N° d'ordre

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le mercredi 14 décembre 2011

par

M VIRARD François

TITRE :

Trafic, maturation et signalisation proapoptotique de TLR3

Directeur de thèse :

M LEBECQUE Serge

JURY :

M	FARGES Jean-Christophe,	Président
M	LEBECQUE Serge,	Directeur
Mme	SASKIA Lippens,	Rapporteur
M	BUSSON Pierre,	Rapporteur
Mme	ALEXOPOULOU Lena,	Examinateur
M	BENAROCH Philippe,	Examinateur

Table des matières

Avant-propos **vii**

1 TLR3, de l'embryon au cancer **1**

1.1 *Toll* et l'axe dorso-ventral de la drosophile 1
1.2 La superfamille IL-1R/TLR 3
1.3 PAMPs et PRRs 8
1.4 Les adaptateurs à domaine TIR 13
1.5 Les TLRs, un système immunitaire ancestral ? 14
1.6 TLR3 et l'immunité anti-virale 18
1.7 TLR3 et cancer 23

2 Article 1 : Processing of TLR3 **27**

2.1 INTRODUCTION : Structure de TLR3 28
2.1.1 Le module de base des TLRs : le LRR 28
2.1.2 Structure tridimensionnelle de TLR3 29
2.1.3 La glycosylation 32
2.1.4 Modèle de reconnaissance de l'ARN db par TLR3 . . . 34
2.2 Article 1 38
2.3 Données complémentaires 84

3 Article 2 : TLR3 induces apoptosis through a death complex **89**

3.1 Mort cellulaire 89
3.1.1 Les premières morts naturelles 89
3.1.2 L'apoptose 91
3.1.3 Terminologie 92

3.2 Mécanisme d'activation de la caspase-8 94
3.2.1 Les différentes caspases 96
3.2.2 Les étapes d'activation de la caspase-8 98
3.2.3 Le recrutement de la caspase-8 102
3.3 Rôle non apoptotique de la caspase-8 103
3.3.1 FLIP, un inhibiteur de la caspase-8 ? 103
3.3.2 RIP1/RIP3 et la nécrose 106
3.4 Article 2 107
3.5 Données complémentaires 152

4 Conclusion : TLR3, un TLR atypique ? 157
4.1 TLR3 et la famille des TLRs intracellulaires 157
4.2 TLR3 dans l'ombre de ses cousins 159
4.3 Impact du clivage sur le modèle de reconnaissance de l'ARN db par TLR3 161
4.4 Rôle de l'apoptose dépendante de TLR3 dans la réponse antivirale 162
4.5 Rôle pro-tumoral de TLR3 dans les cancers 164

Table des figures

1.1 Le homard de Geoffroy St Hilaire 2
1.2 Transcription différentielle le long du gradient de Dorsal activé 3
1.3 Couverture de *Cell* (1996) 5
1.4 comparaison dToll et hToll 6
1.5 La famille de l' IL-1R/TLR 7
1.6 Les PAMPs et leurs TLRs 10
1.7 Phylogeny des TLRs vertébrés 12
1.8 Les adaptateurs des TLRs 14
1.9 Profil d'expression de *tol-1* chez *C. elegans* 17
1.10 Pression sélective sur les TLRs humains 19
1.11 Rôle de TLR3 dans les infections virales 21

2.1 Structures des répétitions riches en leucine (LRR) 30
2.2 Sequence de l'ECD de TLR3 31
2.3 Conservation de l'insertion au niveau du LRR12 32
2.4 Empilement des LRRs 33
2.5 Répartition des glycosylations sur TLR3 35
2.6 La reconnaissance de l'ARN db par TLR3 implique 3 sites . . 37
2.7 Validation des anticorps pour le FACS 85
2.8 Marquage membranaire 87

3.1 Les différents types de morts régulées 95
3.2 La famille des caspases humaines 96
3.3 Classification suivant les prodomaines 99
3.4 Mécanisme d'activation de la caspase-8 101

3.5 La surperfamille des Death Domain 104
3.6 Les protéines humaines à DED 105
3.7 Rôle des isoformes de FLIP dans l'aiguillage entre apopose et nécrose 108
3.8 Evaluation de l'expression et de la fonction de TLR3 dans les OSCC 154
3.9 Sensibilisation des OSCC 156

Avant-propos

J'ai commencé ma thèse sur fond d'anniversaire, celui célébrant le bicentenaire de la naissance de Darwin. Pourtant, le livre qui a plus retenu mon attention n'a pas été *l'origine des espèces* [1]. Dans son livre *The Cuvier-Geoffroy Debate - French Biology in the Decades before Darwin* [2], Toby A. Appel rapporte et analyse une controverse qui opposa Georges Cuvier et Étienne Geoffroy Saint-Hilaire quelques cinquante années avant Darwin.

A l'origine du débat, qui atteint son paroxysme en 1830, se trouve une question fondamentale de biologie : l'organisation des animaux est-elle liée à l'application de lois morphologiques ou à la nécessité de répondre à une fonction ? Cette controverse, en faisant appel à la philosophie de la nature [1], est considérée comme un élément important dans la genèse de la théorie Darwinienne de l'évolution. Mais cette histoire, quand elle est minutieusement analysée comme dans le livre d'Appel, raconte bien plus qu'une simple dispute scientifique. Elle marque la naissance de la biologie telle que nous la connaissons et met en lumière deux conceptions opposées de l'abord d'une énigme scientifique.

De son arrivée à Paris en 1795 jusqu'à son installation comme professeur associé à la chaire d'anatomie animale du Musée d'Histoire Naturelle, Cuvier œuvre pour la renaissance de l'anatomie comparée. Jusqu'ici l'anatomie est largement associée à la médecine mais en l'utilisant comme un outil de comparaison, Cuvier espère en faire une science plus liée à l'histoire naturelle.

1. Avant l'utilisation du mot biologie, un certain nombre de termes étaient utilisés pour décrire l'étude des animaux et des plantes. Le terme *histoire naturelle* fait référence à l'aspect descriptif de la biologie. La *philosophie de la nature* inclut les bases conceptuelles de la vie animale et végétale en tentant de répondre à la question de l'existence des organismes et en essayant d'expliquer leur fonctionnement.

En étudiant la structure des organes mise en place chez les animaux pour remplir les différentes fonctions nécessaires à la vie, Cuvier pense pouvoir établir des critères rationnels pour un système de classification de la nature. Sur la base du fonctionnement du système nerveux, Cuvier définit quatre schéma d'organisation de base, ou embranchements : les vertébrés, les articulés, les mollusques et les radiés. Il insiste sur le fait qu'il n'existe pas de transition entre les schémas, et que même au sein d'un embranchement, le nombre et l'arrangement des différentes pièces varient pour répondre à un besoin fonctionnel. Cuvier pense que chaque partie d'un animal est étudiée pour garantir l'intégrité fonctionnelle de l'animal ou permettre une adaptation à son environnement. A chaque fois qu'une partie est nécessaire pour remplir une nouvelle fonction, le Créateur est libre de façonner le nouvel organe approprié. Pour Cuvier la fonction est suprême et les besoins de l'animal suffisent à déterminer sa structure.

Geoffroy, professeur de zoologie au Musée, s'oppose à cette vision fonctionnaliste par un nouvel ensemble de théories, ou *philosophie de l'anatomie*, qui constituent de nos jour le cœur des sciences morphologiques. Au début du XIXe siècle, il propose de pousser l'anatomie comparative au delà de la description et de la classification et, par une tentative de conceptualisation, de la rendre réellement *philosophique*. Au lieu de décrire chaque classe d'animaux séparément, en utilisant différents noms pour différentes structures dans chaque classe, Geoffroy pense qu'il peut découvrir une anatomie générale des vertébrés, un plan unique d'organisation qui peut être retrouvé chez tous les vertébrés.

L'idée de Geoffroy est d'ignorer la forme et la fonction des éléments et de se concentrer sur les connections entre ces parties. Le *principe des connexions* deviendra, en fait, le principal guide au XIXe siècle pour déterminer les homologies. En 1820, Geoffroy étend son principe *d'unité de plan* des vertébrés aux invertébrés en supposant que ces derniers représentent des stades embryologiques des animaux supérieurs. Les invertébrés partagent donc les mêmes schémas d'organisation, bien que leurs structures ne soient pas aussi développées que chez les animaux supérieurs. Pour Geoffroy, la réponse aux besoins fonctionnels est assujettie au plan unique structurant le règne animal.

Au delà de ces divergences entre deux écoles, c'est la différence d'approche de la question scientifique qui reste, pour moi l'élément le plus fascinant de ce débat. Cuvier est un fervent défenseur de l'empirisme. Le rôle du biologiste tel qu'il le voie est de collecter les faits, les hypothèses ne pouvant aboutir qu'a des généralisations infondées et dangereuses. Il doit donc se borner aux questions qu'un biologiste doit se poser et aux méthodes que l'on doit employer pour y répondre. Geoffroy a une perception différente de la science. Les faits ne sont que les briques de la science alors que l'essence même de la science provient des idées. Aucune interrogation ne se trouve en dehors du cercle des questions scientifiques. Ces conceptions différentes de la méthode scientifique pousseront les contemporains de Cuvier et de Geoffroy à interpréter ce débat non pas comme une confrontation entre la théologie et la morphologie mais plutôt comme une opposition des faits contre les idées ou de l'analyse contre la synthèse.

Quand j'ai cherché à savoir ce qui se doit de figurer dans un manuscrit de Thèse, on m'a répondu "tout ce qui te semble pertinent". Prenant le train en marche, comme tout doctorant, il m'a semblé pertinent de commencer par inscrire les données recueillies durant ces 4 années, avec l'aide de mes camarades, dans un cadre. Le résultat de cette démarche pourra parfois sembler au lecteur comme manquant d'exhaustivité, naïf, s'égarant dans des historiques inutiles et, par certains aspect, n'aurait peut être pas plu à Cuvier. Mais, au cours de la rédaction de ce manuscrit, il m'est apparu que l'étude de la naissance d'un dogme s'avère aussi enrichissante que de l'exposer dans ses moindres détails.

Chapitre 1

Introduction : TLR3, de l'embryon au cancer

1.1 *Toll* et l'axe dorso-ventral de la drosophile

Les théories de Geoffroy sur l'unité de plan se sont construites autour de la comparaison entre les arthropodes et les vertébrés. Pour Geoffroy, ces derniers partagent une organisation antéro-postérieure identique à savoir une tête, un thorax, et un abdomen. Il y retrouve également des caractéristiques dorso-ventrales similaires comme un système nerveux central, un tube digestif, et un cœur à la différence près qu'ils sont inversés. Ainsi, plutôt que de disséquer un homard dans son orientation habituelle il suffit de le retourner, le ventre dirigé vers haut. Dans cette orientation, le système nerveux central est situé au dessus du tube digestif, qui à son tour est localisé au dessus du cœur reprenant ainsi l'organisation des vertébrés (Figure 1.1)[3, 4].

Cette observation qui peut sembler triviale au premier abord, est à l'origine de la *théorie de l'inversion*, selon laquelle les différents groupes zoologiques ont pris leur origine à partir de l'anatomie *inverti* des Vertébrés. Selon Geoffroy cette inversion explique le fossé séparant les différents groupes : par exemple un animal Vertébré vit *autour* de sa colonne vertébrale, tandis que dans le cas des Arthropodes, l'animal vit *dedans* sa colonne. La génétique

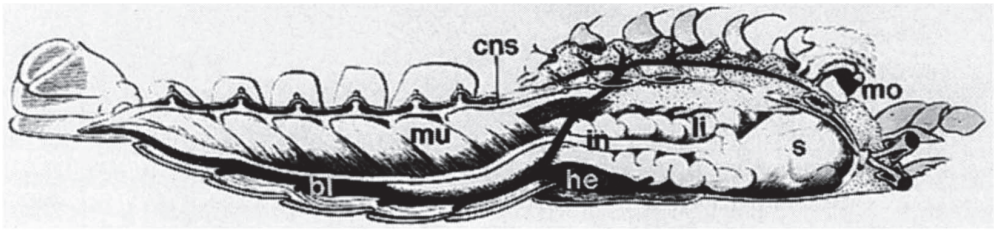

Figure 1.1 – Le homard de Geoffroy St Hilaire
Dans cette orientation l'agencement du corps des arthropodes ressemble à celui des vertébrés. Le système nerveux central (cns) est en haut, traversé par la bouche (mo). Le tube digestif est placé en-dessous, avec l'estomac (s), le foie (li) et l'intestin (in). Sous les intestins, on retrouve le cœur (he) et les principaux vaisseaux sanguins (bl). Les muscles (mu) bordent le système nerveux [3].

évolutive du développement, plus souvent connue sous le nom d'évo-dévo, montre par la suite que les axes de symétrie et l'orientation des animaux jouent bien un rôle déterminant dans la séparation morphologique des différentes espèces.

Chez la drosophile, l'orientation de l'embryon dépend de facteurs maternels. En cherchant à isoler les gènes jouant un rôle dans l'établissement des axes antéro-postérieur et dorso-ventral de la drosophile, Anderson et coll. isolent, en 1985, un ensemble de drosophiles mutantes présentant un phénotype commun qu'ils nomment : *toll*. Toll est un adjectif allemand qui ne possède pas d'équivalent français, mais pourrait être traduit par étonnant, super, merveilleux, etc. Il s'avère que ces phénotypes dépendent d'un même gène dont la perte de fonction chez les mouches femelles induit la production d'œufs à l'axe dorso-ventral inversé, conférant à ce phénotype un caractère *toll* [5, 6].

Le gène *toll* sera identifié plus tard comme une protéine transmembranaire [7] et rejoint par 17 autres facteurs maternels nécessaires à la ventralisation de l' embryon. L'ensemble constitue une cascade de cystéines protéases aboutissant au clivage d'un morphogène, Spätzle, qui après sa protéolyse peut se lier au récepteur Toll. Le signal est transduit dans l'embryon par la protéine adaptatrice dMyd88, la protéine Tube et la kinase Pelle. Il entraine la dégra-

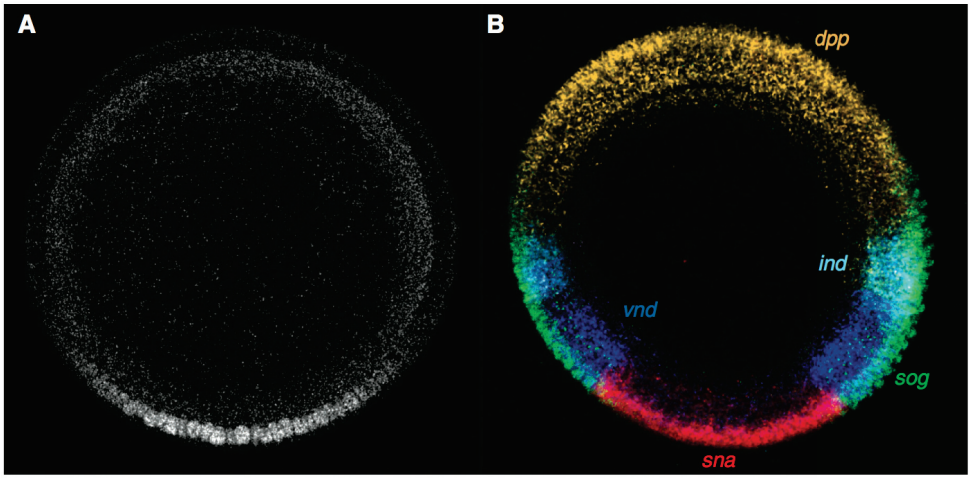

Figure 1.2 – Transcription différentielle le long du gradient de Dorsal activé (A) Section d'un embryon de drosophile, marqué avec un anticorps anti-αdorsal. (B) Section d'un embryon de drosophile, marquée par hybridation *in-situ* permettant de détecter les cibles de dorsal : *dpp, ind, vnd, sog* et *sna.* Adapté de [9].

dation de l'inhibiteur Cactus libérant le facteur de transcription Dorsal qui se déplace dans le noyau. Au cours de la polarisation de l'embryon, un gradient de Spätzle clivé est produit, induisant un gradient de Dorsal nucléaire. Le profil d'expression des gènes va changer en fonction de la quantité de facteur de transcription présent dans le noyau, la partie dorsale se développant à partir du pôle contenant les concentrations plus importantes de Dorsal [8] (figure 1.2).

1.2 La superfamille IL-1R/TLR

En 1991, Gay et coll. [10] montrent qu'une séquence du domaine cytoplasmique du Toll de la drosophile est présente dans le récepteur humain à une cytokine, l'interleukine-1 (IL-1R). Ils remarquent également que la transduction du message de Toll et de IL-1R sont fortement similaires. En effet, la stimulation des cellules par l'IL-1 entraîne le déplacement rapide dans le noyau du facteur de transcription NF-κB, un homologue de la protéine Dor-

sal. De plus l'activation de NF-κB nécessite la dégradation d'un inhibiteur IκB, un homologue de Cactus.

En poussant ce raisonnement plus loin, Lemaître et coll. découvrent, en 1996, chez la drosophile adulte, un autre rôle pour le récepteur Toll [11]. A l'époque, leur travail porte sur la défense des insectes contre les micro-organismes et plus particulièrement sur l'expression de molécules possédant une activité antimicrobienne. Ils ont déjà décrit une mutation pour le gène *imd* responsable d'une suppression de la sécrétion des peptides antibactériens, mais chez ces mutants la sécrétion de la drosomycine, un peptide anti-fongique, reste intacte, ce qui laisse supposer qu'elle est sous le contrôle d'une autre voie. En poursuivant le parallèle séduisant suggéré par Gay et coll., ils évaluent l'expression des gènes antimicrobiens dans des souches mutées pour l'orientation dorsoventrale de l'embryon. Ils découvrent ainsi que tous les gènes compris entre le ligand de Toll, Spätzle, et Cactus jouent un rôle dans le contrôle de l'expression de la drosomycine (figure 1.3).

Cette découverte s'inscrit pleinement dans une théorie énoncée quelques années auparavant par Charles Janeway. Dans son article : *Approaching the asymptote ? evolution and revolution in immunology* [12], Janeway propose que l'activation du système immunitaire adaptatif est sous la dépendance de co-facteurs inductibles. Il suggère que ce signal co-stimulateur est induit par la présence d'éléments d'origine microbienne. Cette dépendance le rend tributaire d'un système de détection des pathogènes. Il propose que ce système de détection repose sur des récepteurs capables de reconnaitre des constituants moléculaires essentiels à la survie des microbes et par conséquent peu sujet à des variations. Il fait également remarquer que cette forme de reconnaissance doit être une évolution du système immunitaire des invertébrés qui ne possèdent pas d'immunité adaptative.

L'existence d'équivalences entre les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire d'un invertébré, comme la drosophile, et d'un mammifère, renforce donc l'hypothèse qu'elles sont l'héritage d'un système de défense plus ancien. Cette idée est alimentée par la découverte chez la plante d'un gène de résistance au virus de la mosaïque du tabac, codant pour la protéine R, possédant un domaine de signalisation similaire à Toll et à l'IL-1R.

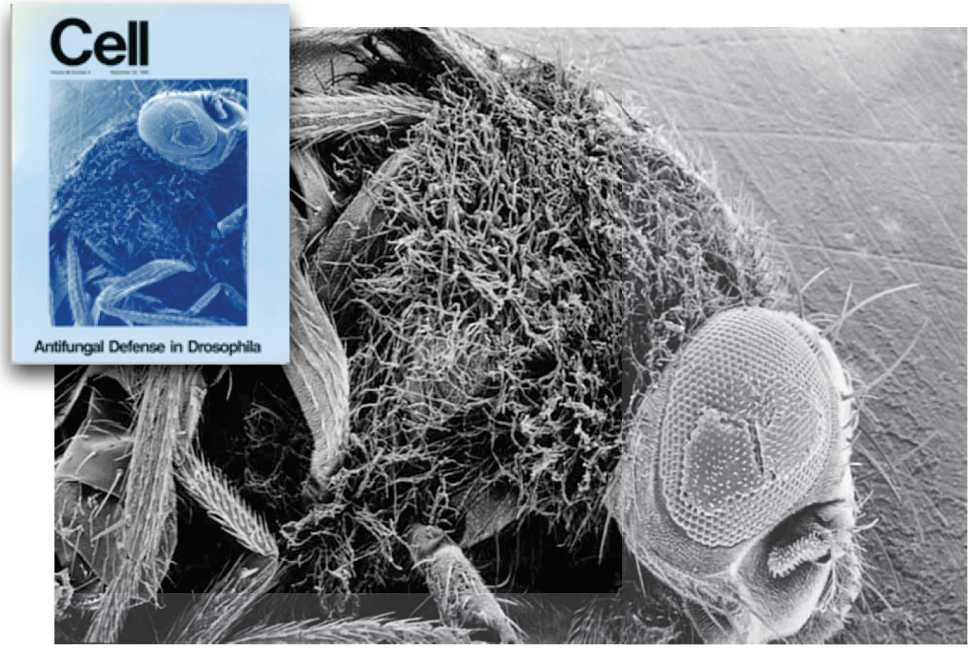

Figure 1.3 – Couverture de *Cell* (1996)
Hyphes de *A. fumigatus* en cours de germination sur une drosophile adulte morte. Microscopie à balayage d'une drosophile adulte ayant succombé à une infection par *A. fumigatus* et couverte de ses hyphes en cours de germination (Agrandissement x200) [11].

En cherchant d'autres séquences similaires à ces 3 protéines dans des bases de données de séquences génomiques exprimées (EST), Medzhitov et coll. identifient une séquence plus proche du Toll de la drosophile que de l'IL-1R humain, qu'ils baptisent donc hToll [13] (figure 1.4).

En même temps, Rock et coll. identifient également, par une approche similaire, 5 récepteurs apparentés au Toll de la drosophile. Ils baptisent l'ensemble Toll-like receptor, ou TLRs, et les annotent de 1 à 5, TLR4 s'avérant identique au hToll [15]. La famille des TLRs humains passe ensuite progressivement de 5 à 10 à mesure de la progression du séquençage du génome humain [16, 17, 18] [1].

Un grand nombre de protéines ont depuis été décrites comme étant ap-

1. la séquence de TLR6 est d'abord identifiée chez la souris avant de retrouver son homologue chez l'homme mais la démarche reste identique [16].

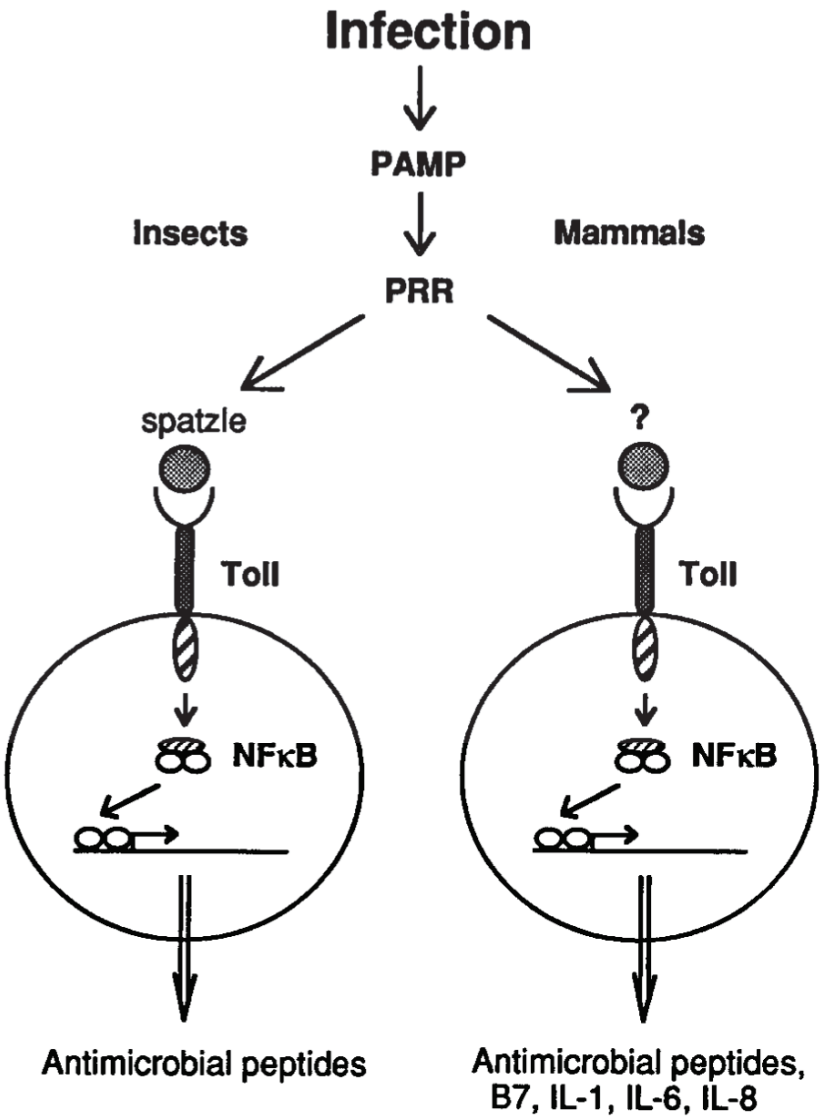

Figure 1. Ancient Host Defense Pathway

Toll/NFκB pathway is conserved between insects and mammals and activates nonspecific defense mechanisms in both cases, while in mammals Toll also induces signals required for the activation of the adaptive immune response. Here, we suggest that recognition of PAMPs by an unknown PRR results in the generation of the Toll ligand.

Figure 1.4 – Toll, un système de défense ancestral
Proposition d'un système de défense ancestral tel qu'elle apparait dans l'article de Janeway en 1997 [14].

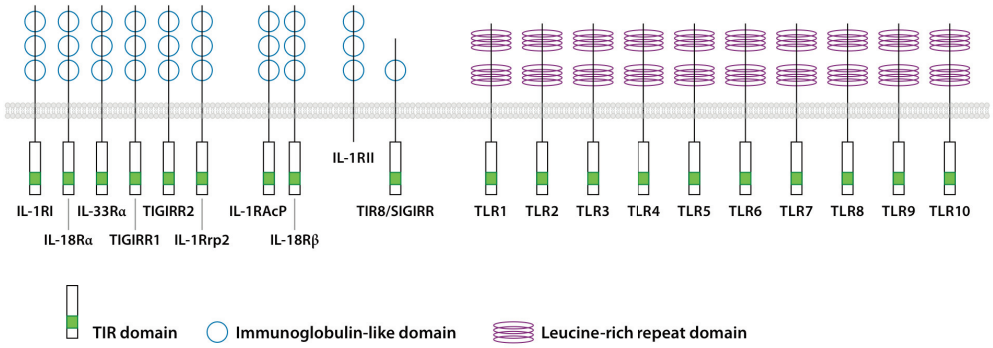

Figure 1.5 – Les protéines à domaine TIR de la famille IL-1R/TLR
Chez l'humain, la famille de l'IL-1R comprend un récepteur sans domaine TIR (IL-1RII) et 9 récepteurs contenant un domaine TIR. Les récepteurs à l'IL-1 fonctionnels forment des hétérodimères associés à des co-récepteurs (IL-1RAcP and IL-18Rb). La spécificité de l'IL-1R est régie par un domaine apparenté à l'immunoglobuline (Immunoglobulin-like domain). La famille des TLRs contient 10 membres avec un domaine TIR et leur spécificité dépend de leurs domaines riches en leucine (Leucine-rich repeat domain). Le domaine TIR est nécessaire au recrutement des autres partenaires impliqués dans la signalisation. D'aprés [21].

parentées à l' IL-1R et/ou Toll. Elles possèdent toutes dans leur portions cytoplasmiques une séquence homologue nécessaire à la signalisation, appelée domaine TIR en référence aux trois protéines Toll/IL-1R/Resistance [19, 20] (figure 1.5). L'ensemble des protéines transmembranaires à domaine TIR est regroupé au sein d'une superfamille dite IL-1R/TLR. Elle est divisible en deux sous-groupes sur la base de leur portion extracellulaire. Le premier ensemble regroupe les homologues à l'IL-1R dont tous les membres contiennent dans leur portion extracellulaire des domaines immunoglobuline (Ig). L'autre ensemble est plus proche de Toll et ses protéines possèdent, en remplacement du domaine Ig, des répétitions de séquences riches en Leucine ou LRR.

1.3 PAMPs et PRRs

La découverte d'une superfamille de récepteurs possédant des orthologues dans des organismes aussi éloignés que les insectes et les plantes tend à valider l'existence d'un système ancestral de détection des pathogènes tel que proposé par Janeway. Le répertoire limité de récepteur impose qu'ils soient capables de reconnaitre des structures moléculaires partagées par un grand nombre de pathogènes, les Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMPs) [14].

Il est connu depuis les travaux de Louis Pasteur et Robert Koch que les maladies infectieuses sont provoquées par des microbes. Mais c'est le médecin allemand Ludwig Brieger qui découvre que la virulence de certains germes passe par la production et la sécrétion de substances toxiques qu'il appelle toxines. Richard Pfeiffer, ancien assistant de Koch, montre également que des substances stables à la chaleur et contenues dans la partie insoluble des bactéries peuvent aussi être des facteurs de virulence. Ce composé, qu'il baptise endotoxine, est identifié par la suite comme un composant de la paroi des bactéries Gram négatives. Il correspond biochimiquement à une substance non protéique, d'où son absence de dénaturation à la chaleur, composée de sucres et de lipides ce qui lui vaut le nom de lipopolysaccharide (LPS) [22].

Le LPS, partagé par toutes les bactéries Gram négatives est donc un bon candidat pour un PAMP. A l'époque de la découverte des TLRs, seuls quelques éléments de la détection du LPS sont connus. La LPS binding protein (LBP) est une protéine circulante possédant une forte affinité pour le LPS. Elle peut récupérer le LPS agrégé pour le présenter à une seconde molécule, le CD14. La suite reste un mystère. CD14 est en effet fixé à la membrane plasmique par une queue lipidique et ne possède pas de capacité de signalisation. Donc bien que la LBP et le CD14 soient les premiers récepteurs du LPS, ils doivent nécessairement le présenter à un co-récepteur pour induire une signalisation. En rendant sensibles des cellules HEK293 au LPS par transfection de TLR2, deux équipes pensent avoir trouver le premier TLR capable de répondre au LPS [23, 24], offrant enfin une solution au problème.

Dans son commentaire sur l'article de Yang et coll. [23], Craig Gerard [25] fait remarquer que le locus *lps*, responsable d'un défaut de réponse au LPS dans la souche murine C3H/HeJ, est le même que celui de TLR4, ce qui permet de penser que TLR4 est également capable de reconnaitre l'endotoxine. Par clonage positionnel du locus *lps*, l'équipe de Bruce Beutler [26] démontre que TLR4 est bien impliqué dans ce défaut de réponse, fournissant le premier modèle génétique supportant une fonction de TLR4 pour la détection des microbes. Pourtant, contrairement aux prédictions, la transfection de TLR4 dans des cellules HEK293 n'est pas suffisante pour induire une réponse au LPS. Il faut attendre que Shimazu et coll découvrent qu'une nouvelle molécule, MD-2, associée à TLR4, est nécessaire pour sa signalisation [27] pour valider définitivement le LPS comme un ligand de TLR4.

Pfeiffer avait observé des effets de type endotoxine aussi bien à partir de bactéries Gram négative que positives [22]. On sait aujourd'hui que les bactéries Gram positives ne sont pas capables de produire du LPS, mais bien qu'elles diffèrent dans la composition de leurs parois bactériennes, leur physiopathologie reste relativement similaire. En effet, l'invasion de la circulation sanguine par les bactéries Gram positive et Gram négative entraîne un choc septique. Le choc septique est lié à la production de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation et se caractérise par une augmentation de la température, une diminution de la fonction cardiaque, de la pression sanguine et une altération des organes. Paradoxalement, les même cytokines responsables du choc septique sont également nécessaires à la mise en place de l'inflammation aiguë initiale, à la base de toute réponse immunitaire. Dans les années 90, un grand nombre de composants dérivés des bactéries (protéines, sucres et lipides) capables d'induire la production de cytokines sont découverts. En 1996, Henderson et coll [28] proposent que ces composés soient considérés comme des facteurs de virulence qu'ils regroupent sous l'appellation moduline.

Ces 10 dernières années, un certain nombre de ces modulines ont été identifiées comme activant des TLRs (Figure 1.6). On a ainsi découvert que le peptidoglycane (PGN) et l'acide lipotéichoïque (LTA) peuvent activer TLR2 [29, 30, 31, 32, 33] et on s'est également aperçu que TLR2 ne reconnait pas le

Espèces	PAMPs	TLR
Bactéries, mycobactéries	LPS	TLR4
	lipoprotéines, LTA, PGN, lipoarabinomannane	TLR2/1, TLR2/6
	Flagelline	TLR5
	ADN	TLR9
	ARN	TLR7
Virus	ADN	TLR9
	ARN	TLR3, TLR7, TLR8
	Protéines structurales	TLR2, TLR4
Fongiques	Zymozsan, β-glucane	TLR2, TLR6
	Mannane	TLR2, TLR4
	ADN	TLR9
	ARN	TLR7
Parasites	mutin-type transmembran glycoprotein (tGPI-mutin) (*Trypanosoma*)	TLR2
	glycoinositolphospholipides (*Trypanosoma*)	TLR4
	ADN	TLR9
	Hemozoïne (*Plasmodium*)	TLR9

Figure 1.6 – PAMPs utilisé pour la détection des microbes et leur TLRs associés. Adapté de [37]

LPS mais des lipoprotéines bactériennes, un contaminant des extraits bruts de préparations de LPS à l'origine de la confusion [34]. Un des aspects intéressant de l'activation de TLR2, est que le répertoire de molécules qu'il reconnait est modulé par l'intervention d'autres TLRs comme TLR6 et TLR1, ce qui lui permet de faire la discrimination entre différents constituants bactériens [35, 36].

Comme imaginé par Janeway, la plupart de ces molécules sont des produits de la chimie des procaryotes. Les virus cadrent moins bien avec ce modèle. En effet, comme ils ne se répliquent pas dans leurs propres cellules, ils ne possèdent pas de glycosylation ou de lipides propres ou toutes biochimie unique pouvant générer une signature clairement identifiable. Bien qu'il ait été montré que des protéines virales peuvent activer TLR2 [38], ces molécules sont en général considérées comme des cibles médiocres car elles mutent rapidement, ce qui est incompatible avec un système de détection dont la spécificité est fixe. Une limitation qui semble avoir été contournée par la détection des acides nucléiques d'origine virale. Ces composés sont supposés subir des contraintes évolutives suffisamment fortes pour limiter les stratégies d'échappement aux systèmes de détection.

L'ARN doube brin (ARN db) est capable d'induire la production de l'in-

terféron de type I, un ensemble de cytokines clefs dans la réponse anti-virale [39]. Il est produit par la plupart des virus au cours de leur cycle de réplication [40, 41]. Il représente donc une bonne signature virale et par conséquent un potentiel PAMP. En 2001, Alexopoulou et coll. montrent que les cellules HEK293 sont capables de produire de l'IFN de type I en réponse à l'ARN db, une fois transfectées avec TLR3. De plus, les souris TLR3 $^{-/-}$ ne répondent plus à l'ARN db d'origine virale, ou de synthèse comme le poly (I :C), ce qui fait de TLR3 le premier TLR impliqué dans l'immunité anti-virale.

La reconnaissance des acides nucléiques n'est pas une stratégie applicable qu'aux virus. Il est connu depuis longtemps que l'ADN d'origine bactérienne, mais pas son équivalent vertébré, est capable de stimuler le système immunitaire. Il apparait que les séquences de dinucléotides CpG sont présentes à une fréquence plus élevée dans le génome des bactéries et des virus. L'ADN des vertébrés se distingue également par la présence de méthylations de ses séquences CpG, ce qui offre un moyen supplémentaire de distinguer les deux types d'ADN. La même année que pour l'ARN db, Bauer et coll.[42] montrent que la transfection de TLR9 rend sensible des cellules jusque là indifférentes aux CpG.

Ainsi, les mécanismes mis en œuvre par les TLRs ne sont pas dirigés contre des micro-organismes, mais plutôt contre des classes de composants protéines, lipoprotéines, liposaccharides et acides nucléiques d'origine microbienne. Roach montre, en analysant la séquence des TLRs issus de plusieurs vertébrés que l'on peut les regrouper en 6 grandes familles. Chaque famille peut être considérée comme la représentante d'une classe d'activateur, la plupart des vertébrés possédant au moins un membre de chaque famille. Ils montrent également que tous les TLRs des vertébrés évoluent lentement, ce qui laisse supposer une forte pression sélective pour le maintien de leur fonction et reste donc en accord avec un détecteur de PAMPs (figure 1.7) [43].

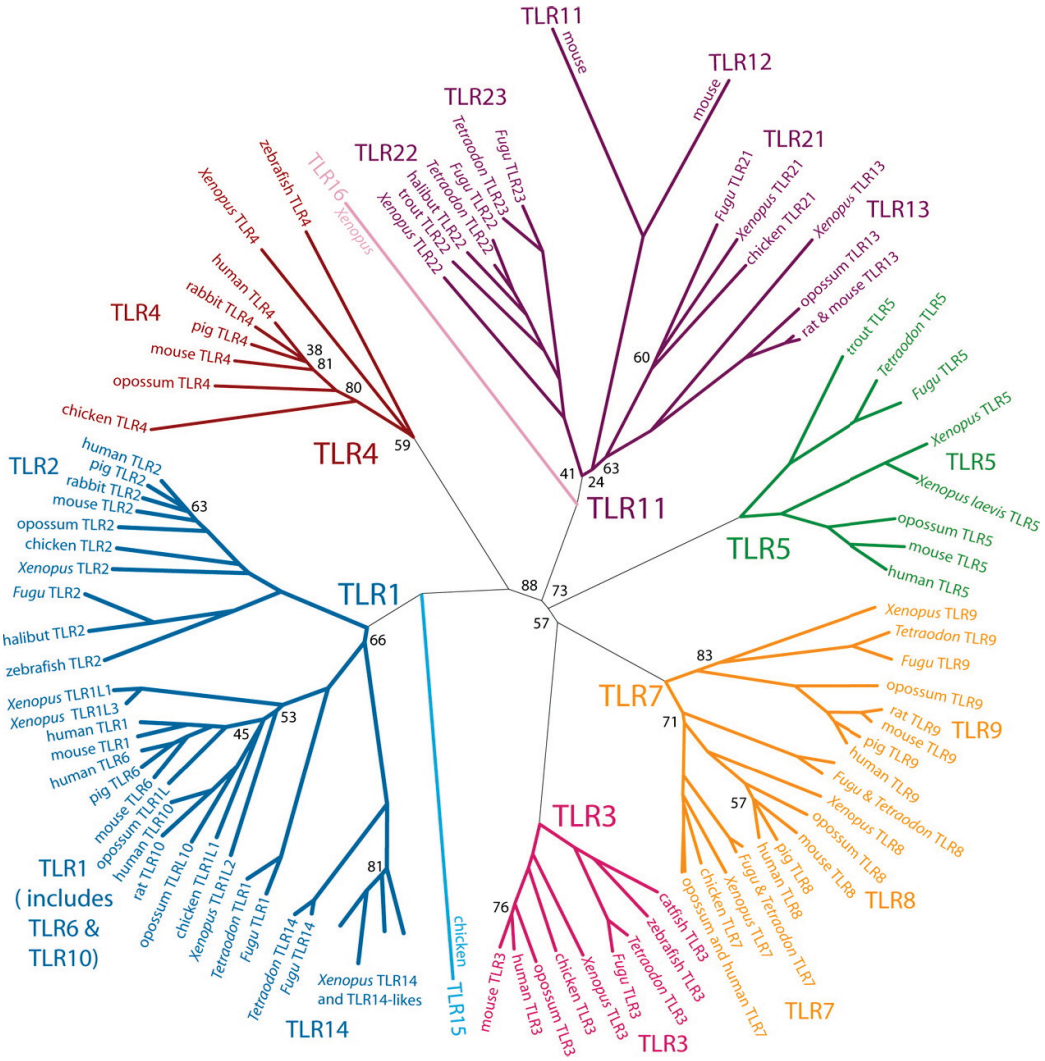

Figure 1.7 – Arbre moléculaire des TLRs vertébrés
Les branches d'une famille sont représentées d'une même couleur. TLR16 pourrait appartenir à la famille TLR11 ; TLR15 pourrait appartenir à la famille TLR1. *Xenopus*, sans précision sur l'espèce, correspond à *Xenopus tropicalis*. Les espèces sont indiquées le long de la branche pour les sous familles ne possédant qu'un seul membre. Pour limiter l'encombrement certains TLRs ne sont pas représentés. Les valeurs indiquées sont les valeurs de bootsrap < 90 % ; Les valeurs de bootstrap sont majoritairement de 100 %. Les faibles bootstrap traduisent en général des incertitudes dans le placement des TLRs, liées à des TLRs très divergeants (par exemple TLR16) ou des branches très courtes. D'aprés [43].

1.4 Les adaptateurs à domaine TIR

La première voie de signalisation identifiée en aval des TLRs est la voie activant le facteur de transcription NF-κB. Elle reste à ce jour la mieux caractérisée mais d'autres voies pouvant aboutir à l'activation des MAP kinases et des IRFs ont été isolées. Toutes s'appuient sur le même mécanisme de transduction. L'activation des récepteurs entraîne leur dimérisation, produisant ainsi une juxtaposition de leur domaines TIR situés dans leur portion cytoplasmique. Ce dimère de domaine TIR forme une plateforme moléculaire permettant le recrutement des protéines adaptatrices présentant elles aussi un domaine TIR [44, 45].

Avant la découverte de hToll et des autres TLRs, les analyses de bioinformatique avaient permis d'identifier une autre protéine possédant un domaine TIR : MyD88 (myeloid differenciation factor-88). Cette protéine se différencie des TLRs et de l'IL-1R par l'absence de domaine transmembranaire [46]. On découvre qu'elle joue le rôle d'adaptateur pour l'IL-1R [47] et Medzithtov et coll. montrent, par la suite, qu'elle sert également d'adaptateur pour hToll [48].

A ce jour 5 adaptateurs cytosoliques contenant un domaine TIR ont été identifiés [49] : MyD88, MAL (Myd88 adaptor like), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon(IFN)β), TRAM (TRIF related adaptor molecule) et enfin la protéine SARM (Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein) [2].

Tous les TLRs à l'exception de TLR3 nécessitent MyD88 pour leur signalisation. Cette interaction est directe sauf pour TLR2 et TLR4 où MAL joue le rôle d'intermédiaire. TLR3 possède une voie de signalisation spécifique liée à l'utilisation d'un autre adaptateur, TRIF. TRIF est capable de se lier directement à TLR3 et peut également être lié indirectement à TLR4 grâce cette fois à TRAM. TLR4 est donc capable d'activer la voie de signalisation dépendante de MyD88 et celle dépendante de TRIF en fonction de l'intermédiaire utilisé (MAL ou TRAM) [44] (figure 1.8).

2. MAL est également connu sous le nom de TIRAP, TRIF celui de TICAM-1, TRAM celui de TICAM-2 et SARM se retrouve parfois avec l'appellation SARM1

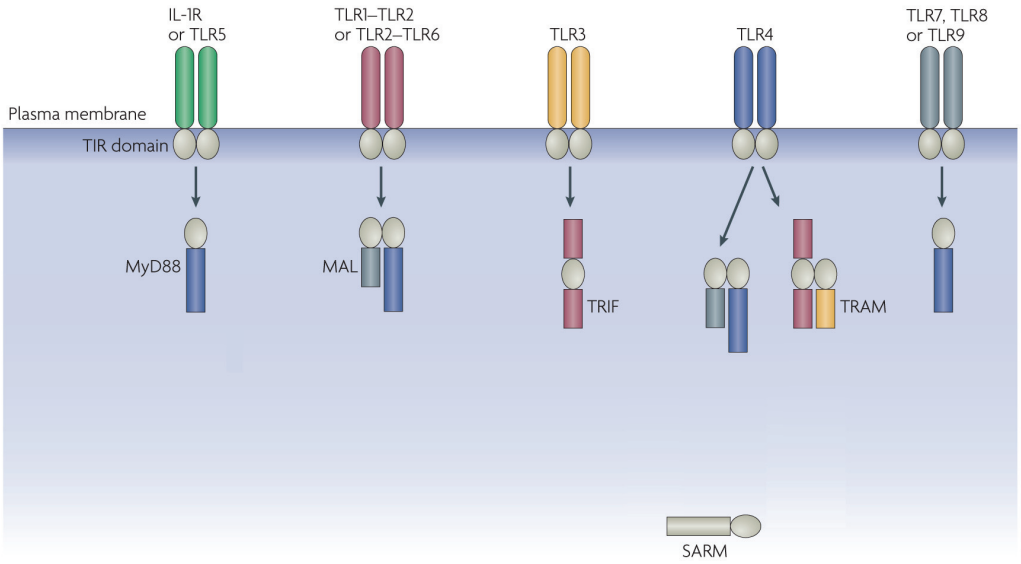

Figure 1.8 – Adaptateurs à domaine TIR pour les différents TLRs
SARM est inhibiteur de TRIF et n'est pas recruté par un TLR. Adapté de [49]

TLR4 est le seul TLR à recruter 4 adaptateurs et à pouvoir faire appel à 2 voies de signalisation distinctes. Toutefois, ces 2 voies possèdent des cinétiques différentes. TLR4 recrute d'abord MyD88 grâce à MAL. MyD88 forme alors avec d'autres partenaires un complexe permettant une activation précoce de NF-κB et des MAP kinases. TLR4 est ensuite endocyté et se retrouve dans des vésicules intracellulaires où il va former un complexe avec TRIF, cette fois avec l'aide de TRAM. Le nouveau complexe se formant à partir de TRIF catalyse alors la phosphorylation d'IRF3, permettant la production d'IFN. Le complexe TRAM-TRIF produit également une deuxième activation de NF-κB, plus tardive.

1.5 Les TLRs, un système immunitaire ancestral ?

Les données accumulées ces dernières années ne laissent aucun doute quant à une participation des TLRs dans l'initiation de la réponse immuni-

taire innée. La conservation de leur structure et de leurs voies de signalisation entre la drosophile et les mammifères permet de penser que cette participation à l'immunité innée est ancienne. Toutefois, les analyses phylogénétiques des TLRs et des composants de leur voies de signalisation s'opposent à cette vision et suggèrent plutôt une intégration secondaire dans l'immunité, à partir d'un rôle dans le développement [50].

Il a été proposé que l'apparition de l'immunité répond à la nécessité d'empêcher la fusion d'espèces génétiquement conspécifiques dans les premiers organismes pluricellulaires [51]. On s'attend donc à une émergence des premiers représentants à cette période. Il est intéressant d'abord de noter que le domaine TIR, qui est la séquence fondatrice de la superfamille IL-1R/TLR, se retrouve aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes où il peut être associé à un nombre varié de domaines [15, 52]. Son apparition est donc antérieure aux premiers animaux pluricellulaires et n'a pas d'implication directe avec l'immunité.

Des protéines à domaine TIR impliquées dans la reconnaissance immunitaire sont également retrouvées dans les plantes mais elles restent différentes de la famille des IL-1R/TLR pour trois raisons : la séquence de leur domaine TIR est assez éloignée. Elle ne possèdent pas de domaine transmembranaire, et elles contrôlent des voies de signalisation différentes, ce qui suggère qu'elles ont évolué indépendamment chez les plantes et les animaux [50].

Les éponges sont considérées comme les ultimes représentant des "premiers animaux" ou métazoaires [3]. On ne retrouve chez l'éponge *Amphimedon queeslandica* que 2 protéines transmembranaires possédant un domaine TIR ainsi que les éléments classiques de la voie de signalisation des IL-1R/TLR comme MyD88, IκB, NF-κB [52]. Le domaine extracellulaire de ces deux protéines est de type Ig, donc plus apparenté à l'IL-1 récepteur qu'aux TLRs, et quand on retrouve des protéines à LRR, elles appartiennent à d'autres familles. Le profil d'expression de ces protéines de type IL-1R montre qu'elles semblent impliquées dans la détection de signaux environnementaux au cours de la métamorphose de l'éponge. Cette observation, associée à un faible

3. Les métazoaires sont définit comme des organismes eucaryotes, pluricellulaires, mobiles et devant se nourrir de constituants organiques préexistant

nombre de représentants, supporte l'idée que ces récepteurs ne jouent pas le rôle de PRR.

Chez la drosophile, Toll possède, en plus de son implication dans l'orientation de l'embryon, d'autres fonctions plus tard au cours du développement. La perte d'activité de Toll est létale pour les embryons et ceux qui survivent ont une forme de baignoire. L'origine de ce phénotype reste inconnue mais n'implique pas, Spätzle, le ligand canonique de Toll [50]. Toll a également été identifié comme un régulateur direct dans l'organogenèse de la drosophile, sa perte induisant une perturbation du développement des muscles. Il est également nécessaire au développement du coeur en permettant un alignement et une migration correcte des cardioblastes. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces différents processus restent mal connus, tous requièrent une communication cellule à cellule et n'ont pas d'implication directe avec l'immunité [50].

Un autre point de divergence entre les TLRs des mammifères et des insectes vient du mode de reconnaissance de leur ligand. On le verra plus tard, les données structurales sur les TLRs montrent qu'ils reconnaissent directement leurs PAMPs [53] alors que chez la drosophile l'activation de la réponse immunitaire est dépendante de spätzle qui est une protéine endogène [11].

Il est intéressant de noter que parmi les 9 Tolls de la drosophile seul Toll-1 est impliqué dans l'immunité [54]. Chez *C. elegans*, un seul gène apparenté aux TLRs, *tol-1*, a été identifié. Là encore, il a un rôle majeur dans le développement du ver, rôle qui, de façon surprenante, ne semble pas impliquer son domaine TIR. Chez l'adulte, son expression est ensuite limitée au système nerveux (figure 1.9). *tol-1* pourrait jouer un rôle dans le système nerveux sensitif de *C. elegans* car sa mutation entraîne la disparition des mécanismes d'évitement qui permettent à *C. elegans* de distinguer plusieurs souches bactérienne et d'éviter les souches potentiellement dangereuses [55]. Un rôle plus direct de protection contre les bactéries Gram négatives a également été décrit [56].

La première protéine à domaine TIR jouant un rôle potentiel dans la réponse immunitaire a été identifiée chez l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*. *Dictyostelium discoïdeum* vit dans les sols et se nourrit de bactéries et la

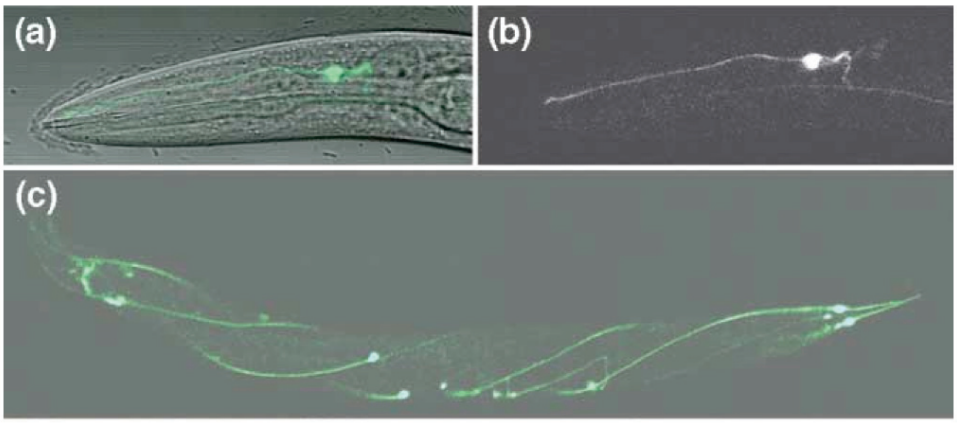

Figure 1.9 – Profil d'expression de *tol-1* chez *C. elegans* (a-c) Images en confocal et en contraste de phase de tol1-GFP ; la tête est à gauche. (a,b) Tête du ver adulte montrant une expression dans les neurones URY. Ces neurones ont une terminaison caractéristique, aplatie dans la portion antérieure du pharynx. (c) Expression dans les 6 mécanorécepteurs (ALML/R, PLML/R, AVM, et PVM). Adapté de [55].

détection des menaces est nécessaire à son développement. Cet organisme unicellulaire est une amibe sociale, c'est à dire que dans des conditions de stress les amibes s'agrègent pour former un organisme multicellulaire [57].

