

**Etude de l'importance des monocytes éduqués par les  
gammaherpèsvirus pour prévenir le développement d'une  
inflammation délétère**

**Deciphering the role of gammaherpervirus-imprinted monocytes  
in preventing deleterious inflammation**



**Céline Maquet**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2021-2022



*Illustration réalisée par Lucie Gillard, doctorante au sein du laboratoire. L'illustration représente l'équilibre délicat du système immunitaire d'un être vivant, qui avance tel un funambule tout au long de la vie, faisant face aux différents pathogènes dispersés sur l'étendue du globe. A l'origine de cet équilibre, les monocytes occupent un rôle central dans cette balance immunitaire.*



**UNIVERSITE DE LIEGE**  
**FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE**  
**DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES**  
**LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE-VACCINOLOGIE**

**Etude de l'importance des monocytes éduqués par les gammaherpèsvirus  
pour prévenir le développement d'une inflammation délétère**

**Deciphering the role of gammaherpesvirus-imprinted monocytes in  
preventing deleterious inflammation**

**Céline Maquet**

**THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
Docteur en Sciences Vétérinaires**

**ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022**



*Après bientôt 5 années de thèse passées dans le laboratoire d'Immunologie-Vaccinologie, l'heure est maintenant aux remerciements. A l'instar d'une réponse immune, l'aboutissement d'une thèse de doctorat implique différents acteurs, tous indispensables pour mener à bien ce projet. En effet, la thèse de doctorat n'est pas qu'un travail scientifique en lui-même mais plutôt une longue aventure humaine. Cette thèse clôture une première étape dans cette vie scientifique et je souhaiterais exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mes deux promoteurs, le Docteur Bénédicte Machiels et le Professeur Laurent Gillet. De façon chronologique, je te remercierai d'abord, Laurent et je me souviens encore particulièrement de ce jour où j'ai reçu un mail de ta part m'invitant à rejoindre ton équipe alors que j'effectuais un stage de bactériologie à Osaka lors de ma dernière année d'études. Après des échanges par visioconférence et un choix cornélien, c'est avec un grand plaisir que je rejoignais le laboratoire d'Immunologie-Vaccinologie. Je pense qu'outre la dynamique attractive du laboratoire, c'est avant tout tes qualités personnelles et notamment humaines qui m'ont permis de prendre cette décision. Tu es quelqu'un d'acharné, passionné et très perspicace pour toujours aller rechercher le détail scientifique pertinent notamment lors de nos réunions. C'est ici que nous aborderons un point-clé de ce parcours de thèse: les réunions. Un long parcours du combattant commençait pour pouvoir te capturer au bon moment entre tes nombreuses réunions, en essayant de commencer les nôtres à l'heure voulue et les terminer dans des délais raisonnables. Ton agenda rempli à l'excès reflète le caractère passionné de ta personnalité, ce goût inégalable pour la recherche ainsi que ta volonté d'apporter de l'aide quel que soit le moment. Merci pour le suivi, pour le soutien et merci également pour les échanges extra-scientifiques de par nos vécus respectifs dans le monde rural.*

*C'est alors qu'en juillet à mon retour du Japon, je découvrais l'équipe et rencontrais Bénédicte. Je n'imaginai pas à ce moment que cette personne deviendrait le pilier et le moteur de ma thèse de doctorat. Cette petite fleur (et non cette petite crasse comme elle aime le rappeler) a germé au fil des mois lors de mon doctorat et constitue les fondements de cette thèse de doctorat. Tes implications scientifiques et émotionnelles font de toi une personne exceptionnelle et particulièrement captivante et je tenais à te remercier pour tout ce travail réalisé ensemble car cette thèse et l'étude en découlant sont avant tout les tiennes. Ton implication émotionnelle et viscérale a permis notamment d'animer les innombrables in-vivo auxquelles tu voulais toujours répondre présente malgré ta charge de travail, d'une façon dynamique, tout en apportant une pression et un stress ayant mis à rude épreuve mon estomac et mes surrénales malgré mon stoïcisme apparent... Grande gaffeuse, je ne décrirai pas non plus les nombreux moments de tension et de stress incontrôlés lors des envois du papier ou de l'ERC. Toutes ces particularités font de toi une personne extrêmement attachante et je te souhaite tout le*

*meilleur pour les projets futurs car quoique tu en penses, tu es une chercheuse brillante !! Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et de m'avoir donné le goût de la recherche que tu affectionnes tant.*

