Gagliani N, Craft JE, Flavell RA, Ghosh S & Rothlin CV (2017) Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 356(6342):1072-1076.
- Bourgeois C, Rocha B & Tanchot C (2002) A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297(5589):2060-2063.
- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R & Feldmann M (1989) Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2(8657):244-247.
- Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, Mostbock S & Ritter U (2009) Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 182(2):774-783.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.
- Briseno CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Kc W, Durai V, Grajales-Reyes GE, Iwata A, Bagadia P, Murphy TL & Murphy KM (2016) Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell reports* 15(11):2462-2474.
- Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD & Kaufmann DE (2009) IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114(2):346-356.
- Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB & Oldstone MB (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine* 12(11):1301-1309.
- Browne EP (2012) Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 136(4):370-379.
- Broyles SS (2003) Vaccinia virus transcription. *The Journal of general virology* 84(Pt 9):2293-2303.
- Bruchard M, Rebe C, Derangere V, Togbe D, Ryffel B, Boidot R, Humblin E, Hamman A, Chalmin F, Berger H, Chevriaux A, Limagne E, Apetoh L, Vegran F & Ghiringhelli F (2015) The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nature immunology* 16(8):859-870.

- Brunette GW (2017) *CDC Yellow Book 2018: health information for international travel*. Oxford University Press,
- Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T & Lohoff M (2007) The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology* 8(9):958-966.
- Bucks CM, Norton JA, Boesteanu AC, Mueller YM & Katsikis PD (2009) Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion. *J Immunol* 182(11):6697-6708.
- Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, Waldschmidt TJ, Crompton PD & Harty JT (2011) Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature immunology* 13(2):188-195.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT & Gazzinelli RT (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1):416-423.
- Cannarile MA, Lind NA, Rivera R, Sheridan AD, Camfield KA, Wu BB, Cheung KP, Ding Z & Goldrath AW (2006) Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nature immunology* 7(12):1317-1325.
- Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M & Demengeot J (2003) Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 197(4):403-411.
- Carbo A, Hontecillas R, Andrew T, Eden K, Mei Y, Hoops S & Bassaganya-Riera J (2014) Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. *Frontiers in cell and developmental biology* 2:31.
- Carlin LM, Stamatides EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, Hedrick CC, Cook HT, Diebold S & Geissmann F (2013) Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153(2):362-375.
- Caron G, Duluc D, Fremaux I, Jeannin P, David C, Gascan H & Delneste Y (2005) Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 175(3):1551-1557.
- Carregaro V, Valenzuela JG, Cunha TM, Verri WA, Jr., Grespan R, Matsumura G, Ribeiro JM, Elnaiem DE, Silva JS & Cunha FQ (2008) Phlebotomine salivars inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. *Journal of leukocyte biology* 84(1):104-114.
- Carrero JA, Calderon B & Unanue ER (2004) Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *The Journal of experimental medicine* 200(4):535-540.
- Carrio R, Rolle CE & Malek TR (2007) Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *European journal of immunology* 37(11):3078-3088.

- Carvalho LP, Petritus PM, Trochtenberg AL, Zaph C, Hill DA, Artis D & Scott P (2012) Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent on TLR9. *J Immunol* 188(3):1394-1401.
- Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM & Kunkel SL (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *The Journal of experimental medicine* 205(11):2609-2621.
- Cerboni S, Jeremiah N, Gentili M, Gehrman U, Conrad C, Stolzenberg MC, Picard C, Neven B, Fischer A, Amigorena S, Rieux-Laucat F & Manel N (2017) Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 214(6):1769-1785.
- Chang Foreman HC, Van Scoy S, Cheng TF & Reich NC (2012) Activation of interferon regulatory factor 5 by site specific phosphorylation. *PloS one* 7(3):e33098.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J & Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology* 5(11):873-882.
- Chen L, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H & Sendo F (2005) The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitology international* 54(2):109-118.
- Chen RA, Ryzhakov G, Cooray S, Randow F & Smith GL (2008a) Inhibition of IkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS pathogens* 4(2):e22.
- Chen W, Lam SS, Srinath H, Jiang Z, Correia JJ, Schiffer CA, Fitzgerald KA, Lin K & Royer WE, Jr. (2008b) Insights into interferon regulatory factor activation from the crystal structure of dimeric IRF5. *Nature structural & molecular biology* 15(11):1213-1220.
- Cheng L, Yu H, Li G, Li F, Ma J, Li J, Chi L, Zhang L & Su L (2017) Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI insight* 2(12).
- Cheng TF, Brzostek S, Ando O, Van Scoy S, Kumar KP & Reich NC (2006) Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection. *J Immunol* 176(12):7462-7470.
- Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL & Zuniga-Pflucker JC (2004) Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 172(9):5230-5239.
- Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T & Akira S (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201(1):19-25.
- Cottalorda A, Vershelde C, Marcais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S, Akira S, Marvel J & Bonnefoy-Berard N (2006) TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *European journal of immunology* 36(7):1684-1693.

- Cotterell SE, Engwerda CR & Kaye PM (2000a) Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity* 68(4):1840-1848.
- Cotterell SE, Engwerda CR & Kaye PM (2000b) *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . *Blood* 95(5):1642-1651.
- Courties G, Heidt T, Sebas M, Iwamoto Y, Jeon D, Truelove J, Tricot B, Wojtkiewicz G, Dutta P, Sager HB, Borodovsky A, Novobrantseva T, Klebanov B, Fitzgerald K, Anderson DG, Libby P, Swirski FK, Weissleder R & Nahrendorf M (2014) In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing. *Journal of the American College of Cardiology* 63(15):1556-1566.
- Couzinet A, Tamura K, Chen HM, Nishimura K, Wang Z, Morishita Y, Takeda K, Yagita H, Yanai H, Taniguchi T & Tamura T (2008) A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7):2556-2561.
- Cox MA, Harrington LE & Zajac AJ (2011) Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends in immunology* 32(4):180-186.
- Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE & Wherry EJ (2014) Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 40(2):289-302.
- Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS & Levings MK (2005) Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 175(12):8051-8059.
- Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, Belz GT, Smyth GK, Busslinger M, Nutt SL & Kallies A (2011) The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature immunology* 12(4):304-311.
- Crowder RN & El-Deiry WS (2012) Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Experimental oncology* 34(3):160-164.
- Cruz-Adalia A, Ramirez-Santiago G, Calabia-Linares C, Torres-Torresano M, Feo L, Galan-Diez M, Fernandez-Ruiz E, Pereiro E, Guttmann P, Chiappi M, Schneider G, Carrascosa JL, Chichon FJ, Martinez Del Hoyo G, Sanchez-Madrid F & Veiga E (2014) T cells kill bacteria captured by transinfection from dendritic cells and confer protection in mice. *Cell host & microbe* 15(5):611-622.
- Cruz-Adalia A, Ramirez-Santiago G, Osuna-Perez J, Torres-Torresano M, Zorita V, Martinez-Riano A, Boccasavia V, Borroto A, Martinez Del Hoyo G, Gonzalez-Granado JM, Alarcon B, Sanchez-Madrid F & Veiga E (2017) Conventional CD4(+) T cells present bacterial antigens to induce cytotoxic and memory CD8(+) T cell responses. *Nature communications* 8(1):1591.
- Cui TX, Kryczek I, Zhao L, Zhao E, Kuick R, Roh MH, Vatan L, Szeliga W, Mao Y, Thomas DG, Kotarski J, Tarkowski R, Wicha M, Cho K, Giordano T, Liu R & Zou W (2013)

- Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity* 39(3):611-621.
- Dalmas E, Toubal A, Alzaid F, Blazek K, Eames HL, Lebozec K, Pini M, Hainault I, Montastier E, Denis RG, Ancel P, Lacombe A, Ling Y, Allatif O, Cruciani-Guglielmacci C, Andre S, Viguerie N, Poitou C, Stich V, Torcivia A, Foufelle F, Luquet S, Aron-Wisnewsky J, Langin D, Clement K, Udalova IA & Venteclef N (2015) Irf5 deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity. *Nature medicine* 21(6):610-618.
- Davey GM, Wojtasiak M, Proietto AI, Carbone FR, Heath WR & Bedoui S (2010) Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *J Immunol* 184(5):2243-2246.
- Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ & Rennick DM (1996) T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 184(1):241-251.
- Dawidowicz K, Allanore Y, Guedj M, Pierlot C, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Alves H, Teixeira VH, Petit-Teixeira E, van de Putte L, van Riel P, Prum B, Bardin T, Meyer O, Cornelis F & Dieude P (2011) The interferon regulatory factor 5 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis and influences its erosive phenotype. *Annals of the rheumatic diseases* 70(1):117-121.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ & Walker BD (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443(7109):350-354.
- de Moura TR, Oliveira F, Rodrigues GC, Carneiro MW, Fukutani KF, Novais FO, Miranda JC, Barral-Netto M, Brodskyn C, Barral A & de Oliveira CI (2010) Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS neglected tropical diseases* 4(6):e712.
- De S, Zhang B, Shih T, Singh S, Winkler A, Donnelly R & Barnes BJ (2017) B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation. *Frontiers in immunology* 8:1938.
- Dideberg V, Kristjansdottir G, Milani L, Libioulle C, Sigurdsson S, Louis E, Wiman AC, Vermeire S, Rutgeerts P, Belaiche J, Franchimont D, Van Gossum A, Bours V & Syvanen AC (2007) An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Human molecular genetics* 16(24):3008-3016.
- Dominguez-Villar M, Gautron AS, de Marcken M, Keller MJ & Hafler DA (2015) TLR7 induces anergy in human CD4(+) T cells. *Nature immunology* 16(1):118-128.
- Donnarumma T, Young GR, Merckenschlager J, Eksmond U, Bongard N, Nutt SL, Boyer C, Dittmer U, Le-Trilling VT, Trilling M, Bayer W & Kassiotis G (2016) Opposing Development of Cytotoxic and Follicular Helper CD4 T Cells Controlled by the TCF-1-Bcl6 Nexus. *Cell reports* 17(6):1571-1583.

- Dostalova A & Volf P (2012) Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors* 5:276.
- Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P & Gordon S (1994) Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *European journal of immunology* 24(6):1441-1445.
- Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ & Hayday AC (1994) T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1(2):83-93.
- Ehrnstrom B, Beckwith KS, Yurchenko M, Moen SH, Kojen JF, Lentini G, Teti G, Damas JK, Espevik T & Stenvik J (2017) Toll-Like Receptor 8 Is a Major Sensor of Group B Streptococcus But Not Escherichia coli in Human Primary Monocytes and Macrophages. *Frontiers in immunology* 8:1243.
- Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S & von Herrath MG (2006) Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *The Journal of experimental medicine* 203(11):2461-2472.
- Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K & Pfeffer K (1999) Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *The Journal of experimental medicine* 189(1):159-168.
- Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM & Kaye PM (2002) A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection. *The American journal of pathology* 161(2):429-437.
- Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC & Kaye PM (1998) Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of Leishmania donovani. *European journal of immunology* 28(2):669-680.
- Evans DA (1993a) In vitro cultivation and biological cloning of Leishmania. *Methods Mol Biol* 21:29-41.
- Evans TG (1993b) Leishmaniasis. *Infectious disease clinics of North America* 7(3):527-546.
- Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M & Barton GM (2011) Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *The Journal of experimental medicine* 208(4):643-651.
- Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB & Brooks DG (2011) Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine* 208(5):987-999.
- Fang CM, Roy S, Nielsen E, Paul M, Maul R, Paun A, Koentgen F, Raval FM, Szomolanyi-Tsuda E & Pitha PM (2012) Unique contribution of IRF-5-Ikaros axis to the B-cell IgG2a response. *Genes and immunity* 13(5):421-430.
- Feau S, Arens R, Togher S & Schoenberger SP (2011) Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nature immunology* 12(9):908-913.

- Feng D, Yang L, Bi X, Stone RC, Patel P & Barnes BJ (2012) Irf5-deficient mice are protected from pristane-induced lupus via increased Th2 cytokines and altered IgG class switching. *European journal of immunology* 42(6):1477-1487.
- Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H & Smith GL (2012) DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *eLife* 1:e00047.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM & Maniatis T (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* 4(5):491-496.
- Flandin JF, Chano F & Descoteaux A (2006) RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *European journal of immunology* 36(2):411-420.
- Fletcher JM, Vukmanovic-Stejić M, Dunne PJ, Birch KE, Cook JE, Jackson SE, Salmon M, Rustin MH & Akbar AN (2005) Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* 175(12):8218-8225.
- Fontenot JD, Gavin MA & Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4(4):330-336.
- Fraietta JA, Mueller YM, Yang G, Boesteanu AC, Gracias DT, Do DH, Hope JL, Kathuria N, McGettigan SE, Lewis MG, Giavedoni LD, Jacobson JM & Katsikis PD (2013) Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS pathogens* 9(10):e1003658.
- Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, Marsland BJ, Oxenius A & Kopf M (2009) IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 324(5934):1576-1580.
- Fu B, Zhao M, Wang L, Patil G, Smith JA, Juncadella IJ, Zuvella-Jelaska L, Dorf ME & Li S (2017) RNAi Screen and Proteomics Reveal NXF1 as a Novel Regulator of IRF5 Signaling. *Scientific reports* 7(1):2683.
- Fujii Y, Shimizu T, Kusumoto M, Kyogoku Y, Taniguchi T & Hakoshima T (1999) Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO journal* 18(18):5028-5041.
- Fukata M, Breglio K, Chen A, Vamadevan AS, Goo T, Hsu D, Conduah D, Xu R & Abreu MT (2008) The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 180(3):1886-1894.
- Garidou L, Heydari S, Gossa S & McGavern DB (2012) Therapeutic blockade of transforming growth factor beta fails to promote clearance of a persistent viral infection. *Journal of virology* 86(13):7060-7071.
- Geissmann F, Jung S & Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71-82.
- Gelman AE, Zhang J, Choi Y & Turka LA (2004) Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 172(10):6065-6073.

- Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C & Defrance T (2007) TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* 178(12):7779-7786.
- Ghoneim HE, Fan Y, Moustaki A, Abdelsamed HA, Dash P, Dogra P, Carter R, Awad W, Neale G, Thomas PG & Youngblood B (2017) De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* 170(1):142-157 e119.
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ & Philpott DJ (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300(5625):1584-1587.
- Gomes NA, Gattass CR, Barreto-De-Souza V, Wilson ME & DosReis GA (2000) TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J Immunol* 164(4):2001-2008.
- Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A & Mosser DM (2011) Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of experimental medicine* 208(6):1253-1265.
- Gonzalez-Navajas JM, Fine S, Law J, Datta SK, Nguyen KP, Yu M, Corr M, Katakura K, Eckman L, Lee J & Raz E (2010) TLR4 signaling in effector CD4+ T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice. *The Journal of clinical investigation* 120(2):570-581.
- Gorak PM, Engwerda CR & Kaye PM (1998) Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology* 28(2):687-695.
- Gossage SM, Rogers ME & Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology* 33(10):1027-1034.
- Grevelink SA & Lerner EA (1996) Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 34(2 Pt 1):257-272.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE & Roncarolo MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-742.
- Guilliams M & Scott CL (2017) Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature reviews. Immunology* 17(7):451-460.
- Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, Radtke F & Ablasser A (2017) Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. *Nature communications* 8(1):427.
- Gundra UM, Girgis NM, Gonzalez MA, San Tang M, Van Der Zande HJP, Lin JD, Ouimet M, Ma LJ, Poles J, Vozhilla N, Fisher EA, Moore KJ & Loke P (2017) Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. *Nature immunology* 18(6):642-653.

- Gunthner R & Anders HJ (2013) Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization. *Mediators of inflammation* 2013:731023.
- Guy RA & Belosevic M (1993) Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infection and immunity* 61(4):1553-1558.
- Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E & Wagner H (2008) The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28(3):315-323.
- Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Muller W, Sparwasser T, Forster R & Pabst O (2011) Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34(2):237-246.
- Haljasorg U, Dooley J, Laan M, Kisand K, Bichele R, Liston A & Peterson P (2017) Irf4 Expression in Thymic Epithelium Is Critical for Thymic Regulatory T Cell Homeostasis. *J Immunol* 198(5):1952-1960.
- Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabie A, Duguay AP, Heinonen KM & Stager S (2017) HIF-1alpha is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens* 13(9):e1006616.
- Hammami A, Charpentier T, Smans M & Stager S (2015) IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1alpha and Impairing Dendritic Cell Functions during *Leishmania* Infection. *PLoS pathogens* 11(6):e1004938.
- Handman E & Spira DT (1977) Growth of *Leishmania* amastigotes in macrophages from normal and immune mice. *Z Parasitenkd* 53(1):75-81.
- Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, Herrley E, Rasquinha N, McArdle S, Wu R, Peluso E, Metzger D, Ichinose H, Shaked I, Chodaczek G, Biswas SK & Hedrick CC (2015) Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* 350(6263):985-990.
- Hardy AW, Graham DR, Shearer GM & Herbeuval JP (2007) HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(44):17453-17458.
- Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN & Uezato H (2016) Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical medicine and health* 44:2.
- Hashim FA, Ahmed AE, el Hassan M, el Mubarak MH, Yagi H, Ibrahim EN & Ali MS (1995) Neurologic changes in visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 52(2):149-154.
- Hayakawa K, Formica AM, Zhou Y, Ichikawa D, Asano M, Li YS, Shinton SA, Brill-Dashoff J, Nunez G & Hardy RR (2017) NLR Nod1 signaling promotes survival of BCR-engaged mature B cells through up-regulated Nod1 as a positive outcome. *The Journal of experimental medicine* 214(10):3067-3083.

- He Y, Fisher R, Chowdhury S, Sultana I, Pereira CP, Bray M & Reed JL (2014) Vaccinia virus induces rapid necrosis in keratinocytes by a STAT3-dependent mechanism. *PLoS one* 9(11):e113690.
- Heinzel FP, Rerko RM, Ahmed F & Pearlman E (1995) Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* 155(2):730-739.
- Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, Jirik FR & Kuberski P (2008) PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nature immunology* 9(7):743-752.
- Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Forster I & Brombacher F (2004) Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20(5):623-635.
- Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, Andersson J & Shearer GM (2006) Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(18):7000-7005.
- Hinterberger M, Wirnsberger G & Klein L (2011) B7/CD28 in central tolerance: costimulation promotes maturation of regulatory T cell precursors and prevents their clonal deletion. *Frontiers in immunology* 2:30.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N & Taniguchi T (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434(7034):772-777.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E & Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
- Hou B, Saudan P, Ott G, Wheeler ML, Ji M, Kuzmich L, Lee LM, Coffman RL, Bachmann MF & DeFranco AL (2011) Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity* 34(3):375-384.
- Hu G & Barnes BJ (2009) IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 284(5):2767-2777.
- Hu G, Mancl ME & Barnes BJ (2005) Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer research* 65(16):7403-7412.
- Hunt PW, Sinclair E, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, Robinson J, Huang Y, Epling L, Martin JN, Deeks SG, Meinert CL, Van Natta ML, Jabs DA & Lederman MM (2014) Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 210(8):1228-1238.

- Ichii H, Sakamoto A, Kuroda Y & Tokuhisa T (2004) Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 173(2):883-891.
- Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, Alonso C & Corraliza I (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. *Parasite immunology* 24(3):113-118.
- Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y & Nunez G (2000) An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 275(36):27823-27831.
- Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, Mullen AC, Gasink CR, Kaech SM, Miller JD, Gapin L, Ryan K, Russ AP, Lindsten T, Orange JS, Goldrath AW, Ahmed R & Reiner SL (2005) Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology* 6(12):1236-1244.
- Ishikawa C, Senba M, Barnes BJ & Mori N (2015) Constitutive expression of IRF-5 in HTLV-1-infected T cells. *International journal of oncology* 47(1):361-369.
- Italiani P & Boraschi D (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* 5:514.
- Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ & Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126(6):1121-1133.
- Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, Kwok WW, Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Hallahan CW, Davey RT, Jr., Dybul M, Vogel S, Metcalf J & Connors M (2003) Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4⁺ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *Journal of virology* 77(20):10900-10909.
- Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG & Schoenberger SP (2003) CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421(6925):852-856.
- Jellison ER, Kim SK & Welsh RM (2005) Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection. *J Immunol* 174(2):614-618.
- Ji Y, Pos Z, Rao M, Klebanoff CA, Yu Z, Sukumar M, Reger RN, Palmer DC, Borman ZA, Muranski P, Wang E, Schrumph DS, Marincola FM, Restifo NP & Gattinoni L (2011) Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8⁺ T cells. *Nature immunology* 12(12):1230-1237.
- Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF & Pamer EG (2008) Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 180(10):6846-6853.
- Jimenez Fernandez D & Lamkanfi M (2015) Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biological chemistry* 396(3):193-203.