L'ensemble de ces données, même si elles ne remettent pas en cause le rôle des TLRs en tant que PRRs, ouvre la possibilité que leur rôle ne soit pas limité à la détection de pathogènes mais de façon plus générale à la détection de variations quantitatives ou qualitatives de l'environnement. Le concept des DAMPs proposé par Polly Matzinger abonde dans ce sens car il prêche pour un élargissement de la définition des composés pouvant être détectés par les TLRs [58]. Dans ce modèle, les systèmes de détection ne font pas de distinction entre le non soi représenté par les pathogènes et le soi, mais sont plutôt sensibles à des situations de danger. Par exemple, les acides nucléiques tels que les CpG, reconnus par TLR9, et l'ARN db, reconnue par TLR3, peuvent avoir une origine aussi bien endogène, qu'exogène, les acides nucléiques d'origine endogène étant accessibles dans des contextes traduisant un danger comme après la nécrose ou la phagocytose de corps apoptotiques.

Le terme "danger" est peut-être mal choisi car il ménage difficilement une place pour un rôle des TLRs au cours du développement. Pourtant, on peut voir dans le développement un processus de défense initié par un danger, comme c'est le cas pour *Dictyostelium discoïdeum*. Ce processus étant par la suite, chez les métazoaires, entretenu par un programme génétique dédié, car il offre des avantages sélectifs indéniables.

1.6 TLR3 et l'immunité anti-virale

L'étude de l'évolution des TLRs chez les vertébrés a permis d'observer qu'ils subissent une forte pression sélective attribuée à leur implication dans l'immunité. En reséquençant les 10 TLRs humains chez des individus sains représentatifs des populations d'Afrique, d'Europe et d'Asie, Casanova et coll. [21] ont cherché à évaluer l'importance de cette pression sélective à l'échelle d'une même espèce. A la lumière de cette analyse, deux groupes se dégagent. Le premier, constitué des TLRs détectant les acides nucléiques (TLR3, TLR7, TLR8, et TLR9), subit une forte sélection négative, c'est à dire une élimination de toute nouvelle mutation parce que létale ou délétère. Cette sélection est en faveur d'un rôle essentiel et non redondant pour la survie de l'hôte. A l'inverse, avec plus de 23% de la population globale présentant une mutation faux-sens affectant au moins un récepteur et une proportion importante de mutations non sens (16 %), les contraintes sélectives agissant sur les autres TLRs ne reconnaissant pas les acides nucléiques semblent plus lâches. Ces mutations sont réparties sur l'entièreté des gènes, y compris des domaines clefs (figure 1.10). Les adaptateurs des TLRs, MyD88 et TRIF, sont également contraints à une sélection négative, alors que les adaptateurs intermédiaires MAL et TRAM, nécessaires à la fonction de TLR2 et TLR4, subissent moins de contraintes. Ces données indiquent clairement que MyD88 et TRIF jouent un rôle non redondant et que ces deux molécules sont essentielles pour la survie de l'hôte [21, 59].

On peut se demander si l'origine de la pression sélective exercée sur TRIF est liée à TLR3. Bien que les premières souris TLR3 $^{-/-}$ montrent une activation de TLR3 dépendante de l'ARN db de synthèse (poly (I :C) ou issu

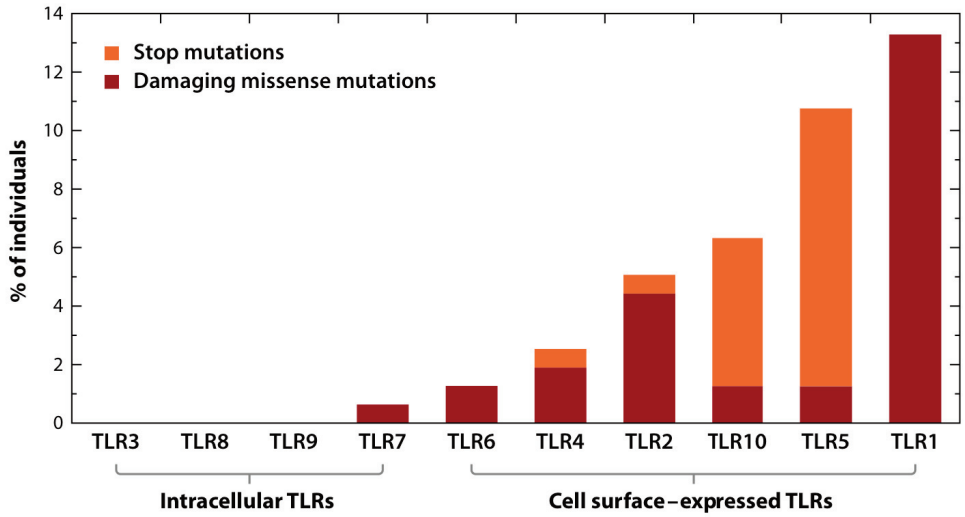

Figure 1.10 – Pression sélective d'intensité différente sur les TLRs humains Ces données représentent le pourcentage d'individus, parmi un échantillon d'individus sains d'origines ethniques diverses (Afrique, Europe, Asie de l'est), présentant une mutation non-silencieuse prédite par *PolyPhen* pour avoir un impact sur la fonction ou produisant un codon stop. Adapté de [21].

de virus [60], son rôle dans la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale efficace reste controversé [61, 62]. Dans l'article *Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections ?*, Edelmann et coll soulèvent directement la question [63] et les études qui suivent montrent que les souris TLR3 $^{-/-}$ ne sont rendues plus vulnérables qu'à un nombre restreint de virus alors qu'elles sont devenues résistantes à d'autres. Ces différences peuvent être liées au fait que les activateurs des TLRs sont des facteurs de virulence des pathogènes par conséquent dans certains cas ils peuvent être favorables à la pathologie, voire nécessaires. Certains auteurs ont proposé que la sensibilité limitée de TLR3, soit liée à leur mode de réplication. Des virus pourraient, par exemple, produire des quantités insuffisantes d'ARN db pour récapituler les observations faites *in vitro*, ou bien cet ARN db n'entre pas en contact avec TLR3 [63, 62]. TLR3 étant un récepteur transmembranaire, on suppose que son accès se limite à l'ARN db extracellulaire alors que l'ARN db intracellulaire est sous la surveillance de PRRs cytosoliques comme la protéine kinase R (PKR), 2'-5'-oligoadenylate synthetases et les hélicase RIG-I (retinoic acid-inductible gene I) et MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) [64] et récemment les récepteurs DDX1, DDX21, DHX36 [65].

Des observations similaires ont été faites chez les patients ayant contracté des encéphalites herpétiques [21], une maladie associée à une perturbation de la voie de signalisation de TLR3. Les encéphalites herpétiques correspondent à une complication rare des primo-infections à l'Herpes Virus Simplex-1 (HSV-1) [4] produisant des encéphalites. De façon surprenante, ces patients ne montrent pas de sensibilité particulière à d'autres virus et, à l'inverse, les enfants présentant des immunodéficiences héritées ou acquises, causant des sensibilisations à la plupart des virus, n'ont pas de tendance particulière à l'encéphalite herpétique. Il existe donc une redondance avec d'autres mécanismes indépendants de TLR3 et il est intéressant de noter que cette redondance s'applique également à des virus semblables à ceux pour lesquels les souris déficientes en TLR3 sont sensibles. Toutefois, la redondance diffère suivant les types cellulaires. TLR3 est exprimé dans les cellules immunitaires

4. plus de 85 % des jeunes adultes sont infectés au HSV-1 sans conséquences cliniques notables

Virus[a]	Target system, organ, tissue, and/or cells expressing TLR3	Role of TLR3[b]	Reference(s)
Influenza A virus	Respiratory tract CNS	− +	62 40
Respiratory syncytial virus	Respiratory tract	+	30
Rabies virus	CNS (neuronal cells)	−?	49
Herpes simplex virus 1	CNS (neuronal cells)	−?	49, 81
West Nile virus	CNS	−	105
Theiler's murine encephalomyelitis virus	CNS (astrocytes)	+?	95
Encephalomyocarditis virus	Heart	+	35
Human immunodeficiency virus	Skeletal muscle	−?	92
Punta Toro virus	Liver	−	28
Hepatitis C virus	Liver Kidney	+/−? −?	63, 73 110
Herpes simplex virus 2	Female genital tract	+?	8, 25, 39

[a] Viruses are listed in the order of their appearance in the text.
[b] +, protective; −, detrimental; +/−, protective or detrimental.

Figure 1.11 – Rôle de TLR3 dans les infections virales. D'aprés [61]

comme les macrophages et les cellules dendritiques mais on le retrouve également dans les cellules épithéliales et les fibroblastes ou dans le système nerveux central. Chez les patients déficients pour TLR3, les monocytes et les lymphocytes ne présentent pas de sensibilité particulière à de nombreux virus mais les fibroblastes ont une réponse diminuée à HSV-1 ainsi qu'au VSV. De plus, on peut penser qu'ils ne présentent pas de localisation cutanée de HSV-1 car les kératinocytes sont encore capables de répondre au poly (I :C).

On le voit, l'évaluation de l'implication de TLR3 dans la réponse immunitaire reste difficile et l'extrapolation à partir de la souris peut s'avérer parfois périlleuse. Toutefois, les redondances observées chez la souris et l'homme mettent en question l'origine infectieuse de la forte pression sélective observée sur TRIF et TLR3. Elles s'opposent également avec le rapport bénéfice/risque si cher à la médecine. En effet, la reconnaissance des acides nucléiques est une stratégie dangereuse car elle rend possible la détection de ligands d'origine endogène et donc une auto-immunité. L'auto-immunité liée aux récepteurs aux acides nucléiques a surtout été décrite pour TLR9 [66], et l'implication de TLR3 semble plus limitée. Il est donc raisonnable de penser que la pression sélective imposée aux récepteurs des acides nucléiques, et plus particulièrement TLR3, peut avoir une origine autre que celle imposée par les agents infectieux.

Deux Phénotypes des souris KO pour TLR3 suggèrent un rôle potentiellement différent pour le récepteur. En effet, il semble impliqué dans le développement et la plasticité neuronale [67, 68] et les souris TLR3 ($^{-/-}$) présentent un retard de cicatrisation, associé à une diminution de la production de cytokines au site de la lésion. Contrairement au système nerveux, cette participation à la cicatrisation cadre mieux avec des éléments connus de la physiologie de TLR3. Il a été montré que l'expression de TLR3 est augmentée suite a des blessures [69] et que les cellules nécrosées sont capables d'activer le récepteur et ce, en absence de toute infection virale [69, 70, 71]. Dans ce contexte, TLR3 n'apparait plus comme un détecteur de PAMPs mais interviendrait dans la détection de signaux de dangers comme l'a proposé Matzinger [58].

1.7 TLR3 et cancer

En redéfinissant les contours de l'immunité innée, les TLRs sont rapidement devenus des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement des maladies auto-immunes mais également dans le traitement des cancers [72].

On peut considérer que la notion de l'existence de liens entre l'immunité et le cancer remonte à William Coley. Coley est alors jeune chirurgien au Memorial Hospital de New York quand il perd en 1891 son premier patient atteint d'un sarcome. Désillusionné par la médecine traditionnelle, il commence à se demander si la nature n'abrite pas un remède contre le cancer. Pour cela, il parcourt les archives de l'hôpital à la recherche de maladies et de guérisons inhabituelles. Il prend alors connaissance du cas d'un immigrant s'étant présenté à l'hôpital avec un sarcome sur la joue gauche de la taille d'un œuf. Le sarcome avait été opéré deux fois avec à chaque fois une récidive. Les plaies dues aux interventions successives ne se refermaient plus et les greffes de peau restaient un échec. La tumeur progressant sans possibilité d'excision, le patient fut considéré comme perdu. Après sa dernière opération, la blessure s'infecta et le patient fut pris d'une forte fièvre. On remarqua alors qu'à chaque montée de fièvre la taille de la tumeur se réduisait un peu plus, jusqu'à disparaitre complètement. Le patient quitta l'hôpital quelques 4 mois plus tard. Coley recherche le patient et découvre que 7 années après sa guérison, il est toujours vivant et en bonne santé. Coley suspecte que l'infection est liée à sa guérison et il entreprend d'injecter des bactéries inactivées à certains de ses patients [73]. Il commence par une série de 10 patients pour arriver à plus de 800. Un nombre significatif de ces patients montrent des signes de régression, certaines de ces régressions se maintenant pendant plusieurs dizaines d'années.

Ce succès apparent entraîne, par la suite, des expérimentations avec d'autres micro-organismes comme les virus, mais la réussite reste variable et limitée à un faible nombre de patients. Même si les mécanismes restent inconnus, il devient rapidement évident que les effets observés ne proviennent pas des micro-organismes eux-même mais de la réponse immunitaire qu'ils induisent. Rétrospectivement on peut considérer ce "vaccin" également appelé

toxine de Coley comme le premier succès de l'immunothérapie [74].

En 1930, il est connu que des cellules déjà infectées par des virus sont plus à-même de se défendre contre une nouvelle infection. Jean Lindenmann découvre en 1957 que la molécule responsable de ce blocage est l'IFN [75]. Alors qu'ils sont à recherche de molécules capables de stimuler la production d'IFN, Field et coll. découvrent une série de séquences d'ARN db se synthèse capables d'induire de fortes sécrétions d'IFN [39]. Peu après leur description, le potentiel thérapeutique de ces nouveaux composés est rapidement évalué. Après avoir montré qu'ils jouent un rôle protecteur dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'infection virale expérimentale [39, 76, 77], on constate qu'ils augmentent également la survie des animaux porteurs de tumeurs d'origine virale mais aussi non virale.

Encouragée par ces observations, l'évaluation clinique du potentiel thérapeutique de l'ARN db démarre au début des années 70. Avec 6 essais cliniques effectués entre 1970 et 1990 [78], les thérapeutiques adjuvantes basées sur l'ARN db montrent des résultats certes encourageants mais restreints à un nombre limité de patients. A cette époque la cible de l'ARN db n'est pas connue mais les limitations observées laissent supposer qu'elle n'est présente que dans un sous-groupe de patients. La découverte que TLR3 est activé par l'ARN db et qu'il est exprimé dans certaines tumeurs aboutit à l'hypothèse qu'il pourrait participer à la réussite de certains traitements [78]. De plus, notre équipe a démontré *in vitro* que le TLR3 exprimé par les cellules tumorales pouvait, une fois activé, entrainer en plus d'une réponse immunitaire la mort des cellules [79]. Même si le rôle joué par ce phénomène reste à ce jour indéterminé, TLR3 apparait dans une étude rétrospective comme un marqueur de l'efficacité thérapeutique de l'ARN db dans le traitement du cancer du sein [78].

La nécessité de sélectionner les patients pour augmenter le succès des traitements par l'ARN db a amené notre équipe à développer et valider des anticorps dirigés contre TLR3. Au cours de la caractérisation de ces outils, nous avons découvert de nouveaux aspects du trafic et de la maturation de la protéine. Nous avons également été en mesure d'isoler le complexe moléculaire en aval de TLR3 responsable de l'apoptose. L'activation de TLR3

par l'ARN db n'aboutit pas à l'apoptose dans toutes les lignées tumorales, malgré l'expression du récepteur. A partir de lignées issues de cancers buccaux présentant une faible sensibilité à l'apoptose induire par l'ARN db, nous avons chercher à isoler les mécanismes régulant la mise en jeu du complexe proapoptotique associé à TLR3.

Ces résultats sont présentés ici sous la forme de deux articles en cours de soumission. Chaque article est séparément introduit et suivi de données complémentaires non publiées. Une conclusion finale cherchera a replacer ces données dans le cadre défini par ce chapitre introductif.

Chapitre 2

ARTICLE 1 : *Processing of TLR3 by endolysosomal cathepsins generates a signalling cleaved/associated receptor*

En découvrant le rôle de toll dans la réponse immunitaire contre les champignons, Lemaitre et coll. [11] ont montré que la drosophile est capable de produire une réponse de défense adaptée au type de pathogène. Chez les mammifères, la sensibilité des TLRs à des structures endogènes impose, soit un niveau d'intégration du signal supplémentaire, si le signal est désiré, soit la mise en place de points de contrôle pour limiter l'apparition d'une réponse inappropriée. De plus, si l'on considère que les PAMPs sont des facteurs de virulence [28], il apparait important que cette réponse soit également quantitativement contrôlée pour être efficace sans devenir nocive. La compréhension des mécanismes contrôlant qualitativement et quantitativement la réponse des TLRs se révèle donc être un élément important de leur physiologie.

Au cours de la caractérisation des anticorps anti-TLR3, nous avons été amenés à détecter plusieurs formes de la protéine. En nous appuyant sur

un grand nombre de données structurales publiées, dont je fais un rappel ici, nous avons proposé un modèle de maturation de TLR3 et conçu des constructions permettant sa validation. La polyvalence de certains anticorps nous a également permis de localiser la protéine endogène par immunofluoresence. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à une publication, en cours de soumission, présentée ici à la suite des rappels. Elle est suivie de données complémentaires sur la localisation en surface de TLR3, obtenues au cours de la validation des anticorps pour un usage en cytométrie en flux (FACS).

2.1 INTRODUCTION : Structure de TLR3

Compte tenu de leurs ressemblances avec le Toll de la drosophile, il a d'abord été postulé que les TLRs se situaient en aval d'une cascade protéolytique [19]. Cependant, il est apparu que le LPS est capable d'activer directement TLR4 [80] et cette particularité a été étendue aux autres TLRs grâce notamment à l'analyse de plusieurs co-cristaux de TLRs associés à leurs ligands [53]. La biologie structurale a également permis de clarifier un ensemble d'observations biochimiques dictant la reconnaissance de l'ARN db par TLR3.

2.1.1 Le module de base des TLRs : le LRR

Dans la superfamille IL-1R/TLR, les TLRs se distinguent de l' IL-1R par la présence dans leur domaine extracellulaire, ou ectodomaine (ECD), de la répétition d'un module connu sous le nom de LRR. Les LRRs sont des motifs construits à partir de séquences de 22 à 29 acides aminés qui doivent leur appellation à la présence d'une proportion inhabituelle d'un acide aminé hydrophobe, la leucine. Ils sont largement répandus et se retrouvent dans des protéines d'origines diverses, allant des virus aux cellules eucaryotes en passant par les plantes. Ces protéines peuvent être intracellulaires ou liées à la membrane pour remplir des fonctions aussi variées que l'adhésion, l'assemblage de la matrice extracellulaire, l'agrégation plaquettaire, le développement neuronal, la modification de l'ARN et bien sûr la réponse immunitaire.

Malgré ces fonctions sans relations apparentes, toutes les protéines à LRRs partagent une même structure particulièrement adaptée pour les interactions protéines/protéines [81].

Les LRRs adoptent une structure tridimensionnelle en boucle qui débute par une portion organisée en brins β d'au minimum 3 acides aminés. Quand ils sont assemblés dans une protéine, l'empilement consécutif des LRRs construit une bobine, dans laquelle les acides aminés hydrophobes consensus pointent vers l'intérieur pour former un noyau central hydrophobe. Les brins β de chaque boucle LRR sont alignés en feuillets β parallèles, réunis par des liaisons hydrogènes. Les feuillets β étant plus rapprochés que les autres portions non-β, la bobine va s'incurver. Par conséquent, toutes les protéines construites à partir de LRRs présentent une surface concave, constituée des feuillets β et une surface convexe opposée. Elles comprennent également une surface latérale dite 'ascendante' qui monte du brin β vers la surface convexe, et une face opposée, qui descend du brin β en direction de la boucle LRR précédente [53] (figure 2.1)

2.1.2 Structure tridimensionnelle de TLR3

En fonction du nombre d'acides aminés constituant la boucle LRR, la face convexe peut présenter différentes structures secondaires. L'encombrement de ces structures va avoir un impact direct sur l'importance de la courbure de la bobine. Par exemple, la première protéine à LRRs à avoir été cristallisée, l'inhibiteur de la ribonucléase (RI), est construite à partir de boucles relativement longues comprenant de 27 à 29 acides aminés. Le repliement de chaque boucle constitue des hélices α de 3 tours à la surface convexe de la protéine. A l'inverse, la boucle LRR consensus des TLRs ne comprend que 24 acides aminés, ce qui n'autorise pas la formation des tours d'hélices α. Par conséquent, au niveau de la face convexe, la distance entre les boucles est plus courte pour les TLRs que pour la protéine RI ce qui leur donne une courbure plus faible et un diamètre externe plus important (figure 2.1). Alors que dans les autres protéines à LRRs de 24 acides aminés, une légère torsion s'opère entre chaque LRR, ce qui génère des structures non planes,

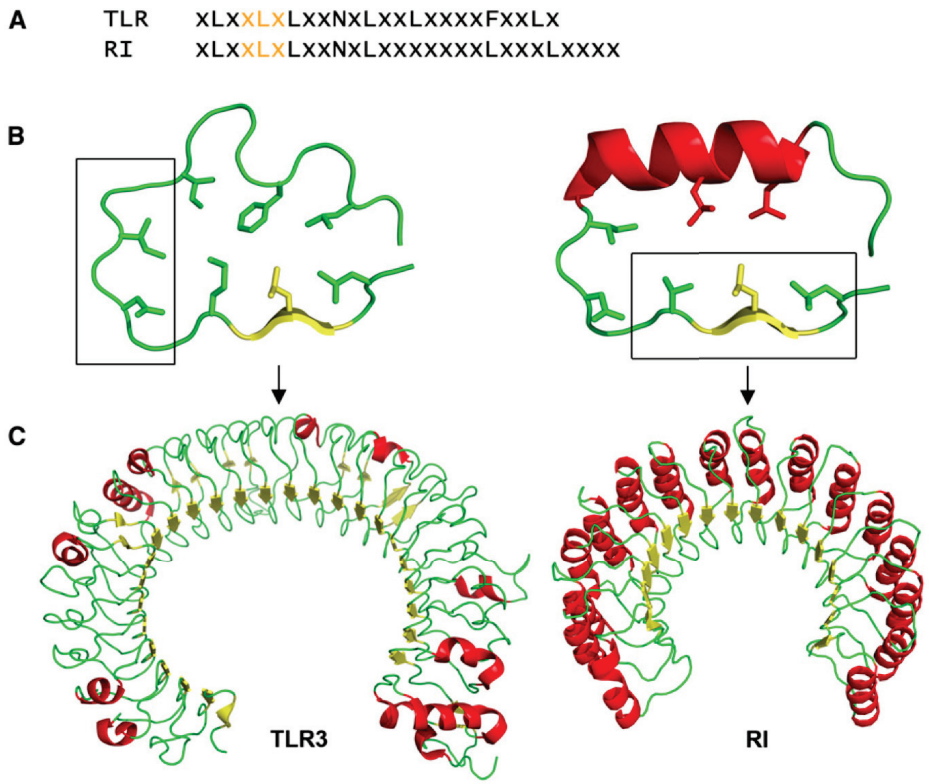

Figure 2.1 – Structures des répétitions riches en leucine (LRR)
(A) Séquence LRR consensus de TLR3 et de l'inhibiteur de la ribonucléase (RI). Les résidus formant le brin β apparaissent en orange. (B) Une boucle LRR de hTLR3 et une boucle LRR de RI sont représentées avec les acides aminés conservés formant le noyau central hydrophobe. Les brins β sont représentés en jaune et les hélices α en rouge. Les portions encadrées forment les surfaces impliquées dans la liaison au ligand. (C) Diagramme en ruban de TLR3 (2A0Z) et de l'inhibiteur de la ribonucléase (1DFJ). Notez la différence de courbure de RI par rapport à TLR3, imposée par les structures secondaires de la face convexe. Adapté de [53].

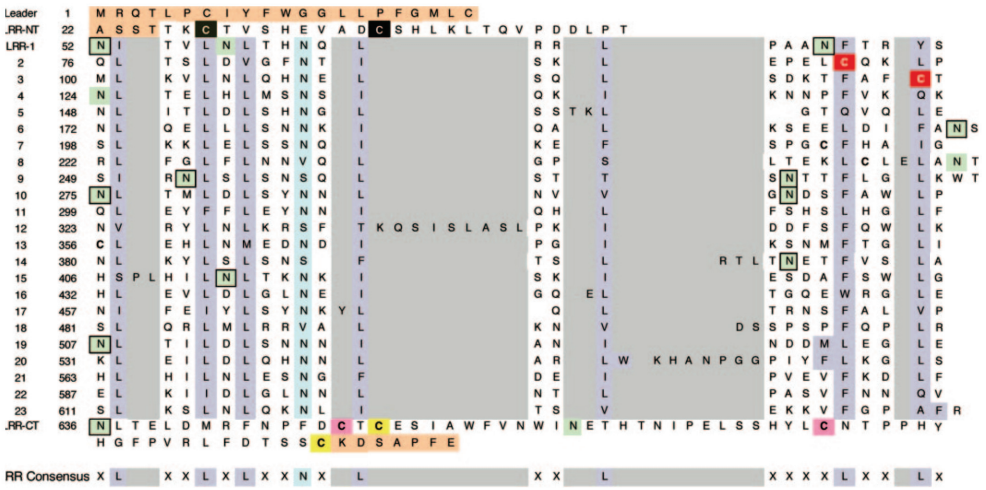

Figure 2.2 – Séquence de l'ECD de TLR3 (NCBI : NP003256) organisée en fonction du cristal publié par Bell et Coll. [82].
On retrouve après le peptide signal (Leader), la coiffe N-terminale (LRR-NT), 23 LRRs, et la coiffe C-terminale (LRR-CT). Le surlignage en orange indique les résidus non compris dans le cristal. Les cystéines formant des ponts disulfures entre elles sont de la même couleur. Les sites de glycosylation potentiels sont indiqués en vert clair, ceux encadrés sont retrouvés dans le cristal. Les résidus hydrophobes formant la séquence consensus sont rappelés en violet avec l'asparagine conservée en cyan. Les insertions dans la séquence consensus ont été placées dans les boites grises. D'aprés [82].

l'ECD des TLRs forme une structure plane qui joue un rôle important dans la reconnaissance du ligand [53].

Une autre caractéristique de l'ECD des TLRs est la présence de LRRs plus longs que la séquence consensus de 24 acides aminés (figure 2.2). Ces résidus supplémentaires produisent en général des boucles proéminentes sur la face ascendante ou convexe du fer à cheval. Bell et coll. ont proposé de faire la distinction entre les insertions après le 10 ème acide aminé, produisant des boucles proches du feuillet β, et les insertions après le 15 ème acide aminé dont les boucles seront plus proches de la face convexe. Ces dernières peuvent introduire une certaine flexibilité dans la structure en fer à cheval [83]. TLR3 présente des insertions au niveau des LRR12 et 20. Ces insertions dépassent respectivement des faces latérales et convexes et bien qu'on les

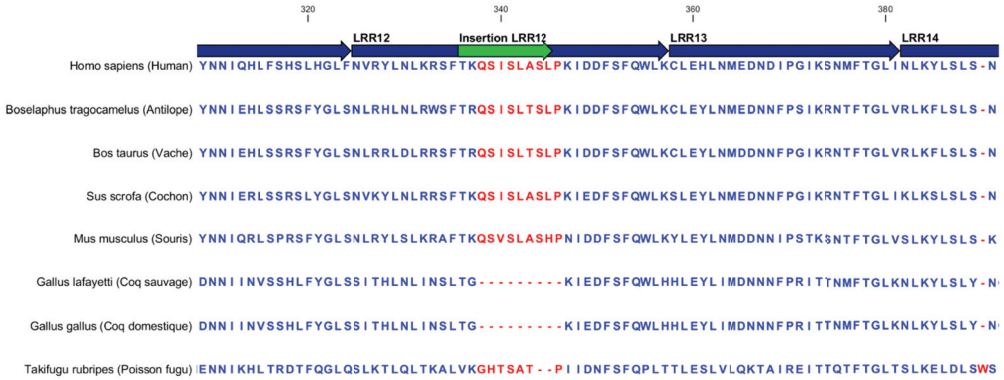

Figure 2.3 – Conservation de l'insertion au niveau du LRR12
L'alignement des séquences de différentes espèces montrent que, à l'exception des oiseaux, l'insertion au niveau du LRR12 est bien conservée.
Alignement effectué avec le logiciel *CLC Main Workbench*.

retrouve conservées chez toutes les espèces analysées à l'exception des oiseaux (figure 2.3), leur rôle reste à ce jour inconnu.

La stabilité des protéines à LRRs provient du noyau central hydrophobe. Le noyau d'un LRR est isolé du solvant par la présence du LRR suivant, ce qui provoque un verrouillage de l'ossature (figure 2.4) [81]. L' ECD de TLR3, ainsi que des autres TLRs, contient également des structures coiffant les extrémités N- et C-terminales appelées LRR-NT et LRR-CT, jouant un rôle protecteur pour le noyau du premier et dernier LRR. Les LRR-NT sont des boucles en épingle à cheveux (β hairpin) réunies par des ponts disulfures, alors que les LRR-CT sont des structures globulaires qui contiennent deux hélices α stabilisées par 2 ponts disulfures. Des "coiffes" similaires sont retrouvées dans d'autres protéines constituées de LRRs de 24 résidus (figure 2.4) [53].

2.1.3 La glycosylation

L'ECD des 10 TLRs humains varie dans le nombre de LRRs et de N-glycosylations [53] et à ce jour, seules les structures des TLR1, 2, 3, 4 et 6 (humains ou souris) ont été définies. Tous les ECD possèdent la même structure en fer à cheval, mais ces structures ne sont pas superposables du fait de variations dans leur courbures. Pour les TLRs dont les structures

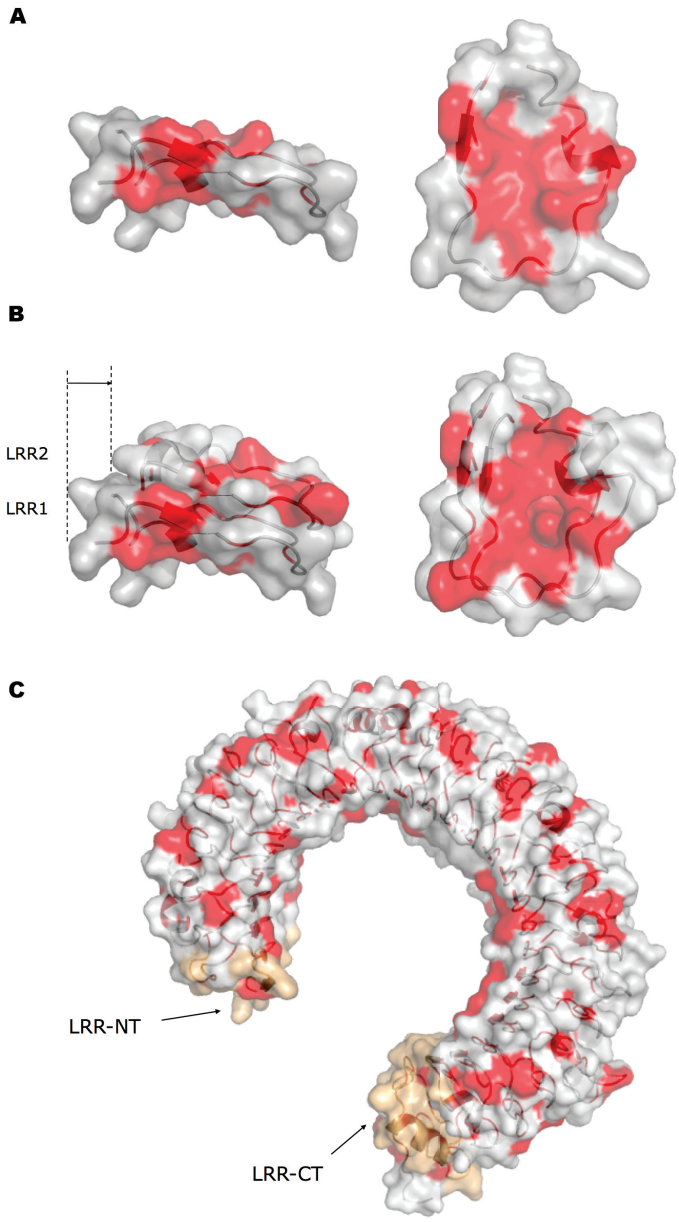

Figure 2.4 – Stabilisation de la structure de TLR3 par empilement des LRRs. Les structures hydrophobes sont représentées en rouge. (A) LRR1 vu de profil (à gauche) et de dessus (à droite). (B) LRR2 recouvrant le noyau hydrophobe du LRR1. Vue de profil (à droite), vue de dessus (à gauche). (C) Vue de profil de l' ECD complet de TLR3 (2A0Z). Les coiffes N-terminale et C-terminale protégeant la zone hydrophobe du premier et du dernier LRR sont colorées en orange. Modélisations réalisées avec le logiciel *MacPyMOL*.

ont été identifiées, des sucres sont distribués tout autour de la molécule, à l'exception de la face latérale formée par les boucles ascendantes des LRRs. Dans la plupart des protéines à LRRs, la liaison avec le ligand s'effectue au niveau de la surface concave, mais pour les TLRs, cette liaison est entravée par la présence de glycosylations. Elle s'accomplit donc la plupart du temps au niveau de la face dépourvue de sucres [53].

L'ECD de TLR3 contient 15 sites potentiels de N-glycosylation dont 11 sont visibles sur le cristal [82, 84]. Tous ont été mutés expérimentalement, individuellement ou couplés [82, 85, 86]. La plupart des mutations n'ont pas d'impact sur l'expression ou l'activité de la protéine, à l'exception de l'asparagine 247 (en alanine [86] ou en arginine [85]) qui entraîne une perte partielle ou totale de la fonction de TLR3 sans affecter son expression. Pourtant, sur le cristal, ce sucre ne semble pas impliqué dans la liaison avec le ligand [87], il est donc possible qu'il soit important pour l'adressage de la protéine au site de signalisation ou pour son repliement. Le seul sucre en contact avec l'ARN db dans le cristal est situé en position 413 [87], et Sun et coll. [86] ont montré qu'une mutation de l'asparagine entraînait une diminution de la réponse de TLR3.

2.1.4 Modèle de reconnaissance de l'ARN db par TLR3

Les études à partir d'ECD de TLR3 solubles ou de constructions de TLR3 ont permis de définir les modalités d'interaction du récepteur avec son ligand.

En solution, TLR3 est sous la forme de monomère, mais il constitue des dimères quand il se lie à un segment de 45 paires de bases d'ARN db, taille qui semble être minimale pour obtenir une signalisation. Un brin d'ARN db peut lier plusieurs dimères et donc, alors qu'un seul dimère s'associe à un brin d'ARN db de 45 paires de bases, les brins de 90 paires de bases sont capables de recruter 4 dimères et 6 pour ceux de 139 paires de bases [88]. La liaison est saturable, réversible et peut être inhibée par de l'ARN db d'origine virale ou du poly (I :C) mais pas par de l'ARN simple brin ou de l'ADN simple ou double brin. TLR3 possède donc des sites de liaison spécifiques de l'ARN db qui ne sont pas influencés par sa séquence en paires de base [88]. Par contre,

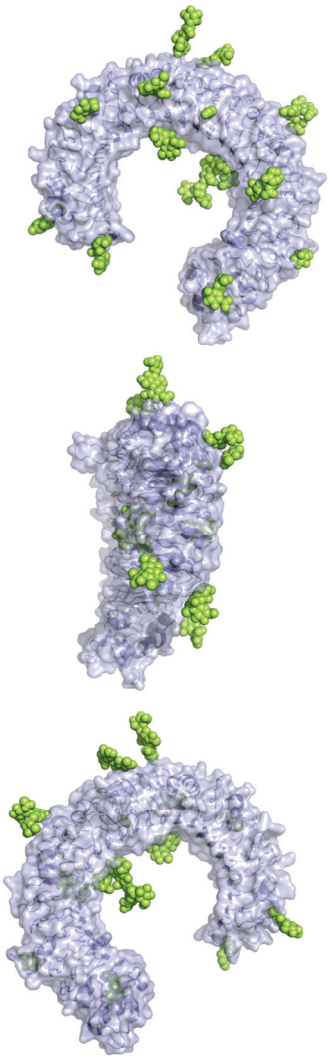

Figure 2.5 – Répartitions des glycosylations sur TLR3 telles qu'observées dans le cristal publié par Bell et coll. [82]
Trois projections orthogonales de l'ECD de TLR3 (2A0Z) sont montrées avec leur N-glycosylations en jaune. (A) Vue de profil, face descendante glycosylée. (B) Vue de face montrant la face ascendante non glycosylée (à gauche) et la face descendante glycosylée (à droite). (C) Vue de profil, face ascendante non glycosylée impliquée dans la reconnaissance du ligand. Modélisations réalisées avec le logiciel *MacPyMOL*.

la reconnaissance de l'ARN db requiert au minimum un pH inférieur ou égal à 6,5 [85, 88].

L'ensemble de ces observations trouve son explication dans le co-cristal de TLR3 dimérisé avec une séquence d'ARN db de 46 paires de bases [87]. Il montre que les faces non-glycosylées des 2 ECDs prennent en sandwich la molécule d'ARN db pour constituer une structure en forme de *M*. L'ARN db interagit à deux sites sur chaque molécule de TLR3, l'un à proximité de l'extrémité N-terminale (comprennant le LRR-NT et les LRR1 à 3) et l' autre proche de l'extrémité C-terminale (impliquant les LRR19 à 23) et cette liaison n'impose aucune modification conformationnelle. La mise en jeu de ces deux sites impose donc une longueur minimale qui correspond à celle déterminée biochimiquement et le fait qu'ils se lient au squelette de ribose/phosphate de l'ARN permet l'indépendance vis à vis de sa séquence (figure 2.6).

La majorité des interactions TLR3/ARN db sont de type hydrophile, c'est à dire hydrogène ou avec un pont salin, et comptent pour 4,4% de la surface de l'ECD [53]. Les interactions électrostatiques entre les groupements phosphates du squelette de l'ARN db et les noyaux imidazoles des résidus histidine aux sites N- et C-terminaux sont particulièrement importants. Ils peuvent expliquer la dépendance vis à vis du pH de la liaison à l'ARN db, car les chaînes latérales de ces acides aminés ne sont protonées qu'en dessous d'un pH de 6,5 et donc incapables d'interagir avec les phosphates de l'ARN à pH neutre. Un troisième site est important pour la liaison à l'ARN db. Il met en jeu une interaction entre les deux molécules de TLR3 qui s'effectue à l'interface entre les 2 motifs LRR-CT. A ce site, les 2 LRR-CT interagissent principalement par des liaisons hydrophiles essentielles à la liaison avec l'ARN db car elles positionnent correctement les 4 sites de liaison dans le complexe, et rapprochent les deux résidus C-terminaux. Wang et coll. ont montré, à l'aide d'un test Elisa, que la formation d'un complexe stable ARNdb/TLR3 nécessite la coopération des 3 sites de liaisons car ils possèdent individuellement une affinité insuffisante [89].

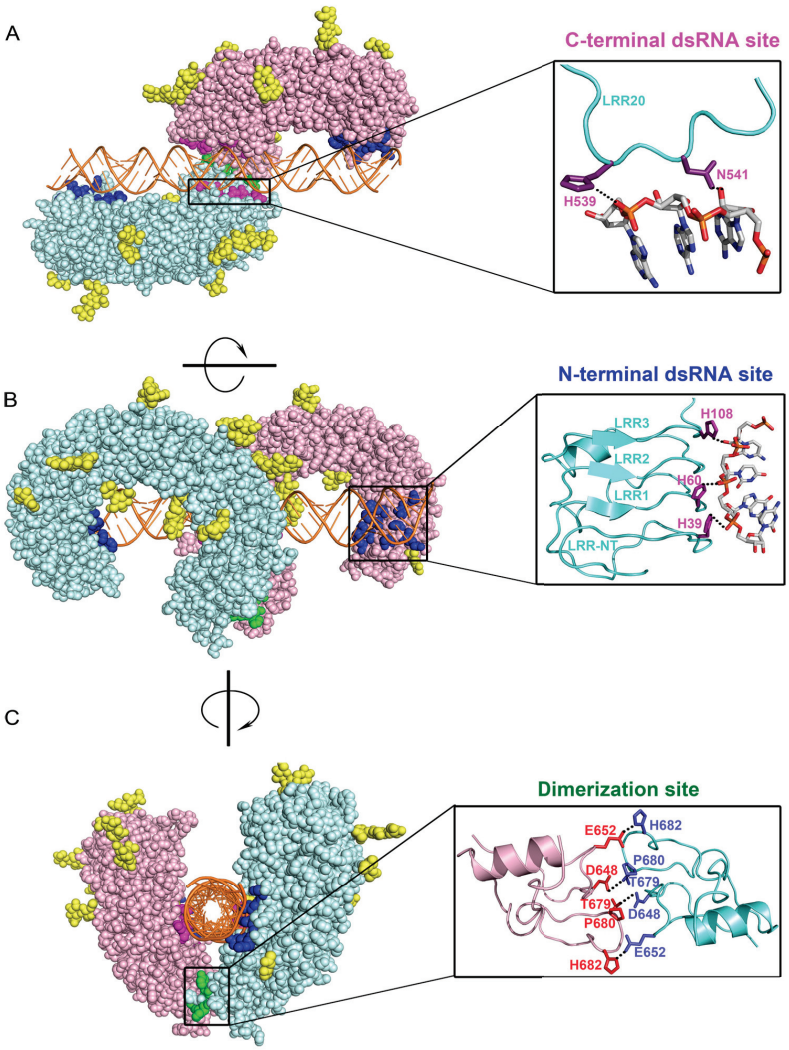

Figure 2.6 – Les trois sites d'intéraction de l'ARN db sur l'ECD de TLR3
Trois projections orthogonales du complexe ECD de TLR3/ARN db sont représentées. (A) Vue du dessus du complexe. Le détail du site C-terminal de liaison à l'ARN db est montré dans l'encart.(B) Vue de profil du complexe. Le détail du site N-terminal de liaison à l'ARN db est montré dans l'encart. (C) Vue de face du complexe dans le grand axe de la double hélice d'ARN. Notez que les deux ECDs de TLR3 ne sont en contact que par un seul site, prés de l'extrémité C-terminale. La dimérisation est montrée en détail dans l'encart. Dans (A-C), les deux ECDs du complexe sont colorés en rose et en bleu, et l'ARN db, sous forme schématique, en orange. Les résidus en contact avec l'ARN db aux sites N-terminaux et C-terminaux sont respectivement de couleur bleue foncée et magenta, et le site de dimérisation en vert. Les N-glycosylations sont colorées en jaune. La numérotation des résidus est issue du cristal (3CIY). D'après [89].

2.2 *Processing of TLR3 by endolysosomal cathepsins generates a signalling cleaved/associated receptor*

Cleavage by cathepsins is required to generate the highly sensitive "cleaved/associated" form of TLR3

Florent Toscano[1,#], Yann Estornes[1,#], François Virard[1], Alejandra Garcia-Cattaneo[2], Audrey Pierrot[1], Béatrice Vanbervliet[1], Kenji Funami[3], Tsukasa Seya[3], Misako Matsumoto[3], Jean-Jacques Pin[4], Toufic Renno[1], Serge Lebecque[1]

1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM UMR1052/CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.

2, Institut Curie, Inserm U932, 12 rue Lhomond, 75005 Paris, France.

3, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo, Japan.

4, DENDRITICS SAS, Bioparc Laennec, 60 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France.

#, these authors contributed equally to this work

Contact: Serge Lebecque; Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM UMR1052/CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France ; phone: 00 33 (0)4 69 16 66 26; fax: 00 33 (0)4 69 16 66 60; serge.lebecque@univ-lyon1.fr

Total character count : 29 907

Running title: Signalling TLR3 as a cleaved/associated receptor

Abstract

Toll Like Receptor 3 belongs to the family of intracellular TLRs that recognize nucleic acids. Localization and maturation of intracellular TLRs play a pivotal role for ligand recognition and signalling, and represent fail-safe mechanisms preventing self nucleic acids recognition. Here we show that endogenous TLR3 is steadily transferred from the Golgi apparatus to the endolysosomal compartments without need for stimulation. Upon arrival in endolysosomes, TLR3 is cleaved by cathepsins at the conserved loop exposed in LRR12. However, dissociated forms of cleaved TLR3 are hardly detectable in cells, as the two fragments remain predominantly associated after cleavage. Comparison of wild-type, non-cleavable and C-terminal only mutants of TLR3 shows that signalling require both the N- and the C-terminal fragments of the receptor and that the cleavage increases significantly the efficiency of TLR3 signalling. Thus, endolysosomal proteolysis generates predominantly a “cleaved/associated” TLR3 that is localized in acidic compartments and poised to respond with high sensitivity to the presence of dsRNA.

Introduction

Toll-like receptors (TLRs) belong to a family of pattern recognition receptors that sense the presence of pathogens and trigger a protective innate immune response (Kawai et Akira, 2010). These germline-encoded type I integral membrane glycoproteins bind their ligands through their extracellular domain (ECD), which is composed of 19-25 leucine-rich repeats (LRRs) (Gay et Gangloff, 2007). In contrast to other members of the family that recognize primarily molecular pattern specific for non-self invaders, TLR3, TLR7, and TLR9 recognize nucleic acids originating not only from microbes but also from the host. To prevent self-polynucleotide recognition and subsequent autoimmune disorders (Barton et Kagan, 2009), several fail-safe mechanisms have been proposed. Ligands must first be recognized by cell surface receptor(s) (Limmon et al., 2008) that mediate their internalization before encountering the corresponding TLR exclusively in the acidic endolysosomal compartment from which signal transduction can be initiated (Barton et al., 2006). Delivery of intracellular TLRs to the endocytic compartments is also tightly regulated by the chaperone Unc93b1 (Tabeta et al., 2006; Kim et al., 2008). Indeed, it has been shown that in resting cells, TLR9 is stocked in the ER and re-localized to acidic compartments only after its ligand is endocytosed (Barton et al., 2006; Leifer et al., 2004; Latz et al., 2004). Finally, processing by pH-dependent proteases such as cathepsins and asparagine endopeptidase (AEP) has emerged as an additional checkpoint for controlling TLR9 trafficking and activation (Ewald et al., 2008; Park et al., 2008; Kasperkovitz et al., 2010), and preliminary data suggest that such a mechanism might apply to TLR3 and TLR7 (Ewald et al., 2011).

Whereas several studies on intracellular TLRs are based on TLR9 trafficking and processing, far less is known regarding TLR3. In particular, TLR3 appears to be dedicated to the recognition of dsRNA (Alexopoulou et al., 2001) and is thought to play an important role in the defense against at least some viruses (Zhang et al., 2007; Matsumoto et al., 2011). Although endogenous mRNA can activate TLR3 *in vitro* (Karikó et al., 2004), its involvement in autoimmune response has not been reported yet. Moreover, crystal structure (Bell et al., 2006; Liu et al., 2008) and mutagenesis (Bell et al., 2006; Watanabe et al., 2007; Fukuda et al., 2006; Fukuda et al., 2008) analysis of TLR3 ECD have revealed that optimal binding depends on the interaction between the negatively charged ribose backbone of dsRNA and the residues of TLR3 dimers located in LRR1 and LRR3, and with a second region formed by LRR19-LRR21 that becomes positively charged in the mildly acidified endolysosomal compartment. This model of ligand recognition contrasts with a mature cleaved form of the receptor recently proposed for TLR9 (Ewald et al., 2011; Ewald et al., 2008; Kasperkovitz et al., 2010; Park et al., 2008).

Thus, it is unclear whether and how endogenous TLR3 is processed, which forms of the receptor can recognize dsRNA, and whether distinct signaling events would emanate from full-length *vs.* cleaved TLR3. In this paper, we have generated and used novel monoclonal antibodies directed against C- and N-terminal epitopes of TLR3 ECD to study the fate of endogenous TLR3. We found that although TLR3 shares several structural, processing and trafficking features with other intracellular TLRs, it also possess specificities that strongly impact on ligand recognition and/or signalling.

Results

New monoclonal antibodies recognize several forms of TLR3

To study endogenous human TLR3, three new monoclonal antibodies (designated as TLR3.1, TLR3.2 and TLR3.3) were raised against the extracellular domain (ECD) of the receptor. First, TLR3.2 and TLR3.3 antibodies were validated in HEK293 cells stably expressing TLR3 tagged with a C-terminal haemagglutinin tag (HEK293-TLR3-HA). In this model, anti-HA, TLR3.2 and TLR3.3 antibodies recognized a ~130 kDa band corresponding to the expected molecular mass of highly glycosylated TLR3 (Fig. 1 A) (Sun et al., 2006). In addition, whereas anti-HA and TLR3.2 antibodies stained a second band at ~72 kDa, TLR3.3 antibody detected a ~60 kDa band (Fig. 1A). Moreover, TLR3.1 monoclonal antibody, which did not allow to detect TLR3 by Western blot, stained by immunofluorescence the receptor in the same way as the anti-HA antibody (Fig. 1 B and Fig. S1 A). To unequivocally identify the different bands revealed by TLR3.2 and TLR3.3 antibodies in Western blot, we mapped the epitopes recognized using 20 single LRR-deleted forms of the ECD of TLR3 (LRR 1 to 11, and 13 to 21) (Takada et al., 2007). Figure 1 C (left panel) shows that TLR3.2 antibody recognizes an epitope present in LRR20, while TLR3.3 binds to an epitope formed by residues present in LRRs 7 and 8 (Fig. 1 C, right panel). We next verified whether similar expression profiles could be observed in human cells of different origins and wondered how treatment with IFN-α, which is known to upregulate the expression of TLR3 (Kaiser et al., 2004), would modify this pattern. We immunoblotted TLR3 from human monocyte-derived dendritic cells (mDC; Fig. 1 D, left panel), from human bronchial epithelial cells transformed by SV40-T antigen (BEAS-2B; Fig. 1 D, middle panel), and from human non-small cell lung cancer

(NSCLC) cell lines (NCI-H292 and NCI-H1703; Fig. 1 D, right panel). The three forms of TLR3 (130 kDa, 72 kDa and 60 kDa) were present in every lysate, but their absolute and relative intensities varied depending on the cells, the antibody used, and the treatment with IFN-α. In basal conditions, all cells expressed mainly 72 kDa and 60 kDa bands. Treatment with IFN-α increased the intensity of the three bands, and allowed the detection of a higher molecular weight form of ~135 kDa (* on Fig. 1 D). Moreover, the TLR3.2 and a commercially available antibody specific for mouse TLR3 (T3.7C3) detected a ~72 kDa band in mouse splenocytes lysate, suggesting that mouse TLR3 was also cleaved (Fig. S1 B). Altogether, our results suggest that endogenous full-length TLR3 (130 kDa) is cleaved to give rise to a N-terminal fragment of 60 kDa recognized by TLR3.3 antibody, and a C-terminal fragment of 72 kDa recognized by TLR3.2 antibody.

The extracellular domain of TLR3 is cleaved into two fragments by cathepsins

To further explore the processing of endogenous TLR3 and its functional consequences, we selected the NCI-H292 and NCI-H1703 NSCLC cell lines, wich triggered an innate immune response when stimulated with the synthetic dsRNA Poly(I:C), as indicated by the activation of ISRE- and NF-KB-dependent luciferase reporter genes (Fig. S2 B, C and D) and cytokines secretions (not shown). We ascertained that this response was exclusively mediated by TLR3 by showing its strict dependence on TRIF, the only known adaptor protein for TLR3 (Fig. S2 B). We started by analysing the effects of the broad-spectrum cathepsin inhibitor Z-FA-fmk on the expression of the different forms of TLR3. After Z-FA-fmk treatment, the intensity of the 130 kDa band increased gradually with time, concomitantly with fading of the 72 kDa and 60 kDa bands, in both NCI-H292 and NCI-H1703 cells (Fig.

2 A and Fig. S 2A). These results show that cathepsins are necessary for TLR3 cleavage. In NCI-H292 cells, the accumulation of full-length TLR3 was observed as early as 120 min after the addition of Z-FA-fmk (Fig. 2 B), while both C-terminal ($TLR3_{C\text{-}ter}$) and N-terminal ($TLR3_{N\text{-}ter}$) TLR3 fragments disappeared with an apparent half-life time ($T_{1/2}$) of over 12h (Fig. 2 A). Of note, Z-FA-fmk induces in both cell lines a shift of $TLR3_{FL}$ from 130 kDa to 135 kDa ($TLR3_{FL+}$) (Fig. 2, A, B and C, and Fig. S2 A), which is more visible after prolonged gel migration (Fig. 2 C). This $TLR3_{FL+}$ could represent the fully glycosylated form of TLR3 before cleavage. Published data regarding the effects of cathepsin inhibitors on TLR3 signalling are contradictory (Ewald et al., 2011; Park et al., 2008). Whereas ISRE- and NF-KB-dependent responses to Poly(I:C) were not modified after prolonged treatment with Z-FA-fmk in NCI-H292 cells (Fig. S2 C), there were significantly but not completely suppressed in NCI-H1703 cells (Fig. S2 D). However, considering the much higher level of TLR3 expression in resting NCI-H292 than NCI-H1703 cells (Fig. 1 D, right panel), the amounts of $TLR3_{C\text{-}ter}$ detected in NCI-H292 cells after 96h of treatment with Z-FA-fmk was still comparable to the basal level in NCI-H1703 cells. Therefore, these results suggest that cleaved TLR3 is important for signalling, even though uncleaved TLR3 might still transduce some signal. Like with Z-FA-fmk treatment, exposure to the lysosomotropic weak base chloroquine, which prevents cathepsin activity, led to the accumulation within 3h of $TLR3_{FL+}$ and to the reciprocal disappearance after 48h of the two TLR3 fragments in NCI-H292 (Fig. 2 D) and NCI-H1703 (Fig. S2 E) cells. Furthermore, short-term blockade of *de novo* protein with cycloheximide confirmed the relative high stability of endogenous $TLR3_{C\text{-}ter}$ (apparent $T_{1/2}$ >24h) (Fig. 2 E) as compared with $TLR3_{FL}$ (apparent $T_{1/2}$ < 4h). Altogether, our data indicate that TLR3 is actively transcribed and rapidly cleaved by cathepsins upon its transfer in

endolysosomes into two highly stable proteolytic fragments.