*Je souhaite également remercier les membres de mon comité d'accompagnement : les Professeurs Catherine Sadzot et Thomas Marichal. Les réunions annuelles ainsi que nos nombreuses entrevues lors des différentes rencontres scientifiques ont toujours été très constructives et stimulantes. Merci pour vos commentaires positifs et votre soutien tout au long de ces années.*

*De façon plus générale, je souhaite remercier toute l'équipe de Laurent et Béné. Les post-doctorantes, Françoise et Adeline pour les agréables interactions, les doctorants Shifang, Xiang, Annet, Alexis, Laura pour la bonne ambiance générale au sein de l'équipe et du bureau ; je souhaiterais remercier également plus particulièrement Lucie, ma voisine face-to-face de bureau pour ces 4 belles années et pour tes talents de dessinatrice restés cachés jusqu'à l'élaboration de cette page de couverture ; Pauline, pour les nombreuses années passées en ta compagnie sur le chemin tortueux de nos thèses ; Jérôme pour ta bonne humeur, ton sens de l'humour et également professionnellement pour la réalisation de toutes les analyses bioinformatiques et enfin Lucia pour ton sens de l'autre, ta passion de la science et ton aide sans faille lors des manip de ces derniers mois. A tous, je vous souhaite tout le meilleur. Je tenais également à remercier l'assistance technique, sans qui la réalisation de ce travail n'aurait tout simplement pas été possible : Justine pour ta perfection et ta conscience professionnelle lors de toutes ces expériences, Rémy pour ton sens de l'organisation, ta disponibilité, ta maniaquerie (oui oui c'est une qualité) et ta bonne humeur constante. Lorène également pour tes aides techniques régulières lors de nos in-vivo démesurées pour compter les cellules de ganglions notamment mais également pour les chouettes discussions au secrétariat. Le secrétariat ne serait pas le même sans Lorène mais également sans son inséparable binôme, Christina. Merci pour ton professionnalisme, ta disponibilité, ton empathie, ton aide quotidienne et ta compassion. Je remercierai enfin Marylin, pour le soin apporté aux souris et ton courage face aux nombreuses cages (il vaut mieux compter en nombre de cages plutôt qu'en nombre de souris) à nettoyer chaque semaine. Je remercie également l'animalerie centrale du GIGA et particulièrement Gaëlle Lambert pour son suivi irréprochable et son professionnalisme ayant permis de générer toutes ces lignées de souris et mener à bien toutes ces expériences.*

*Je souhaiterais également remercier les Professeurs Etienne Thiry et Alain Vanderplasschen ainsi que le Docteur Benjamin Dewals et leurs équipes associées pour les avis scientifiques, les échanges constructifs et l'entente générale entre toutes les personnes du laboratoire tout au long de ces années.*

*Je tiens également à remercier tous les organismes de financement de cette étude : le FNRS, la Fondation Léon Frédéricq, l'ERC et l'Université de Liège.*

*Je remercie également mes amis de façon générale et plus particulièrement: Aurore, pour notre parcours commun depuis les bancs de Bellevue en secondaire, nos trois années de colocation à Namur, les soirées de cercle, les trop nombreux bunkers et retours sinueux jusqu'au kot, nos blocus, notre thèse, ton mariage, ton départ en post-doc. Rien n'aurait et ne serait pareil sans toi. Je remercie également Charlotte, notre coloc de la rue Henri Lemaitre avec Aurore pour tous ces moments exceptionnels passés en votre compagnie. Le hasard a fait que nous suivions toutes les trois la même voie de la thèse de doctorat et il est plus facile d'avoir des oreilles attentives et compréhensives comme les vôtres pour se remonter le moral en thèse mais surtout pour parler d'autres choses. Je remercie les copains d'études namurois ou liégeois, même s'ils n'ont jamais vraiment essayé de comprendre ce que je faisais durant ma thèse, ils m'auront permis de passer des années de guindaille merveilleuses pendant 6 années et également pour les années qui ont suivies.*

*Il y a ensuite les amis qui sont devenus une partie de la famille : les « Sosoye » : Benoit, Adeline, Justin, Elise, Jeanne, Emile et mon petit filleul César. Je me souviens très bien de votre arrivée à Corenne en tant que jeunes diplômés, prêts à entamer votre vie à deux. Depuis votre arrivée, nous ne nous sommes plus jamais quittés. Vous avez été si présents depuis bientôt 20 ans déjà. A cette époque de notre enfance, j'étais loin de m'imaginer que je me retrouverais en face de toi Benoit, Herr Professor, lors d'examens oraux à Namur ou que je me retrouverais quelques années plus tard dans les mêmes bâtiments dans lesquels tu avais effectué ta thèse en virologie. Je vous remercie d'avoir toujours été là, j'ai passé des années tout simplement merveilleuses en votre compagnie.*