- Joseph AM, Srivastava R, Zabaleta J & Davila E (2016) Cross-talk between 4-1BB and TLR1-TLR2 Signaling in CD8+ T Cells Regulates TLR2's Costimulatory Effects. *Cancer immunology research* 4(8):708-716.
- Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L & Kaech SM (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27(2):281-295.
- Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA & Stager S (2009) B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS pathogens* 5(5):e1000431.
- Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, Haining WN, Smith KA & Ahmed R (2010) Prolonged interleukin-2/alpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32(1):91-103.
- Kallies A, Xin A, Belz GT & Nutt SL (2009) Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31(2):283-295.
- Kaplan DE, Ikeda F, Li Y, Nakamoto N, Ganesan S, Valiga ME, Nunes FA, Rajender Reddy K & Chang KM (2008) Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 48(6):903-913.
- Karim AF, Reba SM, Li Q, Boom WH & Rojas RE (2017) Toll like Receptor 2 engagement on CD4(+) T cells promotes TH9 differentiation and function. *European journal of immunology* 47(9):1513-1524.
- Kasimsetty SG, Shigeoka AA, Scheinok AA, Gavin AL, Ulevitch RJ & McKay DB (2017) Lack of Both Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Proteins 1 and 2 Primes T Cells for Activation-Induced Cell Death. *J Immunol* 199(3):1196-1205.
- Kasprovicz V, Schulze Zur Wiesch J, Kuntzen T, Nolan BE, Longworth S, Berical A, Blum J, McMahon C, Reyor LL, Elias N, Kwok WW, McGovern BG, Freeman G, Chung RT, Klenerman P, Lewis-Ximenez L, Walker BD, Allen TM, Kim AY & Lauer GM (2008) High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *Journal of virology* 82(6):3154-3160.
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T & Akira S (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441(7089):101-105.
- Katz O, Waitumbi JN, Zer R & Warburg A (2000) Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62(1):145-150.
- Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B, Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kelleher AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES & Walker BD (2007) Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease

- progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature immunology* 8(11):1246-1254.
- Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O & Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* 6(10):981-988.
- Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ & Scott JC (1994) Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *European journal of immunology* 24(11):2850-2854.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S & Engwerda CR (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological reviews* 201:239-253.
- Keene JA & Forman J (1982) Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 155(3):768-782.
- Kepler SJ, Theil K, Vucikujia S & Aichele P (2009) Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *European journal of immunology* 39(7):1774-1783.
- Khan WI, Richard M, Akiho H, Blennerhasset PA, Humphreys NE, Grecis RK, Van Snick J & Collins SM (2003) Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infection and immunity* 71(5):2430-2438.
- Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME & Ploegh HL (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452(7184):234-238.
- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G & Kyewski B (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* 9(12):833-844.
- Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, Ludwig T, Rajewsky K & Dalla-Favera R (2006) Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology* 7(7):773-782.
- Kobe B & Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* 11(6):725-732.
- Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J & Murali-Krishna K (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine* 202(5):637-650.
- Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D & Liew FY (2004) TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9):3029-3034.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K & Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177(1):566-573.

- Kondo M, Weissman IL & Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91(5):661-672.
- Krammer PH, Arnold R & Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews. Immunology* 7(7):532-542.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M & Udalova IA (2011) IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology* 12(3):231-238.
- Krausgruber T, Saliba D, Ryzhakov G, Lanfrancotti A, Blazek K & Udalova IA (2010) IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells. *Blood* 115(22):4421-4430.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazi S, Galanos C, Smith DF & Muller I (2004) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity* 72(4):1920-1928.
- Kwon DS & Kaufmann DE (2010) Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis. *European cytokine network* 21(3):208-214.
- Larkin B, Ilyukha V, Sorokin M, Buzdin A, Vannier E & Poltorak A (2017) Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death. *J Immunol* 199(2):397-402.
- Lawrence T (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(6):a001651.
- Lazear HM, Pinto AK, Ramos HJ, Vick SC, Shrestha B, Suthar MS, Gale M, Jr. & Diamond MS (2013) Pattern recognition receptor MDA5 modulates CD8+ T cell-dependent clearance of West Nile virus from the central nervous system. *Journal of virology* 87(21):11401-11415.
- Lazzari E, Korczeniewska J, Ni Gabhann J, Smith S, Barnes BJ & Jefferies CA (2014) TRIPartite motif 21 (TRIM21) differentially regulates the stability of interferon regulatory factor 5 (IRF5) isoforms. *PloS one* 9(8):e103609.
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ & Marshak-Rothstein A (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416(6881):603-607.
- Lee BL, Moon JE, Shu JH, Yuan L, Newman ZR, Schekman R & Barton GM (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife* 2:e00291.
- Leon B, Lopez-Bravo M & Ardavin C (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26(4):519-531.
- Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, Chaperot L, Plumas J, Randall RE, Si-Tahar M, Mammano F, Albert ML & Schwartz O (2011) Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS pathogens* 7(2):e1001284.
- Lesokhin AM, Hohl TM, Kitano S, Cortez C, Hirschhorn-Cymerman D, Avogadri F, Rizzuto GA, Lazarus JJ, Pamer EG, Houghton AN, Merghoub T & Wolchok JD (2012)

- Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer research* 72(4):876-886.
- Lieberman LA, Cardillo F, Owyang AM, Rennick DM, Cua DJ, Kastelein RA & Hunter CA (2004) IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J Immunol* 173(3):1887-1893.
- Lien C, Fang CM, Huso D, Livak F, Lu R & Pitha PM (2010) Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(10):4664-4668.
- Lin CL, Chung CS, Heine HG & Chang W (2000) Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of virology* 74(7):3353-3365.
- Lin R, Yang L, Arguello M, Penafuerte C & Hiscott J (2005) A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of IRF-5 subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* 280(4):3088-3095.
- Lin SC, Lo YC & Wu H (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465(7300):885-890.
- Lind EF, Prockop SE, Porritt HE & Petrie HT (2001) Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *The Journal of experimental medicine* 194(2):127-134.
- Liu Z, Falo LD, Jr. & You Z (2011) Knockdown of HMGB1 in tumor cells attenuates their ability to induce regulatory T cells and uncovers naturally acquired CD8 T cell-dependent antitumor immunity. *J Immunol* 187(1):118-125.
- Lopez-Pelaez M, Lamont DJ, Peggie M, Shpiro N, Gray NS & Cohen P (2014) Protein kinase IKKbeta-catalyzed phosphorylation of IRF5 at Ser462 induces its dimerization and nuclear translocation in myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49):17432-17437.
- Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C, Blackburn C, Godin I & Jacobsen SE (2012) The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nature immunology* 13(4):412-419.
- Ma S, Pathak S, Trinh L & Lu R (2008) Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood* 111(3):1396-1403.
- Magez S, Stijlemans B, Radwanska M, Pays E, Ferguson MA & De Baetselier P (1998) The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. *J Immunol* 160(4):1949-1956.

- Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G & Beninati C (2009) Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature immunology* 10(6):587-594.
- Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S & Kaye PM (2008) Posttranscriptional regulation of III10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 29(2):295-305.
- Martinez J, Huang X & Yang Y (2010) Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14):6442-6447.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440(7081):237-241.
- Massimino M, Vigneri P, Fallica M, Fidilio A, Aloisi A, Frasca F & Manzella L (2012) IRF5 promotes the proliferation of human thyroid cancer cells. *Molecular cancer* 11:21.
- Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, Gagnon E, Desjardins M & Descoteaux A (2013) Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell host & microbe* 14(1):15-25.
- Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, Gately MK, Louis JA & Alber G (1996) Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *European journal of immunology* 26(7):1553-1559.
- McElrath MJ, Murray HW & Cohn ZA (1988) The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 167(6):1927-1937.
- McFadden G (2005) Poxvirus tropism. *Nature reviews. Microbiology* 3(3):201-213.
- Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW & Haslett C (1992) Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *Journal of leukocyte biology* 52(3):269-273.
- Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT & Luster AD (2005) Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *The Journal of clinical investigation* 115(2):407-417.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
- Melo GD, Goyard S, Fiette L, Boissonnas A, Combadiere C, Machado GF, Minoprio P & Lang T (2017) Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. *Scientific reports* 7(1):8454.
- Menard LC, Minns LA, Darche S, Mielcarz DW, Foureau DM, Roos D, Dzierszinski F, Kasper LH & Buzoni-Gatel D (2007) B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. *J Immunol* 179(7):4857-4866.

- Mercier BC, Cottalorda A, Coupet CA, Marvel J & Bonnefoy-Berard N (2009) TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J Immunol* 182(4):1860-1867.
- Mercier BC, Ventre E, Fogeron ML, Debaud AL, Tomkowiak M, Marvel J & Bonnefoy N (2012) NOD1 cooperates with TLR2 to enhance T cell receptor-mediated activation in CD8 T cells. *PloS one* 7(7):e42170.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM & Mosser DM (2005) A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine* 201(5):747-754.
- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT & Forster R (2004) Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *The Journal of experimental medicine* 200(4):481-491.
- Mittal SK & Roche PA (2015) Suppression of antigen presentation by IL-10. *Current opinion in immunology* 34:22-27.
- Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T & Taniguchi T (1988) Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54(6):903-913.
- Miyazaki T, Suzuki G & Yamamura K (1993) The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance. *International immunology* 5(9):1023-1033.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ & Greene WC (2014) IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science* 343(6169):428-432.
- Moore MA & Owen JJ (1967) Experimental studies on the development of the thymus. *The Journal of experimental medicine* 126(4):715-726.
- Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y & Arakawa H (2002) Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 21(18):2914-2918.
- Morin P, Braganca J, Bandu MT, Lin R, Hiscott J, Doly J & Civas A (2002) Preferential binding sites for interferon regulatory factors 3 and 7 involved in interferon-A gene transcription. *Journal of molecular biology* 316(5):1009-1022.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA & Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348-2357.
- Mucida D, Husain MM, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis BS, Huang Y, Lambolez F, Docherty M, Attinger A, Shui JW, Kim G, Lena CJ, Sakaguchi S, Miyamoto C, Wang P, Atarashi K, Park Y, Nakayama T, Honda K, Ellmeier W, Kronenberg M, Taniuchi I & Cheroutre H (2013) Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nature immunology* 14(3):281-289.
- Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR & Heath WR (2013) Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual review of immunology* 31:137-161.

- Muller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W & Laskay T (2001) Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Medical microbiology and immunology* 190(1-2):73-76.
- Murphy ML, Cotterell SE, Gorak PM, Engwerda CR & Kaye PM (1998) Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *J Immunol* 161(8):4153-4160.
- Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA & Farrell JP (2001) IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology* 31(10):2848-2856.
- Murray HW (2001) Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *International journal of experimental pathology* 82(5):249-267.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G & Coffman RL (2002) Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infection and immunity* 70(11):6284-6293.
- Murray HW & Nathan CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of experimental medicine* 189(4):741-746.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R & Pittet MJ (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 204(12):3037-3047.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K & Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171(11):6173-6177.
- Nakamura K, Kitani A & Strober W (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 194(5):629-644.
- Napier RJ, Lee EJ, Vance EE, Snow PE, Samson KA, Dawson CE, Moran AE, Stenzel P, Davey MP, Sakaguchi S & Rosenzweig HL (2018) Nod2 Deficiency Augments Th17 Responses and Exacerbates Autoimmune Arthritis. *J Immunol* 201(7):1889-1898.
- Naucke TJ, Menn B, Massberg D & Lorentz S (2008) Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology research* 103 Suppl 1:S65-68.
- Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T & Honda K (2005) Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(44):15989-15994.
- Negishi H, Yanai H, Nakajima A, Koshiba R, Atarashi K, Matsuda A, Matsuki K, Miki S, Doi T, Aderem A, Nishio J, Smale ST, Honda K & Taniguchi T (2012) Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature immunology* 13(7):659-666.
- Ng CT & Oldstone MB (2012) Infected CD8alpha- dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(35):14116-14121.

- Ngo VN, Cornall RJ & Cyster JG (2001) Splenic T zone development is B cell dependent. *The Journal of experimental medicine* 194(11):1649-1660.
- Ning S, Campos AD, Darnay BG, Bentz GL & Pagano JS (2008) TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1. *Molecular and cellular biology* 28(20):6536-6546.
- Nolz JC & Harty JT (2014) IL-15 regulates memory CD8+ T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *The Journal of clinical investigation* 124(3):1013-1026.
- Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G & Soong L (2004) Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity* 72(3):1240-1247.
- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM & Scott P (2014) Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *The Journal of infectious diseases* 209(8):1288-1296.
- Novy P, Quigley M, Huang X & Yang Y (2007) CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* 179(12):8243-8251.
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q & Dong C (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29(1):138-149.
- O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ & Berry MP (2013) The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology* 31:475-527.
- Obar JJ, Jellison ER, Sheridan BS, Blair DA, Pham QM, Zickovich JM & Lefrancois L (2011) Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 187(10):4967-4978.
- Obar JJ, Molloy MJ, Jellison ER, Stoklasek TA, Zhang W, Usherwood EJ & Lefrancois L (2010) CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(1):193-198.
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A & Cheng G (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439(7073):208-211.
- Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A & Bellio M (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173(9):5688-5696.

- Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S & Valenzuela JG (2008) Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS neglected tropical diseases* 2(4):e226.
- Ortega-Gomez A, Perretti M & Soehnlein O (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine* 5(5):661-674.
- Osokine I, Snell LM, Cunningham CR, Yamada DH, Wilson EB, Elsaesser HJ, de la Torre JC & Brooks D (2014) Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(20):7409-7414.
- Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, Fitzgerald KA, Sasseti CM & Kelliher MA (2009) NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens* 5(7):e1000500.
- Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, Inohara N & Nunez G (2007) RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 178(4):2380-2386.
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB & Riley JL (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology* 25(21):9543-9553.
- Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, Drake AM, Chen Z, Sen DR, Kurachi M, Barnitz RA, Bartman C, Bengsch B, Huang AC, Schenkel JM, Vahedi G, Haining WN, Berger SL & Wherry EJ (2016) Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 354(6316):1160-1165.
- Paun A, Bankoti R, Joshi T, Pitha PM & Stager S (2011) Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. *PLoS pathogens* 7(1):e1001246.
- Paun A, Reinert JT, Jiang Z, Medin C, Balkhi MY, Fitzgerald KA & Pitha PM (2008) Functional characterization of murine interferon regulatory factor 5 (IRF-5) and its role in the innate antiviral response. *The Journal of biological chemistry* 283(21):14295-14308.
- Pearson RD & Steigbigel RT (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan Leishmania donovani by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 127(4):1438-1443.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN & Sacks D (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321(5891):970-974.
- Petrie HT, Livak F, Burtrum D & Mazel S (1995) T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *The Journal of experimental medicine* 182(1):121-127.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F & Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314(5801):997-1001.

- Pinto AI, Brown N, Preham O, Doehl JSP, Ashwin H & Kaye PM (2017) TNF signalling drives expansion of bone marrow CD4⁺ T cells responsible for HSC exhaustion in experimental visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens* 13(7):e1006465.
- Polley R, Stager S, Prickett S, Maroof A, Zubairi S, Smith DF & Kaye PM (2006) Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8⁺ T cells requires the presence of cognate antigen. *Infection and immunity* 74(1):773-776.
- Porritt HE, Gordon K & Petrie HT (2003) Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *The Journal of experimental medicine* 198(6):957-962.
- Prates DB, Araujo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, Franca-Costa J, Afonso L, Clarencio J, Miranda JC, Bozza PT, Dosreis GA, Brodskyn C, Barral-Netto M, Borges VM & Barral A (2011) *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 90(3):575-582.
- Prescott DM, Kates J & Kirkpatrick JB (1971) Replication of vaccinia virus DNA in enucleated L-cells. *Journal of molecular biology* 59(3):505-508.
- Qi L, Yu H, Zhang Y, Zhao D, Lv P, Zhong Y & Xu Y (2016) IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget* 7(44):71673-71685.
- Quigley M, Martinez J, Huang X & Yang Y (2009) A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* 113(10):2256-2264.
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR & Aguet M (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10(5):547-558.
- Rallon N, Garcia M, Garcia-Samaniego J, Cabello A, Alvarez B, Restrepo C, Nistal S, Gorgolas M & Benito JM (2018) Expression of PD-1 and Tim-3 markers of T-cell exhaustion is associated with CD4 dynamics during the course of untreated and treated HIV infection. *PloS one* 13(3):e0193829.
- Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R & Ross SR (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4):2281-2286.
- Raue HP, Beadling C, Haun J & Slifka MK (2013) Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells. *Immunity* 38(1):131-139.
- Reba SM, Li Q, Onwuzulike S, Ding X, Karim AF, Hernandez Y, Fulton SA, Harding CV, Lancioni CL, Nagy N, Rodriguez ME, Wearsch PA & Rojas RE (2014) TLR2 engagement on CD4(+) T cells enhances effector functions and protective responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of immunology* 44(5):1410-1421.
- Reinhardt RL, Liang HE & Locksley RM (2009) Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature immunology* 10(4):385-393.

- Ren J, Chen X & Chen ZJ (2014) IKKbeta is an IRF5 kinase that instigates inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49):17438-17443.
- Reynolds JM, Martinez GJ, Chung Y & Dong C (2012) Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(32):13064-13069.
- Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, Martinez GJ, Zhang Y, Chung Y, Ma L, Yang XO, Nurieva RI, Tian Q & Dong C (2010) Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 32(5):692-702.
- Richer MJ, Nolz JC & Harty JT (2013) Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* 38(1):140-152.
- Richer MJ, Pewe LL, Hancox LS, Hartwig SM, Varga SM & Harty JT (2015) Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *The Journal of clinical investigation* 125(9):3477-3490.
- Richter K, Perriard G, Behrendt R, Schwendener RA, Sexl V, Dunn R, Kamanaka M, Flavell RA, Roers A & Oxenius A (2013) Macrophage and T cell produced IL-10 promotes viral chronicity. *PLoS pathogens* 9(11):e1003735.
- Rittig MG, Schroppe K, Seack KH, Sander U, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I, Solbach W & Bogdan C (1998) Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infection and immunity* 66(9):4331-4339.
- Roberts KL & Smith GL (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in microbiology* 16(10):472-479.
- Roberts LJ, Handman E & Foote SJ (2000) Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ* 321(7264):801-804.
- Rodriguez D, Rodriguez JR, Ojakian GK & Esteban M (1991) Vaccinia virus preferentially enters polarized epithelial cells through the basolateral surface. *Journal of virology* 65(1):494-498.
- Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, van den Berg WB & Radstake TR (2005) The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis and rheumatism* 52(8):2313-2322.
- Rogers ME, Chance ML & Bates PA (2002) The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124(Pt 5):495-507.
- Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME & Mosser DM (1996) *Leishmania* major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and immunity* 64(6):2206-2215.

- Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, Jacob J, Calame K & Kaech SM (2009) Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 31(2):296-308.
- Ryzhakov G, Eames HL & Udalova IA (2015) Activation and function of interferon regulatory factor 5. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35(2):71-78.
- Sacks DL & Perkins PV (1985) Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34(3):456-459.
- Saliba DG, Heger A, Eames HL, Oikonomopoulos S, Teixeira A, Blazek K, Androulidaki A, Wong D, Goh FG, Weiss M, Byrne A, Pasparakis M, Ragoussis J & Udalova IA (2014) IRF5:RelA interaction targets inflammatory genes in macrophages. *Cell reports* 8(5):1308-1317.
- Salzman NP (1960) The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology* 10:150-152.
- Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Chaplin P, Suter M, O'Keeffe M & Hochrein H (2008) Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *The Journal of clinical investigation* 118(5):1776-1784.
- Sanchez-Puig JM, Sanchez L, Roy G & Blasco R (2004) Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection. *Virology journal* 1:10.
- Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N & Taniguchi T (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13(4):539-548.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K & Akira S (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171(8):4304-4310.
- Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K & Akira S (2010) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature immunology* 11(10):936-944.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM & Haslett C (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The Journal of clinical investigation* 83(3):865-875.
- Savitsky DA, Yanai H, Tamura T, Taniguchi T & Honda K (2010) Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of