The N- and C-terminal fragments of TLR3 remain associated after cleavage

To determine whether TLR3 cleavage is followed by dissociation of the two proteolytic fragments, we performed immunoprecipitation with C-terminal specific TLR3.2 and N-terminal specific TLR3.3 antibodies, and analysed the precipitates by immunoblot with the two antibodies. Figure 3 A shows that in all cases $TLR3_{N\text{-}ter}$ and $TLR3_{C\text{-}ter}$ coimmunoprecipitated. These results indicate that $TLR3_{N\text{-}ter}$ remains at least partially associated with $TLR3_{C\text{-}ter}$ after cleavage. We next compared the profiles of TLR3 on Western blot performed with lysates prepared in non-denaturing (protein lysate not reduced neither heated) *vs.* denaturing conditions. In non-denaturing conditions, we detected the 130 kDa band whereas bands corresponding to the proteolytic fragments were barely detectable (Fig. 3 B and Fig. S3). We ensured that non-denaturing conditions did not prevent migration of TLR3 cleaved fragments as a $TLR3_{C\text{-}ter}$ mutant migrated at expected molecular weight (~72 kDa; Fig. 6 C). In contrast, in denaturing conditions, $TLR3_{C\text{-}ter}$ and $TLR3_{N\text{-}ter}$ became clearly visible (Fig. 3 B and Fig. S3), thereby revealing the presence of both uncleaved and "cleaved/associated" TLR3 in cells. Moreover, non-denaturing conditions showed that Poly(I:C) treatment did not lead to the dissociation of $TLR3_{C\text{-}ter}$ and $TLR3_{N\text{-}ter}$. Taken together, our data show that the two fragments of TLR3 remain mostly associated after cleavage and that this association is not disrupted by ligand binding.

TLR3 transits steadily through the Golgi before being cleaved in the endo-lysosomal compartments

Although TLR3, like other intracellular TLRs, depends on the chaperone protein

Unc93b1 for proper trafficking, it is unclear whether its transfer to the endolysosomes occurs constitutively or in response to its ligand. Using TLR3.1 antibody, we observed by immunofluorescence microscopy that TLR3 colocalizes extensively with Lamp1 (a lysosome marker) but not with EEA1 (an early endosome marker) (Fig. 4 A and Fig. S4) in resting cells, and that this distribution remains unchanged after stimulation with dsRNA. TLR3 being a highly glycosylated protein with approximately 35% of its total mass corresponding to N-linked sugars (Sun et al., 2006), we next addressed the trafficking of the different forms of TLR3 by analysing the consequences of treatment with PNGase or EndoH on NCI-H292 cell lysates. When treated with PNGase - which removes all N-glycans - $TLR3_{FL}$ and $TLR3_{FL+}$ shifted from 130 kDa and 135 kDa to 95 kDa, corresponding to the expected molecular mass of non-glycosylated neosynthezised $TLR3_{FL}$ (904 aa), and the $TLR3_{C\text{-}ter}$ band shifted from 72 kDa to 50 kDa (Fig. 4 B). Treatment with EndoH, an endoglycosidase that cleaves N-glycans before their modification in the Golgi apparatus, indicates that $TLR3_{FL}$ is EndoH sensitive while $TLR3_{C\text{-}ter}$ and $TLR3_{FL+}$ (which became visible after treatment with Z-FA-fmk) are EndoH resistant. Consistent with these data, treatment with tunicamycin, which inhibits all *de novo* N-glycosylation in cells, caused the rapid fading of $TLR3_{FL}$ (apparent $T_{1/2}$ < 8h), which was replaced by a band of ~95 kDA representing non-glycosylated full length TLR3 (Fig. 4 C). Altogether, our data indicate that $TLR3_{FL}$ corresponds to the small amounts of TLR3 present in the ER, which in resting cells is steadily translocated to the Golgi, converted into fully-glycosylated $TLR3_{FL+,}$ and exported to the endosomes/lysosomes. There, TLR3 is rapidly cleaved by cathepsins and accumulates as two long-lived associated fragments.

Cleavage generates a fully competent TLR3

To determine which forms of TLR3 are functional, we took advantage of the prolonged stability of cleaved/associated fragments *vs.* $TLR3_{FL}$ revealed by 24h treatment with cycloheximide (Fig. 2 E). To avoid the pleiotropic effects of this drug, we used specific siRNA and could observe that 24h and 48h after transfection, $TLR3_{FL}$ had completely disappeared, while the two cleavage fragments were still abundant (Fig. 5 A and Fig. S5 A). In these conditions, the ISRE-dependent response to Poly(I:C) was not reduced (Fig. 5 B), suggesting that the uncleaved $TLR3_{FL}$ does not contribute significantly to downstream signalling. Notably, ISRE activation was reduced gradually with time as the expression of cleaved TLR3 decreased (Fig. 5, A and B). Similar results were obtained with a NF-KB-dependent reporter gene (Fig. S5 B). These data show that cleaved/associated TLR3 can signal in the absence of uncleaved $TLR3_{FL}$, and may even represent the predominant signalling form of the receptor.

To definitely establish the functionality of both uncleaved and cleaved TLR3, we expressed several mutants of TLR3 in HEK293 cells. First, we ensured that exogenous TLR3 in HEK293 cells behaved like endogenous receptor. Indeed, in this model, TLR3 cleavage was reversed by Z-FA-fmk (Fig. S6 A). Moreover, cycloheximide (Fig. S6 B) and tunicamycin (Fig. S6 C) treatments led to the same modifications of expression as those of the endogenous receptor, both in terms of half-lives of different forms, and of appearance of a non-glycosylated 95 kDa band, respectively (Fig. 2 E and Fig. 4 C). Finally, $TLR3_{C\text{-}ter}$ and $TLR3_{FL+}$ were EndoH-resistant (Fig. S6 D) and, importantly, the two proteolytic fragments remained almost completely associated after cleavage (Fig. S6, E, F and G). Given the apparent molecular mass of deglycosylated $TLR3_{C\text{-}ter}$ and $TLR3_{FL}$ (50 kDa and 95 kDa,

respectively; Fig. 4 B and Fig. S5 D), the highly-conserved insertion within LRR12 (residues 335-342) (Choe et al., 2005; Ranjith-Kumar et al., 2007a; Bell et al., 2005; Botos et al., 2009), that protrudes on the glycosylation-free side of the LRR12, was a likely site for cathepsin-dependent proteolysis. Thus, three mutants were generated. The first mutant lacked the entire LRR12 insertion (TLR3-Ins12-HA), which corresponds to the putative single TLR3 cleavage site. The two others mutants represented N-terminus-deleted TLR3 starting just after the LRR12 insertion (amino acid 346: TLR3-Cter$_{346}$-HA) or at the beginning of LRR13 (amino acid 356: TLR3-Cter$_{356}$-HA), respectively (Fig. 6 A). Immunoblots confirmed that all four constructs were expressed at comparable levels (Fig. 6 B) and staining with TLR3.2 antibody showed that, whereas HEK293 cells transfected with TLR3-WT-HA construct expressed TLR3$_{FL}$, TLR3$_{C\text{-}ter}$, and TLR3$_{N\text{-}ter}$, cells transfected with TLR3-Ins12-HA expressed a single 130 kDa band, indicating that the LRR12 insertion is indeed required for TLR3 to be cleaved and that TLR3-Ins12-HA is a non-cleavable form of the receptor. As expected, lysates from TLR3-Cter$_{356}$-HA or TLR3-Cter$_{346}$-HA transfected cells contained a single form of ~72 kDa, whose size is consistent with the predicted length of each construct (Fig. 6 B). Importantly, in non-denaturing conditions, like for the endogenous protein in NSCLC cells (Fig. 3 B), TLR3$_{C\text{-}ter}$ was hardly detectable in TLR3-WT-HA transfected cells (Fig. 6 C). We also observed that treatment with Poly(I:C) did not modify the processing of TLR3, and particularly did not induce the cleavage of TLR3-Ins12-HA (Fig. 6 D).

When expressed in HEK293 cells, the non-cleavable form of the receptor showed a reduced capacity to activate ISRE- and NF-kB-dependent transcription in response to 10 µg/ml of Poly(I:C) (Fig. 6 E) compared with wild-type TLR3. Moreover, TLR3-Cter$_{356}$-HA was unable to activate either pathway, while TLR3-Cter$_{346}$-HA

triggered a modest NF-KB-dependent response, but no ISRE-dependent response. To take a closer look at the signalling ability of the non-cleavable form of the receptor, we next compared the levels of ISRE-dependent transcription in HEK293 cells transfected with TLR3-WT-HA or TLR3-Ins12-HA in response to increasing concentrations of either Low Molecular Weight (LMW) Poly(I:C) or Poly(A:U) (Fig. 6 F). The dose-responses showed that Poly(I:C) is a stronger activator than Poly(A:U) with both wild-type and non-cleavable TLR3. However, the shift (by about one log) to the right of the two curves with non-cleavable TLR3 confirmed its lower sensitivity to dsRNA. Moreover, the maximal response was higher in cells transfected with wild-type TLR3. Both cleaved forms of the receptor remained inactive with all doses of the two ligands (data not shown). Taken together, these results show that whereas, in agreement with a previous report (Ranjith-Kumar et al., 2007b), uncleaved TLR3 can generate a response to dsRNA, the cleaved/associated receptor (generated from wild-type TLR3) most efficiently activates both NF-KB and ISRE pathways. In the almost absence of detection of $TLR3_{FL}$ or free TLR3 C-terminal fragment in resting cells, cleaved/associated TLR3 therefore represents the predominant form of the functional endogenous receptor.

Discussion

Remarkable progress has been made recently in our understanding of the biology of nucleic acid sensing TLRs 3, 7, and 9. Notably, several data now suggest a model in which exogenous nucleotides can be recognized with high sensitivity while self-nucleotide-induced signalling and autoimmunity are prevented (Barton et Kagan, 2009). Discrimination between non-self *vs.* self nucleotides appears to be facilitated by several levels of regulation: 1/ ligands cannot be detected at the cell surface but have to be internalized into intracellular acidic compartments to meet their respective TLRs (Limmon et al., 2008; Barton et al., 2006); 2/ low endolysosomal pH increases the affinity of TLR3 and TLR9 for their ligands (de Bouteiller et al., 2005); 3/ the Unc93b1 chaperone protein is crucial for relocalization of TLR7 and TLR9 from ER to endosomes after exposure to their respective ligands (Tabeta et al., 2006; Kim et al., 2008; Barton et al., 2006; Leifer et al., 2004; Latz et al., 2004); 4/ cleavage of TLR9 in endolysosomes is required to generate the C-terminal fragment of the receptor that binds dsDNA with high affinity and signals. Preliminary results have indicated that this last mechanism might also apply to TLR3 and TLR7 (Ewald et al., 2011). Our data allow us to propose a new model for TLR3 biology (presented on Figure 7) where processing and trafficking both contribute to a tight control of dsRNA recognition and signalling allowing sensitive detection of non-self dsRNA while preventing autoimmune reactivity.

The streamlined transfer to endolysosomes and cleavage of TLR3 explains why fragments of endogenous TLR3 were abundant while $TLR3_{FL}$ was difficult to detect in all resting cell types analysed. In contrast, similar amounts of full-length and cleaved TLR3-WT were observed in HEK293 transfected cells. The relative accumulation of

uncleaved TLR3 resulted possibly from the imbalance between the high amounts of transfected TLR3 and the limiting availability of Unc93b1 in HEK293 cells. Moreover, the half-lives of transfected TLR3 fragments were shorter compared with native TLR3 (compare Figure S6A with Figure 2A). Although the molecular explanations are still missing, these differences between transfected *vs.* endogenous TLR3 should be kept in mind when studying the biology of endosomal TLRs. Notably, the LRR12 external loop (residues 335-343) that is the target of a single-cut proteolysis by cathepsins has been strongly conserved during evolution, suggesting that cleavage is an important step in the biology of mammals TLR3 (Ranjith-Kumar et al., 2007).

TLR3 processing could conceivably increase or decrease the sensitivity of the receptor and/or modify its specificity for different ligands. Interestingly, our functional studies revealed that the cleavage increases significantly the sensitivity of TLR3 to dsRNA. Indeed, the cleaved/associated form of TLR3 required about ten fold less dsRNA to trigger an innate immune response, and the maximal response was stronger. Moreover, the increase of sensitivity of the cleaved/associated TLR3 was observed with the 3 forms of dsRNAs tested - HMW Poly(I:C), LMW Poly(I:C) and Poly(A:U) - suggesting that cleavage was not associated with a shift in TLR3 ligand specificity. Although not detected within 2 hours in our kinetic experiments, it remains possible that the cleavage could exert some negative feedback on TLR3 signalling, i.e. by accelerating the degradation of the receptor after dsRNA binding. The lack of appropriate ligand prevented us from visualizing directly TLR3 bound to dsRNA. However, the physical association of TRIF with $TLR3_{C\text{-}ter}$ but not $TLR3_{FL}$ after activation with Poly(I:C) in NCI-H292 cells (submitted manuscript), combined with the absence of free $TLR3_{C\text{-}ter}$ in those cells, indicate that cleaved/associated TLR3 is the main form of the receptor recognizing Poly(I:C). We also found that transfected non-

cleavable TLR3 has the capacity to trigger a weaker and more restricted signal than wild-type TLR3 in response to higher concentrations of Poly(I:C). Yet, the physiological importance of recognition of dsRNA by $TLR3_{FL}$ remains unclear, as $TLR3_{FL}$ is completely Endo-H sensitive and therefore not present in the endolysosomal compartment where the encounter with dsRNA is known to occur (de Bouteiller et al., 2005). Our data establish that cleavage strongly increases the sensitivity of TLR3 and its response to Poly(I:C). The requirement for TLR3 to remain associated for efficient signalling remains perplexing. Thus, cleavage could somehow increase the affinity of the ECD for its ligands or ease the conformational change that occurs in the presence of dsRNA (Fukuda et al., 2006) and that may facilitate the recruitment of TRIF.

The central role of “cleaved/associated” TLR3 underscores the importance for dsRNA binding affinity and sensitive signalling of two distinct ligand-binding sites present each on one proteolytic fragment. Moreover, the increased sensitivity and remarkable stability of this form of the receptor allows integrating and reconciling some apparently discordant results from the literature (Ewald et al., 2011; Park et al., 2008). Indeed, one group reported the absence of inhibition of TNF production by RAW macrophages treated for 12h with cathepsin inhibitors and then for 2h with 100 µg/ml of Poly(I:C) (Park et al., 2008) whereas another group showed a strong suppression of TNF production by the same cells in response to 1 µg/ml of Poly(I:C) (Ewald et al., 2011). These different outcomes may be due to differences in the concentration of ligand used, with high concentrations of dsRNA being able to activate the less efficient $TLR3_{FL}$. In addition, our data show that 12h of Z-FA-fmk pretreatment is not sufficient to suppress the expression of TLR3 fragments in NSCLC cells, suggesting that lack of inhibition by Z-FA-fmk of cells activated with

moderate concentrations of poly(I:C) could have resulted from the persistence of some cleaved/associated TLR3 at the time of stimulation.

Our new model for TLR3 biology shows significant differences with the one proposed for TLR9 (Park et al., 2008; Ewald et al., 2008). In contrast to TLR9, which has been reported to reside principally in the ER in resting cells (Leifer et al., 2004) and to reach the acidic compartments after DNA stimulation (Tabeta et al., 2006; Kim et al., 2008; Barton et al., 2006; Latz et al., 2004), TLR3 appears to be continuously exported from the ER to the Golgi and to accumulate in the endolysosomal compartments, both in untreated and dsRNA treated cells. Following transfer to the endolysosomal compartment, TLR3 undergoes a single cleavage by cathepsins in the short (9 amino acids) LRR12 external loop, while AEP first cleave the long (30 amino acids) LRR14-15 flexible loop of TLR9 that is secondarily trimmed by cathepsins (Park et al., 2008; Ewald et al., 2008; Ewald et al., 2011; Kasperkovitz et al., 2010; Sepulveda et al., 2009). The two long-lived fragments of TLR3 remain essentially associated to bind dsRNA and form the predominant signalling receptor located in lysosomes. In contrast, even though some TLR9 fragments could also remain associated (Park et al., 2008), the C-terminal fragment of the receptor is viewed as the major form of the functional receptor, binding agonist CpG ODNs with high affinity and being able to recruit the adaptor protein Myd88 (Park et al., 2008; Ewald et al., 2008).

TLR3 provides the first example, to our knowledge, of receptor maturation by cleavage and conversion into a “cleaved/associated” form of the protein. Further work are now required to evaluate the consequences of the newly discovered features of TLR3 on its functions *in vivo* and to determine to which extent some aspects of TLR3 biology might also apply to the other endolysosomal TLRs.

Materials and methods

Cell culture and reagents

HEK293 and HEK293-TLR3-HA cells (Invivogen) were grown in DMEM medium (Invitrogen Life Sciences) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. Human bronchial epithelial cell line BEAS-2B (Sigma-Aldrich) was cultured in LHC-9 medium (Invitrogen) in bovine collagen type I (Invitrogen) and fibronectin (Sigma) coated dishes. CD14+ monocytes were purified from peripheral blood of healthy donors: peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from human peripheral blood by standard density gradient centrifugation on PANCOLL (PAN-Biotech), then mononuclear cells were separated from peripheral blood lymphocytes on a 50% Percoll solution (GE Healthcare). Monocytes were then enriched by one step of adherence, and differentiated in immature dendritic cells (DC) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 200 ng/ml human GM-CSF (kind gift of Schering-Plough) and 50 ng/ml human rIL4 (R&D Systems) during 6 days. NCI-H292 and NCI-H1703 NSCLC cell lines (ATCC), were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Sigma), HEPES, NaPy, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. IFN-α was from Schering-Plough. z-FA-fmk, chloroquine, tunicamycin and cycloheximide were from Sigma-Aldrich. Poly(I:C)-HMW and Poly(I:C)-LMW were purchased from Invivogen. Poly(A:U) was from Innate Pharma. Mouse monoclonal IgG1 anti-actin antibody was from MP Biomedicals. T3.7C3 anti-TLR3 antibody was a gift from Nadège Goutagny (CRCL, Lyon, France). HRP-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody was from Jackson ImmunoResearch.

TLR3.2 and TLR3.3 antibodies preparation and purification

Balb/C mice were immunized with recombinant human TLR3 ECD (rhTLR3, R&D Systems), by 3 intraperitoneal injections of the immunogen in the presence of Freund's adjuvant, and a final intravenous boost, 3 days before spleen isolation. Splenic cells were fused with SP20 myeloma cell line in the presence of PEG. Hybridoma supernatants were screened by immunofluorescent staining of pUNO-hTLR3-HA and pUNO-hTLR3-V5 transiently transfected 293T cells with Exgen 500 (Euromedex) and fixed with acetone. Only clones recognizing both transfected cells were selected.

Western blotting

Cells were lysed in cold lysis buffer (20 mM Tris-HCL [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.2% Nonidet NP40, supplemented with 1 mM orthovanadate, 10 mM NaF and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) for 25 min on ice. Cell lysates were cleared by centrifugation (13,000 g for 10 min at 4℃) and pro tein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Protein lysates were denatured or not in Laemmli buffer containing 1% SDS and 5 mM DTT, and heated at 95℃ during 5 minutes. For PNGase/EndoH digestions, lysates were treated as described by the manufacturer (New England Biolabs). Proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred onto pvdf membranes by electroblotting and non-specific binding sites were blocked using Tris-Buffered Saline containing 0.1% Tween-20 and 5% (w/v) dry milk. After incubation with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, blots were revealed using the ECL (GE healthcare) or SuperSignal (Thermo Scientific) reagents.

Immunofluorescence

Cells were washed with PBS, fixed with 4% formaldehyde for 10 min at room temperature, and washed 3 times with PBS. Cells were then blocked using Image-iT® FX signal enhancer (lifes technologies) for 30 min at room temperature and washed once with PBS. Below this point every washing steps were done using TBS. Cells were incubated 1 hour at room temperature with TLR3.1, anti-HA, EEA1 or Lamp1 primary antibodies. After washing three times, cells were incubated for 30 min at room temperature with secondary antibodies (goat anti mouse Alexa 488 and goat anti rabbit Alexa 555 or633; lifes technologies). Cells were washed again 3 min each. Cover slips were air-dried and then mounted on in Prolong gold antifade reagent with DAPI (lifes technologies). Images of HEK293-TLR3-HA were acquired on a confocal microscope LEICA TCS-SP2, X63 Leica HLX PL APO 1.32NA oil immersion lens or a ZEISS Axiovert100M LSM510 with 63x 1.4NA plan-apochromat oil immersion lens. Image Noise was reduced using despeckle FIJI filter.

DNA cloning

Preparation of LRR1-11 and 13-21 deletion mutants had been previously described (Takada et al., 2007).

For TLR3-Ins12-HA mutant, mutagenesis was performed using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and primer pairs containing deletion of 24 nucleotides (5'-CTGAATTTGAAACGGTCTTTTACTCTCCCCAAGATTGATGATTTTTCT-3' (forward) and 5'-AGAAAAATCATCAATCTTGGGGAGAGTAAAAGACCGTTTCAAATTCAG-3'

(reverse)). Ten ng of plasmid DNA and 125 ng of primers were used according to the manufacturer. Two colonies from each library were sequenced.

For TLR3-Cter$_{356}$-HA mutant, LRR deletion mutants of TLR3 (A_{22}–K_{356}) were generated by PCR with Phusion (finnzyme) using appropriate primers (5'-TGTTTGGAGCACCTTAACATGGAAG 3' (forward) and 5' GGTGGAGGATGCACACAGCATCCCA 3' (reverse)). PCR was performed with the following cycling conditions: 10 s at 98℃, 2 min at 72℃ for 25 cycles. The PCR product was treated with DpnI to digest the template DNA, and phosphorylated with T4 PNK (New England Biolabs), then ligated using a DNA Ligation kit (New England Biolabs). Deletion constructs were sequenced.

TLR3-Cter$_{346}$ was provided by P. Bénaroch (Curie Institute, Paris, France).

RNA interference

Synthetic TRIF (L-012833-00-0005) and Control non-silencing (D-001810-03-20) siRNAs were from Dharmacon. TLR3 Stealth RNAi siRNA (TLR3HSS110816) was from Invitrogen. siRNAs mix were prepared in OptiMEM medium (Invitrogen) and cells in suspension were transfected using HiPerFect reagent (Qiagen), as described by manufacturer. The final siRNAs concentrations were 25 nM. Transfected cells were seeded in 6-well plates or 96-well white plates (Greiner) and incubated for 24h. Medium was then replaced by fresh complete medium and cells were incubated for 48 h before Poly(I:C) treatment.

ISRE- and NF-KB-luciferase reporter cell lines generation

HEK293, NCI-H292 and NCI-H1703 cells were transduced with luciferase ISRE- or NF-KB-reporter lentiviruses (SABiosciences) according to the manufacturer's recommendations, and transduced cells were selected with puromycin.

Reporter luciferase assays

Cells were seeded in white 96-well plates (10 000 cells / well), and 24 hours later were treated with 10 ug/ml Poly(I:C) in 50 ul medium for 4 or 6 hours according to cell lines. Then, 50 ul Steady Glow reactive (Promega) was added to each well before reading luminescence with a TECAN Infinite 200 microplate reader using I-Control software (Tecan).

Transient expression in HEK293 cells

Cells were seeded in 100 mm dishes to reach ~70% confluence on the day of transfection. Cells were transfected either with pUNO, TLR3-WT-HA, TLR3-Ins12-HA, TLR3-$Cter_{356}$-HA or TLR3-$Cter_{346}$-HA by incubating 8 ul of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 8 ug of plasmid in 6 ml of OptiMEM medium during 5 hours, then OptiMEM was replaced by fresh medium. 24 h after transfection, cells were trypsinized and seeded in 96-well white plates and 6-well plates, and then incubated during 24 h.

Co-immunoprecipitation

Cells were cultured in 150 mm dishes, collected, washed in PBS and lysed in 750µl cold lysis buffer (20 mM Tris-HCL [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.2% Nonidet NP40, supplemented with 1 mM orthovanadate, 10 mM NaF and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) for 25 min on ice. Cell lysates were cleared by centrifugation (13,000 g for 10 min at 4℃). Lysates were pre-clea red with 50 µl Sepharose-6B (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 4℃ and then immunopr ecipitated overnight at 4℃ with 5 µg of either mouse anti-TLR3.2, TLR3.3 or control IgG1 (R&D systems) antibodies and the following day in the presence of 20 µl protein G-Sepharose for 3 hours at 4℃. Beads were recovered by centrifugation, and immunoprecipitates were extensively washed with lysis buffer and eluted with Laemmli buffer containing 1% SDS and 5 mM DTT and heated at 95℃ during 10 minutes.

TLR3 ECD modelisation

MacPyMol (DeLano Scientific) was used to generate TLR3 structure figure (PDB:1ZIW)

Statistical analysis

Statistical significance was determined using the Student *t* test (* $p < 0.05$).

Acknowledgements

We thank Philippe Benaroch for its intellectual and material contribution, Olivier Micheau (Bourgogne University) for critical reading of the manuscript and Sebastian Amigorena for discussions. Supported by Cancéropôle Lyon-Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FT, YE, FV, AGC, TS, MM, TR and SL designed the experiments. FT, YE, FV, AGC, AP, BV, KF and JJP performed experiments and data analysis. FT, YE, FV, TR and SL wrote the paper with all authors providing detailed comments and suggestions. SL directed the project.

FT and YE contributed equally to this work.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

References

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., et Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Barton, G. M., Kagan, J. C., et Medzhitov, R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7, 49-56.

Barton, G. M., et Kagan, J. C. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol 9*, 535-542.

Bell, J. K., Askins, J., Hall, P. R., Davies, D. R., et Segal, D. M. 2006. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *PNAS* 103, 8792 -8797.

Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D. M., et Davies, D. R. 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *PNAS* 102, 10976 -10980.

Botos, I., Liu, L., Wang, Y., Segal, D. M., et Davies, D. R. 2009. The Toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *BBA* 1789, 667-674.

Choe, J., Kelker, M. S., et Wilson, I. A. 2005. Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science* 309, 581 -585.

de Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U. A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Bates, E. E. M., et Caux, C. 2005. Recognition of Double-stranded RNA by

Human Toll-like Receptor 3 and Downstream Receptor Signaling Requires Multimerization and an Acidic pH. *J. Biol. Chem.* 280, 38133 -38145.

Ewald, S. E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogyo, M., et Barton, G. M. 2011. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.*. Available at: http://jem.rupress.org/content/early/2011/03/09/jem.20100682.abstract.

Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G.-P., Chapman, H. A., et Barton, G. M. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658-662.

Fukuda, K., Tsujita, T., Matsumoto, M., Seya, T., Sakiyama, H., Nishikawa, F., Nishikawa, S., et Hasegawa, T. 2006. Analysis of the interaction between human TLR3 ectodomain and nucleic acids. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 50, 249 -250.

Fukuda, K., Watanabe, T., Tokisue, T., Tsujita, T., Nishikawa, S., Hasegawa, T., Seya, T., et Matsumoto, M. 2008. Modulation of Double-stranded RNA Recognition by the N-terminal Histidine-rich Region of the Human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 283, 22787 -22794.

Gay, N. J., et Gangloff, M. 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem*. 76, 141-165.

Kaiser, W. J., Kaufman, J. L., et Offermann, M. K. 2004. IFN-α Sensitizes Human Umbilical Vein Endothelial Cells to Apoptosis Induced by Double-Stranded RNA. *J. Immunol.* 172, 1699 -1710.

Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., et Weissman, D. 2004. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 12542 -12550.

Kasperkovitz, P. V., Cardenas, M. L., et Vyas, J. M. 2010. TLR9 Is Actively Recruited to Aspergillus fumigatus Phagosomes and Requires the N-Terminal Proteolytic Cleavage Domain for Proper Intracellular Trafficking. *J. Immunol.* 185, 7614 -7622.

Kawai, T., et Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E., et Ploegh, H. L. 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234-238.

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., et Golenbock, D. T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190-198.

Leifer, C. A., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M. J., et Segal, D. M. 2004. TLR9 Is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. *J. Immunol.* 173, 1179 -1183.

Limmon, G. V., Arredouani, M., McCann, K. L., Minor, R. A. C., Kobzik, L., et Imani, F. 2008. Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *The FASEB Journal* 22, 159 -167.

Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., Segal, D. M., et Davies, D. R. 2008. Structural basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with double-stranded RNA. *Science* 320, 379-381.

Matsumoto, M., Oshiumi, H., et Seya, T. 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev. Med. Virol.* 21, 67-77.

Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y.-M., et Ploegh, H. L. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9, 1407-1414.

Peter, M. E., Kubarenko, A. V., Weber, A. N. R., et Dalpke, A. H. 2009. Identification of an N-Terminal Recognition Site in TLR9 That Contributes to CpG-DNA-Mediated Receptor Activation. *J. Immunol.* 182, 7690 -7697.

Ranjith-Kumar, C. T., Miller, W., Xiong, J., Russell, W. K., Lamb, R., Santos, J., Duffy, K. E., Cleveland, L., Park, M., Bhardwaj, K., et al. 2007. Biochemical and Functional Analyses of the Human Toll-like Receptor 3 Ectodomain. *J. Biol. Chem.* 282, 7668 -7678.

Sepulveda, F. E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L., et Manoury, B. 2009. Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells. *Immunity* 31, 737-748.

Sun, J., Duffy, K. E., Ranjith-Kumar, C. T., Xiong, J., Lamb, R. J., Santos, J., Masarapu, H., Cunningham, M., Holzenburg, A., Sarisky, R. T., et al. 2006. Structural and Functional Analyses of the Human Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 281, 11144 -11151.

Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7, 156-164.

Takada, E., Okahira, S., Sasai, M., Funami, K., Seya, T., et Matsumoto, M. 2007. C-terminal LRRs of human Toll-like receptor 3 control receptor dimerization and signal transmission. *Molecular Immunology* 44, 3633-3640.

Watanabe, T., Tokisue, T., Tsujita, T., Matsumoto, M., Seya, T., Nishikawa, S., Hasegawa, T., et Fukuda, K. 2007. N-terminal Binding Site in The Human Toll-like Receptor 3 Ectodomain. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 51, 405 -406.

Zhang, S., Jouanguy, E., Sancho□Shimizu, V., Von Bernuth, H., Yang, K., Abel, L., Picard, C., Puel, A., et Casanova, J. 2007. Human Toll□like receptor□dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol. Rev.* 220, 225-236.

Figure legends

Figure 1. New monoclonal antibodies recognize several forms of TLR3. (A) Immunoblot analysis of HEK293 cells stably expressing an empty vector (EV) or TLR3-HA; lysates were analyzed with monoclonal anti-HA, TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. (B) Immunocytochemistry of HEK293 cells stably expressing TLR3-HA; cells were stained with anti-HA and TLR3.1 antibodies followed by DAPI nuclear staining (blue). (C) Left panel: Epitope mapping of TLR3.2 and TLR3.3 antibodies on HEK293 cells stably transfected with TLR3 mutants carrying LRR deletions (1 to 11 and 13 to 21). Lysates were analyzed with monoclonal TLR3.2, TLR3.3 and anti-Flag antibodies. Right panel: Schematic representation of epitopes recognized by TLR3.2 and TLR3.3 antibodies on TLR3 ECD. (D) Immunoblot analysis of mDC, BEAS-2B, NCI-H292 and NCI-H1703 cells treated or not for 18h with IFN-α (1000 IU/ml); lysates were analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. NS: Non specific. Values represent molecular weights (kDa). Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 2. The extracellular domain of TLR3 is cleaved into two fragments by cathepsins. (A) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated during indicated times with Z-FA-fmk (20 uM) renewed every 24h. Lysates were analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. (B) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated during indicated times with Z-FA-fmk (20 uM). Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (C) Immunoblot analysis of NCI-H292 and NCI-H1703 cells treated during 24h with Z-FA-fmk (20 uM). Lysates were analyzed with TLR3.2 antibody. (D) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated during indicated times with chloroquine (1 ug/ml). Lysates were analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-

actin antibodies. (E) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated during indicated times with cycloheximide (1.5 ug/ml) for 24h. Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights (kDa). Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 3. The N- and C-terminal fragments of endogenous TLR3 fragments remain associated after cleavage. (A) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells. Lysates were immunoprecipitated with IgG1, TLR3.2 or TLR3.3 antibodies, and analyzed with TLR3.2 and TLR3.3 antibodies. (B) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated with Poly(I:C) (10 ug/ml) for indicated times. Lysates were denatured or not and then analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 4. TLR3 transits through the Golgi before being cleaved in the endo-lysosomal compartments. (A) Immunocytochemistry of NCI-H292 cells treated during indicated times with Poly(I:C) (10 ug/ml) and then stained with Lamp1, EEA1 and/or TLR3.1 antibodies followed by DAPI nuclear staining (blue). (B) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated or not with Z-FA-fmk (20 uM) for 24h. Lysates were untreated (-) or treated with PNGase (P) or endoH (E), and then analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (C) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated during indicated times with tunicamycin (1 ug/ml). Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 5. $TLR3_{FL}$ is not required to a complete signalling. (A) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells at indicated times after non silencing (-) or TLR3 (+) siRNAs transfections (25 uM). Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin

antibodies. (B) ISRE reporter assay in NCI-H292 cells at indicated times after non silencing (-) or TLR3 (+) siRNAs transfections (25 uM) and treatment without or with Poly(I:C) (10 ug/ml) for 4 h. *: $p < 0.05$ comparing untreated with Poly(I:C)-treated conditions (B). Data are representative (A) or mean (B) of three independent experiments. Error bars (B) represent SEM.

Figure 6. Cleavage generates a fully competent TLR3. (A) Left panel: Modelisation of the putative location of the cleavage on LRR12 and TLR3 sequence with (in red) starting points of TLR3-$Cter_{356}$ and TLR3-$Cter_{346}$ mutants and deleted sequence (aa305-342) of TLR3-Ins12. Blue framework: LRR12 loop1. Right panel: Schematic representation of TLR3 mutants. (B) Immunoblot analysis of HEK293 cells transfected with empty vector (EV), TLR3-WT-HA (WT), TLR3-Ins12-HA (Ins12), TLR3-$Cter_{356}$-HA ($Cter_{356}$) or TLR3-$Cter_{346}$-HA ($Cter_{346}$). Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (C) Immunoblot analysis of HEK293 cells transfected with TLR3-WT-HA (WT), TLR3-Ins12-HA (Ins12), TLR3-Cter356-HA (Cter356) or TLR3-Cter346 (Cter346). Lysates were denatured (D) or not (ND) and then analyzed with TLR3.2 and TLR3.3 antibodies. (D) Immunoblot analysis of HEK293 cells transfected with empty vector (EV), TLR3-WT-HA (WT) or TLR3-Ins12-HA (Ins12), and then treated without (-) or with (+) Poly(I:C) (10 ug/ml) for 4 h. Lysates were analyzed with anti-HA, TLR3.3 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights (kDa). (E) ISRE (left panel) and NF-KB (right panel) reporter assay in HEK293 cells transfected with TLR3-WT-HA, TLR3-Ins12-HA, TLR3-$Cter_{356}$-HA or TLR3-$Cter_{346}$-HA, and then treated without (white) or with (black) Poly(I:C) (10 ug/ml) for 6 h. (F) ISRE reporter assay in HEK293 cells transfected with TLR3-WT-HA or TLR3-Ins12-HA, and then treated with indicating concentrations of Poly(I:C))-LMW or Poly(A:U) for 6 h. Data are representative of at least three

independent experiments. *: $p < 0.05$ comparing untreated with Poly(I:C)-treated conditions (E). Data are representative (B, C and D) or mean (E and F) of at least three independent experiments. Error bars (E and F) represent SEM.

Figure 7. Model proposed of TLR3 processing. TLR3 is neosynthezised and N-glycosylated in the ER (1). Then, probably chaperonned by unc93b1, it crosses the Golgi apparatus where it is fully glycosylated to become EndoH-resistant (2). TLR3 exits the Golgi to enter the endosome membrane (3) where it is cleaved by cathepsins (4). The two proteolytic fragments remain associated to fully signal (5).

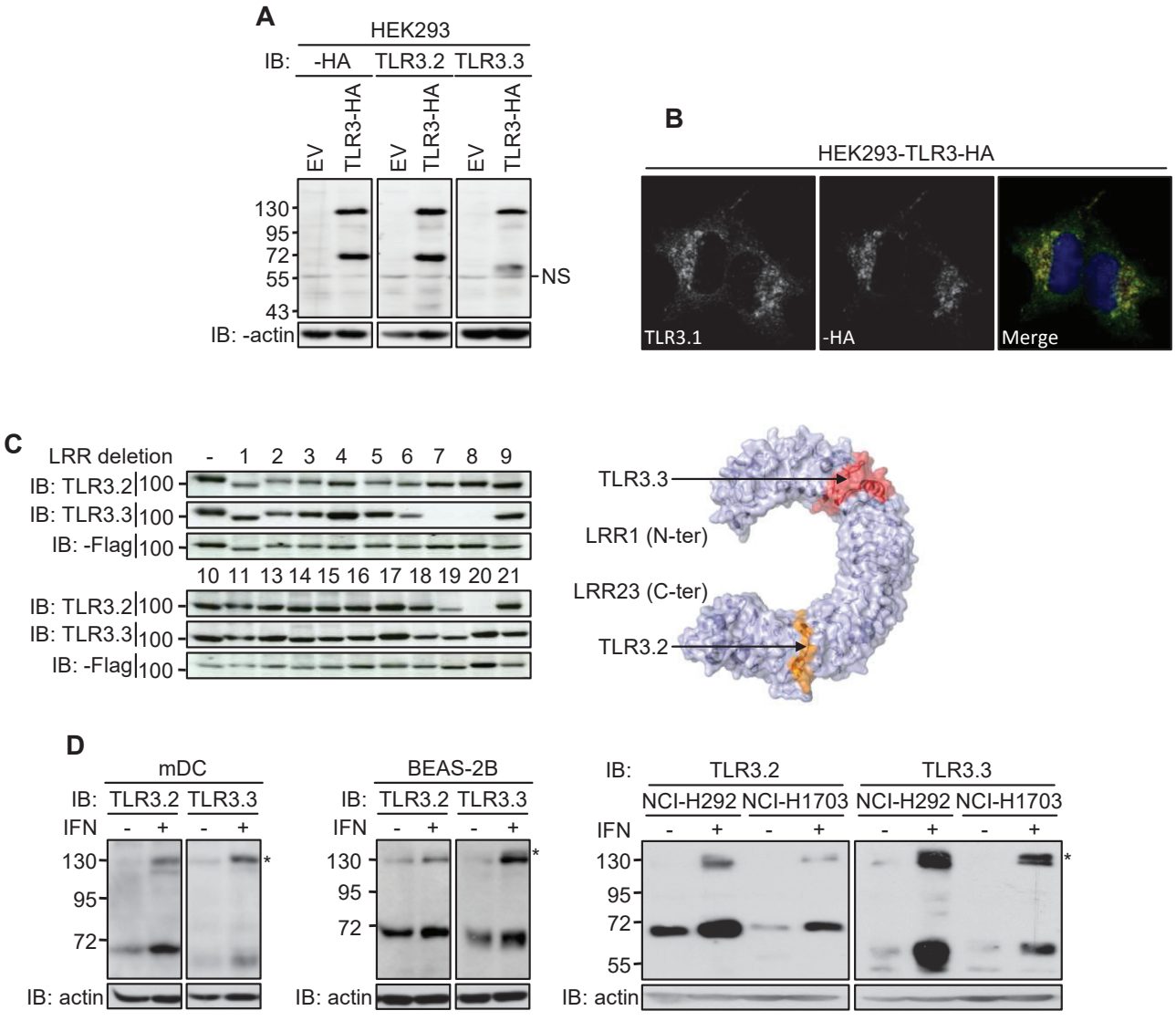
A
HEK293
IB:
-HA
TLR3.2
TLR3.3
EV
TLR3-HA
130
95
72
55
43
NS
IB: -actin
B
HEK293-TLR3-HA
TLR3.1
-HA
Merge
C
LRR deletion
IB: TLR3.2
IB: TLR3.3
IB: -Flag
TLR3.3
LRR1 (N-ter)
LRR23 (C-ter)
TLR3.2
D
mDC
BEAS-2B
IFN
IB: actin
NCI-H292
NCI-H1703

Figure 1

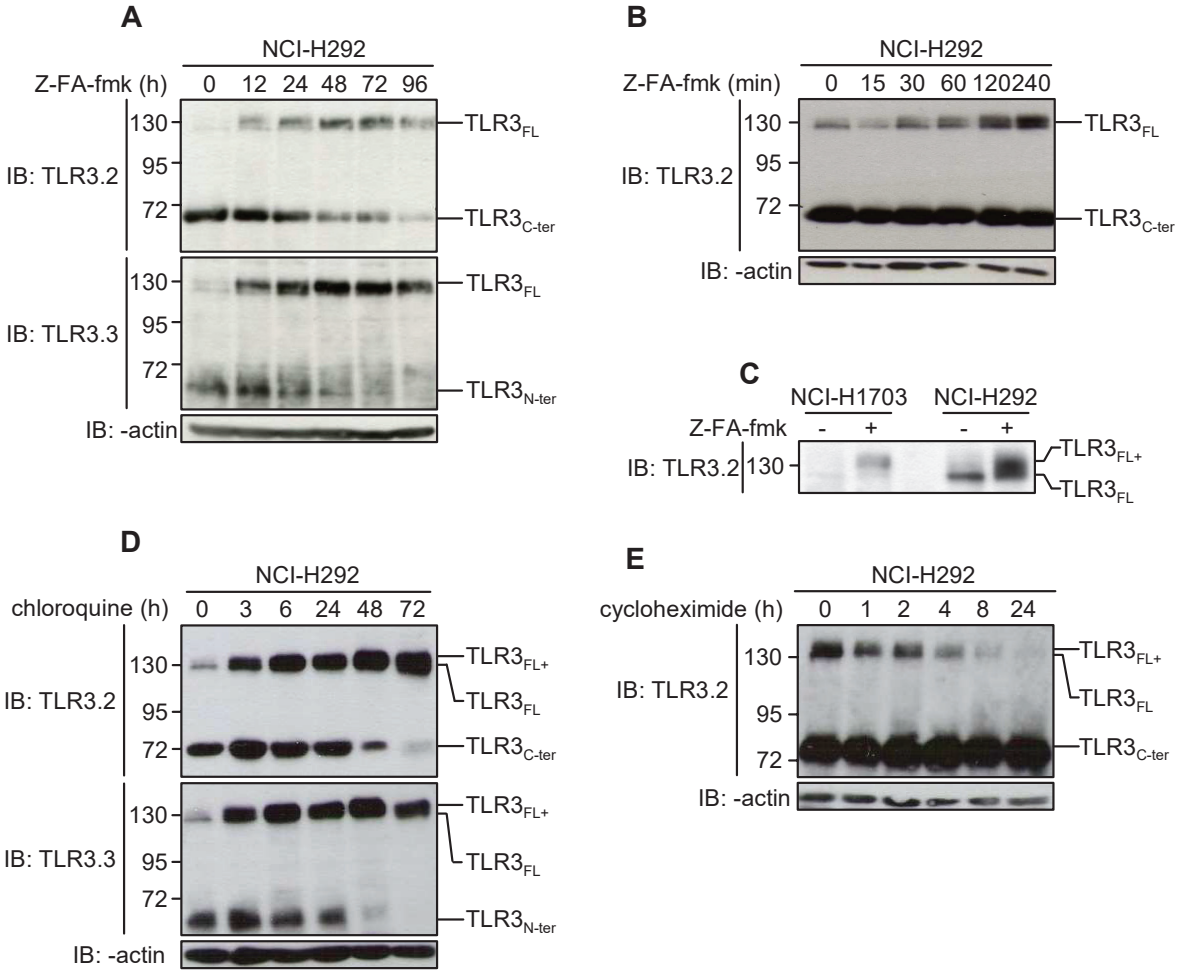
A
NCI-H292
Z-FA-fmk (h)
0 12 24 48 72 96
130
95
72
IB: TLR3.2
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: TLR3.3
TLR3FL
TLR3N-ter
IB: -actin
B
NCI-H292
Z-FA-fmk (min)
0 15 30 60 120240
130
95
72
IB: TLR3.2
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: -actin
C
NCI-H1703
NCI-H292
Z-FA-fmk
- + - +
IB: TLR3.2
130
TLR3FL+
TLR3FL
D
NCI-H292
chloroquine (h)
0 3 6 24 48 72
130
95
72
IB: TLR3.2
TLR3FL+
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: TLR3.3
TLR3FL+
TLR3FL
TLR3N-ter
IB: -actin
E
NCI-H292
cycloheximide (h)
0 1 2 4 8 24
130
95
72
IB: TLR3.2
TLR3FL+
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: -actin

Figure 2

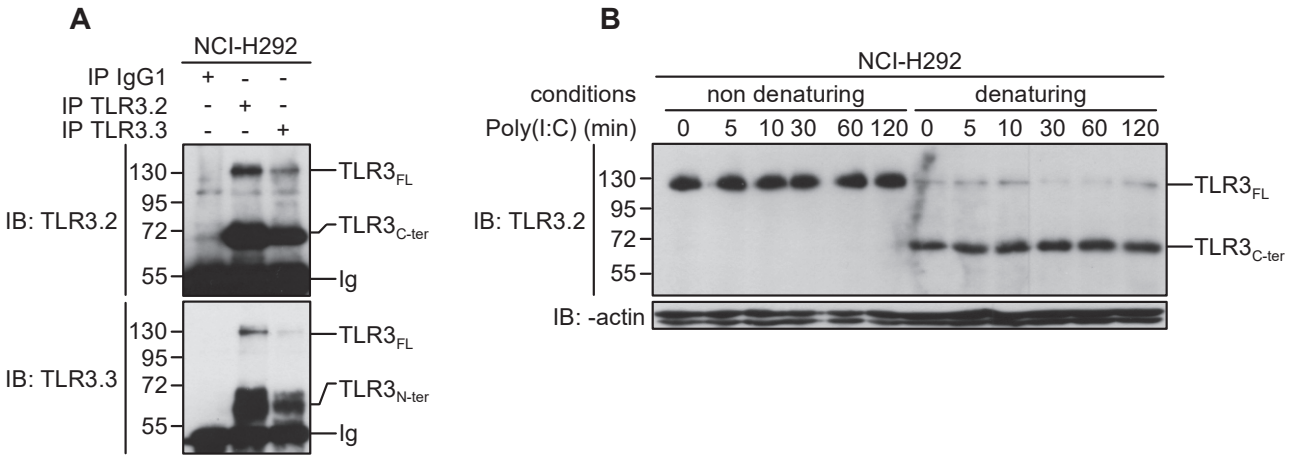
A
NCI-H292
IP IgG1 + - -
IP TLR3.2 - + -
IP TLR3.3 - - +
IB: TLR3.2
130
95
72
55
TLR3FL
TLR3C-ter
Ig
IB: TLR3.3
130
95
72
55
TLR3FL
TLR3N-ter
Ig
B
NCI-H292
conditions
non denaturing
denaturing
Poly(I:C) (min)
0 5 10 30 60 120 0 5 10 30 60 120
IB: TLR3.2
130
95
72
55
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: -actin

Figure 3

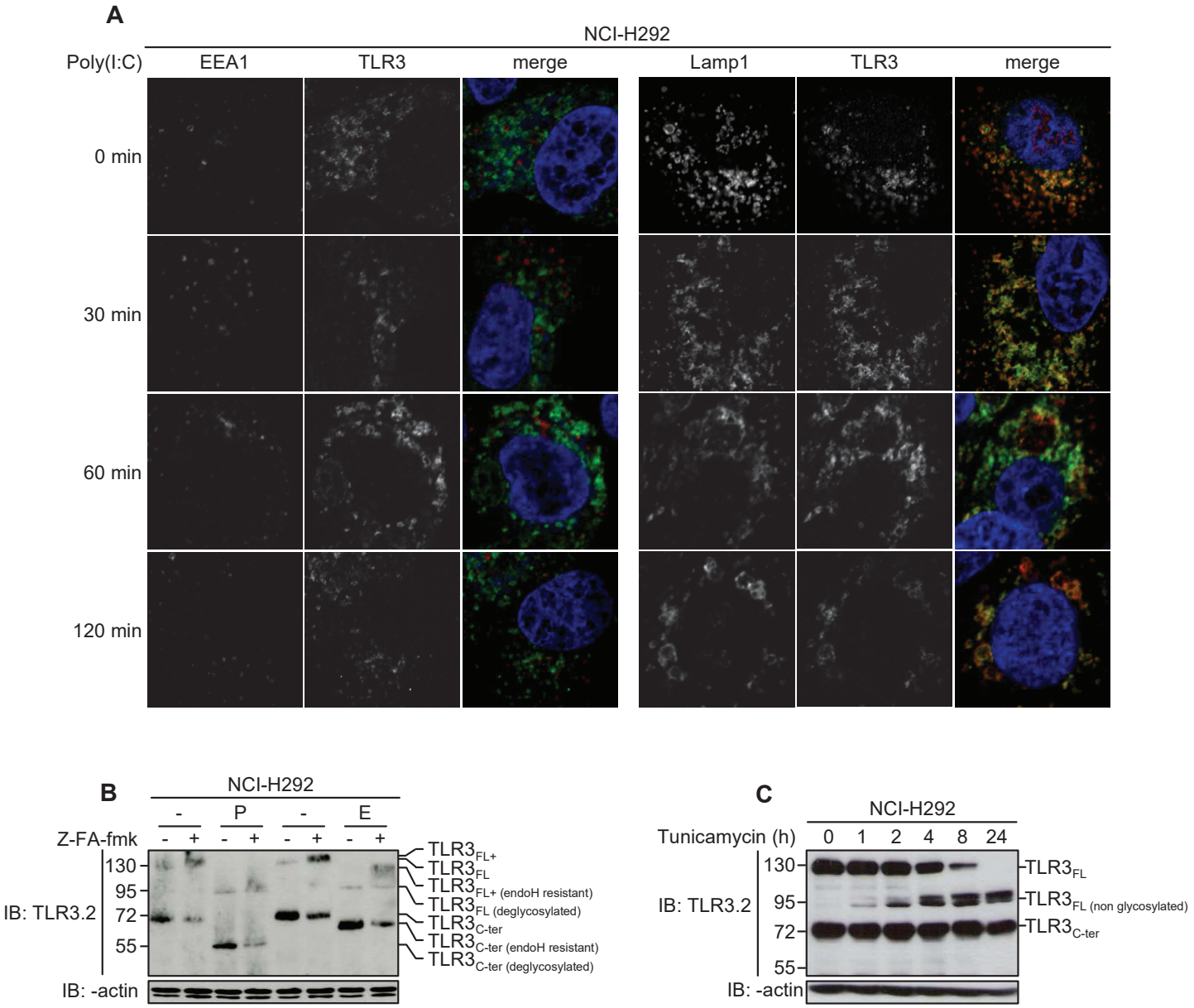
A
NCI-H292
Poly(I:C)
EEA1
TLR3
merge
Lamp1
TLR3
merge
0 min
30 min
60 min
120 min
B
NCI-H292
-
P
-
E
Z-FA-fmk
- + - + - + - +
130
95
72
55
IB: TLR3.2
IB: -actin
TLR3FL+
TLR3FL
TLR3FL+ (endoH resistant)
TLR3FL (deglycosylated)
TLR3C-ter
TLR3C-ter (endoH resistant)
TLR3C-ter (deglycosylated)
C
NCI-H292
Tunicamycin (h)
0 1 2 4 8 24
130
95
72
55
IB: TLR3.2
IB: -actin
TLR3FL
TLR3FL (non glycosylated)
TLR3C-ter