*Enfin et un chapitre non des moindres, je souhaiterais remercier ma famille. Je souhaitais les remercier pour leur soutien sans faille, nous ayant permis à ma sœur et moi de grandir et d'évoluer librement notamment dans nos choix professionnels. Merci de nous avoir inculqué ce sens du travail, de la persévérance et de la rigueur. Au final, cette éducation ne nous a sans doute pas rendu la vie plus « facile » dans notre société mais elle reste néanmoins la plus louable. Plus particulièrement, je souhaite remercier ma maman pour sa présence quotidienne, ses attentions depuis maintenant 29 ans et toutes ces particularités qui font d'elle une maman exceptionnelle. Je souhaite également remercier mon papa, d'avoir été si présent et supportif pour mon développement personnel. Quoique tu en dises, nous avons passé une enfance exceptionnelle, certes sans beaucoup de « loisirs » comme tu le rappelles souvent, mais je ne voudrais l'échanger contre rien au monde. Les moments passés en ta compagnie ont juste été exceptionnels: durant mon enfance, en ferme, matin, midi et soir, sur un ballot dans le froid devant une césarienne, durant mon adolescence et ton suivi sur les courses d'endurance, durant ma vie actuelle de jeune adulte avec toujours cette passion commune et un peu démesurée pour les animaux et l'élevage.*

*Vous nous avez appris beaucoup de choses et de valeurs qui restent pour moi inégalables. Enfin, je tenais à remercier ma sœur, Marie, pour tout ce qu'elle a toujours fait pour moi également depuis ma naissance et qui remplit son rôle de grande sœur comme personne d'autre. Je te remercie de toujours prendre soin de moi, de t'inquiéter pour moi et plus pratiquement pour essayer de me donner un style et un look acceptable lorsque je dois sortir de chez moi ;).*

*Il y a ensuite la famille proche si petite soit-elle mais qui est néanmoins incontournable : mes oncles et tantes et plus particulièrement mon Parrain, Véro, Alexis et Anaïs. Parrain, ta philosophie, ton empathie et ton recul sont toujours apaisants lors des moments difficiles. Les gènes ne mentent pas (ceux du Père également ;) ) et c'est sans doute les récits contés encore aujourd'hui de tes frasques et tes soirées durant ton parcours universitaire qui m'a peut-être donné l'envie de suivre cette voie ;). Je remercie également mes grands-parents, papy et mamy « Dampicourt » et mamy « Gerpinnes » pour leur soutien, je sais combien ils se sont inquiétés et s'inquiètent encore pour nous.*

*Et enfin le plus important, je remercie Maximilien, tout simplement, merci pour tout. Il n'y a pas grand-chose à ajouter, tout a toujours semblé si facile, logique et évident en ta présence. Je te remercie pour ton soutien au quotidien. Je me réjouis de continuer ce chemin ensemble et notamment d'entamer ce nouveau chapitre de vie en Suisse, en compagnie de notre fidèle Queiko.*

## *Abréviations*

<b><math>\alpha</math>-<math>\beta</math>-<math>\gamma</math>-HVs</b>	Alpha-, Beta-, Gammaherpesvirinae
<b>ADCC</b>	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AEC</b>	<i>Alveolar epithelial cell</i>
<b>AM</b>	<i>Alveolar macrophage</i>
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BAC</b>	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
<b>BALF</b>	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
<b>BAM</b>	<i>Border-associated macrophage</i>
<b>BCG</b>	Bacille de Calmette-Guérin
<b>cDC</b>	<i>Conventional dendritic cell</i>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
<b>CDP</b>	<i>Common dendritic cell progenitors</i>
<b>cGAS</b>	<i>cyclic GMP–AMP synthase</i>
<b>CIITA</b>	<i>Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator</i>
<b>CLP</b>	<i>Common lymphoid cell progenitors</i>
<b>cMoP</b>	<i>Common monocyte progenitors</i>
<b>CMP</b>	<i>Common myeloid progenitors</i>
<b>CRP</b>	<i>C-reactive protein</i>
<b>CRTAM</b>	<i>Class I-restricted T cell-associated molecule</i>
<b>CSF (-1/-2)</b>	<i>Colony-stimulating factor (-1=M-CSF/-2=GM-CSF)</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i>
<b>DSS</b>	<i>Dextran Sulfate Sodium</i>
<b>EAE</b>	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
<b>EBNA-1</b>	<i>Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1</i>
<b>EBV/HHV-4</b>	<i>Epstein-Barr Virus, Herpèsvirus humain 4</i>
<b>eGFP</b>	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<b>EMP</b>	<i>Erythro-myeloid progenitors</i>
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycan
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GMP</b>	<i>Genome maintenance protein</i>
<b>GMPs</b>	<i>Granulocyte-monocyte progenitors</i>
<b>Gp</b>	Glycoprotéine