- the IgG2a locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(22):10154-10159.
- Savva A & Roger T (2013) Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Frontiers in immunology* 4:387.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC & Lefrancois L (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* 1(5):426-432.
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R & Melief CJ (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684):480-483.
- Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, Fitzgerald KA & Golenbock DT (2005) The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* 280(17):17005-17012.
- Schofield L & Hackett F (1993) Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *The Journal of experimental medicine* 177(1):145-153.
- Seixas Duarte MI, Tuon FF, Pagliari C, Kauffman MR & Brasil RA (2008) Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. *The Journal of infection* 57(4):332-337.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R & Hiscott J (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300(5622):1148-1151.
- Shaw MH, Reimer T, Sanchez-Valdepenas C, Warner N, Kim YG, Fresno M & Nunez G (2009) T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nature immunology* 10(12):1267-1274.
- Silva-Barrios S, Smans M, Duerr CU, Qureshi ST, Fritz JH, Descoteaux A & Stager S (2016) Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell reports* 15(11):2427-2437.
- Slebioda TJ & Kmiec Z (2014) Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation* 2014:325129.
- Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR & Kaye PM (2000) B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 164(7):3681-3688.
- Smiley ST, King JA & Hancock WW (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167(5):2887-2894.
- Smith GL & Law M (2004) The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus research* 106(2):189-197.
- Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA, Mazouz S, Guthmiller JJ, Vijay R, Butler NS, Bruneau J, Shoukry NH, Krawczyk CM & Richer MJ (2018) Interleukin-10 Directly Inhibits

- CD8(+) T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* 48(2):299-312 e295.
- Sobek V, Birkner N, Falk I, Wurch A, Kirschning CJ, Wagner H, Wallich R, Lamers MC & Simon MM (2004) Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis research & therapy* 6(5):R433-446.
- Song Y, Zhuang Y, Zhai S, Huang D, Zhang Y, Kang W, Li X, Liu Q, Yu Q & Sun Y (2009) Increased expression of TLR7 in CD8(+) T cells leads to TLR7-mediated activation and accessory cell-dependent IFN-gamma production in HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses* 25(12):1287-1295.
- Sottnek HM, Campbell WG, Jr. & Cassel WA (1975) The pathogenesis of Vaccinia virus toxicity. II. An electron microscopic study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 33(5):522-532.
- Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H & Kirschning CJ (2008) TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *The Journal of experimental medicine* 205(8):1747-1754.
- Stager S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F & Kaye PM (2003) Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and immunity* 71(8):4804-4807.
- Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M & Kaye PM (2006) Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *European journal of immunology* 36(7):1764-1771.
- Stanley AC & Engwerda CR (2007) Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and cell biology* 85(2):138-147.
- Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E & Bopp T (2010) Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33(2):192-202.
- Stein M, Keshav S, Harris N & Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 176(1):287-292.
- Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL & Murray HW (1988) Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 140(11):3971-3977.
- Stockmann M, Schmitz H, Fromm M, Schmidt W, Pauli G, Scholz P, Riecken EO & Schulzke JD (2000) Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915:293-303.
- Stone RC, Feng D, Deng J, Singh S, Yang L, Fitzgerald-Bocarsly P, Eloranta ML, Ronnblom L & Barnes BJ (2012) Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons. *Arthritis and rheumatism* 64(3):788-798.

- Stuller KA & Flano E (2009) CD4 T cells mediate killing during persistent gammaherpesvirus 68 infection. *Journal of virology* 83(9):4700-4703.
- Sun JC & Bevan MJ (2003) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300(5617):339-342.
- Sung JH, Zhang H, Moseman EA, Alvarez D, Iannacone M, Henrickson SE, de la Torre JC, Groom JR, Luster AD & von Andrian UH (2012) Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell* 150(6):1249-1263.
- Suthar MS, Ramos HJ, Brassil MM, Netland J, Chappell CP, Blahnik G, McMillan A, Diamond MS, Clark EA, Bevan MJ & Gale M, Jr. (2012) The RIG-I-like receptor LGP2 controls CD8(+) T cell survival and fitness. *Immunity* 37(2):235-248.
- Sutherland DB, Ranasinghe C, Regner M, Phipps S, Matthaei KI, Day SL & Ramshaw IA (2011) Evaluating vaccinia virus cytokine co-expression in TLR GKO mice. *Immunology and cell biology* 89(6):706-715.
- Svensson M, Maroof A, Ato M & Kaye PM (2004) Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21(6):805-816.
- Swain SL, Weinberg AD, English M & Huston G (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145(11):3796-3806.
- Tabiasco J, Devevre E, Rufer N, Salaun B, Cerottini JC, Speiser D & Romero P (2006) Human effector CD8+ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. *J Immunol* 177(12):8708-8713.
- Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G & Louis JA (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 165(5):2628-2636.
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y & Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448(7152):501-505.
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW & Taniguchi T (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434(7030):243-249.
- Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ & Reiner SL (2006) Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 177(11):7515-7519.
- Takeuchi A, Badr Mel S, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, Sasaki Y, Ike H, Takumi A, Tsuji NM, Murakami Y, Katakai T, Kubo M & Saito T (2016) CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *The Journal of experimental medicine* 213(1):123-138.
- Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J & Kaneda Y (2011) PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high

- mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(16):6609-6614.
- Tamura T, Tailor P, Yamaoka K, Kong HJ, Tsujimura H, O'Shea JJ, Singh H & Ozato K (2005) IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* 174(5):2573-2581.
- Tanaka Y & Chen ZJ (2012) STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science signaling* 5(214):ra20.
- Tang CH, Zundell JA, Ranatunga S, Lin C, Nefedova Y, Del Valle JR & Hu CC (2016) Agonist-Mediated Activation of STING Induces Apoptosis in Malignant B Cells. *Cancer research* 76(8):2137-2152.
- Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, Schreiber RD, de la Torre JC & Oldstone MB (2013) Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340(6129):207-211.
- Ting SB, Deneault E, Hope K, Cellot S, Chagraoui J, Mayotte N, Dorn JF, Laverdure JP, Harvey M, Hawkins ED, Russell SM, Maddox PS, Iscove NN & Sauvageau G (2012) Asymmetric segregation and self-renewal of hematopoietic stem and progenitor cells with endocytic Ap2a2. *Blood* 119(11):2510-2522.
- Tinoco R, Alcalde V, Yang Y, Sauer K & Zuniga EI (2009) Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* 31(1):145-157.
- Tlili A, Marzouki S, Chabaane E, Abdeladhim M, Kammoun-Rebai W, Sakkouhi R, Belhadj Hmida N, Oliveira F, Kamhawi S, Louzir H, Valenzuela JG & Ben Ahmed M (2018) Phlebotomus papatasi Yellow-Related and Apyrase Salivary Proteins Are Candidates for Vaccination against Human Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of investigative dermatology* 138(3):598-606.
- Tominaga N, Ohkusu-Tsukada K, Udono H, Abe R, Matsuyama T & Yui K (2003) Development of Th1 and not Th2 immune responses in mice lacking IFN-regulatory factor-4. *International immunology* 15(1):1-10.
- Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK & Spits H (2009) Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* 10(8):864-871.
- Tripathy A, Khanna S, Padhan P, Smita S, Raghav S & Gupta B (2017) Direct recognition of LPS drive TLR4 expressing CD8(+) T cell activation in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific reports* 7(1):933.
- Tsagozis P, Karagouni E & Dotsika E (2003) CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite immunology* 25(11-12):569-579.
- Tsagozis P, Karagouni E & Dotsika E (2005) Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. *Parasitology international* 54(2):139-146.

- Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J & Murray HW (1994) Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 153(2):768-775.
- Tumanov A, Kuprash D, Lagarkova M, Grivennikov S, Abe K, Shakhov A, Drutskaya L, Stewart C, Chervonsky A & Nedospasov S (2002) Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. *Immunity* 17(3):239-250.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T & Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta* 1843(11):2563-2582.
- Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, Matsuda M, Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Takeuchi O & Akira S (2005) Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *The Journal of experimental medicine* 201(6):915-923.
- Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL & Takahama Y (2004) CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 200(4):493-505.
- Unterholzner L, Sumner RP, Baran M, Ren H, Mansur DS, Bourke NM, Randow F, Smith GL & Bowie AG (2011) Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS pathogens* 7(9):e1002247.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD & Wagner H (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *The Journal of biological chemistry* 277(17):15107-15112.
- Valadares DG, Davis RE, Kiser E, Chen Y, Borbon T & Wilson ME (2018) T cell exhaustion during murine cutaneous and visceral leishmaniasis. (*Am Assoc Immunol*).
- Vander Lugt B, Khan AA, Hackney JA, Agrawal S, Lesch J, Zhou M, Lee WP, Park S, Xu M, DeVoss J, Spooner CJ, Chalouni C, Delamarre L, Mellman I & Singh H (2014) Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nature immunology* 15(2):161-167.
- Vignali DA & Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology* 13(8):722-728.
- Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ & Descoteaux A (2009) The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS pathogens* 5(10):e1000628.
- Virgin HW, Wherry EJ & Ahmed R (2009) Redefining chronic viral infection. *Cell* 138(1):30-50.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR & Girkontaite I (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390(6658):350-351.

- Voll RE, Jimi E, Phillips RJ, Barber DF, Rincon M, Hayday AC, Flavell RA & Ghosh S (2000) NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity* 13(5):677-689.
- Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, Schwantes A, Pohlmann C, Ludwig H, Palomo-Otero M, Alcami A, Sutter G & Kalinke U (2009) Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *Journal of virology* 83(4):1563-1571.
- Wang C, McPherson AJ, Jones RB, Kawamura KS, Lin GH, Lang PA, Ambagala T, Pellegrini M, Calzascia T, Aidarus N, Elford AR, Yue FY, Kremmer E, Kovacs CM, Benko E, Tremblay C, Routy JP, Bernard NF, Ostrowski MA, Ohashi PS & Watts TH (2012) Loss of the signaling adaptor TRAF1 causes CD8+ T cell dysregulation during human and murine chronic infection. *The Journal of experimental medicine* 209(1):77-91.
- Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182:207-214.
- Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, Hauyon-La Torre Y, Auderset F, Schuster S, Zangger H, Fasel N, Barral A & Tacchini-Cottier F (2013) Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity* 81(5):1575-1584.
- Weiss M, Byrne AJ, Blazek K, Saliba DG, Pease JE, Perocheau D, Feldmann M & Udalova IA (2015) IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(35):11001-11006.
- Weissman IL, Anderson DJ & Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology* 17:387-403.
- Wen X, Kudo T, Payne L, Wang X, Rodgers L & Suzuki Y (2010) Predominant interferon-gamma-mediated expression of CXCL9, CXCL10, and CCL5 proteins in the brain during chronic infection with *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice resistant to development of toxoplasmic encephalitis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 30(9):653-660.
- Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R & Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of virology* 77(8):4911-4927.
- WHO (2017) The World Health Report 2017. Leishmaniose. Édité In: World Health Organization G Editor).
- Williams MA & Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology* 25:171-192.
- Wilson A, Held W & MacDonald HR (1994) Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 179(4):1355-1360.
- Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow BJ, Karp CL & Brooks DG (2013) Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340(6129):202-207.

- Wilson ME & Pearson RD (1986) Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol* 136(12):4681-4688.
- Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA & McGowan SE (1998) The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 161(11):6148-6155.
- Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ & Shortman K (1991) CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* 349(6304):71-74.
- Xiao Z, Casey KA, Jameson SC, Curtsinger JM & Mescher MF (2009) Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* 182(5):2786-2794.
- Xu Y, Lee PY, Li Y, Liu C, Zhuang H, Han S, Nacionales DC, Weinstein J, Mathews CE, Moldawer LL, Li SW, Satoh M, Yang LJ & Reeves WH (2012) Pleiotropic IFN-dependent and -independent effects of IRF5 on the pathogenesis of experimental lupus. *J Immunol* 188(8):4113-4121.
- Yajima T, Yoshihara K, Nakazato K, Kumabe S, Koyasu S, Sad S, Shen H, Kuwano H & Yoshikai Y (2006) IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 176(1):507-515.
- Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K & Taniguchi T (2007) Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9):3402-3407.
- Yang L, Feng D, Bi X, Stone RC & Barnes BJ (2012) Monocytes from *Irf5*^{-/-} mice have an intrinsic defect in their response to pristane-induced lupus. *J Immunol* 189(7):3741-3750.
- Yang S, Sugawara S, Monodane T, Nishijima M, Adachi Y, Akashi S, Miyake K, Hase S & Takada H (2001) *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and immunity* 69(4):2025-2030.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S & Sher A (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308(5728):1626-1629.
- Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, Agrawal N, Akira S, Marshak-Rothstein A & Rifkin IR (2007) Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J Immunol* 178(11):6876-6885.
- Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H & Wagner H (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174(10):6129-6136.
- Yeon SI, Youn JH, Lim MH, Lee HJ, Kim YM, Choi JE, Lee JM & Shin JS (2008) Development of monoclonal antibodies against human IRF-5 and their use in identifying the binding of IRF-5 to nuclear import proteins karyopherin-alpha1 and -beta1. *Yonsei medical journal* 49(6):1023-1031.

- Yi JS, Du M & Zajac AJ (2009) A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 324(5934):1572-1576.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S & Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5(7):730-737.
- Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ & Yang H (2006) HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26(2):174-179.
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD & Ahmed R (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* 188(12):2205-2213.
- Zelkowitz P, Guzder J, Paris J, Feldman R, Roy C & Schiavetto A (2004) Borderline Pathology of Childhood: Implications of Early Axis II Diagnoses. *The Canadian child and adolescent psychiatry review = La revue canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent* 13(3):58-61.
- Zeng M, Haase AT & Schacker TW (2012) Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends in immunology* 33(6):306-314.
- Zhan Y, Seregin SS, Chen J & Chen GY (2016) Nod1 Limits Colitis-Associated Tumorigenesis by Regulating IFN-gamma Production. *J Immunol* 196(12):5121-5129.
- Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K & Ray A (1997) Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *The Journal of biological chemistry* 272(34):21597-21603.
- Zhao GN, Jiang DS & Li H (2015) Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1852(2):365-378.
- Zhao Y, De Trez C, Flynn R, Ware CF, Croft M & Salek-Ardakani S (2009) The adaptor molecule MyD88 directly promotes CD8 T cell responses to vaccinia virus. *J Immunol* 182(10):6278-6286.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM & el-Hassan AM (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet. Infectious diseases* 3(2):87-98.