Figure 4

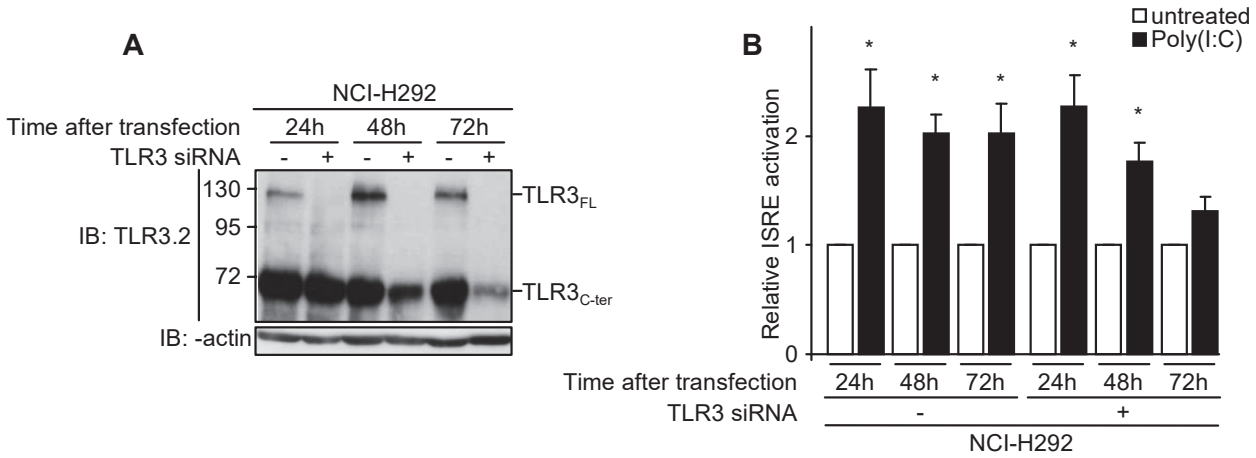
A
NCI-H292
Time after transfection
24h
48h
72h
TLR3 siRNA
- + - + - +
130
95
72
IB: TLR3.2
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: -actin
B
untreated
Poly(I:C)
Relative ISRE activation
0
1
2
*
Time after transfection
24h 48h 72h 24h 48h 72h
TLR3 siRNA
- +
NCI-H292

Figure 5

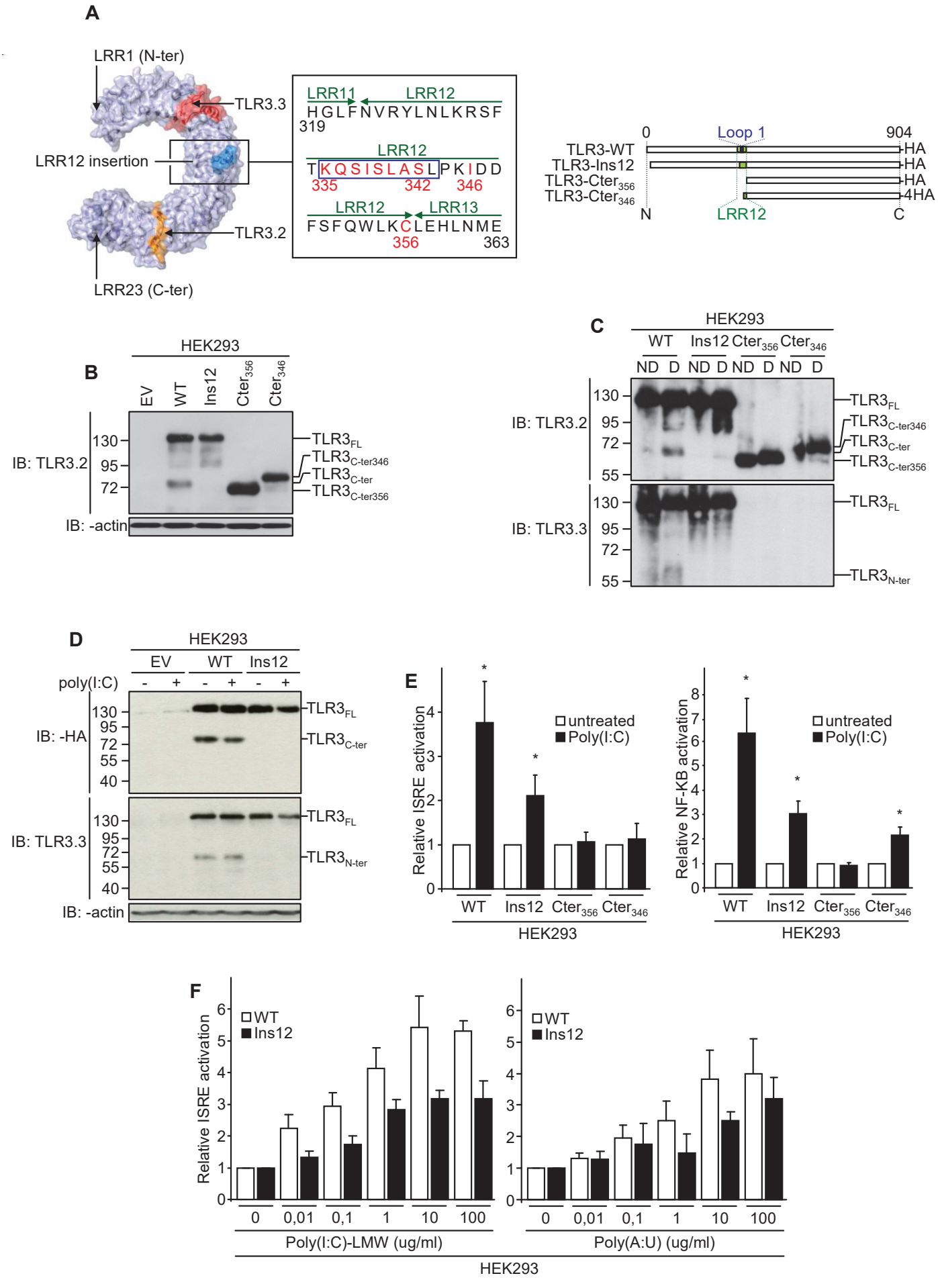
A
LRR1 (N-ter)
TLR3.3
LRR12 insertion
TLR3.2
LRR23 (C-ter)
LRR11 LRR12
HGLFNVRYLNLKRSF
319
LRR12
TKQSISLASLPKIDD
335 342 346
LRR12 LRR13
FSFQWLKCLEHLNME
356 363
0 Loop 1 904
TLR3-WT HA
TLR3-Ins12 HA
TLR3-Cter356 HA
TLR3-Cter346 4HA
N LRR12 C
B
HEK293
EV WT Ins12 Cter356 Cter346
IB: TLR3.2
130 95 72
TLR3FL
TLR3C-ter346
TLR3C-ter
TLR3C-ter356
IB: -actin
C
HEK293
WT Ins12 Cter356 Cter346
ND D ND D ND D ND D
IB: TLR3.2
130 95 72 55
TLR3FL
TLR3C-ter346
TLR3C-ter
TLR3C-ter356
IB: TLR3.3
130 95 72 55
TLR3FL
TLR3N-ter
D
HEK293
EV WT Ins12
poly(I:C) - + - + - +
IB: -HA
130 95 72 55 40
TLR3FL
TLR3C-ter
IB: TLR3.3
130 95 72 55 40
TLR3FL
TLR3N-ter
IB: -actin
E
Relative ISRE activation
untreated
Poly(I:C)
WT Ins12 Cter356 Cter346
HEK293
Relative NF-KB activation
untreated
Poly(I:C)
WT Ins12 Cter356 Cter346
HEK293
F
Relative ISRE activation
WT
Ins12
0 0,01 0,1 1 10 100
Poly(I:C)-LMW (ug/ml)
Poly(A:U) (ug/ml)
HEK293

Figure 6

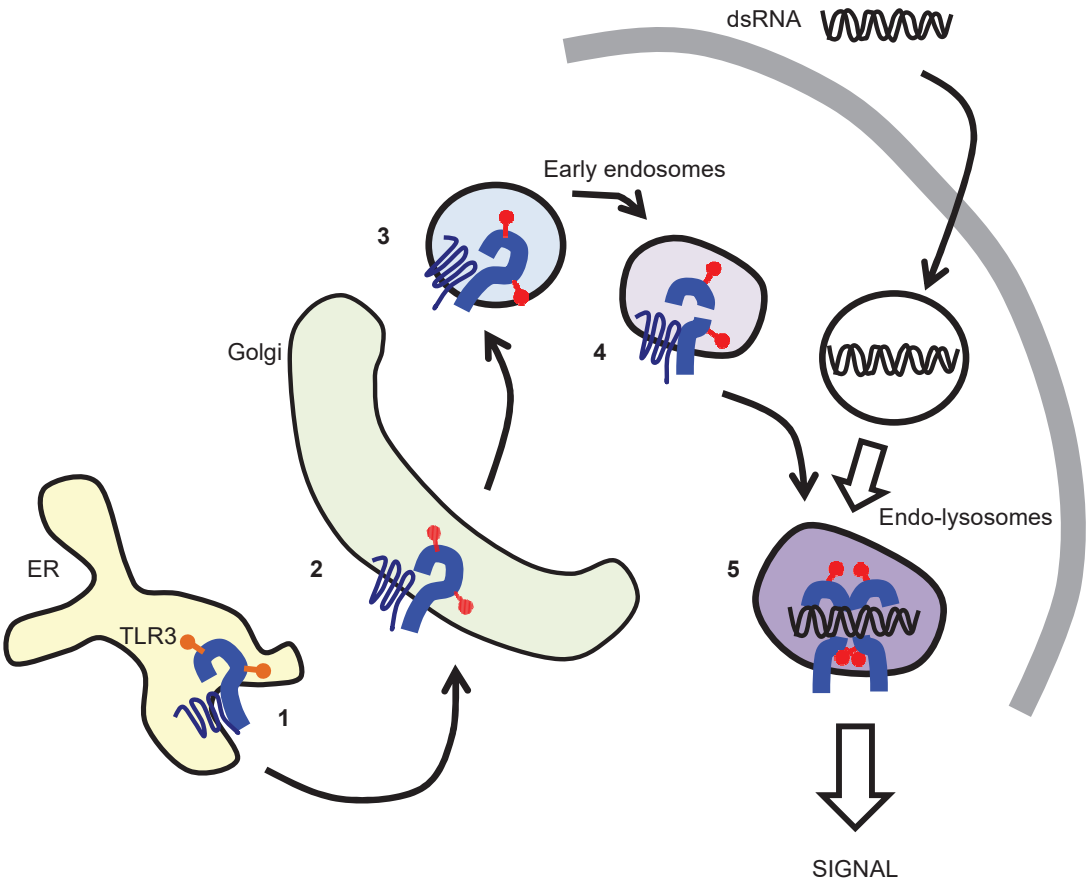
dsRNA
Early endosomes
3
4
Golgi
ER
TLR3
1
2
5
Endo-lysosomes
SIGNAL

Figure 7

Supplemental material

Toscano et al.

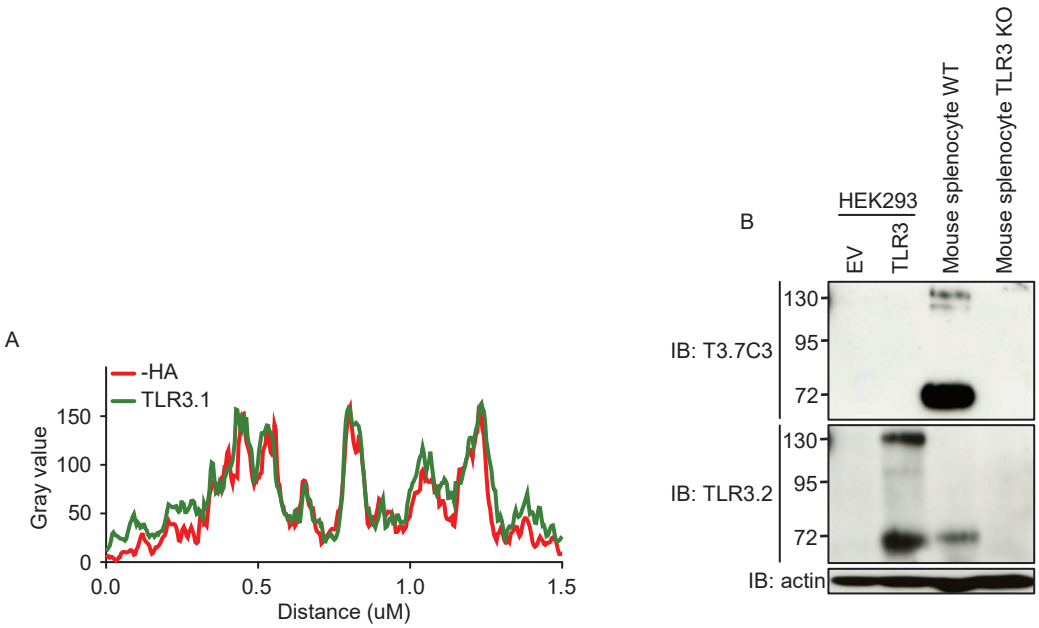

Figure S1. New monoclonal antibodies recognize several forms of TLR3. (A) Fluorescence intensity profiles of HEK293-TLR3-HA cells stained with anti-HA and TLR3.1 antibodies. (B) Immunoblot analysis of EV and TLR3 transfected HEK293 cells, wild-type (WT) and TLR3 KO mouse splenocytes. Lysates were analyzed with T3.7C3, TLR3.2 and anti-actin antibodies.

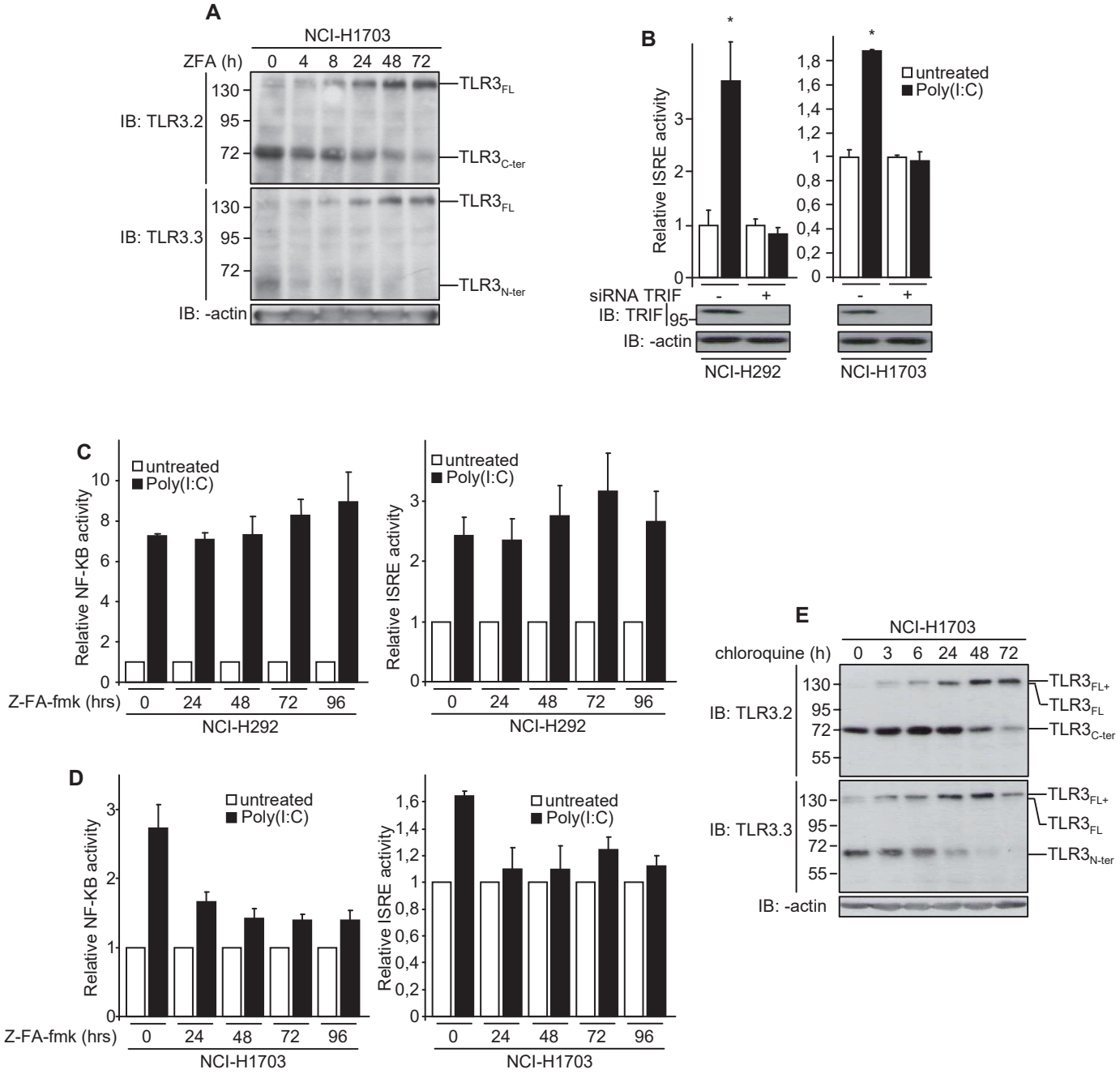

Figure S2. The extracellular domain of TLR3 is cleaved into two fragments by cathepsins. (A) Immunoblot analysis of NCI-H1703 cells treated during indicated times with Z-FA-fmk (20 uM) renewed every 24h. Lysates were analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. (B) ISRE reporter assay and immunoblot analysis in NCI-H292 and NCI-H1703 cells after non silencing (-) or TRIF (+) siRNAs transfections (20 uM) and treatment without (white) or with (black) Poly(I:C) (10 ug/ml) for 4 h. For immunoblot, lysates were analyzed with anti-TRIF and anti-actin antibodies. *: $p < 0.05$ comparing untreated with Poly(I:C)-treated conditions. (C and D) ISRE (left panel) and NF-KB (right panel) reporter assay in NCI-H292 (C) and NCI-H1703 (D) cells pretreated during indicated times with Z-FA-fmk (20 uM) renewed every 24h, and then treated with Poly(I:C) (10 ug/ml) for 4 h. (E) Immunoblot analysis of NCI-H1703 cells treated during indicated times with chloroquine (1 ug/ml). Lysates were analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights (kDa) (A and E). Data are representative (A and E) or mean (B, C and D) of three independent experiments. Error bars represent SEM.

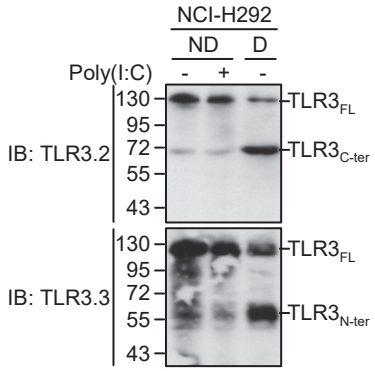

Figure S3. The N- and C-terminal fragments of endogenous TLR3 fragments remain associated after cleavage. Immunoblot analysis of NCI-H292 cells treated (+) or not (-) with Poly(I:C) (10 ug/ml) for 2 h. Lysates were denatured (D) or not (ND) and then analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights (kDa). Data are representative of three independent experiments.

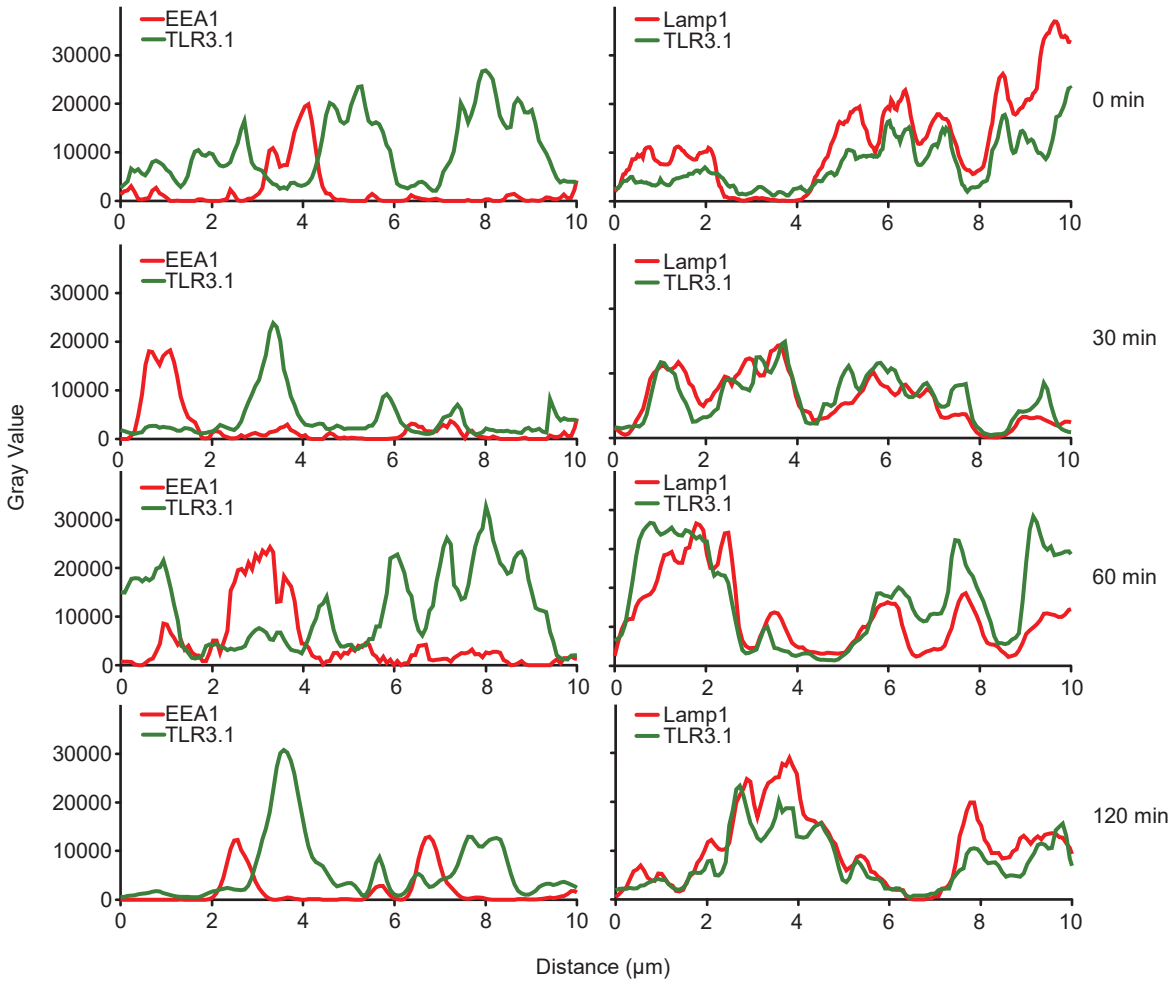

Figure S4. TLR3 transits through the Golgi before being cleaved in the endo-lysosomal compartments. Fluorescence intensity profiles of NCI-H292 cells were treated during indicated times with Poly(I:C) (10 ug/ml) and then stained with Lamp1, EEA1 and/or TLR3.1 antibodies. Data are representative of three independent experiments.

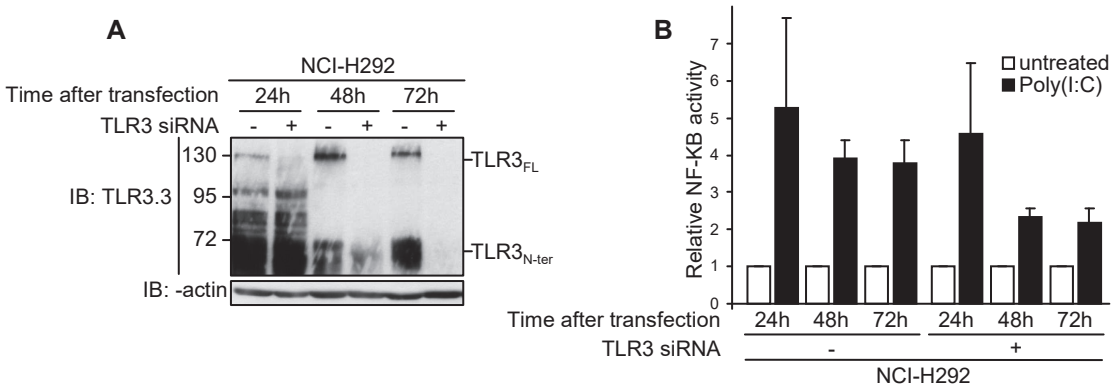

Figure S5. $TLR3_{FL}$ is not required to a complete signalling. (A) Immunoblot analysis of NCI-H292 cells at indicated times after non-silencing (-) or TLR3 (+) siRNAs transfections (20 uM). Lysates were analyzed with TLR3.3 and anti-actin antibodies. (B) NF-KB reporter assay in NCI-H292 cells at indicated times after non-silencing (-) or TLR3 (+) siRNAs transfections (20 uM) and treatment without or with Poly(I:C) (10 ug/ml) for 4 h. Data are representative (A) or mean (B) of three independent experiments. Error bars represent SEM.

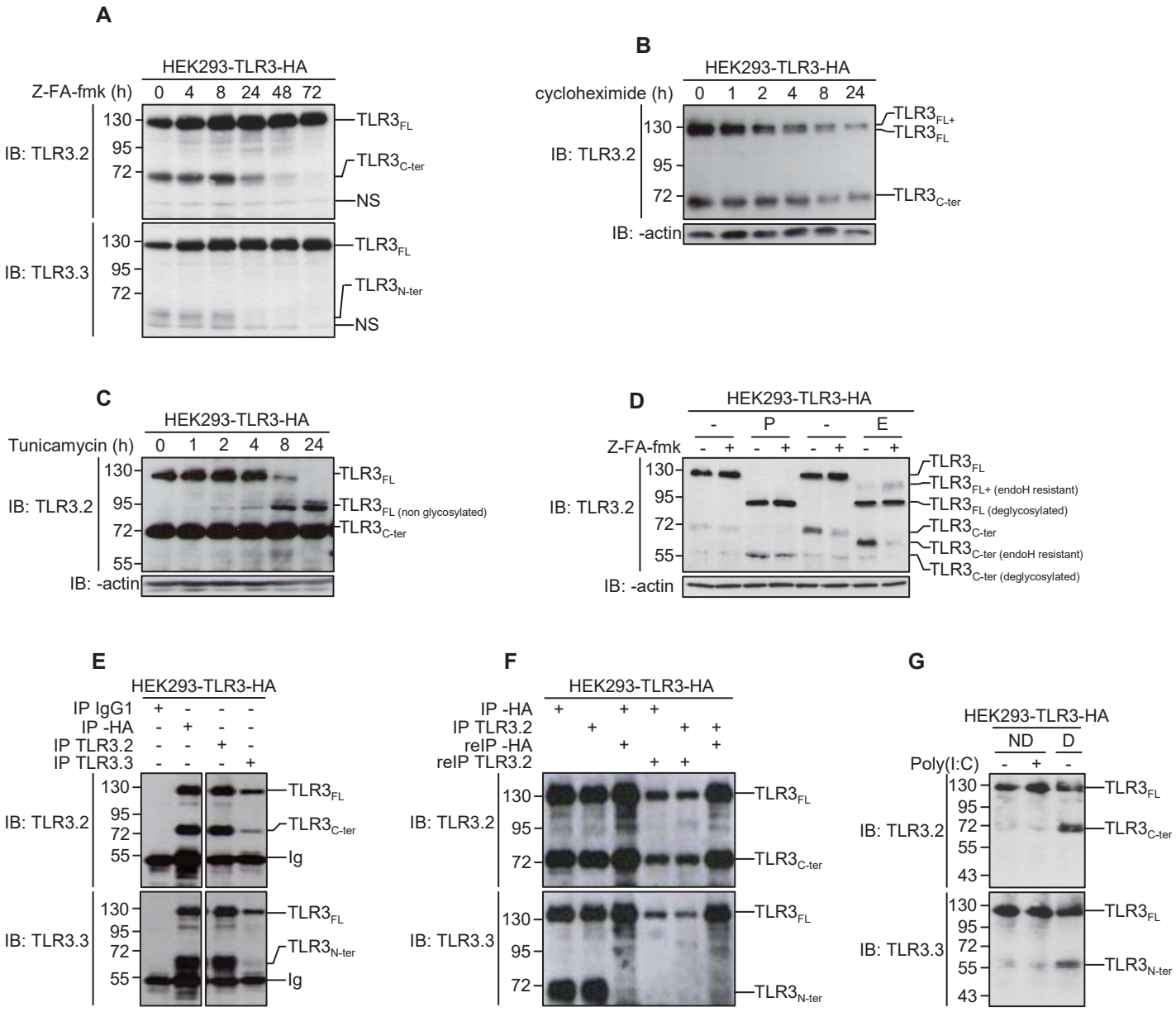

Figure S6. Cleavage generates a fully competent TLR3. (A) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells treated during indicated times with Z-FA-fmk (20 uM) renewed every 24h. Lysates were analyzed with TLR3.2 and TLR3.3 antibodies. (B) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells treated during indicated times with cycloheximide (1,5 ug/ml) for indicated times. Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (C) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells treated during indicated times with tunicamycin (1 ug/ml) for indicated times. Lysates were analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (D) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells treated or not with Z-FA-fmk (20 uM) for 24h. Lysates were untreated (-) or treated with PNGase (P) or endoH (E), and then analyzed with TLR3.2 and anti-actin antibodies. (E) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells. Lysates were immunoprecipitated with IgG1, anti-HA, TLR3.2 or TLR3.3 antibodies, and analyzed with TLR3.2 and TLR3.3 antibodies. (F) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells. Lysates were immunoprecipitated with anti-HA or TLR3.2 antibodies, and then precipitates were re-immunoprecipitated with anti-HA or TLR3.2 antibodies, and analyzed with TLR3.2 and TLR3.3 antibodies. (G) Immunoblot analysis of HEK293-TLR3-HA cells treated (+) or not (-) with Poly(I:C) (10 ug/ml) for 2 h. Lysates were denatured (D) or not (ND) and then analyzed with TLR3.2, TLR3.3 and anti-actin antibodies. Values represent molecular weights (kDa). Data are representative of at least three independent experiments.

2.3 Données complémentaires : Localisation membranaire de TLR3

Certains auteurs ont montré à partir de marquages en FACS que des fibroblastes (MRC-5) [90] et des cellules épithéliales bronchiques (BEAS2-B) [91] expriment, contrairement aux monoDC [90], TLR3 à la surface.

En FACS, la discrimination entre des cellules positives et négatives peut être limitée par plusieurs paramètres comme l'autofluorescence, ou la liaison non spécifique des anticorps [92]. Bien que l'utilisation de contrôles isotypiques pour évaluer la liaison non spécifique d'un anticorps soit le sujet de débats depuis de nombreuses années, elle reste couramment utilisée, jusqu'à être considérée comme un standard [92]. En comparant le marquage de deux isotypes contrôles du commerce sur une cellule HEK293 servant de contrôle négatif de l'expression de TLR3, il nous est apparu que le marquage non spécifique pouvait évoluer différemment en fonction de la concentration de l'anticorps et de son origine de production (figure 2.7A). L'anticorps présentant le bruit de fond le plus faible et le plus stable a été retenu et désigné IgG1 contrôle dans la suite de l'étude.

Nous avons ensuite évalué la spécificité des anticorps anti-TLR3 par deux approches différentes. Dans un premier temps le bruit de fond des anticorps anti-TLR3 a été comparé à celui de l'IgG1 contrôle dans la cellule HEK293. A l'exception de TLR3.3, tous les anticorps ont présenté une liaison non spécifique du même ordre que l'isotype contrôle (figure 2.7C). Dans un deuxième temps, nous avons utilisé une cellule exprimant TLR3 (NCI-H292) et procédé à son extinction à l'aide d'un siRNA. Comme attendu, l'extinction de la protéine a entrainé une suppression du marquage de TLR3.1 et TLR3.2 mais pas de TLR3.3 du fait de son marquage non spécifique.

Enfin, la sensibilité de TLR3.1 et TLR3.2 a été comparée à un couple anticorps/antigène connu. Dans une cellule HEK293 transfectée par une construction de TLR3 à laquelle la séquence de l'hémagglutinine (HA) a été rattachée en C-terminal, la sensibilité des anticorps anti-TLR3 s'est révélée du même ordre que pour l'anti-HA (figure 2.7B).

Les anticorps validés pour le marquage intracellulaire, nous avons cherché

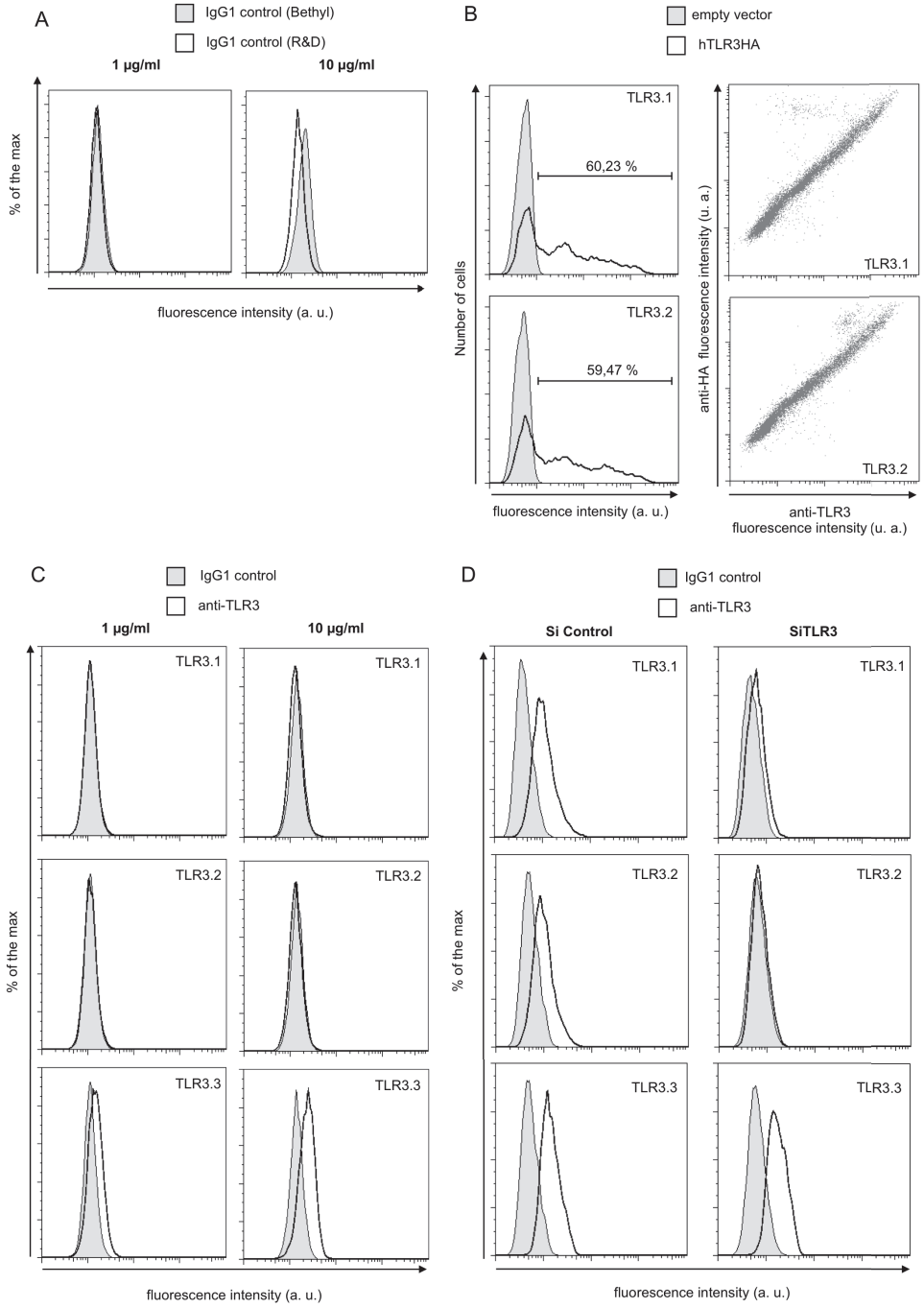

Figure 2.7 – Validation des anticorps TLR3.1-3 pour la cytométrie en flux. (A) Validation de l'isotype contrôle pour deux concentrations différentes dans une cellule contrôle négative (HEK293). (B) Comparaison de la sensibilité des anticorps anti-TLR3 par rapport à un couple antigène/anticorps connu (HA) à l'aide d'une construction TLR3-HA transfectée dans des cellules HEK293. (C) Évaluation du marquage non spécifique des anticorps anti-TLR3 dans les cellules HEK293. (D) Validation du marquage par un traitement (120h) d'une cellule sontrôle positive pour TLR3 (NCI-H292) avec un siRNA TLR3.

à mesurer le marquage de surface, en reprenant les modèles décrits précédemment. Nous n'avons malheureusement pas été en mesure de détecter TLR3 à la surface des cellules MRC-5 et BEAS-2B alors que ce dernier était détecté après perméabilisation des cellules (figure 2.8A). De façon surprenante, l'anticorps TLR3.7 décrit pour reconnaitre TLR3 à la surface n'a pas non plus montré de marquage positif en surface dans nos conditions expérimentales, à l'inverse du contrôle positif (figure 2.8B).

L'expression de TLR3 en surface reste une question ouverte. En effet, à l'exception de quelques articles discutés à la fin de ce manuscrit, elle a essentiellement été abordée à l'aide du FACS dont l'une des limites, on l'a vu, est liée à la mise en place des contrôles négatifs. D'autres approches, comme la biotinylation des protéines de surface, seraient donc souhaitables. Toutefois, il reste possible cette localisation soit dépendante des conditions expérimentale. En effet, Groskreutz et coll. [93] ont montré que TLR3 n'est pas détectable en surface dans des cellules épithéliales bronchiques (A549) au repos mais qu'une infection par le virus RSV (Respiratory Syncytial Virus) entrainait une expression en surface du récepteur.

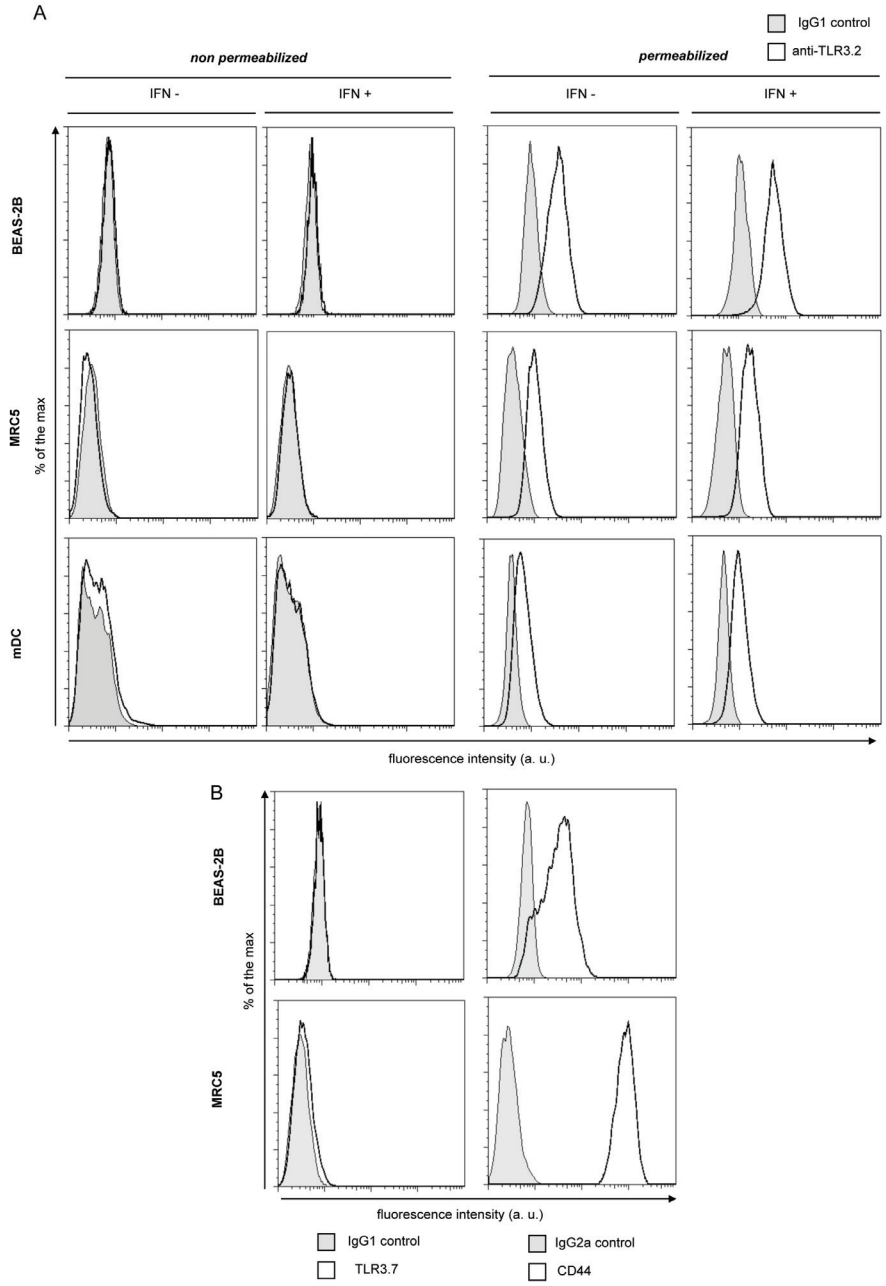

Figure 2.8 – Évaluation du marquage membranaire de TLR3
Le marquage de TLR3 a été montré positif en surface pour les cellules BEAS-2B [91] et MRC5[90], mais négatif pour les cellules monoDC [90] avec l'anticorps TLR3.7. (A) Marquage avec ou sans perméabilisation dans les cellules MRC-5, BEAS-2B et monoDC. (B) Le marquage avec l'anticorps TLR3.7 dans nos conditions expérimentales est négatif, à l'inverse du contrôle positif de surface, le CD44.

Chapitre 3

ARTICLE 2 : *dsRNA induces apoptosis through a TLR3-caspase-8 death complex controlled by cIAPs-dependent RIP1 ubiquitination*

3.1 La mort cellulaire : Accidentelle, programmée ou contrôlée

3.1.1 Les premières morts naturelles

Toute cellule vivante meurt quand un processus essentiel à sa survie s'interrompt. La mort cellulaire peut donc être déclenchée par des conditions physiques extrêmes, incompatibles avec la survie de la cellule, et sera alors considérée comme accidentelle.

Les premières observations de l'existence d'une mort cellulaire dans des conditions physiologiques, favorables à la vie, datent de la seconde moitié du XIXe siècle. A cette époque, l'histologie et l'embryologie sont dominées par l'école allemande et il est largement admis que certaines structures fœtales

ou larvaires sont capables de régresser voir de disparaitre au cours du développement, mais on en ignore les mécanismes. Les théories sur la cellule, avancées par Matthias J. Schleiden et Theodor Schwann, ainsi que des avancées techniques comme le microscope, permettent à Carl Vogt en 1842 de faire la première description d'une mort cellulaire naturelle. Bien que le mot mort ne soit pas utilisé, il décrit l'occurrence au cours de l'embryogenèse de résorption, de destruction et de disparition des cellules. Ces observations sont noyées au milieu d'une monographie de 130 pages dédiées à divers aspects du développement du crapaud accoucheur [1], ce qui leur valent d'être ignorées par ses contemporains [94].

Par la suite, il n' y a que peu de tentatives pour définir les mécanismes de cette mort, ou son rôle. On retrouve, à la place, une approche descriptive et systématique, de différents phénomènes impliquant une mort naturelle qui sont compilés, en 1951, par Alfred Glücksmann. Dans son article, intitulé *Cell Deaths in Normal Vertebrate Ontogeny* [95], Glücksmann regroupe et classe 74 observations de morts cellulaires embryonnaires. Il souligne leur récurrence à différents endroits et stades du développement, et suggère qu'elles jouent un rôle crucial pour l'intégration des cellules au cours du développement. Il y exprime également le souhait que son travail puisse encourager ses paires à étudier la mort cellulaire comme un mécanisme important dans la formation des organes et des tissus. Malheureusement ses efforts ne trouvent que peu d'écho auprès de la communauté des embryologistes.

Dans les années 60, la biologie du développement prend un nouvel essor avec l'arrivée du microscope électronique et les travaux de Glücksmann sont revisités à la lumière de ce nouvel outil [96]. Mais cette fois, la question des mécanismes de ces morts commence à être abordée. John W. Saunders Jr [97] note, dans une revue publiée en 1966, que l'on ne peut se contenter d'accepter, sans l'avoir démontré, le fait que la mort accompagnant la morphogénèse ou l'histogenèse est nécessaire à leur déroulement. Il cite donc une série d'expérimentations qui l'amènent à conclure que la mort cellulaire à l'origine de la destruction des tissus et des organes est programmée comme

1. Le qualificatif d'accoucheur vient de ce que le mâle porte jusqu'à leur éclosion les œufs pondus par la femelle, les trempant chaque nuit dans l'eau d'une mare.

tout événement morphogène impliqué dans le développement des organismes pluricellulaires. Ce thème de mort cellulaire programmée apparait également à la même époque, dans une série de 5 articles publiés par Richard A. Lockshin entre 1964 et 1965 [98]. Ces articles sont issus de son travail de thèse sur la transformation de la nymphe en papillon. Ils suggèrent que des facteurs endocrines sont nécessaires pour planifier, avec précision, la mort des cellules musculaires interségmentaires servant au papillon adulte à s'extraire du cocon, peu après son émergence.

Au delà de leur aspect purement historique, ces articles montrent l'intérêt tardif pour la mort cellulaire, traduisant une certaine difficulté à la considérer comme un processus physiologique, contrôlé, devant être étudié au niveau moléculaire au même titre que la division et la différenciation cellulaire.

3.1.2 L'apoptose

Alors que l'existence d'un programme d'auto destruction pouvant s'opérer dans un contexte physiologique commence à être accepté chez les embryologistes, une mort présentant des aspects structuraux particuliers mais pouvant intervenir dans des contextes cette fois pathologiques est redécouverte par des anatomo-pathologistes [99]. Autour de 1962, l'anatomo-pathologiste australien John F. R. Kerr remarque différentes variétés de morts dans des cellules hépatiques après une ligature expérimentale de la veine porte chez le rat. Dans un premier temps, il observe, suite à la diminution de l'afflux sanguin, la présence de groupes de cellules nécrosées, mais dans les semaines qui suivent une autre forme de mort cellulaire apparaît, disséminée a travers les hépatocytes. Après l'obtention de son diplôme en 1965, Kerr publie ses résultats [100] et continue à étudier cette forme curieuse de mort cellulaire, à l'aide notamment de la microscopie électronique. 5 ans plus tard, Alastair R. Currie, un anatomo-pathologiste spécialisé en endocrinologie, fait la rencontre de Kerr. Currie a observé, au cours de ses études sur la carcinogénèse des organes endocrines, une forme de mort cellulaire atypique et un nouveau doctorant dans son laboratoire, Andrew H. Wyllie, a fait des observations similaires dans la corticosurrénale de rats nouveaux nés déficients en adré-

nocorticotrophine (ACTH). Après avoir vu les photographies de microscopie electronique de Kerr, Currie l'invite à passer un an dans son laboratoire où il fait la rencontre de Wyllie. Kerr aide à confirmer que les observations de Currie et de Wyllie ressemblent bien à celles des foies hypoxiques. Ils trouvent plus tard un phénomène similaire lors de la régression de cancers du sein après ablation des ovaires chez le rat. L'ensemble de ces observations cherche une interprétation quand Allison Crawford, un autre doctorant du laboratoire de Currie, fait remarquer l'existence d'une importante bibliographie, remontant jusqu'en 1951 avec l'article de Glücksmann, sur ce que les embryologistes appellent la mort programmée. Les trois anatomo-pathologistes comparent leurs microphotographies en microscopie électronique à celles publiées par les embryologistes et confirment que les morts régulées décrites au cours du développement, comme celles observées dans des conditions pathologiques, possèdent des morphologies identiques. Ils la baptisent apoptose [2] et en 1972, *Apoptosis : A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics* est publié dans le British Journal of Cancer, co-signé par les 3 anatomo-pathologistes. Pendant une dizaine d'années leur article ne reçoit qu'une faible considération, car très peu de chercheurs étudient l'apoptose dans les années 70. Toutefois au cours des années 80 de nombreux laboratoires commencent à décrire des aspects biochimiques et moléculaires de l'apoptose, entrainant une explosion du domaine à partir des années 90.

3.1.3 Terminologie

Il est intéressant de constater à quel point la découverte de l'apoptose a occulté les autres types de morts programmées compilées par Glücksmann [95], jusqu'à considérer les deux termes comme synonymes. Dans les années 70, le gros des publications sur la mort cellulaire tournaient autour de l'activité lysosomale. Rudolf Weber et d'autres mesuraient le niveau des cathepsines au cours de la métamorphose de la queue du têtard et Jan Erics-

2. Dans leur manuscrit, les auteurs expliquent que la paternité du nom revient au professeur James Cormack du département de Grec de l'université d'appartenance du laboratoire de Currie. Le mot *apoptosis* est utilisé en grec pour décrire la chute des pétales ou celle des feuilles des arbres

son et coll. montraient le rôle des lysosomes dans l'involution des glandes mammaires chez la ratte après la lactation [98]. L'influence progressive des thymocytes et des lymphocytes comme modèles permettant l'étude de la mort cellulaire a progressivement éclipsé cette recherche, ces cellules produisant seulement de l'apoptose. Aujourd'hui, la forme lysosomale de la mort cellulaire (autophagie) est redevenue un centre d'intérêt jusqu'à redécouvrir des travaux effectués dans les années 70. Déjà, Kerr et coll. considéraient que l'apoptose était probablement le seul type de mort contrôlée contribuant à réguler le nombre de cellules dans les tissus des mammifères [101]. Même, la nécrose, rebaptisée nécroptose récemment, a perdu son caractère obligatoirement accidentel pour devenir un phénomène régulé au même titre que l'apoptose [102]. De façon amusante, la mort cellulaire programmée décrite par Lockshin dans ses articles de thèse se révèle être en fait plus proche de l'autophagie que de l'apoptose [103, 104].

Il semblerait que la confusion entre apoptose et mort cellulaire programmée réside au niveau de l'interprétation du terme "programme". Alors que pour certains le programme correspond à la séquence d'étapes contrôlées aboutissant à la destruction de la cellule, telles qu'on les retrouve dans l'apoptose, les embryologistes emploient ce terme dans le cadre de l'application d'un programme génétique responsable de l'ontogenèse. Nous retiendrons les recommandations du *Nomenclature Comitee on Cell Death* suggérant que le qualificatif "programmé" soit restreint aux morts intervenant dans un contexte physiologique (développement embryonnaire et post embryonnaire, homéostasie des tissus) et ce indépendamment de la façon dont elle s'opère. On utilisera le terme plus large de mort cellulaire contrôlée chaque fois que l'initiation et/ou l' exécution de la mort est sous la dépendance d'une machinerie moléculaire pouvant être bloquée [105].

Cette définition reflète l'évolution du domaine ces dernières années. Alors que la classification des différentes morts était jusqu'ici principalement axée sur leur morphologie [106, 107] l'amélioration de la compréhension des mécanismes biochimiques l'a faite progressivement évoluée vers des définitions plus moléculaire (figure 3.1). Bien que l'on considère souvent que des morphologies similaires sont liées à l'activation de signalisations identiques, il devient

clair que ces apparentes similitudes peuvent cacher une certaine hétérogénéité dans les voies de signalisation impliquées. On peut également supposer que plusieurs sous-routines moléculaires, d'efficacité variable, ont la possibilité de s'activer en parallèle, aboutissant à des morphologies intermédiaires rendant cette classification inapplicable.

Au delà de la classification, l'existence de différentes morts controlées permet de supposer qu'elles peuvent jouer des fonctions différentes, liées ou non à l'immunité.