---

<b>Grz</b>	Granzyme
<b>GVHD</b>	<i>Graf-versus-host-disease</i>
<b>HCMV</b>	<i>Human cytomegalovirus</i>
<b>HLH</b>	<i>Hemophagocytic lymphohistiocytosis</i>
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic stem cell</i>
<b>i.n.</b>	Intra-nasal
<b>i.p.</b>	Intra-péritonéal
<b>ICTV</b>	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
<b>IEL</b>	<i>Intraepithelial lymphocyte</i>
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL-...</b>	Interleukine-...
<b>InfResMac</b>	<i>Inflammatory resident macrophage</i>
<b>irAE</b>	<i>Immune-related adverse event</i>
<b>IRF</b>	<i>IFN regulatory factor</i>
<b>KICS</b>	<i>KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome</i>
<b>Kpb</b>	Kilopaire de base
<b>KSHV/HHV-8</b>	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, Herpèsvirus Humain 8</i>
<b>LANA</b>	<i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i>
<b>LCMV</b>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MCD</b>	<i>Multicentric castelman disease</i>
<b>MDP</b>	<i>Myeloid and dendritic progenitors</i>
<b>MEP</b>	<i>Megakariocyte-erythroid progenitors</i>
<b>MHCI-II</b>	<i>Major histocompatibility complex type I/II</i>
<b>MODS</b>	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
<b>MPP</b>	<i>Multipotent progenitors</i>
<b>MPS</b>	<i>Mononuclear phagocyte system</i>
<b>MS</b>	<i>Multiple Sclerosis</i>
<b>MSC</b>	<i>Mesenchymal stem cells</i>
<b>MuHV-1/MCMV</b>	<i>Murid herpesvirus 1/ Mouse cytomegalovirus</i>
<b>MuHV-4</b>	<i>Murid gammaherpesvirus 4</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NPC</b>	<i>Nuclear pore complex</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>p.i.</b>	Post-infection

---

<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>pDC</b>	<i>plasmacytoid dendritic cell</i>
<b>PDP</b>	Podoplanine
<b>PEL</b>	<i>Primary Effusion Lymphoma</i>
<b>PFU</b>	<i>Plaque forming unit</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>Prf-1</b>	Perforine-1
<b>PVM</b>	<i>Pneumonia virus of mice</i>
<b>RAG</b>	<i>Recombination activating gene</i>
<b>ResMac</b>	<i>Resident macrophage</i>
<b>RSV</b>	<i>Respiratory syncytial virus</i>
<b>RTA</b>	<i>Replication and Transcription Activator protein</i>
<b>s.c.</b>	Sous-cutané
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
<b>STING</b>	<i>Stimulator of interferon genes</i>
<b>T Reg</b>	<i>Regulatory T cell</i>
<b>TAP</b>	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>Tip-DC</b>	<i>TNF/iNOS-producing dendritic cell</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TpMO</b>	<i>Transitional pre-monocyte</i>
<b>YS</b>	<i>Yolk sac</i>



**TABLE DES MATIERES**

<b>RÉSUMÉ - ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>PRÉAMBULE GÉNÉRAL.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Les gammaherpèsvirus.....</b>	<b>11</b>
1.1. Taxonomie.....	11
1.2. Les gammaherpèsvirus humains.....	15
1.3. Le MuHV-4 comme modèle expérimental.....	18
1.4. Stratégies virales d'immunoévasion.....	32
1.5. Réponse immunitaire.....	37
<b>2. Les monocytes .....</b>	<b>43</b>
2.1. Introduction .....	43
2.2. Classification .....	44
2.3. Ontogénie et développement des monocytes classiques.....	47
2.4. Circulation des monocytes : émigration, diapédèse, recrutement .....	49
2.5. Spécialisations fonctionnelles.....	52
2.6. Concept de la niche.....	60
2.7. Trained Immunity .....	65
<b>3. Les immunopathologies virales .....</b>	<b>69</b>
3.1. La sphère pulmonaire .....	69
3.2. La tempête cytokinique .....	70
3.3. Acteurs et mécanismes .....	71
3.5. Effets systémiques.....	76
3.6. Les immunopathologies liées à l'EBV et le KSHV.....	77
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>83</b>
<b>SECTION EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>85</b>