3.2 Mécanisme d'activation de la caspase-8

Il faut attendre quelques années avant d'observer des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la mort cellulaire. En 1976, John Sulston et H. Robert Horvitz montrent que 131 des 1090 cellules somatiques constituant l'embryon de *Caenorhabditis elegans* meurent de façon prévisible peu de temps après leur apparition, fournissant un modèle simple pour étudier les bases génétiques de la mort cellulaire contrôlée. Ils découvrent également que la perte de deux gènes *ced-3* et *ced-4* suffit à modifier le destin de ces cellules qui au lieu de mourir, survivent et se différencient comme les autres.*ced-3* et *ced-4* deviennent ainsi les premiers gènes directement impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire [108]. Alors qu'il n'existe que peu de pistes concernant la fonction de *ced-4*, il apparait que *ced-3* code pour une protéine possédant des analogies avec une cystéine protéase impliquée dans l'inflammation chez l'homme et la souris : l'Interleukin-1β(IL-1β) Converting Enzyme (ICE) [109].

Le couple CED-3/ICE est rapidement rejoint par d'autres enzymes et l'identification frénétique de nouveaux homologues entraine la multiplication des appellations pour une même protéine. Il est alors proposé de regrouper sous l'appellation *caspase* l'ensemble de ces protéases aux propriétés catalytiques similaires. Le "c" fait référence au mécanisme de la cystéine protéase alors que le "aspase" rappel leur site préférentiel de clivage, juste après un acide aspartique. Le chiffre arabe qui suit correspond à l'ordre de publication

	Main biochemical features	Caspase dependence	Examples of inhibitory interventions[a]
Anoikis	Downregulation of EGFR Inhibition of ERK1 signaling Lack of β1-integrin engagement Overexpression of BIM Caspase-3 (-6,-7) activation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Autophagic cell death	MAP1LC3 lipidation SQSTM1 degradation	−−	VPS34 inhibitors AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 or BCN1 genetic inhibition
Caspase-dependent intrinsic apoptosis	MOMP Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Caspase-independent intrinsic apoptosis	Release of IMS proteins Respiratory chain inhibition	−−	BCL-2 overexpression
Cornification	Activation of transglutaminases Caspase-14 activation	+	Genetic inhibition of TG1, TG3 or TG5 Genetic inhibition of caspase-14
Entosis	RHO activation ROCK1 activation	−−	Genetic inhibition of metallothionein 2A Lysosomal inhibitors
Extrinsic apoptosis by death receptors	Death receptor signaling Caspase-8 (-10) activation BID cleavage and MOMP (in type II cells) Caspase-3 (-6,-7) activation	++	CrmA expression Genetic inhibition of caspases (8 and 3) Z-VAD-fmk administration
Extrinsic apoptosis by dependence receptors	Dependence receptor signaling PP2A activation DAPK1 activation Caspase-9 activation Caspase-3 (-6,-7) activation	++	Genetic inhibition of caspases (9 and 3) Genetic inhibition of PP2A Z-VAD-fmk administration
Mitotic catastrophe	Caspase-2 activation (in some instances) TP53 or TP73 activation (in some instances) Mitotic arrest	−−	Genetic inhibition of TP53 (in some instances) Pharmacological or genetic inhibition of caspase-2 (in some instances)
Necroptosis	Death receptor signaling Caspase inhibition RIP1 and/or RIP3 activation	−−	Administration of necrostatin(s) Genetic inhibition of RIP1/RIP3
Netosis	Caspase inhibition NADPH oxidase activation NET release (in some instances)	−−	Autophagy inhibition NADPH oxidase inhibition Genetic inhibition of PAD4
Parthanatos	PARP1-mediated PAR accumulation Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation ATP and NADH depletion PAR binding to AIF and AIF nuclear translocation	−−	Genetic inhibition of AIF Pharmacological or genetic inhibition of PARP1
Pyroptosis	Caspase-1 activation Caspase-7 activation Secretion of IL-1β and IL-18	++	Administration of Z-YVAD-fmk Genetic inhibition of caspase-1

Abbreviations: ATG, autophagy; BCN1, beclin 1; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential; CrmA, cytokine response modifier A; DAPK1, death-associated protein kinase 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK1, extracellular-regulated kinase 1; IL, interleukin; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; NET, neutrophil extracellular trap; PAD4, peptidylarginine deiminase 4; PAR, poly(ADP-ribose); PARP1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; PP2A, protein phosphatase 2A; ROCK1, RHO-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; SQSTM1, sequestosome 1; TG, transglutaminase; Z-VAD-fmk, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone; Z-YVAD-fmk, *N*-benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone.

Figure 3.1 – Classification fonctionnelle des morts régulées
(a) Les auteurs précisent que pour des raisons de classification, les traitements pharmacologiques ou les modifications génétiques ne peuvent être considérés comme inhibiteurs que lorsqu'ils réduisent la survenue de la mort cellulaire, et pas quand ils ne provoquent qu'un changement du type de mort ou qu'ils modifient la morphologie de la mort cellulaire. Adapté de [105].

de la protéine[3] (figure 3.2) [112].

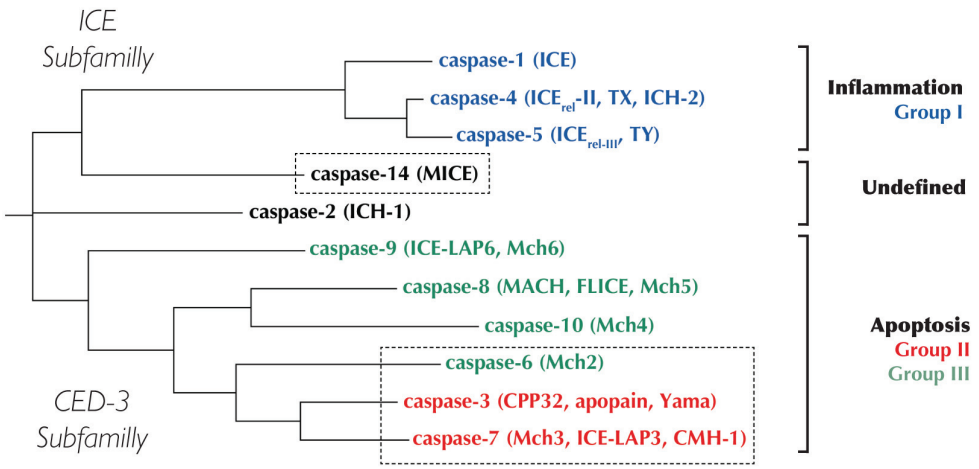

Figure 3.2 – La famille des caspases humaines
Les caspases peuvent être regroupées en deux sous-familles phylogéniques (ICE, CED-3). En fonction de leurs propriétés catalytiques, elles peuvent encore être divisées en trois groupes. Le groupe I (bleu) est impliqué dans la maturation des cytokines alors que les caspases apoptotiques sont soit du groupe des exécutrices ou groupe II (rouge), soit du groupe des initiatrices ou groupe III (vert). La fonction et les spécificité catalytiques des caspases-2 et -14 étant mal définie ou inconnues, elles ont été regroupées dans un même ensemble. La plupart des caspases ont un pro-domaine long à l'exception des caspases -3, -6, -7 et 14 (encadré). Alignement de séquence et arbre phylogénique réalisé à l'aide du logiciel MEGA.

3.2.1 Les différentes caspases

Différentes approches ont été utilisées pour classer les caspases, et, de façon surprenante, toutes les méthodes aboutissent à des regroupements plus ou moins similaires, ce qui suggère une relation étroite entre leur structure et leur fonction.

3. La nomenclature actuelle des caspases s'étend jusqu'a 14. Les caspases 11 et 12 sont des caspases inflammatoires retrouvées chez la souris et absentes chez l'homme, alors que la caspase-13, également une caspase inflammatoire, est retrouvée chez le bovin [110]. Enfin, caspase-14 n'est exprimée que dans les épithéliums cornéens et n'est pour le moment pas directement impliquée dans l'apoptose ou l'inflammation [111]. Seules les caspases inflammatoires et apoptiques humaines sont traitées par la suite.

Les alignements de séquences, supportés par les données expérimentales, permettent une première division fonctionnelle en deux grands groupes (figure 3.2) : les caspases dites *inflammatoires* similaires à ICE (caspase-1) et les caspases *apoptiques*, apparentés à CED-3 dont l'équivalent humain est la caspase-3 [112] [4]. Bien qu'elles puissent présenter des fonctions différentes, toutes les caspases sont synthétisées dans la cellule sous une forme catalytique inactive (pro-enzyme) et partagent une structure canonique composée d'un pro-domaine et d'un domaine catalytique (appelé peptidase C14).

Le domaine catalytique comporte deux sous-unités, une grosse d'environ 20 kDa (p20), et une petite d' approximativement 10 kDa (p10) connectées par une séquence de liaison de taille variable (figure 3.3). Les caspases ciblent un nombre limité de protéines cellulaires, et plus spécifiquement un motif de 4 acides aminés comprenant un acide aspartique en dernière position, pour procéder à une protéolyse restreinte à une ou un petit nombre de coupures [114]. Comme toutes les familles de protéases, on peut donc regrouper les caspases en fonction de leur préférence de substrat et il est intéressant de noter qu'à l'exception de la caspase-6, les caspases possédant des séquences apparentées présentent des préférences de substrat remarquablement similaire (figure 3.2). Grâce à une librairie de tetrapeptides contenant différentes combinaisons des 20 acides animés, avec en tête l'acide aspartique, Thornberry et coll. ont montré que le quatrième acide aminé joue un rôle déterminant dans la spécificité. Ainsi, les caspases inflammatoires (Groupe I) préfèrent des résidus hydrophobes volumineux, une caractéristique en accord avec un rôle non apoptotique car aucune des protéines clivées au cours de l'apoptose ne possède ce type d'acide aminé en $4^{\text{ème}}$ position. Le groupe des caspases apoptotiques est divisible en 2 sous-ensembles. Le groupe II (caspase-2, -3, -7) est plus exigeant pour son site de clivage puisqu'il nécessite la présence d'un autre acide aspartique en position 4, une séquence retrouvée dans de nombreuses protéines clivées au cours de l'apoptose. Enfin, le groupe III (caspase-6, -8, -9 et -10) possède une préférence pour un acide aminé ali-

4. Même si cette classification peut s'avérer utile dans une certaine mesure, on peut toutefois noter que pour la plupart des caspases apoptotiques, un rôle non apoptotique à été décrit[113] et que les caspases inflammatoires peuvent provoquer la mort par pyroptose.

phatique à chaîne ramifiée, séquence retrouvée au site de maturation de la plupart des caspases du groupe II et III [115, 116] (figure 3.2) [5]. Ces spécificités de substrat permettent de considérer les caspases du groupe II comme les caspases exécutrices de l'apoptose alors que les caspases du groupe III, en ciblant les caspases exécutrices, se positionnent en amont d'une cascade protéolytique et sont considérées comme des caspases initiatrices.

Initialement, la caspase-2 a été identifiée comme appartenant au groupe II des caspases effectrices [115]. Elle cible en fait des séquences non pas de 4 mais de 5 acides aminés [117]. Malgré une littérature abondante sur son rôle dans l'apoptose, un certain nombre de controverses persistent ce qui rend cette protéase difficile à classer tant au niveau de sa fonction première qu'au niveau de la cascade apoptotique [118]. La caspase-14 présente également certaines spécificités. Contrairement aux autres caspases, son expression est limité à l'épiderme des animaux terrestre. Sa préférence de substrat varie entre l'humain et la souris. Chez l'humain, la caspase-14 appartient au groupe I des caspases inflammatoires alors que son équivalent chez la souris présentes des caractéristiques du groupe III [119]. Son rôle est encore mal connu, mais elle semble impliquée dans la cornification, l'hydration, et la protection contre les UVB de l'épiderme [120].

3.2.2 Les étapes d'activation de la caspase-8

Alors que le mécanisme d'activation des caspases exécutrices est relativement bien connu, celui des caspases initiatrices reste l'objet de plus de débat.

Dans leur conformation active, toutes les caspases sont sous la forme de dimères arrangés en symétrie anti-parallèle, les petites sous-unités servant d'interface. Chaque molécule de caspase active contient donc 2 sites catalytiques [122]. Les pro-caspases exécutrices sont produites dans la cellule sous la forme de dimères zymogènes, et sont activées par la protéolyse de leur séquence de liaison, un événement orchestré par les caspases initiatrices. Le

5. La classification des caspases sur la base de la préférence de substrat fournit des renseignements sur leur mode d'action *in vitro*, mais elle ne reflète pas la préférence de substrat réelle *in vivo*[113].

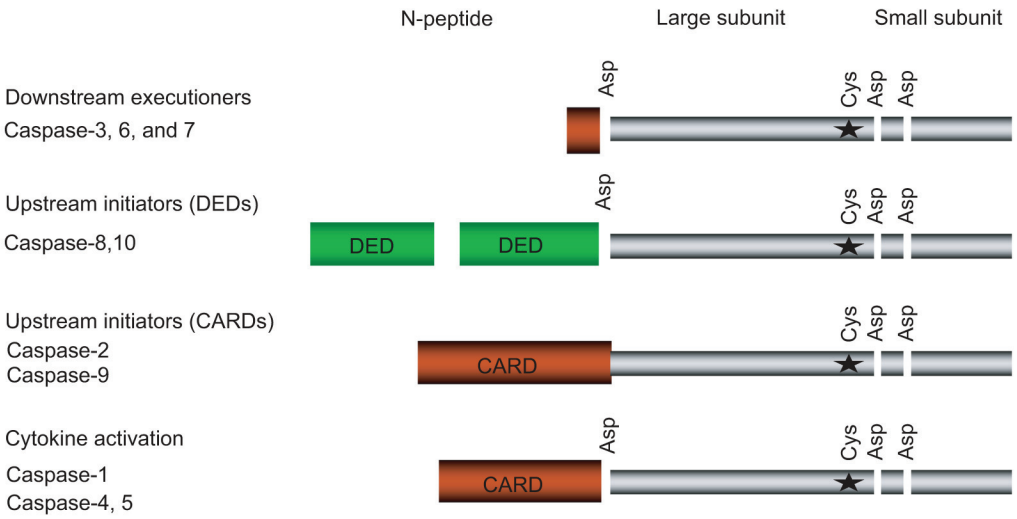

Figure 3.3 – Classification suivant les pro-domaines
Les pro-domaines des caspases initiatrices sont absents dans les caspases effectrices situées en aval. L'acide aspartique (Asp) qui est la cible d'un clivage et la cystéine (Cys) du site catalytique sont indiqués. Le pro-domaine de la caspase-2 peut être enlevé par clivage au niveau d'un acide aspartique (non représenté) alors que le prodomaine de la caspase-9 reste intact. Adapté de [121].

clivage est suivi d'un réarrangement de la séquence de liaison pour former le site actif des caspases exécutrices.

Contrairement aux pro-caspases exécutrices, les pro-caspases initiatrices sont retrouvées sous forme de monomères dans le cytosol et n'ont pas d'enzymes activatrices en amont. Dans le modèle actuellement admis, la dimérisation est favorisée par le recrutement dans des complexes de hauts poids moléculaires grâce au pro-domaine. Ce recrutement augmente la concentration locale de monomères, ce qui favorise leur dimérisation. Il s'ensuit un clivage autoprotéolytique qui sépare les deux sous-unités catalytiques, et un clivage supplémentaire au niveau du pro-domaine libère l'enzyme active du complexe d'activation. Bien que ce modèle soit bien accepté, le role exact à donner au clivage et à la dimérisation pour l'activation des caspases initiatrices reste encore discuté.

En 2009, Keller et coll. [123] ont pu, à partir de cristaux de pro-caspase-8, préciser le rôle de la dimérisation. On retrouve dans le cristal de la pro-caspase-8, le repliement typique des caspases, à savoir un noyau central de 6 brins β encadré par 5 hélices α, et 5 boucles, dont la séquence de liaison, qui débordent de cette structure. Les auteurs remarquent qu'au cours de l'activation de la pro-caspase-8, la majeure partie de la maturation s'effectue au niveau des boucles car les brins β et les hélices α se superposent avec la caspase activée. Ils observent également que dans la pro-enzyme, le futur site de reconnaissance du substrat est absent et que la séquence de liaison recouvre la plupart des éléments (figure 3.4).

A l'inverse dans l'enzyme mature, la séquence de liaison clivée a opéré une rotation qui démasque le site de reconnaissance et le complète en positionnant le site catalytique dans la poche nouvellement créée (figure 3.4). Toutefois, ils démontrent que le clivage ne permet pas à lui seul ces réarrangements et qu'ils sont induits par la dimérisation. Bien que des données contradictoires [123, 124] ne permettent pas de conclure que la dimérisation des pro-caspase-8 est suffisante pour leur activation, il apparait claire qu'elle reste nécessaire pour permettre la mise en place du site catalytique.

La protéolyse reste importante à la maturation des caspases initiatrices. Elle s'appuie sur deux clivages. Le premier, comme pour les caspases exécu-

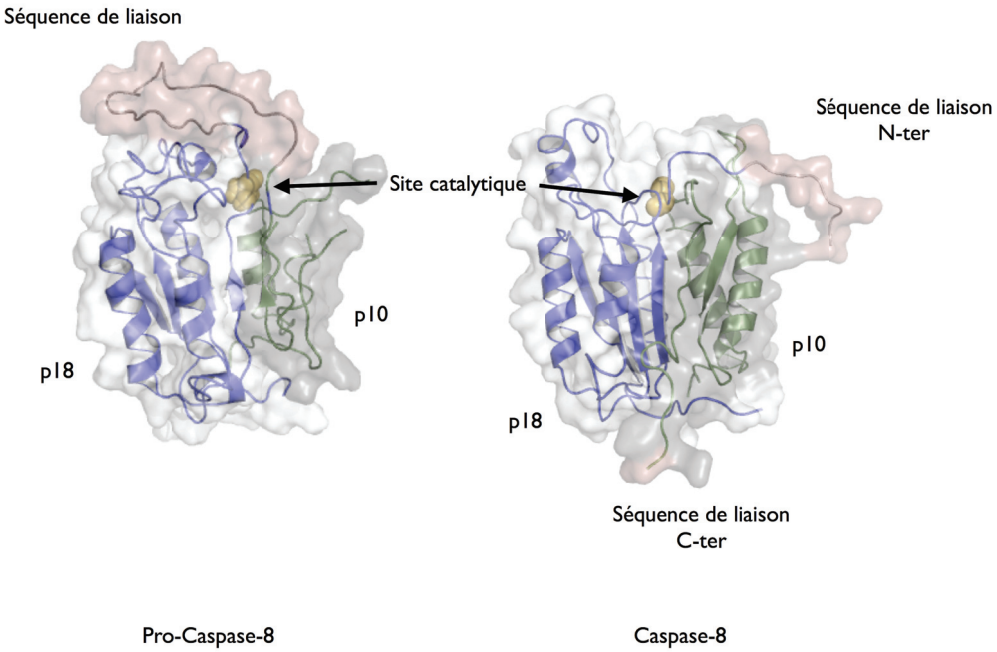

Figure 3.4 – Mécanisme d'activation de la caspase-8
A gauche, le site catalytique (jaune) de la pro-caspase-8 (2K7Z) est masqué par la séquence de liaison réunissant la petite sous-unité p10 (gris foncé) à la grande sous-unité p18 (gris claire). A droite, la caspase-8 activée (1QTN) par clivage de la séquence de liaison. La portion N-terminale a opéré une rotation qui libère et repositionne le site catalytique alors que la portion C-terminale stabilise le complexe p18/p10. Modélisations réalisées avec le logiciel *MacPyMOL*.

trices, cible la séquence de liaison. Il peut être obtenu de différentes façons, par une protéolyse intramoléculaire, par une protéolyse intermoléculaire, où l'asparagine cible et la cystéine catalytique font partie de caspases différentes mais engagées dans un même dimère (clivage intradimérique), et intermoléculaire quand elles font parties de dimères différents [113]. Le second clivage sépare la grande sous-unité du prodomaine et libère ainsi le dimère de caspase-8 possédant une activité catalytique mature dans le cytosol, cette étape étant critique pour son rôle dans l'apoptose [125].

Le clivage de la séquence de liaison stabilise le domaine catalytique [123] et permet le maintient de son activité catalytique une fois dans le cytosol. Ainsi, pour éviter la libération de caspases non matures, la région entre le prodomaine et la grande sous-unité n'est pas ciblée par le clivage tant que la petite et la grande sous-unité n'ont pas été clivées. De plus, alors que les dimères de pro-caspase-8 se reconnaissent entre eux, la caspase-8 mature cible seulement les caspases exécutrices. Cette incapacité pour la caspase-8 mature de cibler sa pro-enzyme permet de maintenir une activation séquentielle et empêche le clivage des pro-caspase-8 zymogènes en monomères [125].

En résumé, bien que la dimérisation soit nécessaire et peut être suffisante pour l'activation de la caspase-8 zymogène, le clivage de la séquence de liaison est important pour la stabilisation des dimères, alors que le deuxième clivage est nécessaire à sa fonction apoptotique.

3.2.3 Le recrutement de la caspase-8

Le recrutement de la pro-caspase-8 dans des complexes macromoléculaires, tout comme la formation de ces complexes, sont sous le contrôle d'interactions homotypiques menées par des séquences appartenant à la superfamille des Death Domains (DDs). A ce jour 102 membres ont été identifiés chez l'humain et l'alignement de leurs séquences permet de regrouper ces protéines en 4 sous familles fonctionnelles . Malgré d'importantes divergences de séquences entre les membres de cette superfamille, plus de 90% pour certains, les protéines présentent toutes le même type de repliement. Cette structure globulaire est composée de 6 hélices α dont la disposition anti-parallèle rap-

pelle les méandres des ornements grecques [6]. Les différences de longueur et d'orientation de ces hélices α, qui sont moins prononcées entre les membres d'une même sous famille qu'entre les différentes sous familles, régissent les interactions homotypiques. Ainsi, chaque membre d'une famille limite ses interactions aux membres de la même famille [126]. (figure 3.5)

Le pro-domaine de la caspase-8 contient des séquences appartenant à la famille des death effector domains (DEDs) et peut donc créer des interactions homotypiques de type DED-DED. Seules 6 protéines possédant une DED, en plus de la caspase-8 et de la caspase-10, ont été identifiées, auxquelles ont peut ajouter 6 autres membres présentant des variants du DED ou pseudo DED [127] (figure 3.6). Les protéines contenant des DED ne sont retrouvées que chez les vertébrés. Chez la drosophile, on peut retrouver des équivalents fonctionnels : la caspase DREDD, apparentée à la caspase-8, et un adaptateur dFADD pour son recrutement. Toutefois, ils ne contiennent pas de vrai DED mais plutôt des pseudo DED.

3.3 Rôle non apoptotique de la caspase-8

3.3.1 FLIP, un inhibiteur de la caspase-8 ?

On retrouve également des protéines à DED chez les virus, où elles jouent le rôle d'inhibiteurs de l'apoptose initiée par la caspase-8. En 1997, Irmler et coll.[128] identifient, chez l'homme, une protéine apparentée aux protéines virales qu'ils nomment FLIP (Flice-inhibitor protein). Sur les nombreux transcrits identifiés à ce jour, FLIP_L et FLIP_S sont les isoformes les mieux caractérisés [129].

La forme courte, FLIP_S, mime le pro-domaine de la pro-caspase-8 et bloque son activation en agissant comme un dominant négatif. La forme longue, FLIP_L, est globalement identique à la pro-caspase-8 dans le sens ou elle contient un prodomaine, une région ressemblant au domaine catalytique, ainsi qu'une séquence de liaison contenant le site de clivage. Toute-

6. les méandres ou grecques (appelés ainsi car très fréquents dans l'art hellénique) sont des entrelacements de lignes brisées à angle droit.

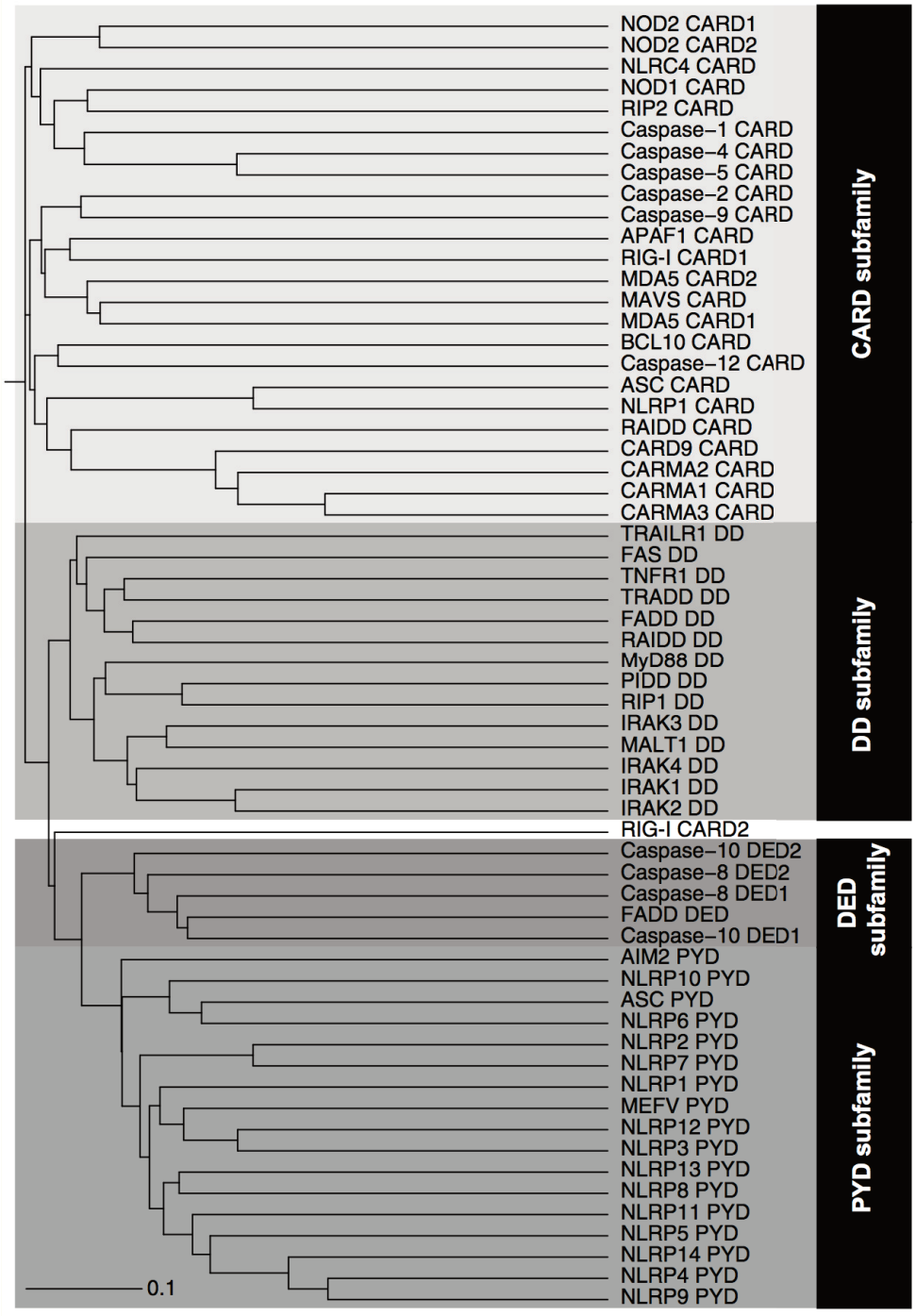

Figure 3.5 – Analyse phylogénétique de la superfamille des protéines à Death Domain. D'aprés [126].

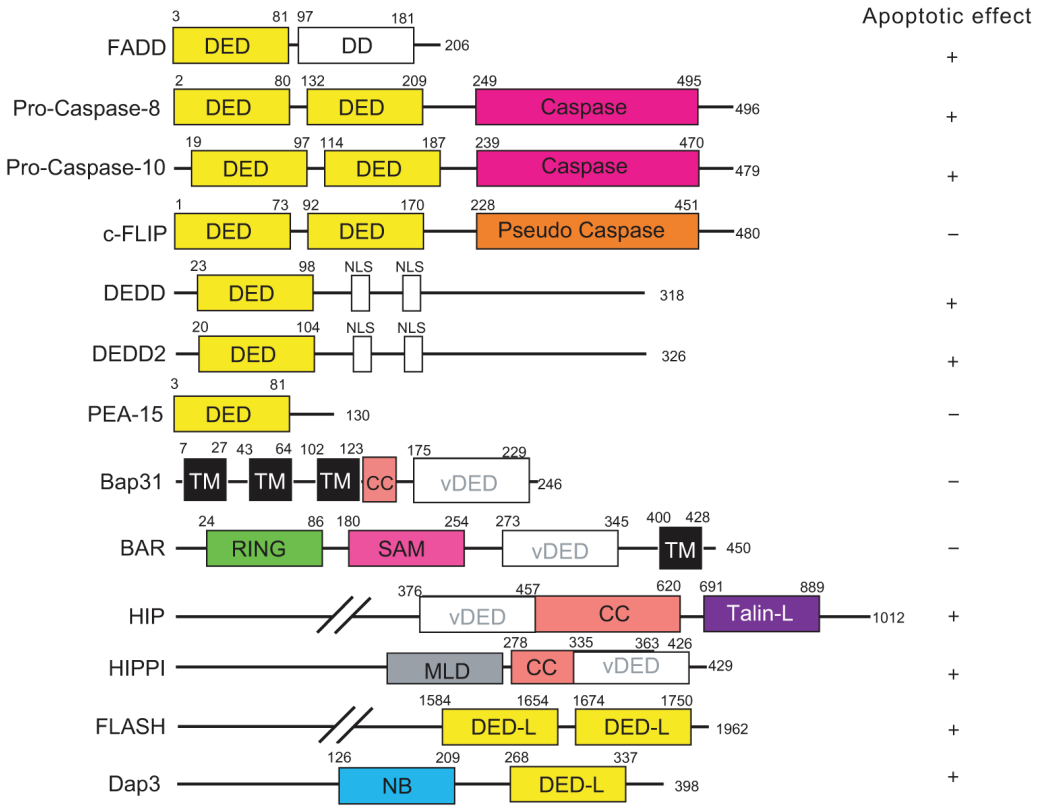

Figure 3.6 – Les protéines humaines à DED
La famille des protéines humaines à DED et leur domaines sont schématisés. Le rôle inhibiteur ou activateur de l'apoptose est indiqué à droite. Bap31, BAR, HIP, and HIPPI (Hip-1 protein interactor) contiennent des variants des DEDs et représentent un branche distincte de la famille des protéines à DED. Dap3 and FLASH contiennent également un domaine apparenté au DED ou DED Like (DED-L). NLS, séquence de localisation nucléaire ; NB domaine de liaison au nucléotide GTP ; TM, domaine transmembranaire ; Talin-L, domaine Talin-like ; MLD, domaine myosin-like. Adapté de [121].

fois, $FLIP_L$ est dépourvue des résidus impliqués dans l'activité protéolytique et n'est donc pas une protéase à proprement parler. De façon surprenante, les hétérodimères de caspase-8/FLIP possèdent une activité enzymatique. Contrairement aux dimères de caspase-8, la liaison à FLIP entraîne un réarrangement suffisant de la séquence de liaison de la pro-caspase-8 pour former un site catalytique actif et ne nécessites pas de clivage. On observe toutefois, une maturation par clivage des séquences de liaison de FLIP et de la pro-caspase-8 qui augmente l'activation de la caspase 8. Il n'y a, par contre, pas de second clivage au niveau du pro-domaine, l'hétérodimère reste donc séquestré dans le complexe ce qui limite sa protéolyse aux substrats à proximité [130, 124].

Donc en plus de former des homodimères, la caspase-8 est capable de former avec FLIP des hétérodimères actifs, produisant une enzyme avec un seul site activé, mais le maintient de l'hétérodimère dans le complexe d'activation reste limitant pour l'activation de l'apoptose. Cet hétérodimère s'assemble avec une plus forte affinité et/ou stabilité que les homodimères de caspase-8, il semble donc être la forme prédominante quand FLIP est présent [131]. A de fortes concentrations, $FLIP_L$ peut même rentrer en compétition avec la pro-caspase-8 pour le DED du complexe d'activation et bloquer totalement l'activation de la pro-caspase-8 [124].

3.3.2 RIP1/RIP3 et la nécrose

Quel est le rôle des hétérodimères Caspase-8/FLIP vis à vis de l'apoptose ? Compte tenu de l'omniprésence de la mort cellulaire programmé au cours du développement [95], il est attendu que les KO des protéines impliquées dans l'apoptose aient des conséquences majeurs sur le déroulement de l'embryogenèse, produisant des phénotypes en accords avec une diminution de la mort cellulaire. Par exemple, en supprimant la caspase-3, on observe un déficit en apoptose au niveau cérébral [132], de même pour la suppression de la caspase-9 [133]. A l'inverse, les souris déficientes en caspase-8 présentent un phénotype inattendu dans le sens où elles ont un défaut d'angiogenèse et de développement du muscle cardiaque qui entraînent la mort des embryons

autour du 10ème jour [134].

De façon surprenante, le KO de FLIP [135] et de FADD, une autre protéine possédant un DED servant au recrutement de la pro-caspase-8 dans son complexe d'activation, produisent un phénotype similaire [136]. Trois équipes [137, 136, 138] ont montré, cette année, que ce phénotype est empêché par la suppression de RIP1 ou de RIP3, laissant penser que FLIP, FADD et caspase-8 ont un rôle protecteur vis à vis de RIP1 et RIP3.

RIP1 et RIP3 sont des sérines/thréonines kinases appartenant à la famille des Receptor Interacting Protein (RIP)[139]. Ces kinases sont connues pour être responsables de l'induction d'une nécrose contrôlée ou necroptose. La nécrose dépendante des kinases RIPs semble être un mécanisme de défense contre les virus. En effet, les souris RIP3 ($^{-/-}$) succombent à une infection au Vaccinia Virus par une augmentation de la charge virale liée à un défaut de nécroptose [140].

Lorsqu'elles sont engagées dans un complexe avec RIP1, les isoformes de FLIP jouent un rôle clef dans la décision de produire l'apoptose via la caspase-8 ou de la nécrose via le couple RIP1/RIP3. En effet, alors que l'homodimère de caspase-8 est relargué dans le cytoplasme une fois activé pour initier l'apoptose, l'hetérodimère caspase-8/FLIP$_L$ bien que catalytiquement actif est maintenu dans le complexe, ce qui limite son activité aux protéines à proximité comme RIP1. En détruisant RIP1, caspase-8/FLIP$_L$ protège de la nécrose induite par le couple RIP1/RIP3 tout en empêchant l'apoptose. Enfin, FLIP$_L$ en n'activant pas caspase-8 protège certes de l'apoptose mais ne désactive pas le couple RIP1/RIP3 et donc ne protège pas contre la nécrose (figure 3.7).

3.4 ARTICLE 2 : *dsRNA induces apoptosis through a TLR3-caspase-8 death complex controlled by cIAPs-dependent RIP1 ubiquitination*

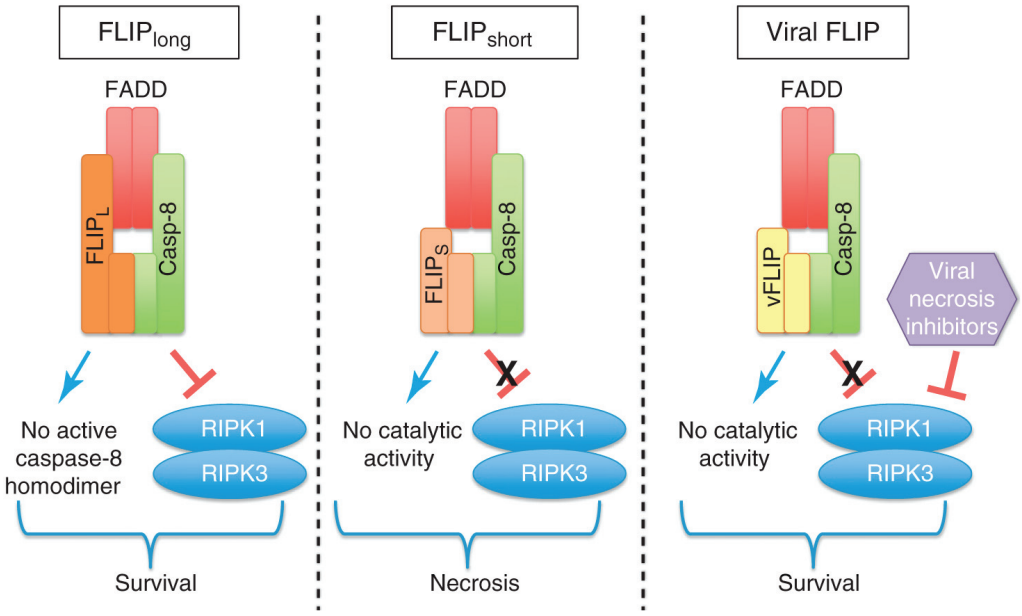

Figure 3.7 – Rôle de FLIP dans l'aiguillage entre apopose et nécrose
(A) $FLIP_L$ inhibe l'homodimère de caspase-8 en formant un hétérodimère catalytiquement actif capable de bloquer la nécrose dépendante des kinases RIPs. Il favorise donc la survie des cellules. (B) A l'inverse, $FLIP_S$ et le FLIP viral forment des hétérodimères sans activité catalytique et sont donc incapables de bloquer la nécrose dépendante des kinases RIPs. Certains virus codent pour des inhibiteurs de la caspase-8 et de l'activité des kinases RIPs et favorisent la survie des cellules. Adapté de [102]

dsRNA induces apoptosis through a TLR3-caspase-8 death complex controlled by cIAPs-dependent RIP1 ubiquitination.

Running title: TLR3-caspase-8 death complex is regulated by RIP1

Authors

Yann Estornes[1*], Florent Toscano[1*], François Virard[1,2], Guillaume Jacquemin[3,4], Marc Bonnin[1], Audrey Pierrot[1], Béatrice Vanbervliet[1], Najoua Lalaoui[3,4], Perrine Mercier-Gouy[5], Yves Pachéco[6,7], Bruno Salaun[8], Toufic Renno[1], Olivier Micheau[3,4], and Serge Lebecque[1,6,7].

Affiliations

1. Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM UMR1052/CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.
2. Faculté d'Odontologie, Université Lyon 1, rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon, France
3. INSERM, U866, Dijon, F-21079 France
4. Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, F-21079 France
5. UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, IBCP, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon, France
6. CHLS, Hospices Civils de Lyon, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-bénite, France
7. Faculté de Médecine Lyon-Sud, 165, chemin du Petit Revoyet, BP 12, 69921 Oullins Cedex
8. Ludwig Institute for Cancer Research, 155 chemin des Boveresses, 1066 Epalinges, Switzerland

Additional footnotes

*. These authors contributed equally to this work

Corresponding author

Serge Lebecque; UMR 5201 CNRS/Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France ; phone: 00 33 (0)4 69 16 66 26; fax: 00 33 (0)4 69 16 66 60; serge.lebecque@univ-lyon1.fr

Abstract

Toll-like receptor 3 (TLR3) is a pattern-recognition receptor known to initiate an innate immune response when stimulated by double strand RNA (dsRNA). Components of TLR3 machinery, including TRIF, have been demonstrated to contribute to dsRNA-induced cell death through caspase-8 and RIP1 in various human cancer cells. However the precise molecular mechanism underlying caspase-8 activation and apoptosis remained so far elusive. We provide here the first demonstration that activation of caspase-8 by synthetic Poly(I:C) dsRNA involves the formation of an atypical caspase-8-activating complex physically associating caspase-8 to TLR3, and devoid of classical death receptors of the TNFR superfamily. Engagement of TLR3 by dsRNA in both type I and type II NSCLC cells induces the recruitment of TRIF, RIP1, $FLIP_L$, FADD, caspase-10, and caspase-8 to TLR3. Recruitment and activation of caspase-8 within this death platform require RIP1, and are negatively controlled by cIAP2-TRAF2-TRADD ubiquitin ligase complex which regulates RIP1 ubiquitination. Our findings uncover a novel aspect of the molecular mechanisms involved during apoptosis induced by the innate immune receptor TLR3 in cancer cells.

Keywords

Toll-like receptor 3, apoptosis, caspase-8, RIP1, ubiquitination, cancer cells

Introduction

dsRNA had been known for decades for its ability not only to activate a strong anti-viral response trough the stimulation of type I IFN (IFN-I), but also to inhibit the growth of virus-induced and virus-independent mouse tumors [1, 2]. More recently, the membrane bound TLR3, and the cytosolic protein kinase RNA-activated (PKR), the helicases retinoic acid-inducible gene I protein (RIG-I), and melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) have been identified as dsRNA receptors that could each trigger IFN-I production and cell death, depending on the cellular context [3].

TLR3 was first described as a pattern recognition receptor expressed by monocytes and macrophages [4] that triggers an innate immune response in the presence of dsRNA released during viral infections and possibly endogenous mRNA freed by damaged tissues [3] . Normal epithelial cells also express TLR3 and, upon exposure to extracellular dsRNA, they activate a strong antiviral immune response characterized by the production of cytokines and chemokines. Following recognition by a plasma membrane receptor such as class A scavenger receptor [5], dsRNA is delivered to the endocytic pathway where it binds to TLR3 in acidified endosomes/lysosomes. TLR3 dimerization and reorientation of its Toll-IL-1R-Receptor (TIR) cytoplasmic domain leads to the recruitment of the adapter molecule TIR domain-containing adapter inducing IFN-α (TRIF). Oligomerized TRIF acts as a starting platform essential to recruit TNF receptor-associated factor (TRAF)-6 and the receptor interacting protein (RIP)-1 serine-threonine kinase for the activation of NF-κB, and/or TRAF3 for the activation of IFN regulatory factor 3 and the IFN-α response [3]. Microscopy analysis revealed that TLR3 and TRIF transiently colocalize in response to Poly(I:C) before the formation of the TRIF signalling complex [6]. However, whether or not TLR3 takes part of the TRIF signalosome remains undetermined. Recently, we and others have demonstrated that TLR3 can in addition trigger caspase-8-dependent apoptosis in breast carcinoma [7], melanoma [8, 9], prostate [10], and head and neck [11] carcinoma. Moreover, we also found that TLR3 expressed by breast cancer cells is a biomarker for the therapeutic efficacy of dsRNA [12].

Triggering apoptosis through the caspase-8-dependent extrinsic pathway was originally described for the currently-known Death Receptors (DRs) Fas, TRAIL-R and TNFR-I of the TNF-R superfamily. Fas- and TRAIL-R-induced apoptosis occurs through the binding of DR to the adapter Fas-associated with death domain (FADD) to form the death-inducing signalling complex (DISC) in which caspase-8 is activated [13]. In contrast to Fas and

TRAIL-R, TNFR-I-induced apoptosis requires the formation of two sequential complexes, the recruitment of FADD and caspase-8 occurring in a secondary complex in a TRADD- or RIP1-dependent manner, and in which TNFR-I is absent [13, 14]. To transmit such apoptotic signal, DRs possess a cytoplasmic Death Domain (DD) that binds the DD of FADD or TRADD through homotypic interaction.

TLR3 lacks a DD and thus the molecular basis of dsRNA-triggered apoptosis through caspase-8 remains an open question although recent reports indicate that TRIF and RIP1 are required for synthetic dsRNA Poly(I:C) to engage the apoptotic machinery [7, 9, 15]. Earlier experiments already suggested that a TRIF/RIP1/Caspase-8 complex may have some relevance as ectopic transfection of TRIF induced its binding to RIP1 through its C-terminal RIP homotypic interaction motif (RHIM) [16] but also triggered apoptosis in a caspase-8 dependent manner [17, 18]. Conversely, cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1 and cIAP2 have been described as negative regulators of TLR3-induced apoptosis [9, 11, 15]. These E3 ubiquitin ligases were recently shown to inhibit the spontaneous formation of a molecular complex termed “Ripoptosome”, containing caspase-8, caspase-10, FADD, cFLIP and RIP1 that associates with TRIF after Poly(I:C) stimulation [15, 19]. While formation of this complex clearly involves TRIF, RIP1 but also TLR3, as demonstrated by use of siRNA, evidence of the molecular assembly of this machinery to TLR3 is lacking.

Identifying such a novel complex would be highly relevant to the understanding of the molecular events involved in Poly(I:C)-triggered apoptosis since TRIF is also known to interact with the dsRNA sensor helicases complex DDX1-DDX21-DHX36 [20] and with the RIGI and MDA5 adapter VISA (also known as IPS-1) [21] to signal innate immune responses.

Our results clearly demonstrate that TLR3-induced cell death requires the formation of a novel complex containing TLR3 and caspase-8, and proceeds through apoptosis. Recruitment and activation of caspase-8 to TLR3, in human cancer cells, requires RIP1 and is negatively controlled through cIAPs-dependent RIP1 ubiquitination.

Results

Poly(I:C) dsRNA induces apoptosis in NSCLC cells via the TLR3/TRIF pathway.

To investigate how dsRNA kills human carcinoma cells, several NSCLC cell lines were screened for their response to Poly(I:C) at concentrations ranging from 1 μg/ml up to 100 μg/ml. Some of them showed significant reduction in cell viability (NCI-H1703, NCI-H292, SK-MES-1, and NCI-H596) while others were less (SW900 and NCI-H520) or not sensitive (NCI-H661), even when exposed for up to 72h (Fig. 1a and Supplementary Information, Fig. S1a, and unpublished data). Cell viability reduction by Poly(I:C) was dose-dependent and associated with appearance of cell death characterized by propidium iodide (PI) incorporation and cell-surface annexin V binding (Fig. 1a and 1b, and Supplementary Information, Fig S1b). Two sensitive cell lines (NCI-H1703 and NCI-H292) were chosen to further characterize Poly(I:C)-induced cell death. Cell-surface annexin V staining of NCI-H1703 and NCI-H292 cells was detected before PI incorporation, and increased in a time dependent manner, indicating an apoptotic death (Fig. 1c). Electron microscopy of Poly(I:C)-treated NCI-H292 (Supplementary information, Fig. S1c) and NCI-H1703 cells (not shown) showed typical features of apoptosis including membrane blebbing, karyorrhexis, pyknosis and organelle condensation, with no evidence of autophagy. Moreover, the broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD blocked both annexin V and PI staining, establishing the requirement of caspases for cell death (Fig. 1d). Collectively, these data indicate that Poly(I:C) kills NSCLC cancer cells through caspase-dependent apoptosis.

Endosomal membrane-bound TLR3 and/or cytosolic dsRNA receptors PKR, RIG-I, and MDA5 may all contribute to apoptosis in response to dsRNA [22, 23]. However, silencing cytosolic dsRNA receptors PKR, RIG-I, and MDA5 with specific siRNA failed to protect NSCLC cells from Poly(I:C)-induced cytotoxicity (Supplementary Information, Fig. S1d, S1e and S1f). In contrast, siRNAs targeting either TLR3 or TRIF (the only known adapter for TLR3) inhibited Poly(I:C)-induced apoptosis and decreased cell viability (Fig. 1e and 1f, and Supplementary Information, Fig S1d). Moreover, consistent with the requirement for endosome acidification for TLR3, but not cytosolic dsRNA receptor signaling, the V-ATPase inhibitor bafilomycin-A1 inhibited Poly(I:C)-induced apoptosis (Supplementary Information, Fig. S1g). Noteworthy, TLR3 activation induced NF-κB and ISRE-dependent transcription in the NSCLC cells, as shown by luciferase reporter activities (Fig. 1g), which were blocked by TLR3 siRNA (unpublished data). This inflammatory response was further illustrated by the

secretion of IL-6 and/or CXCL10 and/or CCL5 cytokines (Supplementary Information, Fig. S1h). We conclude that Poly(I:C) can both activate the innate immune response and kill cancer cells through the TLR3/TRIF signaling pathway.

TLR3 activation triggers apoptosis through the extrinsic pathway

Although TLR3-dependent cell death requires caspase-8, the contribution of the intrinsic pathway remains unclear {Salaun, 2006 #912;Sun. We therefore analyzed the kinetics of activation of initiator and executioner caspases following Poly(I:C) stimulation in NSCLC cells. In line with annexin V staining (Fig. 1c), activation of caspase-8 (p43/p41 and p18 fragments) and caspase-3 (activated p20, p17 and p12 fragments) was detected by western blot 2h after addition of Poly(I:C) in both cell lines, and coincided with the cleavage of their respective targets, Bid and PARP (Fig. 2a). Caspase-9 was also activated, as shown by the appearance of its p37/p35 fragments (Fig. 2a), but to a much lower extent in NCI-H292 as compared to NCI-H1703 cells.

Since caspase-8 and caspase-9 activation appeared simultaneously, we assessed their relative contribution to TLR3-dependent apoptosis using specific siRNAs. Caspase-8 siRNA abrogated apoptosis in both cell lines, whereas caspase-9 knockdown only partially protected NCI-H1703 cells, and failed to rescue NCI-H292 cells from apoptosis (Fig. 2b and 2c). In line with a role for caspase-8 in mediating TLR3-induced cell death, overexpression of the FLICE-like inhibitory protein ($FLIP_L$) protected both cell lines (Fig. 2d-f). However, the protection conferred by caspase-9 siRNA in NCI-H1703 cells also suggested that the mitochondrial pathway was required to amplify caspase-8 activation, as described in type II cells {Scaffidi, 1998 #1411}. Indeed, overexpression of Bcl-xL or Bcl-2 inhibited both TLR3- and TRAIL receptors-dependent apoptosis in NCI-H1703 cells (Fig. 2d and 2f). By contrast, neither Bcl-xL nor Bcl-2 overexpression rescued NCI-H292 cells from TLR3- or Fas-triggered apoptosis, indicative that NCI-H292 cells are type I cells (Fig. 2e and 2f). Collectively, these data indicate that caspase-8 is the main initiator caspase involved during TLR3-mediated apoptosis in our model.

Activation of TLR3 induces the formation of a caspase-8-activating DISC-like complex independently of classical Death Receptors

Activation of the initiator caspases-8/10 by DRs occurs into high molecular weight protein complexes called Death-Inducing Signaling Complex (DISC) also referred as complex

I and complex II [13, 14]. Since TLR3 triggers apoptosis in a caspase-8-dependent manner, we investigated the possibility that a DISC-like associating caspase-8 complex might occur after Poly(I:C) treatment. Size-exclusion chromatography showed that full-length and cleaved caspase-8 shifted to high molecular weight fractions 2h after TLR3 activation (Supplementary Information, Fig. S2a). We therefore searched for the recruitment of other known DISC components by immunoprecipitating caspase-8 (Fig. 3a). After Poly(I:C) treatment, caspase-8 physically associated with FADD, caspase-10 (only expressed in NCI-H292 cells), and $FLIP_L$. Moreover, caspase-8 immunoprecipitates showed progressive processing of caspase-10 into p50 and p26 fragments, and of $FLIP_L$ into p43/p41 cleavage products. Furthermore, the relative amounts of the cleaved fragments of caspase-10 and $FLIP_L$ were much greater in the caspase-8 immunoprecipitates than in the total cell lysates, suggesting that these cleavages occurred primarily in a complex, in close proximity to caspase-8, as described in Fas- and TRAIL receptor-associated DISCs [24, 25].

Thus, we then asked whether TLR3 triggered apoptosis directly or through the secondary activation of DRs. Consistent with observations reported with melanoma cells [8, 9], the translation inhibitor cycloheximide did not suppress, but rather enhanced TLR3-triggered apoptosis (unpublished data). Moreover, supernatant of Poly(I:C)-treated cells showed no toxicity towards corresponding fresh cells (unpublished data), suggesting that the synthesis of DR ligands was not required. In line with these findings, NCI-H1703 (resistant to Fas) and NCI-H292 (resistant to TNFα) cells were not protected by blocking antibodies targeting TRAIL, TNFα, or Fas (Fig. 3b). Consistently, neither Fas, nor DR4/DR5, or TNFRI, was associated with caspase-8 after TLR3 activation, while Fas and DR4/DR5 associated with this initiator caspase after Fas and TRAIL-receptor engagement, as shown by immunoprecipitation, respectively (Fig. 3c).

Both TRIF and TLR3 associate with caspase-8 after Poly(I:C) stimulation

Since DRs are not involved in the formation of the caspase-8-containing death complex, we wondered whether TRIF but also TLR3 were present in the caspase-8 immunoprecipitates after Poly(I:C) stimulation, using a new monoclonal antibody anti-TLR3 that we have generated (unpublished data). Interestingly, we found that both TRIF and a 72 kDa band corresponding to the recently described C-terminal fragment of TLR3 ([26] and unpublished data) physically associated with caspase-8 following Poly(I:C) stimulation (Fig. 4a). TLR3 and TRIF were detected in caspase-8 pull-downs as early as 30 min up to 6h after Poly(I:C)

addition (Fig. 3c). Interestingly, by 2h, the amount of full length TRIF started to decrease in cell lysates, while a ~34 kDa fragment, probably representing the N-terminal (N-Ter) fragment of TRIF after caspase cleavage [27], became visible (Fig. 4a). However, this cleaved product could not be detected in caspase-8 immunoprecipitates since the TRIF antibody used here recognizes residues located at the N-Ter side of the reported caspase cleavage sites (D281 and D289) [27], whereas the TIR and RHIM domains are on the C-Ter side. Therefore, our data suggest that TRIF is cleaved in the TLR3-signaling complex, and that the generated N-Ter fragment does not remain associated with caspase-8. To confirm that TLR3 and TRIF interact physically with this DISC-like complex, TRIF was immunoprecipitated after addition of Poly(I:C) (Fig. 4b). Consistent with caspase-8 co-immunoprecipitation experiments, TLR3 and caspase-8 were detected associated with TRIF as early as 30 min after Poly(I:C) stimulation. Taken together, our data indicate that Poly(I:C) triggers the formation of a TLR3/caspase-8 complex independent of classical DRs.

Formation of the caspase-8 activating complex and apoptosis after TLR3 activation requires RIP1

RIP1 kinase is known to contribute to the TLR3 inflammatory signaling through its ability to interact with TRIF [16]. By co-immunoprecipitation experiments, we first confirmed that RIP1 associates with TRIF upon TLR3 engagement in our cell lines (Supplementary Information, Fig. S3). Interestingly, we found that RIP1 not only associates with caspase-8 after Poly(I:C) addition (Fig. 5a) but is required for apoptosis triggering since inactivation of RIP1 expression using siRNAs suppressed almost completely TLR3-mediated apoptosis (Fig. 5b). Moreover, RIP1 depletion impaired the recruitment of caspase-8 and FADD to the TLR3/TRIF complex, and the activation of caspase-8 (Fig. 5c). Surprisingly, inactivation of FADD expression using siRNAs failed to prevent TLR3-mediated apoptosis, whereas it significantly inhibited apoptosis induced by an anti-Fas antibody or by TRAIL (Supplementary Information, Fig. S4a and S4b). In addition, while caspase inhibition by Z-VAD efficiently blocked TLR3-dependent cell death, pre-treatment with necrostatin-1, a specific inhibitor of RIP1 kinase activity [28], had no effect (Supplementary Information, Fig. S5), indicating that the kinase domain of RIP1 is not required for TLR3-induced cell death and that no additional caspase-independent cell death such as necroptosis takes place in our model.

RIP1 is cleaved and ubiquitinated within the death complex after TLR3 activation

Beside the 78 kDa full length RIP1 associated with caspase-8 in this complex, a 43 kDa band was observed that could correspond to a cleaved product of RIP1 resulting from caspase-8 activation, as reported for TNFRI [29], since this band was enriched in the caspase-8 immunoprecipitates as compared to the cell lysates (Fig. 5a), and since it was not detected after Z-VAD pretreatment (Supplementary Information, Fig S6). Moreover, caspase-8-associated RIP1 also showed several post-translational modifications suggestive of polyubiquitination (Fig. 5a), similar to those observed for TRIF-associated RIP1 (Supplementary Information, Fig. S3), and to those required for NF-κB activation by TLR3 ([16] or by TNFRI [14, 30, 31]. Indeed, using an anti-ubiquitin antibody, we demonstrated that these high molecular weight forms of RIP1 associated with caspase-8 corresponded to ubiquitinated RIP1 (Fig. 5d). Addition of Z-VAD increased the detection of the full length and ubiquitinated RIP1 associated with caspase-8, probably by blocking caspase-8 activation and subsequent complex destabilization (Fig. 5d and Supplementary Information, Fig. S6). Altogether, our data indicate that RIP1 is required to recruit caspase-8 to TLR3, and that ubiquitination levels of RIP1 could regulate TLR3-mediated apoptosis.

The ubiquitin ligase complex TRADD-TRAF2-cIAPs negatively regulates TLR3-triggered apoptosis.

Transient association of ubiquitinated RIP1 with caspase-8 correlated with the presence in the complex of ubiquitin ligases, including TRAF2 and cIAP2, as well as with the adaptor protein TRADD (Fig. 6a, and Supplementary Information, Fig. S7). Although cIAP1 is expressed in both cell lines (Fig. 6e), we could not detected it in the complex after TLR3 activation (unpublished data). Of note, TRADD and TRAF2 also appeared to be modified at the post-translational level after Poly(I:C) stimulation in this complex (Fig. 6a).

Similar to TNFRI [32], TLR3-mediated apoptosis was increased when TRAF2 (for NCI-H292 cells) or cIAP2 expression were knocked-down (Fig. 6b and 6c). TRADD knockdown also enhanced TLR3-mediated apoptosis (Fig. 6b and Fig. 6c). Moreover, pretreatment with the small-molecule IAP-antagonist BV6, which triggers a rapid and specific cIAP1/2 degradation (Fig. 6e, and [32]), drastically sensitized NSCLC cell lines not only to TNFα- but also to TLR3-induced apoptosis (Fig. 6d).

cIAPs-mediated RIP1 ubiquitination negatively regulates TLR3-caspase-8 death complex formation and apoptosis

Given that siRNA-mediated inactivation of TRAF2, cIAP2, or TRADD expression enhances apoptosis induced by TLR3 stimulation, and since RIP1 appears to be ubiquitinated in the TLR3-caspase-8 native complex, we hypothesized that RIP1 ubiquitination might prevent caspase-8 recruitment as reported for TNFRI [33]. Using RIP1 siRNA, Z-VAD, and/or necrostatin-1, we first checked that cell death triggered by the combination of Poly(I:C) plus BV6 still required RIP1 (Fig. 7a), remained strictly apoptotic, and could not proceed through necroptosis, respectively (Supplementary Information, Fig. S8). We next assessed, by immunoprecipitating caspase-8, native TLR3-apoptotic complex in presence or absence of BV6 (Fig. 7b). Inactivation of cIAPs using BV6 did not by itself induce RIP1 association with caspase-8. However, when combined with Poly(I:C) stimulation, loss of cIAPs led to a decrease of RIP1 ubiquitination, and enhanced the association of full length RIP1 with caspase-8, leading to increased RIP1 cleavage (Fig. 7b). Quantifications of RIP1 immunoblot, by densitometric analysis, clearly indicated that the amounts of the cleaved and ubiquitinated forms of RIP1 associated with caspase-8 were inversely regulated after cIAPs depletion, with cleaved RIP1 becoming the major form in the complex (Fig. 7c). Interestingly, the amounts of FADD, TLR3, TRIF, TRAF2, TRADD and cleaved caspase-10 associated with caspase-8 were also significantly increased in presence of BV6 after TLR3 activation, and caspase-8 cleavage was enhanced. Altogether, these results indicate that cIAPs regulate the formation of this pro-apoptotic complex. By ubiquitinating RIP1, cIAPs limit caspase-8 recruitment to TLR3 and thus prevent subsequent apoptosis.

Discussion

We report here the identification of a novel molecular TLR3 pro-apoptotic complex for which a simplified working model is presented in Figure 8. Our results provide for the first time evidences that TLR3, like most death-domain containing receptors, can engage the apoptotic machinery through recruitment and activation of caspase-8. We propose that dsRNA-mediated TLR3 dimerization induces TRIF binding to TLR3 through TIR homotypic interaction allowing recruitment of RIP1 and other component of TNFR machinery, including caspase-8, to trigger apoptosis. Recently, another group has described the formation of a similar death complex after Poly(I:C) stimulation in HaCat keratinocytes depleted for cIAPs [15]. These authors have demonstrated that loss of cIAPs in these cells could lead to the formation of a molecular platform termed "Ripoptosome" which contains RIP1, FADD, cFLIP, caspase-10 and caspase-8, and which associates with TRIF after Poly(I:C) stimulation to drive either apoptosis or necroptosis. Requirement for TLR3 was also revealed using siRNA approaches, but interaction of the Ripoptosome with TLR3 in a native complex was lacking. Our results, in agreement with their findings, not only unravel the direct binding of a similar machinery to TLR3 but also demonstrate that triggering of a death-signaling complex by stimulation with Poly(I:C), in NSCLC cells, can occur in the absence of additional treatments leading to depletion of cIAPs or inactivation of survival pathways such as NF-kB or c-FLIP. The presence of RIP1, FADD, cFLIP, and caspase-8 in the complex described here may indicate that the Ripoptosome is recruited to TRIF-TLR3 to signal cell death. However, since we have no evidence of Ripoptosome assembling in our cells in absence of cIAPs, our data rather suggest that the death-signaling complex forms sequentially in response to TLR3 activation, and that Ripoptosome formation may not be a prerequisite for caspase-8 activation and apoptosis induced by TLR3.

TLR3-mediated apoptosis shows similarities and differences with previous described complexes such those involved in TNFRI, Fas, TRAILR and CD40 signaling, four members of the TNFR superfamily, which all can use RIP1 to trigger cell death. TLR3 shares much similarities with TNFRI regarding the composition of the signaling complex and also the post-translational modifications that appear to be crucial for modulating apoptosis [13, 14, 34]. Our data show that, similar to TNFRI [34], RIP1 ubiquitination by cIAPs is an important check point controlling TLR3 mediated apoptosis. Whether ubiquitination of RIP1 leads to destabilization of the pro-apoptotic complex or to inhibition of DISC component recruitment requires to be investigated as both conclusions may be drawn from our experimental data.

RIP1 ubiquitination by the ubiquitin ligases TRAF2 and cIAPs in collaboration with the ubiquitin conjugating enzyme (E2) enzyme UbcH5a determines whether TNFRI signals inflammation or cell death in sensitive cancer cells [33, 35]. The detection of TRAF2 and cIAP2 together with TRIF in TLR3-signaling complex after treatment with Poly(I:C) suggests that polymerization of Lys-63-linked ubiquitin chains on RIP1 could have a similar function. In agreement with previous observations [9, 11, 15], increase of Poly(I:C)-induced cell death in the presence of smac-mimetic correlated with reduced ubiquitination of RIP1 in the complex and with a greater association with caspase-8. The strong enhancement of apoptosis after treatment with BV6 and Poly(I:C) in type I NCI-H292 cells, known to enhance DR-triggered apoptosis irrespective of XIAP expression levels [36] together with the observation that BV6 suppresses cIAPs but not XIAP [32], suggest that cIAPs are the main targets of the smac mimetic BV6 in our model. This conclusion is corroborated by the sensitizing effect of cIAP2 knockdown. Moreover, inactivation of TRAF2 or TRADD using siRNA further supports this model and suggest that TRAF2 may be required to recruit cIAPs in close proximity to RIP1 in TLR3-signaling complex, as described earlier for TNFRI. Alternatively, TRADD which is likely recruited through the DD of RIP1, may be required to recruit TRAF2 allowing RIP1 ubiquitination as recently suggested for TNFRI [37]. In line with this hypothesis, TRADD was shown to be required in mouse embryonic fibroblasts and bone marrow derived mouse dendritic cells, but not macrophages, for RIP1 ubiquitination and for properly NF-κB and MAP kinase activation in response to TLR3 stimulation [37]. However, the N-Ter portion of TRIF can also bind TRAF2 directly, irrespective of TRADD [38]. Thus, although TRADD inactivation enhances TLR-mediated apoptosis, suggesting that this adapter protein plays a positive regulatory function as regards RIP1 ubiquitination, the exact function of TRADD remains, however, to be clarified.

TLR3 is also expressed and able to signal inflammation in normal bronchial and nasopharyngeal epithelial cells which, however, appear insensitive to poly(I:C)-induced apoptosis, even in the presence of smac mimetic (our unpublished data and [11]). Thus, cIAP-mediated RIP1 ubiquitination is unlikely to explain alone resistance to TLR3-triggered apoptosis in normal epithelial cells. Rather, ubiquitination of RIP1 may be considered as a timing device, preventing excessive caspase-8 activation, allowing cell fate decision, similar to c-FLIP and NF-kB activation after TNFRI stimulation [14, 39]. The molecular mechanisms governing the balance between apoptosis and inflammation in cancer cells remains to be fully elucidated, but the selective cytotoxicity and the ability of TLR3 to induce apoptosis

independent of the p53 status - H1703 and NCI-H292 cell lines used in our study possess a mutated and wild type p53, respectively (IARC TP53 database) - suggests that it may be possible to target tumors that have acquired either full or partial resistance to chemotherapy. Moreover, some viruses such as herpesviruses have developed mechanisms to counteract host cell apoptosis induction. For example, cytomegalovirus or herpes simplex virus encode M45 and R1 proteins, respectively, that confer resistance to TNFα- or Poly(I:C)-induced apoptosis by directly interacting with RIP1 [40, 41]. Thus, our findings showing that TLR3-RIP1-caspase-8 death complex formation is required for Poly(I:C)-induced apoptosis could also be of particular relevance for the control of virus replication and virus-associated pathologies such as encephalitis.

More generally, our findings demonstrate that TLR3, much like TNFRI [14], can transmit death signals through caspase-8. However, contrary to TNFRI, caspase-8 appears to be physically linked to TLR3 through TRIF/RIP1. Given that other toll-like receptors are also able to trigger apoptosis [42], and that caspase-8 has also non-apoptotic functions [43], it is tempting to speculate that related platforms may assemble upon stimulation of these TLRs, for the triggering of apoptosis, but also for the regulation of non-apoptotic signalling activities. Further studies will be required to fully address this question.

Materials and methods

Cell culture and reagents. NCI-H1703 and NCI-H292 cells were purchased from ATCC and were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum, Hepes, NaPy, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. Poly(I:C)-HMW was purchased from Invivogen. Bafilomycin-A1 was purchased from Sigma. Etoposide was a gift of URCC Lyon-Sud (Lyon, France). Z-VAD-FMK, Z-FA-FMK and TNFα were from R&D. TRAIL was from Peprotech, and Smac mimetic BV6 was a gift from Wayne Fairbrother (Genentech, CA).

Antibodies. Goat polyclonal anti-caspase-8 (clone C-20) antibody, mouse monoclonal IgG2b anti-TNFRI (clone H-5) antibody and rabbit polyclonal anti-FAS (C-20) antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit polyclonal anti-DR4 and anti-DR5 antibodies were from Chemicon. Mouse monoclonal IgG1 anti-actin (clone C4) antibody was from MP Biomedicals. Mouse monoclonal IgG1 anti-Bcl-2 (clone 124) antibody was from DAKO. Mouse monoclonal IgG1 anti-cIAP2 (clone F30-2285) and IgG2a anti-TRAF2 (clone C90-481) antibodies were from BD Pharmingen. Mouse monoclonal IgG1 anti-TRADD (clone 37), IgG1 anti-FADD (clone 1) and IgG2a anti-RIP1 (clone 38) antibodies were purchased from BD Transduction Laboratories. Mouse monoclonal IgG1 anti-FLIP (clone NF6) antibody was from Alexis Biochemicals. Goat polyclonal anti-cIAP1 and blocking anti-TRAIL antibodies, mouse monoclonal IgG1 blocking anti- TNFα (clone 6401), and anti-caspase-9 (clone LAP6) antibodies were from R&D Systems. Rabbit polyclonal anti-caspase-3, anti-BID, anti-TRIF antibodies, and mouse monoclonal IgG1 anti-caspase-8 (clone 1C12) and anti-ubiquitin (clone P4D1) antibody were from Cell Signaling. Mouse monoclonal activating IgM anti-Fas (clone CH-11), blocking IgG1 anti-Fas (clone ZB4), IgM isotype control (7E10), IgG1 anti-caspase-10 (clone 4C1) and IgG2b anti-caspase-8 (clone 5F7) antibodies were from MBL. HRP-conjugated donkey anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1, IgG2a or IgG2b secondary antibodies were from SouthernBiotech.

Western blotting and co-immunoprecipitation. Cells were lysed in cold lysis buffer (20 mM Tris-HCL [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.2% Nonidet NP40, supplemented with 1 mM orthovanadate, 10 mM NaF and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) for 25 min on ice. Cell lysates were cleared by centrifugation (13,000 g, 10 min, 4°C) and protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Proteins were resolved on

SDS-polyacrylamide gels, transferred onto pvdf membranes by electroblotting and non-specific binding sites were blocked using Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and 5% (w/v) dry milk or BSA. After incubation with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, blots were revealed using the ECL reagents (GE healthcare).

For co-immunoprecipitation experiments cells were cultured in 100 mm or 150 mm dishes, stimulated, collected, washed in PBS and lysed in 500 µl or 1 ml cold lysis buffer, respectively. Lysis buffer was supplemented as above plus 20 µM Z-VAD-FMK, and plus N-ethylmaleimide (Sigma) for ubiquitination analysis. Lysates were precleared with 20 µl Sepharose-6B or protein G-Sepharose fast Flow (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 4°C and then immunoprecipitated overnight at 4°C with 2 µg of either goat anti-caspase-8 antibodies or rabbit anti-TRIF antibodies in the presence of 20 µl protein G-Sepharose for 2 hours or overnight at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, and immunoprecipitates were extensively washed with lysis buffer and eluted with SDS loading buffer by boiling for 5 min. Alternatively, caspase-8 immunoprecipitation was also performed with µMACS^{TM} protein G microbeads (Miltenyl Biotec) according to manufacturer's recommendations. Briefly, cells were lysed as above and then incubated 30 min at 4°C with 50 µl µMACS^{TM} protein G microbeads and 2 µg of goat anti-caspase-8 antibody. Cell lysates were applied onto µ Columns placed in the magnetic field of the µMACS^{TM} Separator. Columns were then rinsed 5 times with lysis buffer, and immunoprecipitates were eluted with pre-heated (95°C) SDS loading buffer. For re-immunoprecipitation experiments, caspase-8 immunoprecipitates were eluted with pre-heated lysis buffer containing 1% SDS and 5 mM DTT; 20% of each sample was resolved by SDS-PAGE, and the remaining 80% was diluted 10 fold in lysis buffer and then re-immunoprecipitated (reIP) with anti-RIP1 antibody, and resolved by SDS-PAGE.

Quantitation of live cell recovery and apoptosis. For live cell recovery measurement, 1.10^4 cells seeded in 96-wells plates were cultured for 24h and then treated as indicateded before adding 20 µl/well of MTS (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay reagents, Promega). Plates were incubated 2h at 37°C in the dark and absorbance was recorded at 470nm and 690 nm using a Multiskan EX microplate photometer (Thermo Scientific). 690 nm wavelength absorbance was used to subtract background. For apoptosis measurement, cells harvested by trypsinization were washed with PBS, and resuspended in annexin V binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2) containing annexin V-FITC and PI (Abcys). FITC- and PI-labelled cell populations were

analyzed by flow cytometry (FACSCalibur) with CellQuest software, and expressed as percentage.

RNA interference. Synthetic RIP1#7 (J-004445-07), RIP1#8 (J-004445-08), TLR3 (L-007745-00-0005), TRIF (L-012833-00-0005) and Control non-silencing (D-001810-03-20) siRNAs were from Dharmacon, and caspase-8 (SI02661946), caspase-9 (SI00299600), cIAP2 (SI02661918), TRADD (SI03098942) and TRAF2 (SI02644579) siRNAs were from Qiagen. Cells were transfected with siRNA using HiPerFect reagents (Qiagen) for 72h to 144h. The final siRNAs concentrations varied from 5 nM to 100 nM according to cell lines and targeted proteins.

Cell transduction. The retroviral vectors pMSCV-puro-c-FLIP-long and pMSCV-Bcl-xL (Addgene plasmid N°8790) were used for the ectopic expression of c-FLIP long and Bcl-xL. Generation of pseudotype virus from the packaging cell line GP2-293 from Clontech. Cells were transduced for 16 hours with viral supernatants containing polybrene (8 mg/ml), washed in phosphate-buffered saline, and selected in complete medium containing puromycine (2.5 mg/ml) for 7 days. Bcl-2 expressing cells were obtained using the pBabe-Blasticidin vector as above. Transduced cells were then selected with blasticidin (2.5 µg/ml). For stable generation of cell lines expressing the luciferase NF-κB and ISRE reporters, cells were transduced with luciferase NF-κB or ISRE reporter lentiviruses (SABiosciences) according to the manufacturer's recommendations, and transduced cells were selected with puromycin (2 µg/ml).

Stable cell transfection. NCI-H292 cells were transfected with pcDNA-Bcl-2 (a gift from P. Mehlen, CLB, Lyon, France) using FuGENE transfection reagent (Roche) and according to the manufacturer's recommendations. The FuGENE reagent (µl):DNA (µg) ratio 3:1 was used. Cell population resistant to G418 was used for the experiments.

Luciferase reporter assay. NCI-H1703 and NCI-H292 cells stably expressing the luciferase NF-κB or ISRE reporter were seeded at 1.10^4 cells per well in 96-wells plates, cultured for 24h and then treated with Poly(I:C) for indicated times. Luciferase activity was measured with a luminometer (Tecan) by adding luciferin substrate (Steady-Glo luciferase assay, Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Statistics. Results are expressed as the mean ± s.e.m. and statistical analysis was performed by two-tailed unpaired Student's t-test. A $p<0.05$ was considered significant.

Acknowledgments

We thank our colleagues who provided reagents, especially Patrick Melhen for the Bcl-2 expressing plasmid, Wayne Fairbrother for the gift of Smac mimetic BV6, Isabelle Grosjean for their assistance with cultures, Stéphanie Brunet-Manquat and Isabelle Durant for their support with flow cytometry, Laure Denis and Carmen Fernandez for assistance with cytokine dosage, Jean-Paul Pais De Barros for assistance with size-exclusion chromatography, and our colleagues in the laboratory for their restless support and encouragement. The Cancéropole Lyon Auvergne Rhone-Alpes (CLARA) funded the work and S.L. was supported by a grant from the Hospices Civils de Lyon. OM was supported by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche 07-PCV-0031), and the European Community (ApopTrain Marie Curie RTN). G.J. and N.L. were supported by fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer and a joint INSERM and Conseil Régional de Bourgogne fellowship respectively. We gratefully acknowledge the help and advice of Nicolas Foray.

Author Contributions

Y.E., F.T., F.V., O.M. and S.L. conceived and designed the experiments. Y.E., F.T., F.V., G.J., M.B., A.P., B.V., N.L. and P.M. performed experiments and data analysis. T.R., B.S., and Y.P. contributed to data analysis, discussions and intellectual input. Y.E., F.T., F.V., O.M. and S.L. wrote the paper with all authors providing detailed comments and suggestions. S.L. directed the project.

References

1. Levy HB, Law LW and Rabson AS. Inhibition of tumor growth by polyinosinic-polycytidylic acid. Proc Natl Acad Sci U S A.1969; 62: 357-361.

2. Sarma PS, Shiu G, Neubauer RH, Baron S and Huebner RJ. Virus-induced sarcoma of mice: inhibition by a synthetic polyribonucleotide complex. Proc Natl Acad Sci U S A.1969; 62: 1046-1051.

3. Takeuchi O and Akira S. Innate immunity to virus infection. Immunol Rev.2009; 227: 75-86.

4. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature.2001; 413: 732-738.

5. Limmon GV, Arredouani M, McCann KL, Corn Minor RA, Kobzik L and Imani F. Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. Faseb J.2008; 22: 159-167.

6. Funami K, Sasai M, Ohba Y, Oshiumi H, Seya T and Matsumoto M. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. J Immunol.2007; 179: 6867-6872.

7. Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ and Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. J Immunol.2006; 176: 4894-4901.

8. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D and Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? Clin Cancer Res.2007; 13: 4565-4574.

9. Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M and Hacker G. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. Cell Death Differ.2010; 17: 942-51.

10. Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. Carcinogenesis.2008; 29: 1334-1342.

11. Friboulet L, Pioche-Durieu C, Rodriguez S, Valent A, Souquere S, Ripoche H, et al. Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis. Neoplasia.2008; 10: 1183-1194.

12. Salaun B, Zitvogel L, Asselin-Paturel C, Morel Y, Chemin K, Dubois C, et al. TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. Cancer Res.2011; 71: 1607-1614.

13. Wilson NS, Dixit V and Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nat Immunol.2009; 10: 348-355.

14. Micheau O and Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell.2003; 114: 181-190.

15. Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, et al. cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. Mol Cell.2011; Epub ahead of print:

16. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. Nat Immunol.2004; 5: 503-507.

17. Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Hacker G, et al. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. J Immunol.2004; 173: 3320-3328.

18. Kaiser WJ and Offermann MK. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. J Immunol.2005; 174: 4942-4952.

19. Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, et al. The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. Mol Cell.2011; Epub ahead of print:

20. Zhang Z, Kim T, Bao M, Facchinetti V, Jung SY, Ghaffari AA, et al. DDX1, DDX21, and DHX36 Helicases Form a Complex with the Adaptor Molecule TRIF to Sense dsRNA in Dendritic Cells. Immunity.2011; 34: 866-878.

21. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z and Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. Mol Cell.2005; 19: 727-740.

22. Der SD, Yang YL, Weissmann C and Williams BR. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A.1997; 94: 3279-3283.

23. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. J Clin Invest.2009; 119: 2399-2411.

24. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH and Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J Biol Chem.1999; 274: 1541-1548.

25. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. J Biol Chem.2002; 277: 45162-45171.

26. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M and Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. J Exp Med.2011; 208: 643-651.

27. Rebsamen M, Meylan E, Curran J and Tschopp J. The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases. Cell Death Differ.2008; 15: 1804-1811.

28. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Nat Chem Biol.2008; 4: 313-321.

29. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y and Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. Genes Dev.1999; 13: 2514-2526.

30. Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J and Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. Immunity.2003; 18: 655-664.

31. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G and Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. Mol Cell.2006; 22: 245-257.

32. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. Cell.2007; 131: 669-681.

33. O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Skountzos P, Yeh WC and Ting AT. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. Curr Biol.2007; 17: 418-424.

34. O'Donnell MA and Ting AT. RIP1 comes back to life as a cell death regulator in TNFR1 signaling. Febs J.2011; 278: 877-887.

35. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K, et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. J Biol Chem.2008; 283: 24295-24299.

36. Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DC, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. Nature.2009; 460: 1035-1039.

37. Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermohlen O, Kranidioti K, Kollias G, et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. Nat Immunol.2008; 9: 1037-1046.

38. Sasai M, Tatematsu M, Oshiumi H, Funami K, Matsumoto M, Hatakeyama S, et al. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. Mol Immunol.2010; 47: 1283-1291.

39. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K and Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. Mol Cell Biol.2001; 21: 5299-5305.

40. Upton JW, Kaiser WJ and Mocarski ES. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. J Biol Chem.2008; 283: 16966-16970.

41. Dufour F, Bertrand L, Pearson A, Grandvaux N and Langelier Y. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against poly(I:C)-induced apoptosis. J Virol.2011; Epub ahead of print:

42. Salaun B, Romero P and Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. Eur J Immunol.2007; 37: 3311-3318.

43. Maelfait J and Beyaert R. Non-apoptotic functions of caspase-8. Biochem Pharmacol.2008; 76: 1365-1373.

Titles and legends to figures

Figure 1. TLR3 activation by Poly(I:C) induces apoptosis and inflammation

(a) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were treated for 24h with Poly(I:C) at the indicated concentrations, and viable cells were numbered with MTS assay and expressed as % of untreated cells. *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

(b) Percentage of annexin V positive ($^+$) and PI^+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells treated for 24h with Poly(I:C) at the indicated concentrations. *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

(c) Percentage of annexin V^+ and PI^+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells treated with 100 μg/ml Poly(I:C) for the indicated times. A representative experiment is shown.

(d) Percentage of annexin V^+ and PI^+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells treated for 1h with 20 μM pan caspases inhibitor Z-VAD-FMK (Z-VAD) or cathepsin inhibitor Z-FA-FMK (Z-FA), and then exposed to 100 μg/ml Poly(I:C) for 24h. *, $p<0.05$ compared with Z-FA-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.

(e) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with non silencing siRNA (siNS) or with siRNA targeting TLR3 (siTLR3) or TRIF (siTRIF), exposed to 100 μg/ml Poly(I:C) for 6h, and the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.

(f) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with siRNA targeting TLR3 or TRIF, and then immunoblotted as indicated.

(g) NCI-H1703 and NCI-H292 cells stably expressing luciferase NF-κB and ISRE reporters were treated 1h with 20 μM Z-VAD, exposed to 100 μg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and the luciferase activity was measured. *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

Figure 2. TLR3 activation triggers primarily the extrinsic pathway of apoptosis

(a) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were incubated with 100 μg/ml Poly(I:C) for increasing times, and then lysed and immunoblotted as indicated. Arrows and arrowheads indicate full length and cleaved proteins, respectively.

(b) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with siRNA targeting caspase-8 (sicasp-8) or caspase-9 (sicasp-9), exposed to 100 μg/ml Poly(I:C) for 6h, and the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.

(c) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with siRNA targeting caspase-8 or caspase-9 for 72h, and then were lysed and immunoblotted as indicated.

(d and e) NCI-H1703 (d) and NCI-H292 (e) cells stably expressing either empty vector (EV), $FLIP_L$-, Bcl-xL-, or Bcl-2-encoding vectors were exposed for 24h to 100 μg/ml Poly(I:C), 100 ng/ml TRAIL, 200 ng/ml anti-Fas antibody clone CH11, or 50 μM etoposide, and then the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$; error bars represent s.e.m.

(f) NCI-H1703 and NCI-H292 cells stably expressing either EV, $FLIP_L$-, Bcl-xL-, or Bcl-2-encoding vectors were lysed and immunoblotted as indicated. *, indicates nonspecific band.

Figure 3. TLR3 activation triggers the formation of a caspase-8-activating complex independent of classical death receptors

(a) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were treated with 100 μg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and caspase-8 was immunoprecipitated (IP) and immunoblotted as indicated. Arrows and arrowheads indicate full length and cleaved proteins, respectively. *, indicates nonspecific band.

(b) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were pretreated 2 h with 10 μg/ml control IgG or antibodies blocking TRAIL, TNFα or Fas (clone ZB4), and then exposed for 24 h to 100 μg/ml Poly(I:C) , 100 ng/ml TRAIL, 50 ng/ml TNFα, or 200 ng/ml anti-Fas antibody clone CH11. Viable cells were numbered with MTS assay and expressed as % of cells treated with control IgG. *, $p<0.05$; error bars represent s.e.m.

(c) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were stimulated with 100 μg/ml Poly(I:C), or with 200 ng/ml anti-Fas antibody clone CH11, 200 ng/ml TRAIL, or 50 ng/ml TNFα (c) for the indicated times, and caspase-8 immunoprecipitates (IP) and cell lysates were analysed by mmunoblot as indicated. Arrows and arrowheads indicate full length and cleaved proteins, respectively. *, indicates nonspecific band.

Figure 4. Both TRIF and TLR3 associate with caspase-8 after Poly(I:C) stimulation

(a and b) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were stimulated with 100 µg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and caspase-8 (a) or TRIF (b) were immunoprecipitated (IP) and immunoblotted as indicated. Arrows and arrowheads indicate full length and cleaved proteins, respectively. Ig, denotes immunoglobulin heavy chain.

Figure 5. RIP1 is essential for TLR3-dependent recruitment and activation of caspase-8

(a) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were treated with 100 µg/ml Poly(I:C), and caspase-8 was immunoprecipitated (IP) and immunoblotted with anti-RIP1 antibody. Arrows, filled arrowheads, and open arrowheads point to full length, cleaved, and modified proteins, respectively.

(b) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with two different siRNA targeting RIP1 (siRIP1#7 and #8) for 72h, exposed to 100 µg/ml Poly(I:C) for 6h, and the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.. siRNA transfected NCI-H1703 and NCI-H292 cells were lysed, and then immunoblotted as indicated.

(c) NCI-H292 cells were transfected as above (c), and exposed or not to 100 µg/ml Poly(I:C) for 120 min. Caspase-8 was immunoprecipitated (IP), and then immunoblotted as indicated. Arrows, filled and open arrowheads point to full length, cleaved, and ubiquitinated proteins, respectively.

(d) NCI-H292 cells were incubated for 1h with 20 µM Z-VAD, and exposed or not to 100 µg/ml Poly(I:C) for 120 min. Caspase-8 was immunoprecipitated (IP) and 20% of the immunoprecipitate was immunobloted with anti-RIP1 antibody (upper panel). The 80 % remaining was denaturated, re-immunoprecipitated (reIP) with anti-RIP1 antibody, and then immunoblotted as indicated (mild and lower panel). Arrows and open arrowheads point full length and ubiquitinated RIP1, respectively. *, indicates nonspecific band.

Figure 6. Inhibition of the ubiquitin ligases TRAF2 and cIAPs, and of the adapter TRADD sensitizes to TLR3-triggered apoptosis.

(a) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were treated with 100 µg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and caspase-8 was immunoprecipitated (IP) and immunoblotted as indicated. Arrows and open arrowheads indicate full length and modified proteins, respectively.

(b) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were transfected with siRNA targeting TRAF2 (siTRAF2), cIAP2 (sicIAP2), or TRADD (siTRADD) for 72h, exposed for 6h to 100 µg/ml Poly(I:C), and the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.

(c) siRNA transfected NCI-H1703 and NCI-H292 cells were lysed, and then immunoblotted as indicated.

(d) Percentage of annexin V^+ and PI^+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells treated for 1h with the smac mimetic BV6 at the indicated concentrations, and then exposed to 100 µg/ml Poly(I:C) or 20 ng/ml TNFα for 6h. *, $p<0.05$; error bars represent s.e.m.

(e) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were incubated for 1h with the indicated concentrations of smac mimetic BV6, and then lysed and immunoblotted as indicated

Figure 7. Inhibition of cIAPs-dependent RIP1 ubiquitination facilitates the formation of the TLR3-dependent death signaling complex and the activation of caspase-8.

(a) NCI-H292 cells were transfected with 2 different siRNA targeting RIP1 (siRIP1#7 and #8) for 72h, incubated for 1h with smac mimetic BV6, and then stimulated with 100 µg/ml Poly(I:C) for 6h. The percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was then measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-treated cells plus Poly(I:C); error bars represent s.e.m.

(b) NCI-H292 cells were treated 1h with 5 µM BV6, and exposed or not to 100 µg/ml Poly(I:C) for 120 min. Caspase-8 was immunoprecipitated (IP), and then immunoblotted as indicated. Arrows, filled and open arrowheads indicate full length, cleaved, and ubiquitinated proteins, respectively. *, indicates nonspecific band.

(c) Signals obtained in (b) and corresponding to RIP1 associated with caspase-8 following Poly(I:C) treatment were quantified using ImageJ software. Quantifications of cleaved and ubiquitinated forms of RIP1 of 4 independent experiments are shown and expressed as % of total RIP1. *, $p<0.05$; error bars represent s.e.m.

Figure 8. Model of TLR3-mediated apoptosis

dsRNA binds to and induces dimerization of TLR3 allowing the recruitment of TRIF, TRAF2, TRADD, cIAP2, and RIP1, and leading to RIP1 ubiquitination, which defines an early checkpoint that negatively regulates the formation of the pro-apoptotic complex containing caspase-8. Degradation of cIAPs by the smac mimetic BV6 inhibits RIP1 ubiquitination and enhances TLR3-mediated apoptosis. See the text for details.

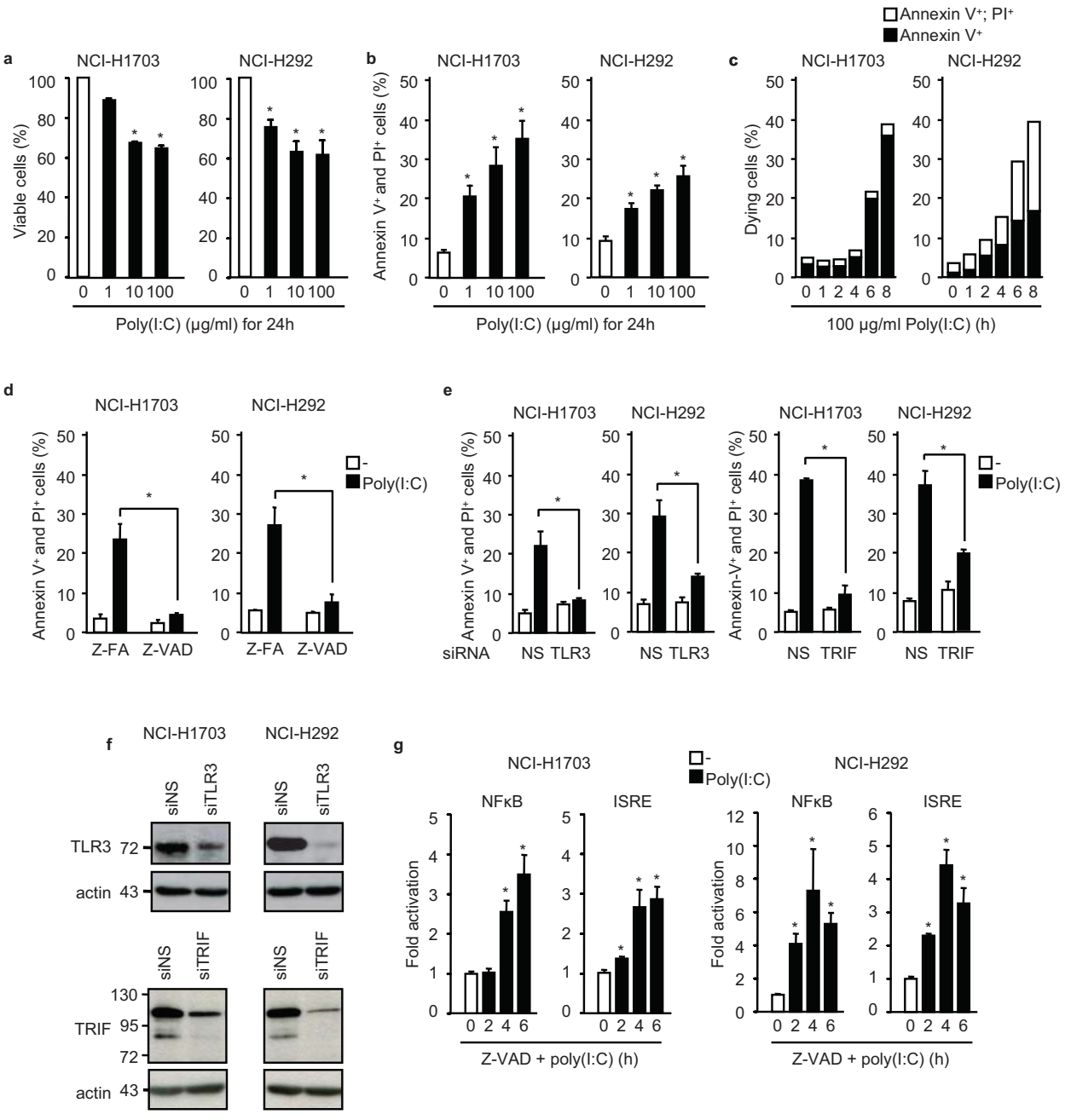
a
NCI-H1703
NCI-H292
Viable cells (%)
Poly(I:C) (μg/ml) for 24h
b
Annexin V+ and PI+ cells (%)
c
Annexin V+; PI+
Annexin V+
Dying cells (%)
100 μg/ml Poly(I:C) (h)
d
Z-FA
Z-VAD
Poly(I:C)
e
siRNA
NS
TLR3
TRIF
f
siNS
siTLR3
siTRIF
TLR3
TRIF
actin
g
NFκB
ISRE
Fold activation
Z-VAD + poly(I:C) (h)

Fig1

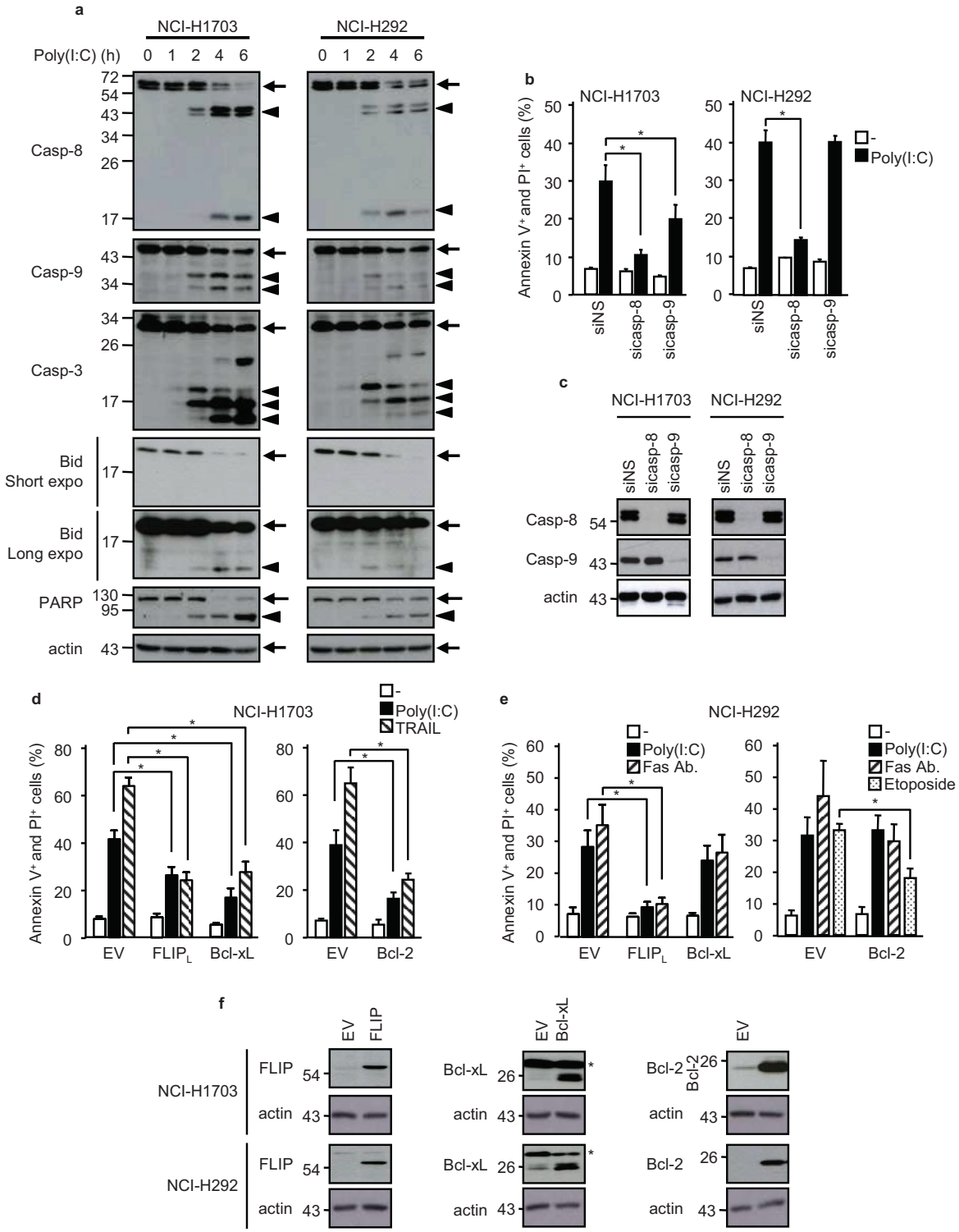
a
NCI-H1703
NCI-H292
Poly(I:C) (h)
0 1 2 4 6
Casp-8
Casp-9
Casp-3
Bid
Short expo
Bid
Long expo
PARP
actin
b
NCI-H1703
NCI-H292
Annexin V+ and PI+ cells (%)
siNS
sicasp-8
sicasp-9
-
Poly(I:C)
c
NCI-H1703
NCI-H292
siNS
sicasp-8
sicasp-9
Casp-8
Casp-9
actin
d
NCI-H1703
-
Poly(I:C)
TRAIL
Annexin V+ and PI+ cells (%)
EV
FLIPL
Bcl-xL
Bcl-2
e
NCI-H292
-
Poly(I:C)
Fas Ab.
Etoposide
Annexin V+ and PI+ cells (%)
EV
FLIPL
Bcl-xL
Bcl-2
f
EV
FLIP
Bcl-xL
Bcl-2
NCI-H1703
NCI-H292
FLIP
Bcl-xL
Bcl-2
actin

Fig2

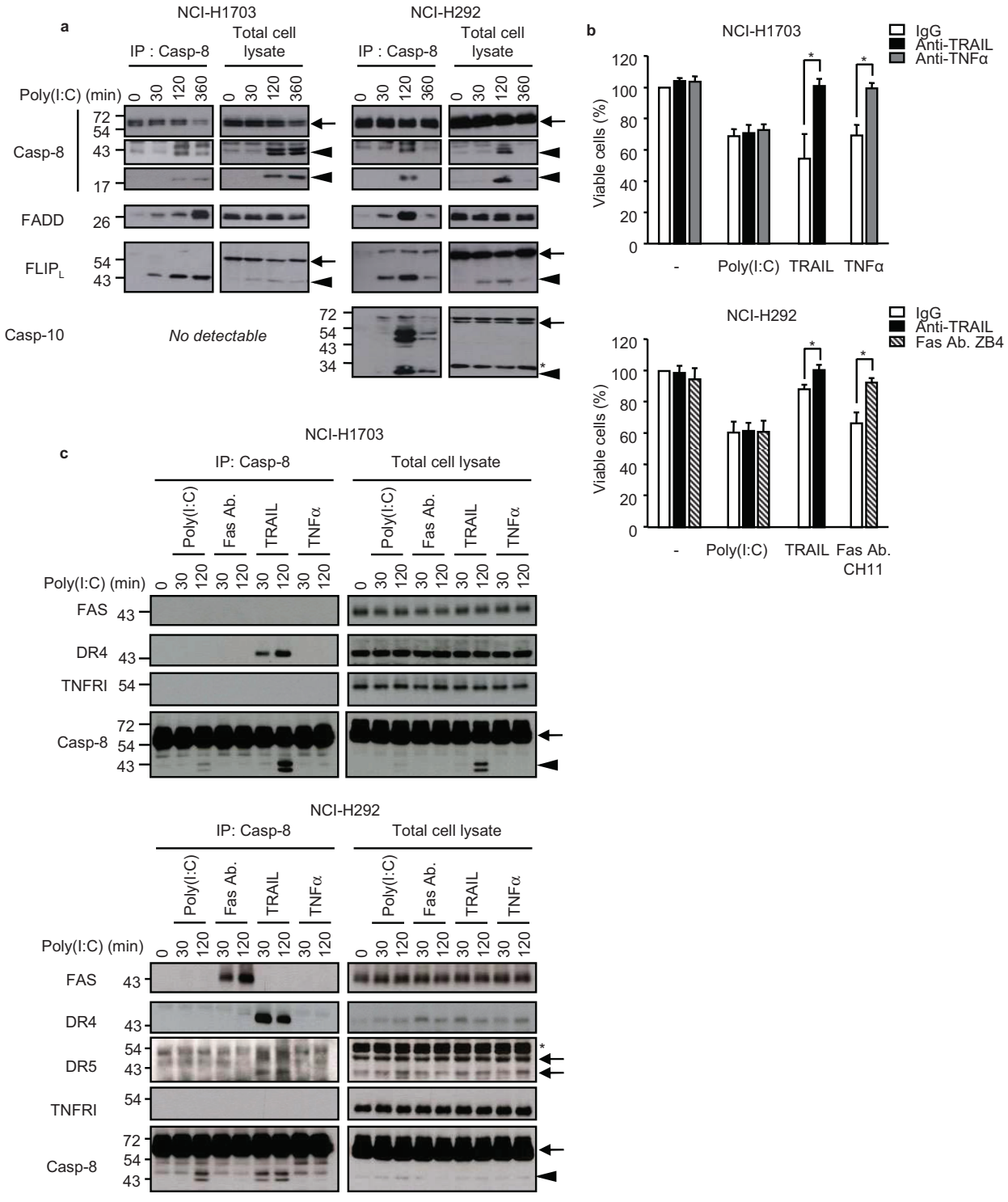
a
NCI-H1703
NCI-H292
IP : Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C) (min)
0
30
120
360
Casp-8
72
54
43
17
FADD
26
FLIP$_L$
54
43
Casp-10
No detectable
72
54
43
34
b
NCI-H1703
IgG
Anti-TRAIL
Anti-TNFα
Viable cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
-
Poly(I:C)
TRAIL
TNFα
NCI-H292
IgG
Anti-TRAIL
Fas Ab. ZB4
Viable cells (%)
-
Poly(I:C)
TRAIL
Fas Ab. CH11
c
NCI-H1703
IP: Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C)
Fas Ab.
TRAIL
TNFα
Poly(I:C) (min)
FAS
43
DR4
43
TNFRI
54
Casp-8
72
54
43
NCI-H292
IP: Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C)
Fas Ab.
TRAIL
TNFα
Poly(I:C) (min)
FAS
43
DR4
43
DR5
54
43
TNFRI
54
Casp-8
72
54
43

Fig3

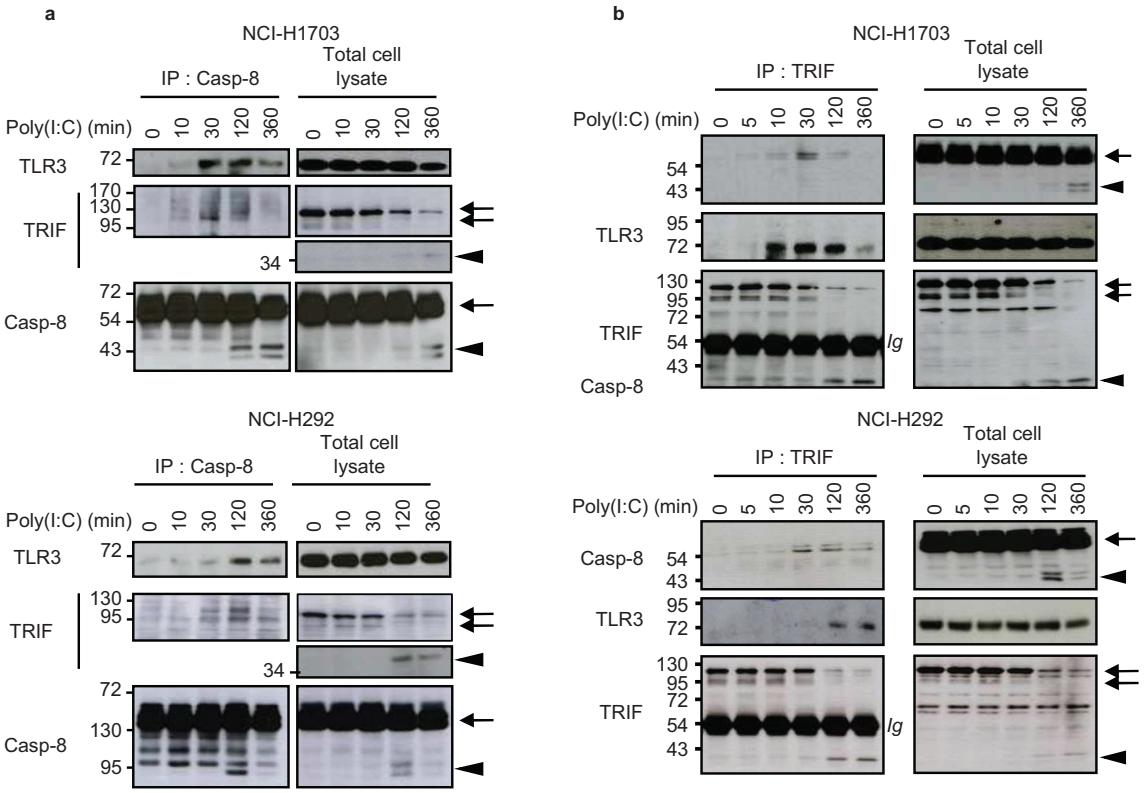
a
NCI-H1703
IP : Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C) (min)
0 10 30 120 360
TLR3
TRIF
Casp-8
72
170
130
95
54
43
34
NCI-H292
b
NCI-H1703
IP : TRIF
Total cell lysate
0 5 10 30 120 360
Ig
NCI-H292

Fig4

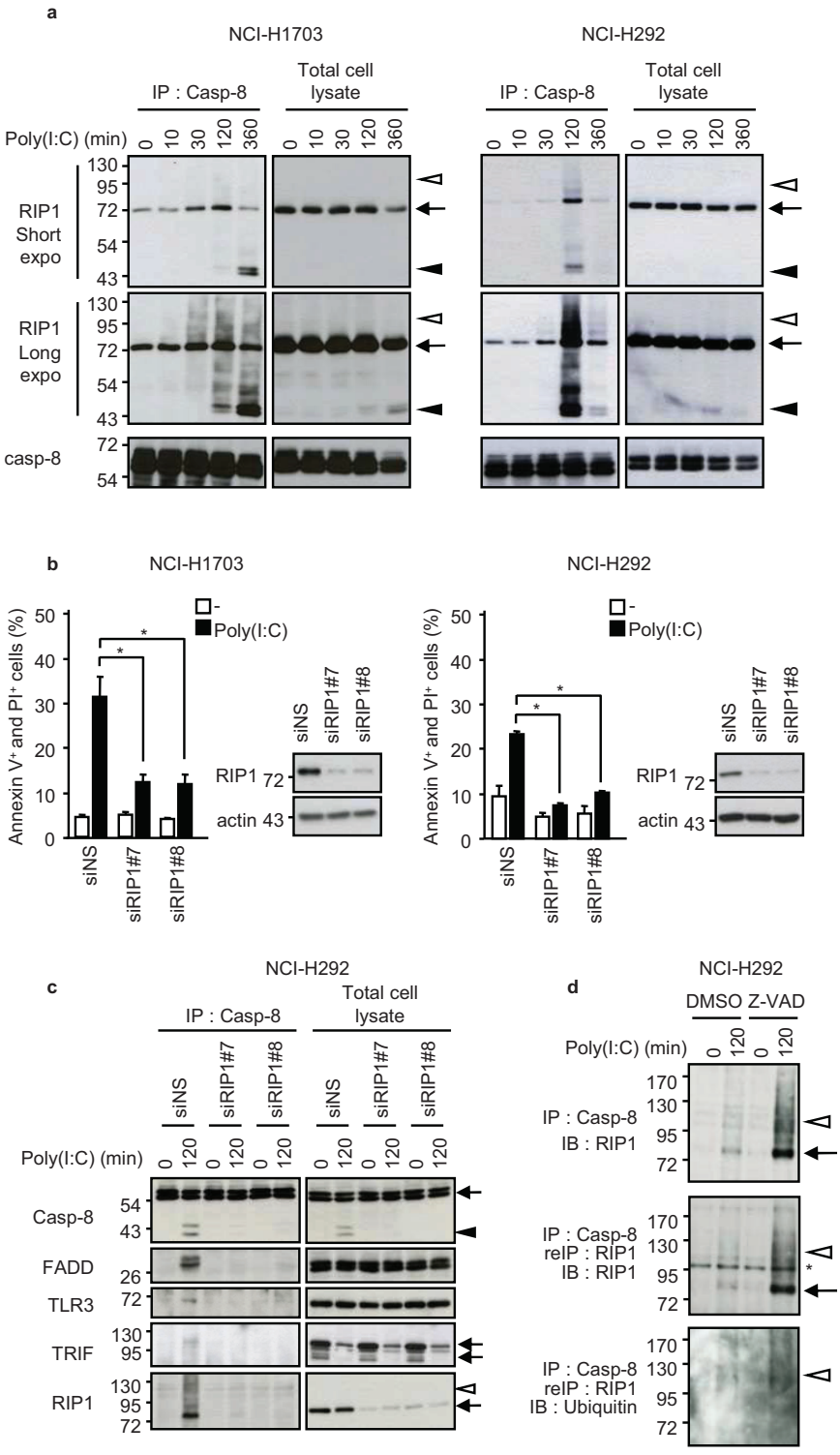
a
NCI-H1703
NCI-H292
IP : Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C) (min)
0 10 30 120 360
RIP1 Short expo
RIP1 Long expo
casp-8
130
95
72
54
43
b
NCI-H1703
NCI-H292
Annexin V+ and PI+ cells (%)
-
Poly(I:C)
siNS
siRIP1#7
siRIP1#8
RIP1
actin
c
NCI-H292
IP : Casp-8
Total cell lysate
Casp-8
FADD
TLR3
TRIF
RIP1
d
NCI-H292
DMSO Z-VAD
IP : Casp-8
IB : RIP1
reIP : RIP1
IB : Ubiquitin

Fig5

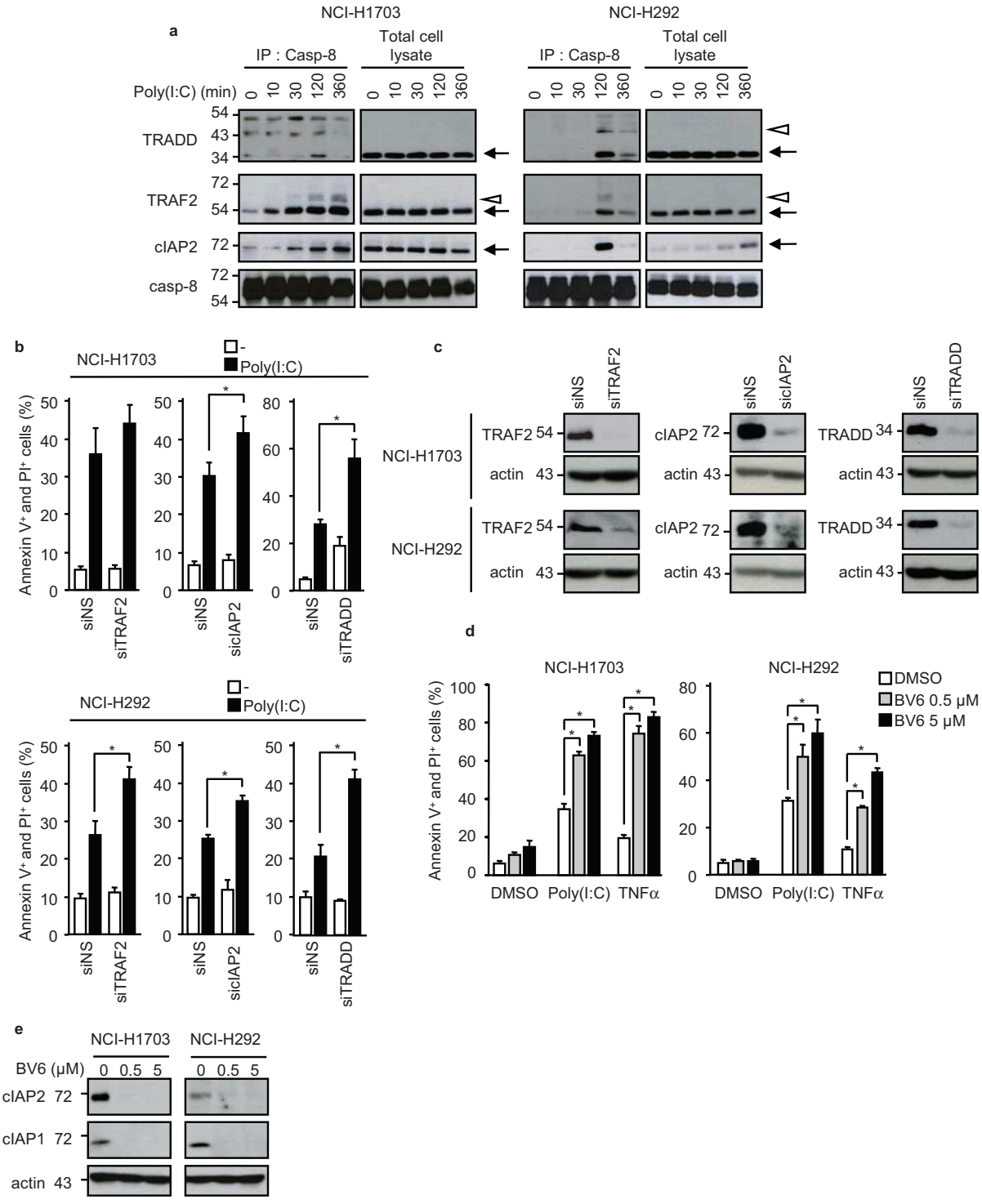
a
NCI-H1703
NCI-H292
IP : Casp-8
Total cell lysate
Poly(I:C) (min)
0 10 30 120 360
TRADD
TRAF2
cIAP2
casp-8
54
43
34
72
b
NCI-H1703
NCI-H292
Poly(I:C)
Annexin V+ and PI+ cells (%)
siNS
siTRAF2
siclAP2
siTRADD
c
siNS
siTRAF2
siclAP2
siTRADD
TRAF2 54
cIAP2 72
TRADD 34
actin 43
d
DMSO
BV6 0.5 μM
BV6 5 μM
DMSO Poly(I:C) TNFα
e
BV6 (μM) 0 0.5 5
cIAP2 72
cIAP1 72
actin 43

Fig6

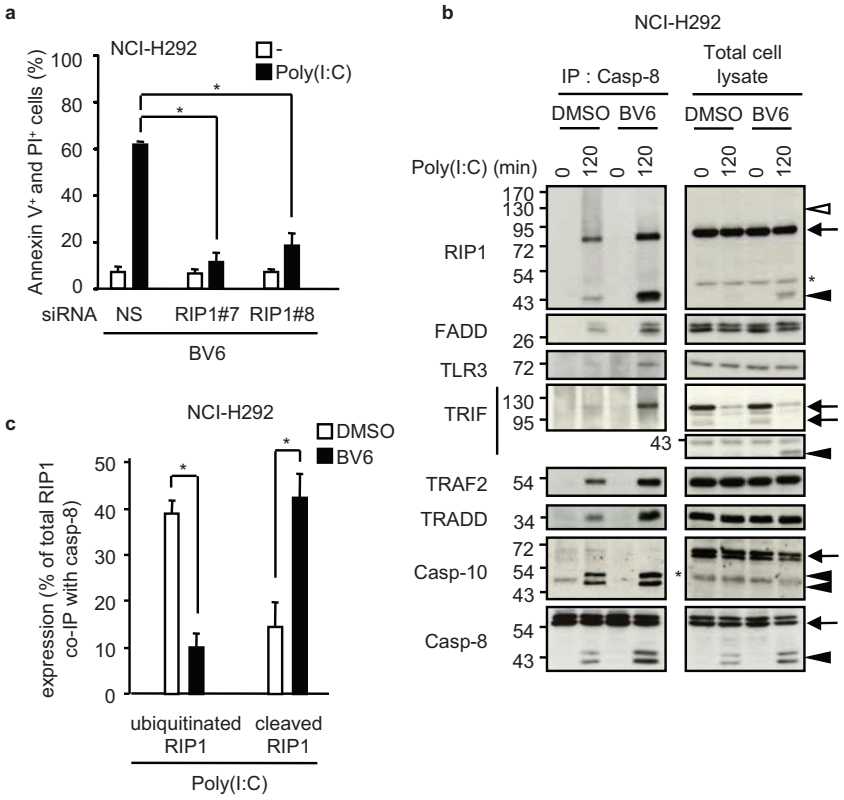
a
NCI-H292
-
Poly(I:C)
Annexin V+ and PI+ cells (%)
100
80
60
40
20
0
*
*
siRNA
NS
RIP1#7
RIP1#8
BV6
b
NCI-H292
IP : Casp-8
Total cell lysate
DMSO
BV6
DMSO
BV6
Poly(I:C) (min)
0
120
0
120
0
120
0
120
RIP1
170
130
95
72
54
43
FADD
26
TLR3
72
TRIF
130
95
43
TRAF2
54
TRADD
34
Casp-10
72
54
43
Casp-8
54
43
c
NCI-H292
DMSO
BV6
expression (% of total RIP1 co-IP with casp-8)
50
40
30
20
10
0
*
*
ubiquitinated RIP1
cleaved RIP1
Poly(I:C)

Fig7

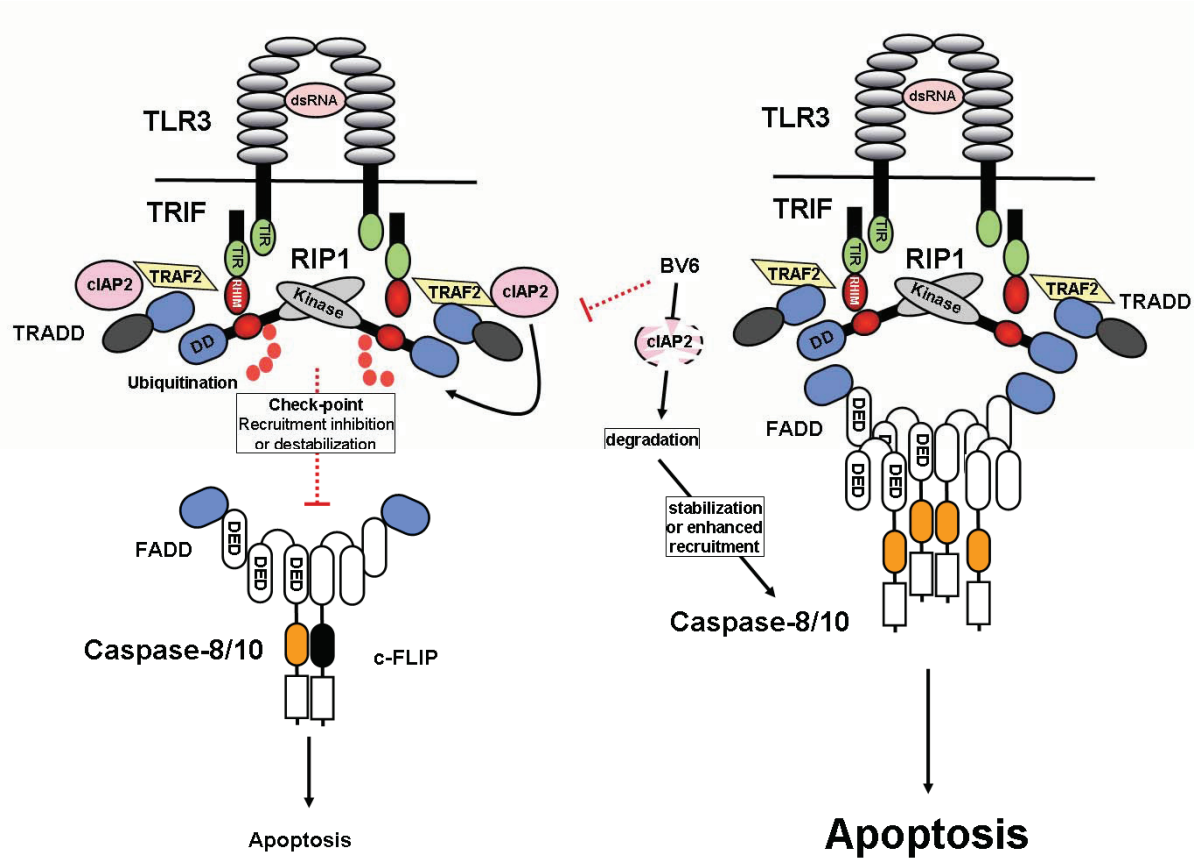
TLR3
dsRNA
TRIF
TIR
RIP1
cIAP2
TRAF2
RHIM
Kinase
TRADD
DD
Ubiquitination
Check-point
Recruitment inhibition
or destabilization
FADD
DED
Caspase-8/10
c-FLIP
Apoptosis
BV6
degradation
stabilization
or enhanced
recruitment
Apoptosis

Fig8

Supplementary information

Supplemental materials and methods

Cell culture, reagents and antibodies. All NSCLC cell lines were purchased from ATCC. NCI-H661, NCI-H520 and NCI-H596 and were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum, Hepes, NaPy, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. SK-MES-1 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, Neaa, NaPy, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. SW900 cells were grown in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine**.** Synthetic MDA5 (L-013041-00-0005), PKR (SI00288232), RIG-I (L-012511-00-0005) siRNAs were from Dharmacon, and FADD#5 (SI00300223), FADD#9 (SI03649016) siRNAs were from Qiagen. Necrostatin-1 was purchased from Sigma. Rabbit polyclonal anti-PKR antibody was from Cell Signaling, goat polyclonal anti-MDA5 was from Santa Cruz Biotechnology and rabbit polyclonal anti-RIG-I was from Abcam.

Cytokines quantitation. Cells supernatants were assayed for IL10, CXCL10 and CCL5 concentrations using a Milliplex map kits (Millipore) and a Luminex Bio-Plex 200 System analyser (Bio-Rad) as recommended by the manufacturer.

Electron microscopy. Cells were fixed by adding 4% glutaraldehyde in cell culture medium for 15 minutes at 4°C. Supernatants were collected and treated separately. Fixation was completed with 4% glutaraldehyde–0.2 M Na-cacodylate/HCl buffer at pH 7.4 for 30 minutes at 4°C. After fixation, cells were washed 3 times with a 0.2 M Na-cacodylate/HCl buffer at pH 7.4 and 0.4 M saccharose solution for 30 minutes. Samples were placed in 2% osmium tetroxide–0.3 M Na-cacodylate/HCl buffer at pH 7.4 for 45 minutes at 4°C, dehydrated in a graded series of ethyl alcohol and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were cut with a RMX-MTL Ultramicrotome (Ventana), contrasted with methanolic uranyl acetate and lead citrate, and examined using a JEOL 1200 EX transmission electron microscope equipped with SIS MEGAVIEW II CCD camera (Olympus) and SIS AnalySIS software (Olympus).

Size-exclusion chromatography. NCI-H1703 cells were stimulated with 100 µg/ml poly(I:C) for 0,5 or 2 h, washed twice in cold phosphate-buffered saline, and lysed in CHAPS-containing lysis buffer (14 mM CHAPS, 150 mM NaCl, and 20 mM Tris-Hcl [pH 7.4], plus complete protease inhibitors). Lysates were loaded onto a Superdex-200 column previously equilibrated in CHAPS lysis buffer. Proteins were eluted at 800 µl/min. Fractions were maintained at 4°C and precipitated using TCA 5%.

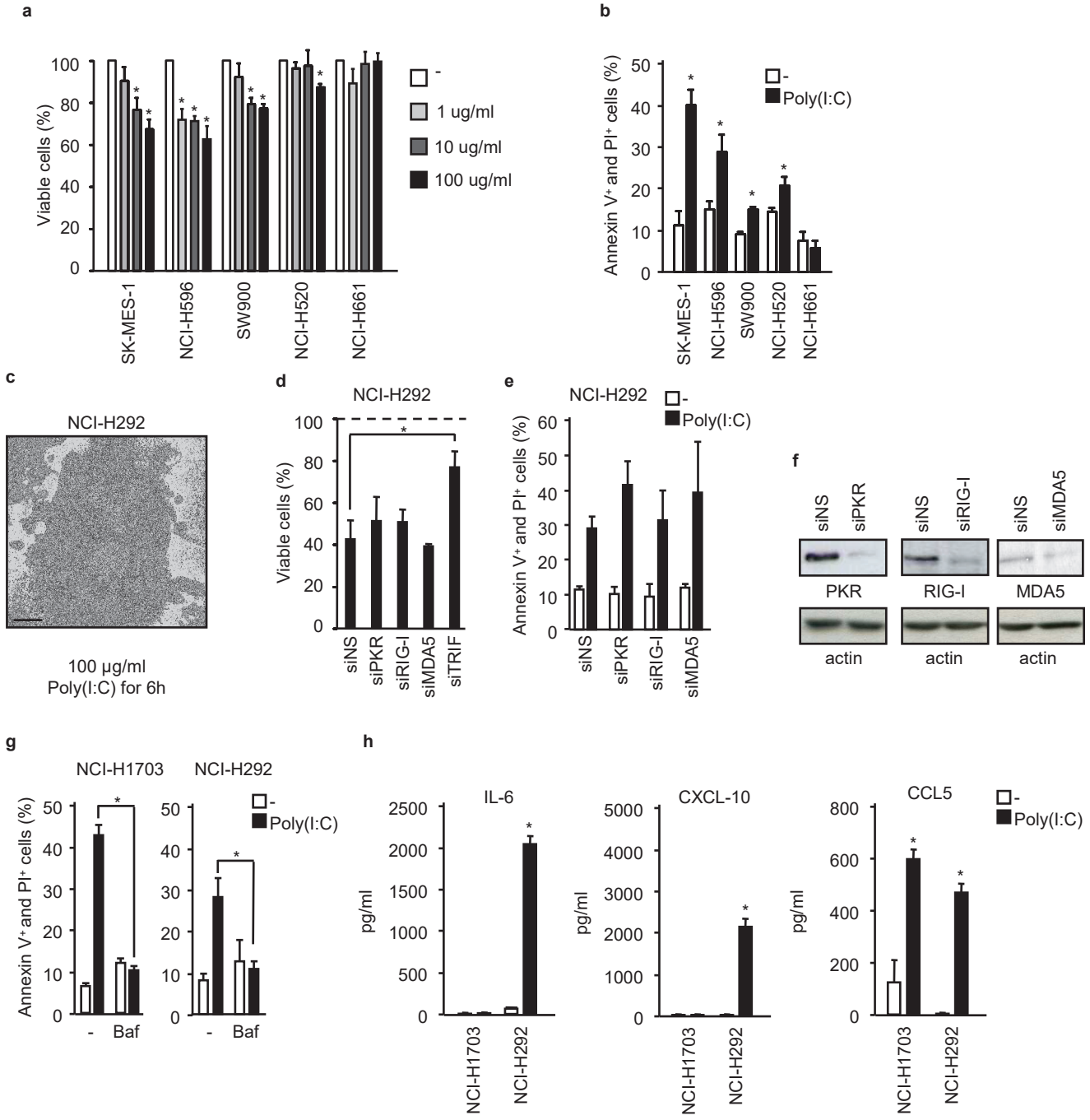

Figure S1. Poly(I:C) decreases NSCLC cells survival and induces apoptosis through TLR3/TRIF pathway.

(a) Various NSCLC cell lines were treated for 24h with Poly(I:C) at the indicated concentrations, and viable cells were numbered with MTS assay and expressed as % of untreated cells. *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

(b) Percentage of annexin V positive $^{(+)}$ and PI^+ NSCLC cells treated for 24h with 100 µg/ml Poly(I:C). *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

(c) Representative picture taken by TEM of NCI-H292 cultured for 6h with 100 µg/ml Poly(I:C) showing typical features of apoptosis. Scale bar, 2 µm.

(d-e) NCI-H292 cells were transfected with non silencing siRNA (siNS) or with siRNA targeting PKR (siPKR), RIG-I (siRIG-I), MDA5 (siMDA5) or TRIF (siTRIF) for 72h, exposed to 100 µg/ml Poly(I:C) for 24h. (d) The number of viable cells was determined and expressed as % of untreated cells (dotted line). (e) The percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with treated siNS cells; error bars represent s.e.m.

(f) siRNA transfected NCI-H292 cells were lysed, and then immunoblotted as indicated.

(g) Percentage of annexin V+ and PI+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells incubated for 1h with 50 nM bafilomycin-A1 (Baf) and then exposed to 100 µg/ml Poly(I:C) for 24h. *, $p<0.05$; error bars represent s.e.m.

(h) NCI-H1703 and NCI-H292 cells were stimulated with 100 µg/ml Poly(I:C) for 24h, and the concentrations of secreted IL-6, CXLC10, and CCL5 cytokines in culture supernatants were determined by multiplex assay. *, $p<0.05$ compared with untreated cells; error bars represent s.e.m.

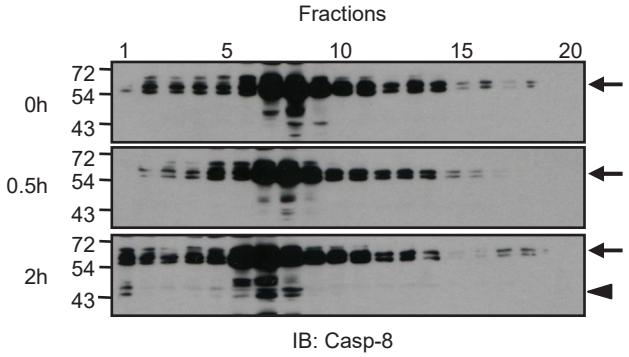

Figure S2. Caspase-8 exhibits high apparent molecular weights after poly(I:C) stimulation.
NCI-H1703 cells were stimulated with 100 µg/ml poly(I:C) for the indicated times, and subsequently lysed in CHAPS lysis buffer. After fractionation on a S200 gel filtration column, caspase-8 was immunoblotted. Arrows correspond to full-length proteins, while arrowheads indicate cleaved fragments.

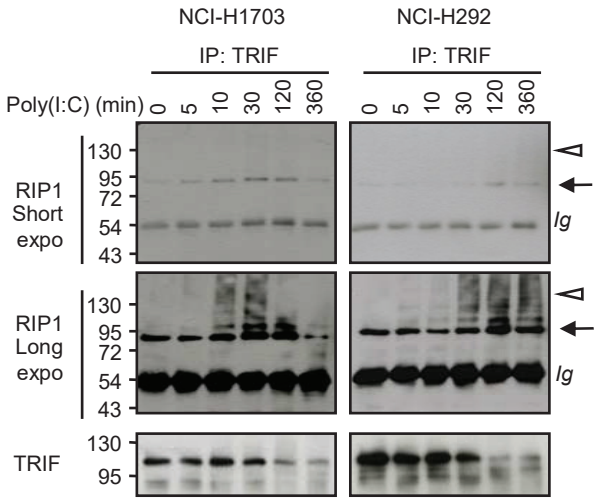

Figure S3. RIP1 associates with TRIF after TLR3 activation.

NCI-H1703 and NCI-H292 cells were stimulated with 100 µg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and TRIF immunoprecipitates (IP) were analyzed by immunoblot. Arrows and open arrowheads point to full length and modified RIP1, respectively. Ig, denotes immunoglobulin heavy chain.

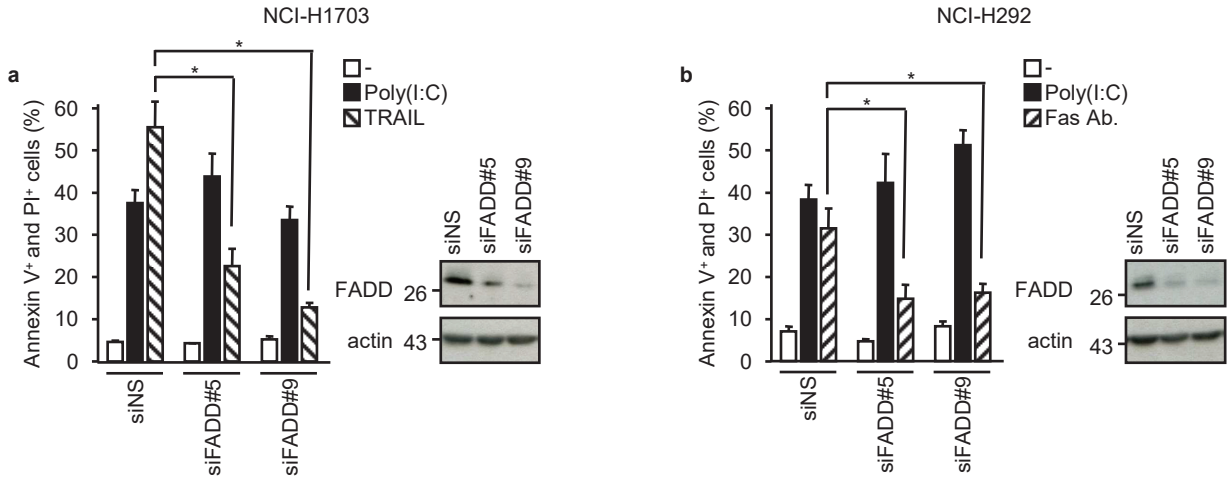

Figure S4. Effect of siRNA targeting FADD treatment on Poly(I:C)-induced apoptosis.
(a and b) NCI-H1703 (a) and NCI-H292 (b) cells were transfected with two different siRNA targeting FADD (siFADD#5 and #9) for 72h, exposed for 6h to 100 μg/ml Poly(I:C) or 200 ng/ml TRAIL (a) or 200 ng/ml anti-Fas antibody (b), and the percentage of annexin V^+ and PI^+ cells was measured. *, $p<0.05$ compared with siNS-transfected cells treated with TRAIL or Fas antibody; error bars represent s.e.m. Right panels: siRNA transfected NCI-H1703 and NCI-H292 cells were lysed, and then immunoblotted as indicated.

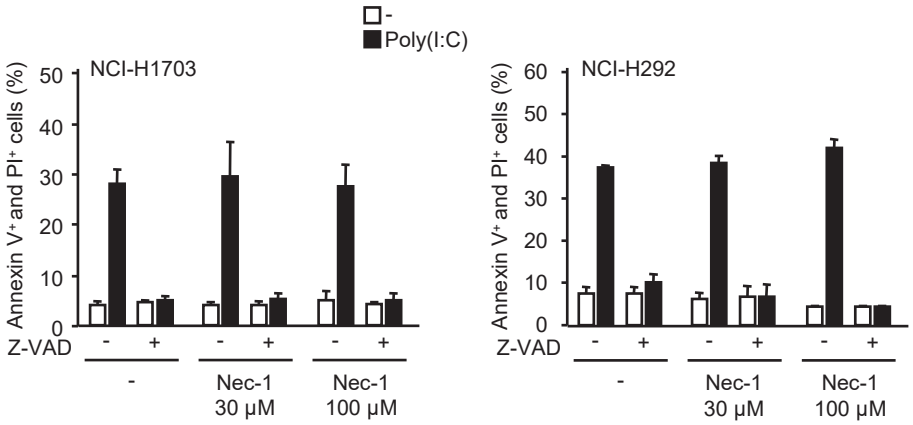

Figure S5. Cell death induced by Poly(I:C) is not inhibited by necrostatin-1
Percentage of annexin V^+ and PI^+ NCI-H1703 and NCI-H292 cells treated for 1h with 20 µM Z-VAD and/or necrostatin-1 (nec-1) at the indicated concentrations, and then exposed to 100 µg/ml Poly(I:C) for 6h. Error bars represent s.e.m.
.

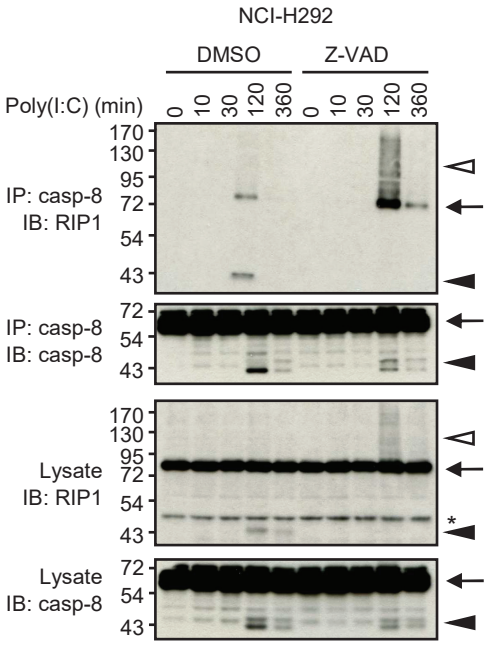

Figure S6. RIP1 cleavage is inhibited by Z-VAD pretreatment

NCI-H292 cells were incubated for 1h with 20 μM caspases inhibitor Z-VAD and then treated with 100 μg/ml Poly(I:C) for the indicated times. Caspase-8 immunoprecipitates were analysed by immunoblot. Arrows, filled arrowheads, and open arrowheads point to full length, cleaved, and modified proteins, respectively. *, indicates nonspecific band.

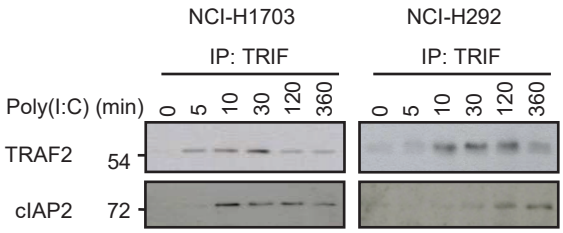

Figure S7. The ubiquitin ligases TRAF2 and cIAP2 associate with TRIF after Poly(I:C) treatment.
NCI-H1703 and NCI-H292 cells were exposed to 100 μg/ml Poly(I:C) for the indicated times, and TRIF immunoprecipitates (IP) and cell lysates were analyzed by immunoblot.

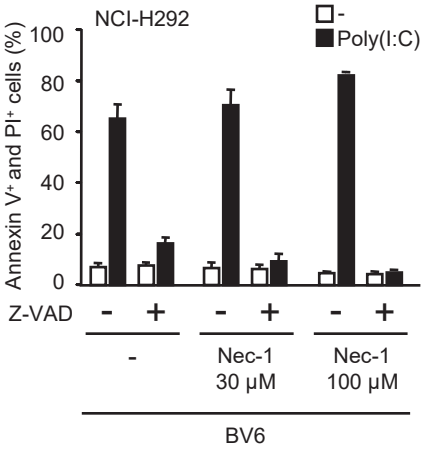

Figure S8. Cell death induced by Poly(I:C) plus smac mimetic BV6 is not inhibited by necrostatin-1
Percentage of annexin V^+ and PI^+ NCI-H292 cells incubated for 1h with 5 µM smac mimetic BV6 in presence or absence of 20 µM Z-VAD and/or necrostatin-1 at the indicated concentrations, and then treated with 100 µg/ml Poly(I:C) for 6h. Error bars represent s.e.m.

3.5 Données complémentaires : Rôle de FLIP et de cIAP dans les cancers buccaux

En parallèle du travail effectué sur le cancer du poumon, nous avons abordé la question de la sensibilité des cancers buccaux à l'ARN db. Ce modèle présente l'avantage de permettre l'accès, en plus des tissus tumoraux, à des tissus buccaux sains. Ils peuvent être obtenus au cours de chirurgies de routines effectués par le chirurgien dentiste, comme les avulsions des dents de sagesse ou les traitements parodontaux. Ils permettent également l'étude d'une série de lésions prénéoplasiques généralement détectée par les dentistes et pour lesquelles un avis d'anatomopathologiste est requis.

A notre connaissance une seule publication a rapporté une sensibilité faible à l'ARN db pour 2 lignées de cancers buccaux, sur 3 testées [141]. Ce chiffre nous est apparu insuffisant pour conclure. Nous avons donc testé l'expression de TLR3 dans 6 lignées de cancers épidermoïdes (OSCC) [7] issues de divers sites buccaux. Toutes présentaient une expression, à des niveaux variables, de la forme clivée et non clivée de TLR3 (figure 3.8A).

Nous avons ensuite évalué la sensibilité des cellules à l'ARN db à l'aide du test de viabilité MTS. A 24H, les courbes dose/réponse ont présenté 3 grands groupes de sensibilité (insensible, faiblement sensible, sensible)(figure 3.8B). Pour une dose donnée (100 µg/ml), a l'exception d'une lignée (H357), le marquage Annexin V/PI s'est révélé faible. Comme attendu, les lignées considérée comme insensibles d'après le test MTS, H314 et H413, ne présentaient pas d'évolution de leur marquarge, 6h comme 24H après traitement (figure 3.8C).

La fonctionnalité de TLR3 a été évaluée par un dosage des cytokines sécrétées en réponse au poly (I :C). Nous avons observé une bonne corrélation avec les sensibilités retrouvées dans le test MTS et la production de RANTES. Par contre, seule les cellules H357 produisaient de fortes quantités d' IL6. Les cellules H314 et H413 étant insensibles à l'ARN db et ne produisant aucune des cytokines testées, nous avons supposé que le récepteur présentait un

7. Les OSCC représentent 90 % des cancers de la cavité buccale [142].

défaut de fonction dans ces cellules, et elles ont par conséquent été écartées du reste de l'étude (figure 3.8D).

La lignée H357 étant la seule lignée testée à présenter une mort significative sous l'effet du poly (I :C), nous nous sommes demandé si elle était dépendante de TLR3. Nous avons donc contrôlé la sensibilité de cette lignée après extinction par siRNA de TLR3 et pu confirmer que les observations étaient spécifiques de TLR3 (figure 3.8E).

En conclusion, toutes les lignées de cancers épidemoïdes buccaux testées expriment TLR3. Toutefois, quand TLR3 est fonctionnel, la sensibilité à l'apoptose semble faible même en présence de fortes concentrations de poly (I :C).

Nous avons cherché à déterminer les paramètres contrôlant la décision de mourir en aval de TLR3.

Dans les cellules de NSCLC la quantité de caspase-8 recrutée par TLR3 après un traitement au poly (I :C) est augmentée par la suppression des cIAPs. Comme attendu, un pré-traitement d'une heure avec le BV6 augmentait la sensibilité de la lignée H357 à l'ARN db. Toutefois, la suppression des cIAP n'avait qu'un impact limité sur la sensibilisation des autres lignées (figure 3.9A).

La cycloheximide a été montrée comme pouvant sensibiliser les cellules à la mort dépendante de l'ARNdb [143]. A l'exception de H103, toutes les lignées se sont révélées plus sensibles après un pré-traitement d'une heure à la cycloheximide (figure 3.9B). Les deux drogues agissant sur des cibles distinctes, nous avons essayé de sensibiliser la lignée H103 à l'aide d'une combinaison des deux traitements. Alors qu'individuellement les drogues ne produisaient pas d'effet, la combinaison des deux sensibilisait fortement la lignée H103 à l'action du poly (I :C) (figure 3.9C).

Compte tenu de l'influence importante jouée par FLIP dans les complexes recrutant RIP1 et caspase-8 (figure 3.7) et de sa courte demi-vie nous avons supposé qu'il pouvait représenter une des cibles importante de la sensibilisation par la cycloheximide. En effet, les lignées rendues sensibles par un pré-traitement à la cycloheximide étaient également sensibilisées à un siRNA FLIP. De plus, la lignée H103 était aussi sensibilisée par la combinaison

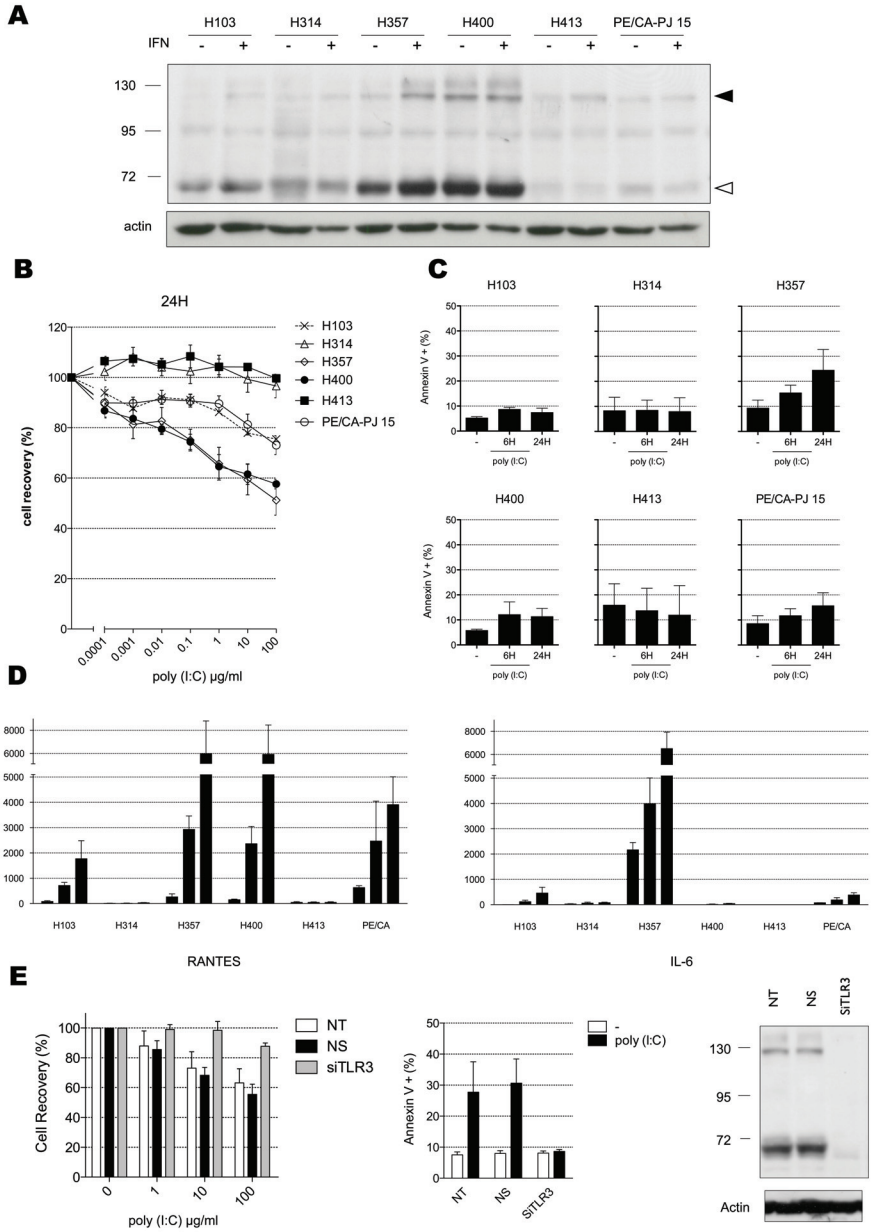

Figure 3.8 – Evaluation de l'expression et de la fonction de TLR3 dans les OSCC

(A) Évaluation de l'expression basale de TLR3, ou induite par un prétraitement de 24h à l'IFN α, à l'aide de l'anticorps TLR3.2 dans 6 lignées de cancer buccaux. (B) Courbes dose/réponse après 24h de traitement au poly (I :C) à l'aide d'un test MTS. (C) Évaluation de la mort induite par une dose de 100 µg/m,l 6h, et 24h aprés traitement. (D) Dosage des cytokines 24h, après traitement avec 0, 1 et 100 µg/ml e poly (I :C). (E) Validation de la mort dépendante de TLR3 pour la lignée H357 après 72h de traitement par un siRNA TLR3. NT, non transfecté ; NS, non silencing.

BV6/siFLIP confirmant l'hypothèse que l'absence de mort dans cette lignée peut être liée à la présence de deux verrous. Le premier, sous le contrôle des cIAPs limitant la formation du complexe proapoptotique dépendant de RIP1, le second, lié à FLIP, capable de bloquer l'activité du complexe et donc l'apoptose et la nécrose. Comme attendu, les effets d'une suppression de FLIP dans la lignée PE/CA-PJ15 pouvaient être augmentés par l'utilisation du BV6. A remarquer dans cette lignée, la présence de mort dans la combinaison BV6/FLIP en absence de stimulation à l'ARN db. Cette dernière peut s'expliquer par la constitution d'un ripoptosome suite au traitement au BV6 qui devient opérationnel du fait de la levée de l'inhibition provoquée par FLIP mais reste à confirmer.

Ces données préliminaires, et le modèle qu'elles suggèrent, restent encore à valider en de nombreux points, comme par exemple, contrôler que les effets observés sont bien dépendants de TLR3. Il apparait important de déterminer si l'ubiquitination de RIP1 est le seul élément qui en aval de TLR3 détermine le recrutement de la machinerie aboutissant à la mort. Si tel est le cas la combinaison BV6/siFLIP suffirait à sensibiliser toutes les cellules possédant au minimum un TLR3 fonctionnel, RIP1 et les partenaires impliqués dans le complexe de mort.

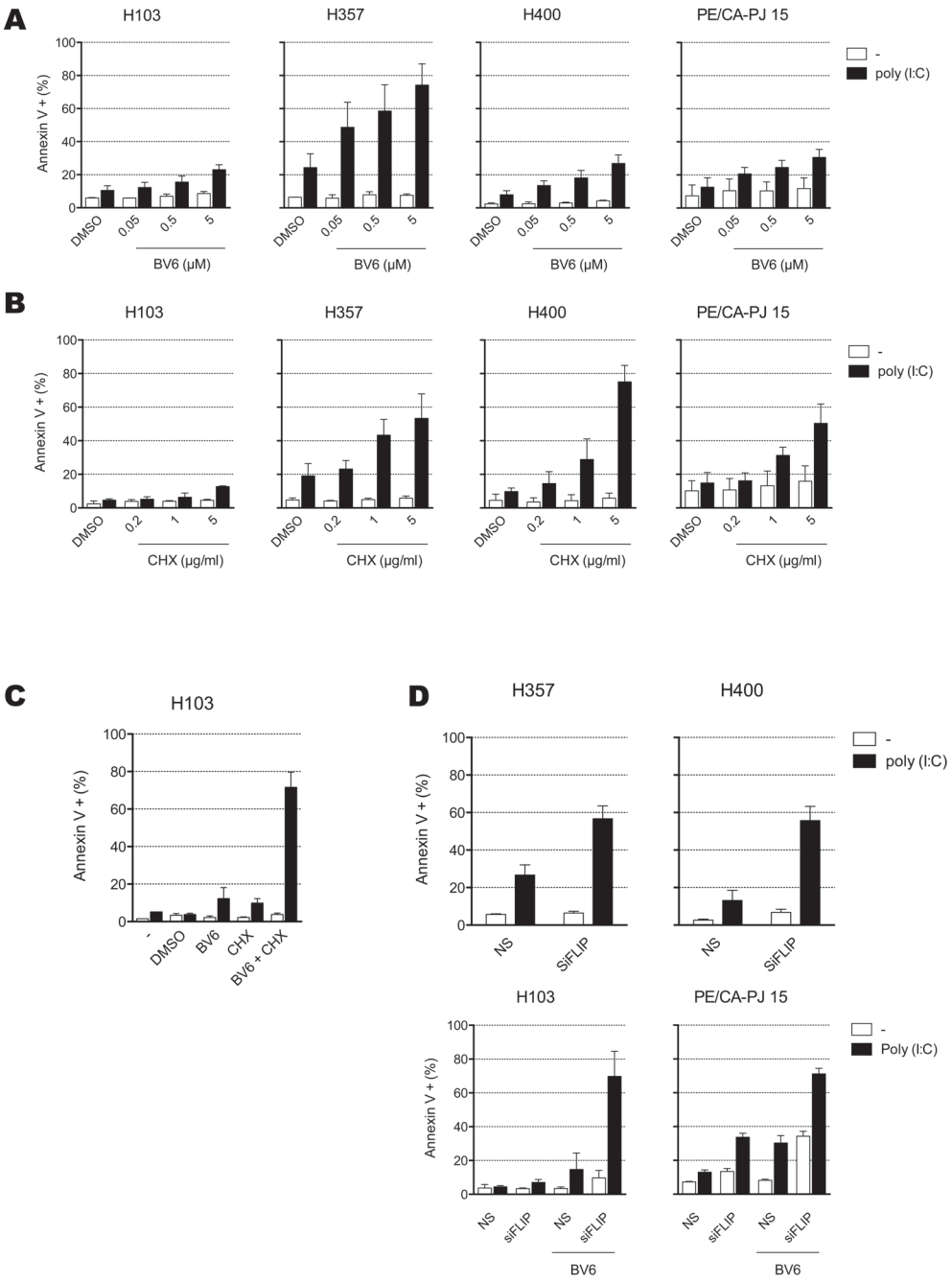

Figure 3.9 – Sensibilisation des OSCC à la mort cellulaire induite par TLR3 (A) Sensibilisation à la mort par un prétraitement d' 1H avec différentes doses de BV6 suivi d'un traitement de 6h au poly (I :C) (100 µg/ml). (B) Évaluation de l'évolution de la mort après un prétraitement d'1h avec des doses croissantes de cycloheximide (CHX) suivit d'un traitement au poly (I :C) (100 µg/ml). (C) combinaison de BV6 (5µM) à la CHX (5µg/ml) 1h avant traitement au poly (I :C) (100 µg/ml) sur la lignée H103. (D) Prétraitement par un siFLIP (25nM sur la nuit) seul ou en combinaison avec du BV6 (5µM).

Chapitre 4

Conclusion : TLR3, un TLR atypique ?

4.1 TLR3 et la famille des TLRs intracellulaires

Les TLRs sont les acteurs principaux de mécanismes anciens permettant à l'organisme de détecter des composés extérieurs. Ils semblent avoir co-évolué chez les vertébrés comme les invertébrés pour participer à la réponse immunitaire innée. Chez les vertébrés, la séquence des TLRs a suivi une évolution lente, attribuée à la forte conservation des ligands [43]. On peut toutefois observer des variabilités inter-espèces dans la détection des PAMPs. Par exemple, TLR5 est activé par la flagelline, le principal constituant d'une structure en forme de fouet servant au déplacement des bactéries, le flagelle. Seul 13 acides aminés de la flagelline sont nécessaires à TLR5 pour détecter un grand nombre de bactéries différentes à l'exception de deux taxons possédant une flagelline inhabituelle qui leur permet d'échapper à la reconnaissance tout en conservant leur mobilité [144]. Malgré la bonne conservation de leur séquence, l' ECD du TLR5 murin détecte la plupart des flagellines mieux que l'humain. De même, le TLR2 humain ne répond pas à certains lipopeptides contenant des groupements acyls de longueurs différentes alors que le TLR2 de souris ne fait pas cette distinction [145]. Enfin, TLR7 et

TLR8 ont des séquences très proches et peuvent détecter chez l'homme des molécules similaires comme l'ARN simple brin, dérivé du génome de virus, ou de petites molécules synthétiques, apparentées aux acides nucléiques. Par contre, bien que TLR7 et 8 soient également présents chez la souris, seul TLR7 est activé par ces ligands, ce qui laisse supposer que TLR8 n'est peut être pas directement fonctionnel dans cet animal [146, 147, 148].

L'évolution, en plus de modifier la structure et la spécificité des TLRs, a aussi introduit des changements dans les profils d'expression des TLRs et un certain nombre de différences ont été observées entre la souris et l'homme. Ces changements sont liés à des différences dans les promoteurs. Mais alors que pour des gènes comme *TLR4*, ces changements sont subtiles, il a été montré que l'expression de TLR2 et 3 était sous le contrôle de promoteurs remarquablement différents [149]. Ces variations inter-espèces peuvent refléter une adaptation de l'hôte aux bactéries pathogènes ou commensales, et/ou inversement une pression sélective sur les bactéries pour maintenir certaines niches écologiques.

Chez l'homme, les TLR3, 7, 8 et 9 semblent subir une pression sélective supérieure aux autres TLRs, ce qui leur confère une certaine singularité [21]. Mais, dans la littérature, c'est surtout leur localisation intracellulaire qui leur vaut d'être regroupés au sein d'une même famille et de nombreux points communs semblent justifier ce regroupement [150]. Les TLRs intracellulaires reconnaissent tous des acides nucléiques et leur spécificité est plus liée au type de structure tridimensionnelle que peuvent former ces composés qu'à leur enchainement dans une séquence. Ils n'ont donc intrinsèquement pas la possibilité de faire la distinction quant à l'origine des acides nucléiques. De même, la spécificité de TLR9, qui a d'abord été supposée limitée aux motifs CpG non méthylés, a récemment été montrée comme directement liée au squelette 2' desoxyribose phosphate de l'ADN simple brin, la séquence ne faisant que moduler l'intensité de la réponse [151].

On prête également aux TLRs intracellulaires une fonction commune. Bien qu'ils soient capables de détecter d'autres microbes [42], leur fonction principale est souvent associée à la reconnaissance des virus. Cette idée est renforcée par le fait que les acides nucléiques sont des PAMPs viraux car ils

induisent tous la production d'IFN de type I, un élément clé dans la réponse contre les virus. Même si le mécanisme est encore mal compris, on peut toutefois noter que TLR2 [38] et TLR4 sont capables de détecter des virus et de produire une réponse adaptée sous la forme d'IFN de type I. Cette production nécessite l'endocytose des récepteurs et il semblerait que la réponse IFN ne puisse être initiée qu'à partir des compartiments intracellulaires. Une des causes possibles est que TRAF3, un élément clef de la voie de signalisation activant la production d'IFN de type I, n'est disponible qu'à l'intérieur des cellules [152]. La réponse immunitaire antivirale n'est donc pas limitée à un type de PAMP mais plus à une localisation dans la cellule.

Le groupe des TLRs intracellulaires semble dépendre de co-facteurs identiques. En 2006, Tabeta et coll. décrivent chez la souris une mutation induisant un défaut de signalisation pour les 3 TLRs murins reconnaissant les acides nucléiques (TLR3, 7 et 9) [153]. Cette souche triplement déficiente, ou 3d, présente une mutation de la protéine Unc93B1 qui l'empêche d'interagir avec le domaine transmembranaire de ces TLRs, interaction qui semble nécessaire à leur fonction [154]. Cette dépendance des TLRs intracellulaires pour Unc93B1 a également été observée pour TLR8 chez l'homme par Casrouges et coll. [155].

Le regroupement de ces protéines sous la même étiquette a conduit à une extrapolation quasi systématique des observations d'un TLR intracellulaire à l'ensemble de la famille. Pourtant, des données de littérature, ainsi que nos travaux, laissent penser que TLR3 occupe une place à part parmi les TLRs intracellulaires.

4.2 TLR3 dans l'ombre de ses cousins

D'un point de vue structurel, alors que TLR7, 8 et 9 possèdent une organisation similaire, TLR3 apparait plus comme un cousin (figure 1.7). A l'exception de TLR3, aucun cristal de ces TLRs n'est disponible, mais en comparant les séquences, on peut toutefois supposer des différences structurelles importantes avec TLR3. D'abords leurs ECDs sont construits à partir d'un nombre plus important de LLRs, avec 25 LRRs contre 23 pour TLR3. En-

suite, ils présentent également des insertions différentes dans leur séquences consensus, avec une insertion de 16 acides aminés, dont 4 résidus cystéines, au niveau du LRR8 et une séquence de liaison de 30 acides aminés après le LRR14 qui partage l'ECD en deux portions distinctes [83, 156].

En 2008, 2 équipes [157, 158] ont démontré que la maturation de TLR9 par clivage est nécessaire à son activation. Cette observation a été étendue à TLR7 et bien sûr TLR3 [159]. Même si la maturation des TLRs intracellulaires implique un clivage, il est raisonnable de penser qu'il n'aura pas le même impact sur des structures aussi différentes. Ainsi les divergences fonctionnelles observées entre nos constructions et celles de TLR9 pourraient être liées à des mécanismes de reconnaissance différents. Le clivage fonctionnel des TLRs n'est d'ailleurs pas une stratégie réservée aux TLRs intracellulaires. TLR15 est un TLR aviaire de surface qui détecte un facteur de virulence associé aux champignons et aux bactéries. En cherchant le ligand de ce TLR, Zoete et coll [160] ont montré que son activation est initiée à partir d'une digestion du TLR par des protéases microbiennes. L'intégration du clivage dans l'activation des TLRs peut donc prendre des formes différentes et il n'est pas improbable qu'il n'ai pas la même fonction dans TLR3 que dans TLR7 et 9.

De même, les défauts de fonction associés au co-facteur Unc93B1 pourraient avoir des origines différentes. En effet, l'ensemble des TLRs intracellulaires interagissent avec Unc93B1 au niveau de leur domaine transmembranaire [154]. Kim et coll. [161] ont montré pour TLR7 et TLR9 que l'interaction avec Unc93B1 n'est pas nécessaire à la reconnaissance du ligand mais qu'elle est importante pour leur sortie du réticulum endoplasmique et leur adressage dans les endosomes. Alors que TLR7 dépend de sa séquence transmembranaire pour son adressage, la localisation de TLR3 est dictée par une séquence différente de 23 acides aminés reliant le domaine transmembranaire au domaine TIR (Glu^{727}-Asp^{749}) [162]. Il n'a d'ailleurs jamais été formellement démontré que Unc93B1 est responsable de l'adressage de TLR3 dans ces compartiments.

Bien que mangeant à la même table et partageant les mêmes couverts, TLR3 ne se nourrit probablement peut être pas comme ces cousins. Il peut

donc être intéressant de sortir TLR3 de son cadre familial, que se soit pour expliquer le rôle de la mort, qui est une spécificité de TLR3, ou celui du clivage, qui semble être partagé par tous les TLRs intracellulaires

4.3 Impact du clivage sur le modèle de reconnaissance de l'ARN db par TLR3

Qu'apportent nos données au modèle de reconnaissance de l'ARN db par TLR3, tel qu'il est décrit dans la littérature ? Nous avons montré qu'une forme non clivable de TLR3 est capable de signaler et que le clivage augmente la signalisation en aval de TLR3. Il apparait toutefois important de déterminer si le clivage favorise la reconnaissance du ligand ou la signalisation en aval. Cette question apparait cruciale car si la maturation de TLR3 modifie les modalités de détection de l'ARN db, elle imposerait une révision de certains aspects du modèle. En effet, il est important de rappeler que le cristal comme les observations biochimiques régissant la liaison du ligand à son récepteur ont été faites en absence de clivage de la protéine.

Ce défaut de maturation impose donc la prudence quant à l'interprétation du modèle, la forme clivée étant majoritaire dans la plupart des types cellulaires que nous avons testés. Par exemple, on admet généralement que la reconnaissance de l'ARN db par TLR3 n'implique pas de modification conformationnelle, le cristal du dimère présentant la même organisation que le monomère [87]. A l'inverse, en utilisant des constructions de TLR9 fluorescentes, Latz et coll. montrent que, dans la cellule, l'engagement de TLR9 par son ligand induit un changement de conformation [163]. Cette différence pourrait trouver son explication dans le fait que TLR9, contrairement à TLR3, forme spontanément des dimères en solution [89]. Pourtant, rien ne permet à l'heure actuelle d'exclure que la position de la portion N-terminale de TLR3 ne soit pas modifiée suite au clivage.

Il est également raisonnable de supposer que certaines limitations du modèle actuel pourraient également être remises en question par le clivage. La modification des seuils de pH et de taille permettrait alors de comprendre des

observations restées jusqu'ici difficilement compatibles. Par exemple, Kleinman et coll. [164] ont montré que des siRNAs de 21 et 23 paires de bases sont capables, dans des cellules endothéliales humaines de la choroïde, d'activer un TLR3 localisé en surface. Cette activation, indépendante de la séquence des siRNAs, ne nécessite pas d'endocytose et induit la production d'IL-12 et d'IFN de type II (IFN γ), des cytokines dépendantes de la voie NFκB. A l'exception de cette étude et des travaux qui ont suivi [165], l'analyse de l'expression en surface de TLR3 se limite, à notre connaissance, à une simple détection en FACS et n'a pas encore été reliée à une fonction précise. En utilisant la même approche, nous n'avons pas été en mesure de détecter TLR3 à la surface de plusieurs types cellulaires mais la question reste néanmoins ouverte.

4.4 Rôle de l'apoptose dépendante de TLR3 dans la réponse anti-virale

Les données sur les TLRs sont en général analysées à travers le prisme de la réponse immunitaire et inflammatoire. Il est donc normal de considérer la mort dépendante de TLR3 comme un dispositif anti-viral. En effet, l'élimination de cellules infectées par des virus est un puissant mécanisme de défense. Le suicide cellulaire fournit un moyen de priver les virus d'un hôte nécessaire à sa réplication, et limite donc sa propagation. Le caractère fondamental de cette barrière de défense est renforcé par l'existence d'inhibiteurs des voies de l'apoptose et de la nécroptose chez les virus [166]. Mais, alors que la mort induite par des cellules cytotoxiques comme les lymphocytes T ou les cellules NK est connue depuis longtemps avec notamment les voies de la perforine/granzyme [167] ou celle des récepteurs de mort [168], les connaissances sur celle provoquée directement par l'infection virale restent encore limitées.

Le lien entre la mort cellulaire contrôlée et les récepteurs à ARN db cytosoliques reste encore mal documenté [169, 170, 171]. En montrant que TLR3 peut recruter caspase-8, par l'intermédiaire de RIP1, notre équipe a isolé

la première voie de signalisation reliant l'ARN db directement à la destruction cellulaire et donc un mécanisme de défense supplémentaire dans la lutte contre l'infection virale. Cependant, bien que décrite dans de nombreux articles, l'apoptose dépendante de TLR3 n'a, à notre connaissance, jamais été démontrée comme un potentiel rempart à la propagation des virus. De plus, il n'a pas encore été établi que ce mécanisme puisse être mis en jeu dans des cellules normales.

Le recrutement de Caspase-8 ne s'accompagne pas toujours d'apoptose. Par exemple, il a été montré que RIP1 et FADD sont nécessaires pour la production d'IFN en aval de RIG-I [172]. Dans un article récent, Rajput et coll. [173] montrent que suite à une infection virale, RIG-I est capable de recruter, en plus de RIP1 et FADD, Caspase-8, mais que la formation de ce complexe n'induit pas d'apoptose. Le recrutement de Caspase-8 sert ici à limiter l'activation d'IRF3 dépendante de RIP1, par clivage de RIP1. De même, chez la drosophile, l'homologue de Caspase-8 (DREDD) est recruté par l'intermédiaire de l'équivalent de FADD (dFADD), à la protéine IMD qui possède une séquence apparentée à RIP1. Il a été proposé que DREDD soit impliqué dans la protéolyse de Relish, une protéine de la famille des NFκB, une étape nécessaire à son activation [174]. Enfin, Maelfait et coll. ont également pu montrer que l'activation de Caspase-8 dépendante de TLR3 pouvait être impliquée dans la maturation de la pro-IL-1 [175].

Certains éléments apparaissent donc importants pour replacer nos observations dans un contexte physiologique. Il nous faut d'abord savoir dans quelle mesure l'apoptose dépendante de TLR3 peut être impliquée, *in vivo*, dans la lutte contre l'infection virale. Si le rôle de TLR3 est de lutter contre l'infection viral et l'apoptose est une stratégie qu'il peut mettre en œuvre, on peut se demander pourquoi les ligands de TLR3 induisent si peu d'apoptose, *in vitro*, dans les cellules normales, même à des concentrations importantes ? Les circonstances même du recrutement de la caspase-8 en aval de TLR3 restent à définir. Est-il systématique ou spécifique d'un contexte ? la caspase-8 peut-elle jouer un rôle non-apoptotique comme observé pour RIG-I, ou seulement apoptotique ? L'observation d'un recrutement de la caspase-8 par TLR3 restant pour le moment limitées aux lignées tumorales dans un

contexte apoptotique, une autre question apparait importante : existe-t-il un avantage sélectif à maintenir un récepteur potentiellement nocif ?

4.5 Rôle pro-tumoral de TLR3 dans les cancers

Le caractère ambivalent de la signalisation en aval des récepteurs de mort semble souvent être exploité par les cellules cancéreuses. Ainsi, Chen et coll. [176] ont montré que l'expression de CD95 est favorable à la croissance tumorale. Comme pour le TNF, les certaines cellules expriment le ligand de CD95 (CD95L) dans des quantités inférieures à celles nécessaires pour induire l'apoptose mais suffisantes pour activer des voies impliquées dans la croissance tumorale. L'expression de TLR3 en présence donc, ici, de petites quantité d'ARN db pourrait favoriser la croissance tumorale.

Dans leur mise à jour des principales caractéristiques acquises par les cellules tumorales ou cours de la carcinogénèse, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg considèrent l'inflammation comme un facteur favorisant la transformation [177]. Ainsi, une activation inférieure au seuil de sensibilité à l'apoptose permettra aux cellules tumorales de contrôler leur microenvironnement en exploitant la composante inflammatoire de la signalisation en aval de TLR3.

Les éléments définissant la sensibilité des cellules à l'apoptose dépendante de TLR3 restent encore inconnu mais nous avons commencé à montrer qu'elle pouvait être influencée par l'absence des cIAPs et la quantité, et probablement l'isoforme, de FLIP. La modulation de ce seuil par la cellule peut se révéler défavorable à une cellule mais présente des avantages à l'échelle d'une communauté. Bien que la présence d'une mort cellulaire active et altruiste chez les organismes unicellulaire soit un sujet de débat, il existe de nombreux exemples où la mort de certaines cellules est utile et souhaitable pour la communauté [178, 179, 180] soit pour la structurer, soit pour la gestion des nutriments. Même s'il est généralement admis que les cellules tumorales, en s'affranchissant des barrières nécessaires au maintien de l'intégrité de l'or-

ganisme, acquièrent un comportement égoïste, il est raisonnable de supposer qu'elles ont pu hériter de certains de ces réflexes communautaires observés chez les organismes unicellulaires.

Deux mécanismes détectables par TLR3 peuvent traduire la présence d'un problème dans l'environnement proche de la cellule. Le premier relève de la communication intercellulaire par l'échange de structures vésiculaires contenant des acides nucléiques, comme les exosomes [181]. A l'instar du *quorum sensing* des bactéries, la quantité de particules présentes dans l'environnement fournit une information sur l'évolution d'une population et permet d'adapter le comportement des cellules en conséquence (migration, suicide). Le deuxième, plus direct, est l'occurrence d'une mort par apoptose ou par nécrose augmentant rapidement la quantité de ligand dans l'environnement. Cependant, l'existence d'un écosystème tumoral, introduisant un comportement communautaire au sein des cellules tumorales, reste pour le moment purement hypothétique.

L'identification des TLRs a eu définitivement un impact majeur sur notre compréhension de l'immunité. Le récent prix Nobel de Jules Hoffmann et de Bruce Beutler illustre parfaitement l'importance de cette découverte sur la médecine et la biologie. Elle s'est appuyée sur l'une des plus grandes inventions de Cuvier : l'anatomie comparée. Appliquée aux voies de signalisations, cet outil s'est révélé être un moteur puissant pour comprendre le rôle et le fonctionnement de ces protéines. Toutefois, à ne voir dans les TLRs que l'illustration de la théorie brillante de Charles Janeway, nous avons involontairement réduit le champs de leurs fonctions. L'approche pragmatique de Cuvier imposerait donc de reprendre les faits. Concernant TLR3, le travail de notre équipe montre que le modèle actuel de reconnaissance de l'ARN db par TLR3 est incomplet et nécessiterait d'être précisé une fois la protéine clivée. Il isole également une voie de signalisation dont le contexte de mise en œuvre reste à définir. Dans un cas comme dans l'autre, il apparait important de déterminer dans quelle mesure ces observations s'inscrivent dans un rôle immunitaire de TLR3 tout en gardant à l'esprit qu'il pourrait n'être qu'un élément d'une fonction plus large.

Bibliographie

[1] Charles Darwin. *L'origine des espèces : au moyen de la sélection naturelle ou La préservation des races favorisées dans la lutte pour la vie.* G.F., ISSN 0768-0465 ; 685. 1992.

[2] Toby A Appel. *The Cuvier-Geoffroy debate : French biology in the decades before Darwin.* Monographs on the history and philosophy of biology. Oxford University Press, New York, 1987.

[3] E M De Robertis and Y Sasai. A common plan for dorsoventral patterning in bilateria. *Nature*, 380(6569) :37–40, Mar 1996.

[4] E M De Robertis. The molecular ancestry of segmentation mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43) :16411–2, Oct 2008.

[5] K V Anderson, G Jürgens, and C Nüsslein-Volhard. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo : genetic studies on the role of the toll gene product. *Cell*, 42(3) :779–89, Oct 1985.

[6] K V Anderson, L Bokla, and C Nüsslein-Volhard. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo : the induction of polarity by the toll gene product. *Cell*, 42(3) :791–8, Oct 1985.

[7] C Hashimoto, K L Hudson, and K V Anderson. The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2) :269–79, Jan 1988.

[8] Gregory T Reeves and Angelike Stathopoulos. Graded dorsal and differential gene regulation in the drosophila embryo. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(4) :a000836, Oct 2009.

[9] Louisa M Liberman, Gregory T Reeves, and Angelike Stathopoulos. Quantitative imaging of the dorsal nuclear gradient reveals limitations

to threshold-dependent patterning in drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(52) :22317–22, Dec 2009.

[10] N J Gay and F J Keith. Drosophila toll and il-1 receptor. *Nature*, 351(6325) :355–6, May 1991.

[11] B Lemaitre, E Nicolas, L Michaut, J M Reichhart, and J A Hoffmann. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell*, 86(6) :973–83, Sep 1996.

[12] C A Janeway, Jr. Approaching the asymptote ? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1 :1–13, 1989.

[13] R Medzhitov, P Preston-Hurlburt, and C A Janeway, Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640) :394–7, Jul 1997.

[14] R Medzhitov and C A Janeway, Jr. Innate immunity : the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3) :295–8, Oct 1997.

[15] F L Rock, G Hardiman, J C Timans, R A Kastelein, and J F Bazan. A family of human receptors structurally related to drosophila toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2) :588–93, Jan 1998.

[16] O Takeuchi, T Kawai, H Sanjo, N G Copeland, D J Gilbert, N A Jenkins, K Takeda, and S Akira. Tlr6 : A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*, 231(1-2) :59–65, Apr 1999.

[17] X Du, A Poltorak, Y Wei, and B Beutler. Three novel mammalian toll-like receptors : gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw*, 11(3) :362–71, Sep 2000.

[18] T Chuang and R J Ulevitch. Identification of htlr10 : a novel human toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*, 1518(1-2) :157–61, Mar 2001.

[19] A Bowie and L A O'Neill. The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily : signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*, 67(4) :508–14, Apr 2000.

[20] Aisling Dunne and Luke A J O'Neill. The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily : signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*, 2003(171) :re3, Feb 2003.

[21] Jean-Laurent Casanova, Laurent Abel, and Lluis Quintana-Murci. Human tlrs and il-1rs in host defense : natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol*, 29 :447–91, Apr 2011.

[22] Bruce Beutler and Ernst Th Rietschel. Innate immune sensing and its roots : the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*, 3(2) :169–76, Feb 2003.

[23] R B Yang, M R Mark, A Gray, A Huang, M H Xie, M Zhang, A Goddard, W I Wood, A L Gurney, and P J Godowski. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 395(6699) :284–8, Sep 1998.

[24] C J Kirschning, H Wesche, T Merrill Ayres, and M Rothe. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 188(11) :2091–7, Dec 1998.

[25] C Gerard. Bacterial infection. for whom the bell tolls. *Nature*, 395(6699) :217, 219, Sep 1998.

[26] A Poltorak, X He, I Smirnova, M Y Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, and B Beutler. Defective lps signaling in c3h/hej and c57bl/10sccr mice : mutations in tlr4 gene. *Science*, 282(5396) :2085–8, Dec 1998.

[27] R Shimazu, S Akashi, H Ogata, Y Nagai, K Fukudome, K Miyake, and M Kimoto. Md-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 189(11) :1777–82, Jun 1999.

[28] B Henderson, S Poole, and M Wilson. Bacterial modulins : a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev*, 60(2) :316–41, Jun 1996.

[29] O Takeuchi, K Hoshino, T Kawai, H Sanjo, H Takada, T Ogawa, K Takeda, and S Akira. Differential roles of tlr2 and tlr4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4) :443–51, Oct 1999.

[30] A O Aliprantis, R B Yang, M R Mark, S Suggett, B Devaux, J D Radolf, G R Klimpel, P Godowski, and A Zychlinsky. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428) :736–9, Jul 1999.

[31] H D Brightbill, D H Libraty, S R Krutzik, R B Yang, J T Belisle, J R Bleharski, M Maitland, M V Norgard, S E Plevy, S T Smale, P J Brennan, B R Bloom, P J Godowski, and R L Modlin. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285(5428) :732–6, Jul 1999.

[32] R Schwandner, R Dziarski, H Wesche, M Rothe, and C J Kirschning. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274(25) :17406–9, Jun 1999.

[33] A Yoshimura, E Lien, R R Ingalls, E Tuomanen, R Dziarski, and D Golenbock. Cutting edge : recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like receptor 2. *J Immunol*, 163(1) :1–5, Jul 1999.

[34] M Hirschfeld, J J Weis, V Toshchakov, C A Salkowski, M J Cody, D C Ward, N Qureshi, S M Michalek, and S N Vogel. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, 69(3) :1477–82, Mar 2001.

[35] A Ozinsky, D M Underhill, J D Fontenot, A M Hajjar, K D Smith, C B Wilson, L Schroeder, and A Aderem. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25) :13766–71, Dec 2000.

[36] O Takeuchi, T Kawai, P F Mühlradt, M Morr, J D Radolf, A Zychlinsky, K Takeda, and S Akira. Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 13(7) :933–40, Jul 2001.

[37] Taro Kawai and Shizuo Akira. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5) :637–50, May 2011.

[38] Roman Barbalat, Laura Lau, Richard M Locksley, and Gregory M Barton. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type i interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol*, 10(11) :1200–7, Nov 2009.

[39] A K Field, A A Tytell, G P Lampson, and M R Hilleman. Inducers of interferon and host resistance. ii. multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(3) :1004–10, Sep 1967.

[40] B L Jacobs and J O Langland. When two strands are better than one : the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded rna. *Virology*, 219(2) :339–49, May 1996.

[41] Friedemann Weber, Valentina Wagner, Simon B Rasmussen, Rune Hartmann, and Søren R Paludan. Double-stranded rna is produced by positive-strand rna viruses and dna viruses but not in detectable amounts by negative-strand rna viruses. *J Virol*, 80(10) :5059–64, May 2006.

[42] S Bauer, C J Kirschning, H Häcker, V Redecke, S Hausmann, S Akira, H Wagner, and G B Lipford. Human tlr9 confers responsiveness to bacterial dna via species-specific cpg motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16) :9237–42, Jul 2001.

[43] Jared C Roach, Gustavo Glusman, Lee Rowen, Amardeep Kaur, Maureen K Purcell, Kelly D Smith, Leroy E Hood, and Alan Aderem. The evolution of vertebrate toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27) :9577–82, Jul 2005.

[44] Nicholas J Gay, Monique Gangloff, and Luke A J O'Neill. What the myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol*, 32(3) :104–9, Mar 2011.

[45] Y Xu, X Tao, B Shen, T Horng, R Medzhitov, J L Manley, and L Tong. Structural basis for signal transduction by the toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808) :111–5, Nov 2000.

[46] D Hultmark. Macrophage differentiation marker myd88 is a member of the toll/il-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(1) :144–6, Feb 1994.

[47] M Muzio, J Ni, P Feng, and V M Dixit. Irak (pelle) family member irak-2 and myd88 as proximal mediators of il-1 signaling. *Science*, 278(5343) :1612–5, Nov 1997.

[48] R Medzhitov, P Preston-Hurlburt, E Kopp, A Stadlen, C Chen, S Ghosh, and C A Janeway, Jr. Myd88 is an adaptor protein in the htoll/il-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2(2) :253–8, Aug 1998.

[49] Luke A J O'Neill and Andrew G Bowie. The family of five : Tir-domain-containing adaptors in toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5) :353–64, May 2007.

[50] François Leulier and Bruno Lemaitre. Toll-like receptors–taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet*, 9(3) :165–78, Mar 2008.

[51] Mansi Srivastava, Oleg Simakov, Jarrod Chapman, Bryony Fahey, Marie E A Gauthier, Therese Mitros, Gemma S Richards, Cecilia Conaco, Michael Dacre, Uffe Hellsten, Claire Larroux, Nicholas H Putnam, Mario Stanke, Maja Adamska, Aaron Darling, Sandie M Degnan, Todd H Oakley, David C Plachetzki, Yufeng Zhai, Marcin Adamski, Andrew Calcino, Scott F Cummins, David M Goodstein, Christina Harris, Daniel J Jackson, Sally P Leys, Shengqiang Shu, Ben J Woodcroft, Michel Vervoort, Kenneth S Kosik, Gerard Manning, Bernard M Degnan, and Daniel S Rokhsar. The amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature*, 466(7307) :720–6, Aug 2010.

[52] Marie E A Gauthier, Louis Du Pasquier, and Bernard M Degnan. The genome of the sponge amphimedon queenslandica provides new perspectives into the origin of toll-like and interleukin 1 receptor pathways. *Evol Dev*, 12(5) :519–33, 2010.

[53] Istvan Botos, David M Segal, and David R Davies. The structural biology of toll-like receptors. *Structure*, 19(4) :447–59, Apr 2011.

[54] Karine Narbonne-Reveau, Bernard Charroux, and Julien Royet. Lack of an antibacterial response defect in drosophila toll-9 mutant. *PLoS One*, 6(2) :e17470, 2011.

[55] N Pujol, E M Link, L X Liu, C L Kurz, G Alloing, M W Tan, K P Ray, R Solari, C D Johnson, and J J Ewbank. A reverse genetic analysis of components of the toll signaling pathway in caenorhabditis elegans. *Curr Biol*, 11(11) :809–21, Jun 2001.

[56] Jennifer L Tenor and Alejandro Aballay. A conserved toll-like receptor is required for caenorhabditis elegans innate immunity. *EMBO Rep*, 9(1) :103–9, Jan 2008.

[57] Guokai Chen, Olga Zhuchenko, and Adam Kuspa. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science*, 317(5838) :678–81, Aug 2007.

[58] Polly Matzinger. Friendly and dangerous signals : is the tissue in control ? *Nat Immunol*, 8(1) :11–3, Jan 2007.

[59] Simona Fornarino, Guillaume Laval, Luis B Barreiro, Jeremy Manry, Estelle Vasseur, and Lluis Quintana-Murci. Evolution of the tir domain-containing adaptors in humans : Swinging between constraint and adaptation. *Mol Biol Evol*, Aug 2011.

[60] L Alexopoulou, A C Holt, R Medzhitov, and R A Flavell. Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857) :732–8, Oct 2001.

[61] Elisabeth Vercammen, Jens Staal, and Rudi Beyaert. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*, 21(1) :13–25, Jan 2008.

[62] Yiqi Guo, Magali Audry, Michael Ciancanelli, Laia Alsina, Joana Azevedo, Melina Herman, Esperanza Anguiano, Vanessa Sancho-Shimizu, Lazaro Lorenzo, Elodie Pauwels, Paul Bastard Philippe, Rebeca Pérez de Diego, Annabelle Cardon, Guillaume Vogt, Capucine Picard,

Zafitsara Zo Andrianirina, Flore Rozenberg, Pierre Lebon, Sabine Plancoulaine, Marc Tardieu, Valérie Doireau, Emmanuelle Jouanguy, Damien Chaussabel, Frederic Geissmann, Laurent Abel, Jean-Laurent Casanova, and Shen-Ying Zhang. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete tlr3 deficiency : Tlr3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*, Sep 2011.

[63] Kurt H Edelmann, Sarah Richardson-Burns, Lena Alexopoulou, Kenneth L Tyler, Richard A Flavell, and Michael B A Oldstone. Does toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections ? *Virology*, 322(2) :231–8, May 2004.

[64] Leonid Gitlin, Winfried Barchet, Susan Gilfillan, Marina Cella, Bruce Beutler, Richard A Flavell, Michael S Diamond, and Marco Colonna. Essential role of mda-5 in type i ifn responses to polyriboinosinic :polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(22) :8459–64, May 2006.

[65] Zhiqiang Zhang, Taeil Kim, Musheng Bao, Valeria Facchinetti, Sung Yun Jung, Amir Ali Ghaffari, Jun Qin, Genhong Cheng, and Yong-Jun Liu. Ddx1, ddx21, and dhx36 helicases form a complex with the adaptor molecule trif to sense dsrna in dendritic cells. *Immunity*, 34(6) :866–78, Jun 2011.

[66] Roman Barbalat, Sarah E Ewald, Maria L Mouchess, and Gregory M Barton. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*, 29 :185–214, Apr 2011.

[67] Justin D Lathia, Eitan Okun, Sung-Chun Tang, Kathleen Griffioen, Aiwu Cheng, Mohamed R Mughal, Gloria Laryea, Pradeep K Selvaraj, Charles ffrench Constant, Tim Magnus, Thiruma V Arumugam, and Mark P Mattson. Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci*, 28(51) :13978–84, Dec 2008.

[68] Eitan Okun, Kathleen Griffioen, Boaz Barak, Nicholas J Roberts, Kamilah Castro, Mario A Pita, Aiwu Cheng, Mohamed R Mughal, Ruiqian Wan, Uri Ashery, and Mark P Mattson. Toll-like receptor 3 inhi-

bits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(35) :15625–30, Aug 2010.

[69] Qing Lin, Dan Fang, Jiazhu Fang, Xiangrong Ren, Xiaoping Yang, Feng Wen, and Shao Bo Su. Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in tlr3-deficient mice. *J Immunol*, 186(6) :3710–7, Mar 2011.

[70] Yuping Lai, Anna Di Nardo, Teruaki Nakatsuji, Anke Leichtle, Yan Yang, Anna L Cogen, Zi-Rong Wu, Lora V Hooper, Richard R Schmidt, Sonja von Aulock, Katherine A Radek, Chun-Ming Huang, Allen F Ryan, and Richard L Gallo. Commensal bacteria regulate toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med*, 15(12) :1377–82, Dec 2009.

[71] Karen A Cavassani, Makoto Ishii, Haitao Wen, Matthew A Schaller, Pamela M Lincoln, Nicholas W Lukacs, Cory M Hogaboam, and Steven L Kunkel. Tlr3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med*, 205(11) :2609–21, Oct 2008.

[72] Eric S Hoffman, Richard E T Smith, and Ronald C Renaud, Jr. From the analyst's couch : Tlr-targeted therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 4(11) :879–80, Nov 2005.

[73] S A Hoption Cann, J P van Netten, and C van Netten. Dr william coley and tumour regression : a place in history or in the future. *Postgrad Med J*, 79(938) :672–80, Dec 2003.

[74] Ian D Davis, Michael Jefford, Phillip Parente, and Jonathan Cebon. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 73(1) :3–29, Jan 2003.

[75] A ISAACS and J LINDENMANN. Virus interference. i. the interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147(927) :258–67, Sep 1957.

[76] A K Field, A A Tytell, G P Lampson, and M R Hilleman. Inducers of interferon and host resistance, v. in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61(1) :340–6, Sep 1968.

[77] J H Park and S Baron. Herpetic keratoconjunctivitis : therapy with synthetic double-stranded rna. *Science*, 162(855) :811–3, Nov 1968.

[78] Bruno Salaun, Laurence Zitvogel, Carine Asselin-Paturel, Yannis Morel, Karine Chemin, Clarisse Dubois, Catherine Massacrier, Rosa Conforti, Marie Pierre Chenard, Jean-Christophe Sabourin, Aicha Goubar, Serge Lebecque, Michel Pierres, Donata Rimoldi, Pedro Romero, and Fabrice Andre. Tlr3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded rna in breast cancer. *Cancer Res*, 71(5) :1607–14, Mar 2011.

[79] Bruno Salaun, Isabelle Coste, Marie-Clotilde Rissoan, Serge J Lebecque, and Toufic Renno. Tlr3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol*, 176(8) :4894–901, Apr 2006.

[80] J da Silva Correia, K Soldau, U Christen, P S Tobias, and R J Ulevitch. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from cd14 to tlr4 and md-2. *J Biol Chem*, 276(24) :21129–35, Jun 2001.

[81] J Bella, K L Hindle, P A McEwan, and S C Lovell. The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci*, 65(15) :2307–33, Aug 2008.

[82] Jessica K Bell, Istvan Botos, Pamela R Hall, Janine Askins, Joseph Shiloach, David M Segal, and David R Davies. The molecular structure of the toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31) :10976–80, Aug 2005.

[83] Jessica K Bell, Gregory E D Mullen, Cynthia A Leifer, Alessandra Mazzoni, David R Davies, and David M Segal. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in toll-like receptors. *Trends Immunol*, 24(10) :528–33, Oct 2003.

[84] Jungwoo Choe, Matthew S Kelker, and Ian A Wilson. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (tlr3) ectodomain. *Science*, 309(5734) :581–5, Jul 2005.

[85] Odette de Bouteiller, Estelle Merck, Uzma A Hasan, Sylvain Hubac, Barbara Benguigui, Giorgio Trinchieri, Elizabeth E M Bates, and Christophe Caux. Recognition of double-stranded rna by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic ph. *J Biol Chem*, 280(46) :38133–45, Nov 2005.

[86] Jingchuan Sun, Karen E Duffy, C T Ranjith-Kumar, Jin Xiong, Roberta J Lamb, Jon Santos, Hema Masarapu, Mark Cunningham, Andreas Holzenburg, Robert T Sarisky, M Lamine Mbow, and Cheng Kao. Structural and functional analyses of the human toll-like receptor 3. role of glycosylation. *J Biol Chem*, 281(16) :11144–51, Apr 2006.

[87] Lin Liu, Istvan Botos, Yan Wang, Joshua N Leonard, Joseph Shiloach, David M Segal, and David R Davies. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded rna. *Science*, 320(5874) :379–81, Apr 2008.

[88] Joshua N Leonard, Rodolfo Ghirlando, Janine Askins, Jessica K Bell, David H Margulies, David R Davies, and David M Segal. The tlr3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1) :258–63, Jan 2008.

[89] Yan Wang, Lin Liu, David R Davies, and David M Segal. Dimerization of toll-like receptor 3 (tlr3) is required for ligand binding. *J Biol Chem*, 285(47) :36836–41, Nov 2010.

[90] Misako Matsumoto, Satomi Kikkawa, Masayoshi Kohase, Kensuke Miyake, and Tsukasa Seya. Establishment of a monoclonal antibody against human toll-like receptor 3 that blocks double-stranded rna-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5) :1364–9, May 2002.

[91] Karen E Duffy, Roberta J Lamb, Lani R San Mateo, Jarrat L Jordan, Gabriela Canziani, Michael Brigham-Burke, Jeremy Korteweg, Mark Cunningham, Heena Solanki Beck, Jill Carton, Jill Giles-Komar, Cynthia Duchala, Robert T Sarisky, and M Lamine Mbow. Down modulation of human tlr3 function by a monoclonal antibody. *Cell Immunol*, 248(2) :103–14, Aug 2007.

[92] Ruud Hulspas, Maurice R G O'Gorman, Brent L Wood, Jan W Gratama, and D Robert Sutherland. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 76(6) :355–64, Nov 2009.

[93] Dayna J Groskreutz, Martha M Monick, Linda S Powers, Timur O Yarovinsky, Dwight C Look, and Gary W Hunninghake. Respiratory syncytial virus induces tlr3 protein and protein kinase r, leading to increased double-stranded rna responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol*, 176(3) :1733–40, Feb 2006.

[94] P G Clarke and S Clarke. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)*, 193(2) :81–99, Feb 1996.

[95] A. Glücksmann. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, 26(1) :59–86, 1951.

[96] R Bellairs. Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. *J Anat*, 95(Pt 1) :54–60.3, Jan 1961.

[97] J W Saunders, Jr. Death in embryonic systems. *Science*, 154(749) :604–12, Nov 1966.

[98] R A Lockshin and Z Zakeri. Programmed cell death and apoptosis : origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(7) :545–50, Jul 2001.

[99] Lijing Jiang. " "apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," by j. f. r. kerr, a. h. wyllie and a. r. currie". http ://embryo.asu.edu/view/embryo :128554.

[100] J F Kerr. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol*, 90(2) :419–35, Oct 1965.

[101] J F Kerr, A H Wyllie, and A R Currie. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4) :239–57, Aug 1972.

[102] Ricardo Weinlich, Christopher P Dillon, and Douglas R Green. Ripped to death. *Trends Cell Biol*, Oct 2011.

[103] L M Schwartz, S W Smith, M E Jones, and B A Osborne. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis ? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3) :980–4, Feb 1993.

[104] L M Schwartz. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell Death Differ*, 15(7) :1163–9, Jul 2008.

[105] L Galluzzi, I Vitale, J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, T M Dawson, V L Dawson, W S El-Deiry, S Fulda, E Gottlieb, D R Green, M O Hengartner, O Kepp, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, X Lu, F Madeo, W Malorni, P Mehlen, G Nuñez, M E Peter, M Piacentini, D C Rubinsztein, Y Shi, H-U Simon, P Vandenabeele, E White, J Yuan, B Zhivotovsky, G Melino, and G Kroemer. Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ*, Jul 2011.

[106] G Kroemer, W S El-Deiry, P Golstein, M E Peter, D Vaux, P Vandenabeele, B Zhivotovsky, M V Blagosklonny, W Malorni, R A Knight, M Piacentini, S Nagata, G Melino, and Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death : recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2 :1463–7, Nov 2005.

[107] G Kroemer, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, W S El-Deiry, P Golstein, D R Green, M Hengartner, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, W Malorni, G Nuñez, M E Peter, J Tschopp, J Yuan, M Piacentini, B Zhivotovsky, G Melino, and Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death : recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1) :3–11, Jan 2009.

[108] H M Ellis and H R Horvitz. Genetic control of programmed cell death in the nematode c. elegans. *Cell*, 44(6) :817–29, Mar 1986.

[109] J Yuan, S Shaham, S Ledoux, H M Ellis, and H R Horvitz. The c. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75(4) :641–52, Nov 1993.

[110] U Koenig, L Eckhart, and E Tschachler. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(5) :1150–4, Aug 2001.

[111] Esther Hoste, Patrick Kemperman, Michael Devos, Geertrui Denecker, Sanja Kezic, Nico Yau, Barbara Gilbert, Saskia Lippens, Philippe De Groote, Ria Roelandt, Petra Van Damme, Kris Gevaert, Richard B Presland, Hidenari Takahara, Gerwin Puppels, Peter Caspers, Peter Vandenabeele, and Wim Declercq. Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol*, Jun 2011.

[112] E S Alnemri, D J Livingston, D W Nicholson, G Salvesen, N A Thornberry, W W Wong, and J Yuan. Human ice/ced-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2) :171, Oct 1996.

[113] Cristina Pop and Guy S Salvesen. Human caspases : activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 284(33) :21777–81, Aug 2009.

[114] A U Lüthi and S J Martin. The casbah : a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14(4) :641–50, Apr 2007.

[115] N A Thornberry, T A Rano, E P Peterson, D M Rasper, T Timkey, M Garcia-Calvo, V M Houtzager, P A Nordstrom, S Roy, J P Vaillancourt, K T Chapman, and D W Nicholson. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b. functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 272(29) :17907–11, Jul 1997.

[116] Katherine Wachmann, Cristina Pop, Bram J van Raam, Marcin Drag, Peter D Mace, Scott J Snipas, Christian Zmasek, Robert Schwarzenbacher, Guy S Salvesen, and Stefan J Riedl. Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry*, 49(38) :8307–15, Sep 2010.

[117] Yinyan Tang, James A Wells, and Michelle R Arkin. Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis. *J Biol Chem*, 286(39) :34147–54, Sep 2011.

[118] L Bouchier-Hayes and D R Green. Caspase-2 : the orphan caspase. *Cell Death Differ*, Nov 2011.

[119] Jowita Mikolajczyk, Fiona L Scott, Stan Krajewski, Daniel P Sutherlin, and Guy S Salvesen. Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry*, 43(32) :10560–9, Aug 2004.

[120] Geertrui Denecker, Petra Ovaere, Peter Vandenabeele, and Wim Declercq. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, 180(3) :451–8, Feb 2008.

[121] John C Reed, Kutbuddin S Doctor, and Adam Godzik. The domains of apoptosis : a genomics perspective. *Sci STKE*, 2004(239) :re9, Jun 2004.

[122] Cristina Pop, Patrick Fitzgerald, Douglas R Green, and Guy S Salvesen. Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry*, 46(14) :4398–407, Apr 2007.

[123] Nadine Keller, Jirí Mares, Oliver Zerbe, and Markus G Grütter. Structural and biochemical studies on procaspase-8 : new insights on initiator caspase activation. *Structure*, 17(3) :438–48, Mar 2009.

[124] Cristina Pop, Andrew Oberst, Marcin Drag, Bram J Van Raam, Stefan J Riedl, Douglas R Green, and Guy S Salvesen. Flip(l) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem J*, 433(3) :447–57, Feb 2011.

[125] David W Chang, Zheng Xing, Vanessa L Capacio, Marcus E Peter, and Xiaolu Yang. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J*, 22(16) :4132–42, Aug 2003.

[126] Kristof Kersse, Jelle Verspurten, Tom Vanden Berghe, and Peter Vandenabeele. The death-fold superfamily of homotypic interaction motifs. *Trends Biochem Sci*, Jul 2011.

[127] M Gudur Valmiki and J W Ramos. Death effector domain-containing proteins. *Cell Mol Life Sci*, 66(5) :814–30, Mar 2009.

[128] M Irmler, M Thome, M Hahne, P Schneider, K Hofmann, V Steiner, J L Bodmer, M Schröter, K Burns, C Mattmann, D Rimoldi, L E French, and J Tschopp. Inhibition of death receptor signals by cellular flip. *Nature*, 388(6638) :190–5, Jul 1997.

[129] Nana Ueffing, Kusum K Singh, Andrea Christians, Christoph Thorns, Alfred C Feller, Florian Nagl, Falko Fend, Sebastian Heikaus, Alexander Marx, Rainer B Zotz, Joachim Brade, Wolfgang A Schulz, Klaus

Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz, and Christian Schwerk. A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-flip protein. *Blood*, 114(3) :572–9, Jul 2009.

[130] Olivier Micheau, Margot Thome, Pascal Schneider, Nils Holler, Jürg Tschopp, Donald W Nicholson, Christophe Briand, and Markus G Grütter. The long form of flip is an activator of caspase-8 at the fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 277(47) :45162–71, Nov 2002.

[131] M Saeed Sheikh and Ying Huang. Death receptor activation complexes : it takes two to activate tnf receptor 1. *Cell Cycle*, 2(6) :550–2, 2003.

[132] K Kuida, T S Zheng, S Na, C Kuan, D Yang, H Karasuyama, P Rakic, and R A Flavell. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in cpp32-deficient mice. *Nature*, 384(6607) :368–72, Nov 1996.

[133] K Kuida, T F Haydar, C Y Kuan, Y Gu, C Taya, H Karasuyama, M S Su, P Rakic, and R A Flavell. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, 94(3) :325–37, Aug 1998.

[134] E E Varfolomeev, M Schuchmann, V Luria, N Chiannilkulchai, J S Beckmann, I L Mett, D Rebrikov, V M Brodianski, O C Kemper, O Kollet, T Lapidot, D Soffer, T Sobe, K B Avraham, T Goncharov, H Holtmann, P Lonai, and D Wallach. Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the tnf receptors, fas/apo1, and dr3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2) :267–76, Aug 1998.

[135] W C Yeh, A Itie, A J Elia, M Ng, H B Shu, A Wakeham, C Mirtsos, N Suzuki, M Bonnard, D V Goeddel, and T W Mak. Requirement for casper (c-flip) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 12(6) :633–42, Jun 2000.

[136] Andrew Oberst, Christopher P Dillon, Ricardo Weinlich, Laura L McCormick, Patrick Fitzgerald, Cristina Pop, Razq Hakem, Guy S Salvesen, and Douglas R Green. Catalytic activity of the caspase-8-flip(l)

complex inhibits ripk3-dependent necrosis. *Nature*, 471(7338) :363–7, Mar 2011.

[137] William J Kaiser, Jason W Upton, Alyssa B Long, Devon Livingston-Rosanoff, Lisa P Daley-Bauer, Razqallah Hakem, Tamara Caspary, and Edward S Mocarski. Rip3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471(7338) :368–72, Mar 2011.

[138] Haibing Zhang, Xiaohui Zhou, Thomas McQuade, Jinghe Li, Francis Ka-Ming Chan, and Jianke Zhang. Functional complementation between fadd and rip1 in embryos and lymphocytes. *Nature*, 471(7338) :373–6, Mar 2011.

[139] Etienne Meylan and Jürg Tschopp. The rip kinases : crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci*, 30(3) :151–9, Mar 2005.

[140] Young Sik Cho, Sreerupa Challa, David Moquin, Ryan Genga, Tathagat Dutta Ray, Melissa Guildford, and Francis Ka-Ming Chan. Phosphorylation-driven assembly of the rip1-rip3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137(6) :1112–23, Jun 2009.

[141] Nozomi Nomi, Satoru Kodama, and Masashi Suzuki. Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway. *Oncol Rep*, 24(1) :225–31, Jul 2010.

[142] Sabrina Daniela da Silva, Alfio Ferlito, Robert P Takes, Ruud H Brakenhoff, Mev Dominguez Valentin, Julia A Woolgar, Carol R Bradford, Juan P Rodrigo, Alessandra Rinaldo, Michael P Hier, and Luiz P Kowalski. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol*, 47(9) :783–91, Sep 2011.

[143] M Kalai, G Van Loo, T Vanden Berghe, A Meeus, W Burm, X Saelens, and P Vandenabeele. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsrna. *Cell Death Differ*, 9(9) :981–94, Sep 2002.

[144] Erica Andersen-Nissen, Kelly D Smith, Richard Bonneau, Roland K Strong, and Alan Aderem. A conserved surface on toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med*, 204(2) :393–403, Feb 2007.

[145] Alina Grabiec, Guangxun Meng, Sylvia Fichte, Wolfgang Bessler, Hermann Wagner, and Carsten J Kirschning. Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides. *J Biol Chem*, 279(46) :48004–12, Nov 2004.

[146] Florian Heil, Hiroaki Hemmi, Hubertus Hochrein, Franziska Ampenberger, Carsten Kirschning, Shizuo Akira, Grayson Lipford, Hermann Wagner, and Stefan Bauer. Species-specific recognition of single-stranded rna via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663) :1526–9, Mar 2004.

[147] Sandra S Diebold, Tsuneyasu Kaisho, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, and Caetano Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of tlr7-mediated recognition of single-stranded rna. *Science*, 303(5663) :1529–31, Mar 2004.

[148] Olivier Demaria, Philippe P Pagni, Stephanie Traub, Aude de Gassart, Nora Branzk, Andrew J Murphy, David M Valenzuela, George D Yancopoulos, Richard A Flavell, and Lena Alexopoulou. Tlr8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *J Clin Invest*, 120(10) :3651–62, Oct 2010.

[149] Michael Rehli. Of mice and men : species variations of toll-like receptor expression. *Trends Immunol*, 23(8) :375–8, Aug 2002.

[150] Amanda L Blasius and Bruce Beutler. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3) :305–15, Mar 2010.

[151] Tobias Haas, Jochen Metzger, Frank Schmitz, Antje Heit, Thomas Müller, Eicke Latz, and Hermann Wagner. The dna sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28(3) :315–23, Mar 2008.

[152] Jonathan C Kagan, Tian Su, Tiffany Horng, Amy Chow, Shizuo Akira, and Ruslan Medzhitov. Tram couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, 9(4) :361–8, Apr 2008.

[153] Koichi Tabeta, Kasper Hoebe, Edith M Janssen, Xin Du, Philippe Georgel, Karine Crozat, Suzanne Mudd, Navjiwan Mann, Sosathya So-

vath, Jason Goode, Louis Shamel, Anat A Herskovits, Daniel A Portnoy, Michael Cooke, Lisa M Tarantino, Tim Wiltshire, Benjamin E Steinberg, Sergio Grinstein, and Bruce Beutler. The unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*, 7(2) :156–64, Feb 2006.

[154] Melanie M Brinkmann, Eric Spooner, Kasper Hoebe, Bruce Beutler, Hidde L Ploegh, and You-Me Kim. The interaction between the er membrane protein unc93b and tlr3, 7, and 9 is crucial for tlr signaling. *J Cell Biol*, 177(2) :265–75, Apr 2007.

[155] Armanda Casrouge, Shen-Ying Zhang, Céline Eidenschenk, Emmanuelle Jouanguy, Anne Puel, Kun Yang, Alexandre Alcais, Capucine Picard, Nora Mahfoufi, Nathalie Nicolas, Lazaro Lorenzo, Sabine Plancoulaine, Brigitte Sénéchal, Frédéric Geissmann, Koichi Tabeta, Kasper Hoebe, Xin Du, Richard L Miller, Bénédicte Héron, Cyril Mignot, Thierry Billette de Villemeur, Pierre Lebon, Olivier Dulac, Flore Rozenberg, Bruce Beutler, Marc Tardieu, Laurent Abel, and Jean-Laurent Casanova. Herpes simplex virus encephalitis in human unc-93b deficiency. *Science*, 314(5797) :308–12, Oct 2006.

[156] Rebecca J Gibbard, Peter J Morley, and Nicholas J Gay. Conserved features in the extracellular domain of human toll-like receptor 8 are essential for ph-dependent signaling. *J Biol Chem*, 281(37) :27503–11, Sep 2006.

[157] Boyoun Park, Melanie M Brinkmann, Eric Spooner, Clarissa C Lee, You-Me Kim, and Hidde L Ploegh. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of toll-like receptor 9. *Nat Immunol*, 9(12) :1407–14, Dec 2008.

[158] Sarah E Ewald, Bettina L Lee, Laura Lau, Katherine E Wickliffe, Guo-Ping Shi, Harold A Chapman, and Gregory M Barton. The ectodomain of toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 456(7222) :658–62, Dec 2008.

[159] Sarah E Ewald, Alex Engel, Jiyoun Lee, Miqi Wang, Matthew Bogyo, and Gregory M Barton. Nucleic acid recognition by toll-like receptors

is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med*, 208(4) :643–51, Apr 2011.

[160] Marcel R de Zoete, Lieneke I Bouwman, A Marijke Keestra, and Jos P M van Putten. Cleavage and activation of a toll-like receptor by microbial proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12) :4968–73, Mar 2011.

[161] You-Me Kim, Melanie M Brinkmann, Marie-Eve Paquet, and Hidde L Ploegh. Unc93b1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*, 452(7184) :234–8, Mar 2008.

[162] Tadashi Nishiya, Emi Kajita, Soichi Miwa, and Anthony L Defranco. Tlr3 and tlr7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem*, 280(44) :37107–17, Nov 2005.

[163] Eicke Latz, Anjali Verma, Alberto Visintin, Mei Gong, Cherilyn M Sirois, Dionne C G Klein, Brian G Monks, C James McKnight, Marc S Lamphier, W Paul Duprex, Terje Espevik, and Douglas T Golenbock. Ligand-induced conformational changes allosterically activate toll-like receptor 9. *Nat Immunol*, 8(7) :772–9, Jul 2007.

[164] Mark E Kleinman, Kiyoshi Yamada, Atsunobu Takeda, Vasu Chandrasekaran, Miho Nozaki, Judit Z Baffi, Romulo J C Albuquerque, Satoshi Yamasaki, Masahiro Itaya, Yuzhen Pan, Binoy Appukuttan, Daniel Gibbs, Zhenglin Yang, Katalin Karikó, Balamurali K Ambati, Traci A Wilgus, Luisa A DiPietro, Eiji Sakurai, Kang Zhang, Justine R Smith, Ethan W Taylor, and Jayakrishna Ambati. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by sirna via tlr3. *Nature*, 452(7187) :591–7, Apr 2008.

[165] Won Gil Cho, Romulo J C Albuquerque, Mark E Kleinman, Valeria Tarallo, Adelaide Greco, Miho Nozaki, Martha G Green, Judit Z Baffi, Balamurali K Ambati, Massimo De Falco, Jonathan S Alexander, Arturo Brunetti, Sandro De Falco, and Jayakrishna Ambati. Small interfering rna-induced tlr3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(17) :7137–42, Apr 2009.

[166] Jason W Upton, William J Kaiser, and Edward S Mocarski. Virus inhibition of rip3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*, 7(4) :302–13, Apr 2010.

[167] E R Podack. How to induce involuntary suicide : the need for dipeptidyl peptidase i. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15) :8312–4, Jul 1999.

[168] A Ashkenazi and V M Dixit. Death receptors : signaling and modulation. *Science*, 281(5381) :1305–8, Aug 1998.

[169] Johanna Rintahaka, Niina Lietzén, Tiina Öhman, Tuula A Nyman, and Sampsa Matikainen. Recognition of cytoplasmic rna results in cathepsin-dependent inflammasome activation and apoptosis in human macrophages. *J Immunol*, 186(5) :3085–92, Mar 2011.

[170] Johanna Rintahaka, Daniel Wiik, Panu E Kovanen, Harri Alenius, and Sampsa Matikainen. Cytosolic antiviral rna recognition pathway activates caspases 1 and 3. *J Immunol*, 180(3) :1749–57, Feb 2008.

[171] Saurabh Chattopadhyay, Joao T Marques, Michifumi Yamashita, Kristi L Peters, Kevin Smith, Avanti Desai, Bryan R G Williams, and Ganes C Sen. Viral apoptosis is induced by irf-3-mediated activation of bax. *EMBO J*, 29(10) :1762–73, May 2010.

[172] Siddharth Balachandran, Emmanuel Thomas, and Glen N Barber. A fadd-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature*, 432(7015) :401–5, Nov 2004.

[173] Akhil Rajput, Andrew Kovalenko, Konstantin Bogdanov, Seung-Hoon Yang, Tae-Bong Kang, Jin-Chul Kim, Jianfang Du, and David Wallach. Rig-i rna helicase activation of irf3 transcription factor is negatively regulated by caspase-8-mediated cleavage of the rip1 protein. *Immunity*, 34(3) :340–51, Mar 2011.

[174] Svenja Stoven, Neal Silverman, Anna Junell, Marika Hedengren-Olcott, Deniz Erturk, Ylva Engstrom, Tom Maniatis, and Dan Hultmark. Caspase-mediated processing of the drosophila nf-kappab factor relish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10) :5991–6, May 2003.

[175] Jonathan Maelfait, Elisabeth Vercammen, Sophie Janssens, Peter Schotte, Mira Haegman, Stefan Magez, and Rudi Beyaert. Stimula-

tion of toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *J Exp Med*, 205(9) :1967–73, Sep 2008.

[176] Lina Chen, Sun-Mi Park, Alexei V Tumanov, Annika Hau, Kenjiro Sawada, Christine Feig, Jerrold R Turner, Yang-Xin Fu, Iris L Romero, Ernst Lengyel, and Marcus E Peter. Cd95 promotes tumour growth. *Nature*, 465(7297) :492–6, May 2010.

[177] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144(5) :646–74, Mar 2011.

[178] Kenneth W Bayles. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 5(9) :721–6, Sep 2007.

[179] R H Kessin. Evolutionary biology. cooperation can be dangerous. *Nature*, 408(6815) :917, 919, 2000.

[180] Hirofumi Nariya and Masayori Inouye. Mazf, an mrna interferase, mediates programmed cell death during multicellular myxococcus development. *Cell*, 132(1) :55–66, Jan 2008.

[181] Clotilde Théry, Matias Ostrowski, and Elodie Segura. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(8) :581–93, Aug 2009.