<b>Ly6C<sup>hi</sup> monocytes balance regulatory and cytotoxic CD4 T cell responses to control virus-induced immunopathology.....</b>	<b>87</b>
<b>DISCUSSION - PERSPECTIVES .....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>173</b>

---

# Résumé - Abstract

---



## ***Résumé***

Les gammaherpèsvirus ( $\gamma$ HVs) sont des pathogènes très prévalents au sein de la population mondiale. Ces virus modulent le système immunitaire de l'hôte pour l'infecter de façon persistante et dans la plupart des cas, de façon asymptomatique. Dans certains cas, l'infection par les  $\gamma$ HVs peut mener au développement d'immunopathologies avec de lourdes conséquences pour l'hôte. Les acteurs et les mécanismes à l'origine de ce déséquilibre immunitaire doivent être étudiés.

Dans cette étude, nous montrons que l'infection pulmonaire par le gammaherpèsvirus murin 4 (MuHV-4), un  $\gamma$ HV infectant la souris, entraîne le recrutement dans les voies aériennes de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> qui contrôlent la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, l'absence de ces monocytes provoque une immunopathologie sévère induite par le virus, associée à la libération systémique de médiateurs inflammatoires. D'un point de vue mécanistique, les monocytes suite à l'infection MuHV-4 recrutent des lymphocytes T CD4 dans les voies respiratoires et déclenchent des voies de signalisation immunosuppressives par l'intermédiaire de l'axe PD-L1/PD-1, freinant ainsi l'activation délétère des lymphocytes T CD4 cytotoxiques. Ces résultats mettent en évidence un nouveau rôle des monocytes Ly6C<sup>hi</sup> dans la modulation des fonctions des lymphocytes T CD4 et révèlent des voies clés qui pourraient être ciblées pour interférer avec la cascade immunopathologique néfaste induite au cours des infections virales respiratoires.

## *Summary*

Gammaherpesviruses ( $\gamma$ HVs) are highly prevalent pathogens in the human population. These viruses modulate the host immune system to infect persistently and in most cases asymptotically. Occasionally,  $\gamma$ HV infection can lead to the development of immunopathologies with severe consequences for the host. The actors and mechanisms at the origin of this immune imbalance must be studied.

In this study, we show that pulmonary infection with murid gammaherpesvirus-4 (MuHV-4), a  $\gamma$ HV infecting mice, results in the recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes into the airways that control the host immune response. Indeed, the absence of these monocytes causes severe virus-induced immunopathology associated with the systemic release of inflammatory mediators. Mechanistically, MuHV-4 imprinted monocytes recruit CD4 T cells to the airways and trigger immunosuppressive signaling pathways through the PD-L1/PD-1 axis, thereby dampening deleterious activation of cytotoxic CD4 T cells. These results highlight a novel role of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in modulating CD4 T cell functions and reveal key pathways that could be targeted to interfere with the detrimental immunopathological cascade during respiratory viral infections.

---

# Préambule général

---



A l'heure où les virus respiratoires font la une de l'actualité, les recherches en cours sur les mécanismes de régulation des réponses immunitaires antivirales font l'objet de toutes les attentions. La dernière pandémie à coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) a mis en évidence toute la diversité des réponses antivirales de la population mondiale et la différence de sensibilité face à un même pathogène, allant de l'infection asymptomatique à la maladie mortelle de l'individu.

La diversité des réponses immunes entre les individus pourrait provenir notamment de l'exposition du système immunitaire à des infections antérieures. Il est aujourd'hui établi que la variation du système immunitaire dépend plus de facteurs environnementaux que de facteurs génétiques. Parmi ces facteurs environnementaux, l'exposition à des agents infectieux dans le jeune âge pourrait assurer une « éducation » du système immunitaire qui le rendrait plus apte à réagir de manière efficace et mesurée lors de l'exposition ultérieure à d'autres microorganismes. Alors que l'influence du microbiote a été largement investiguée, la modulation du système immunitaire par les virus est maintenant de plus en plus étudiée. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes régulateurs induits par des virus persistants, les  $\gamma$ HVs, ayant co-évolué avec leur hôte depuis des millions d'années. La principale caractéristique de ces virus, infectant 80 à 90% de la population humaine, réside dans leur capacité à induire une infection latente, qui reste dans la plupart des cas asymptomatique. Ces virus ont développé de multiples stratégies d'immunomodulation leur permettant d'être tolérés par leur hôte et d'initier une relation que l'on pourrait qualifier de « symbiotique ». En effet, la tolérance de ces virus '*old friends*' suggère un possible avantage sélectif conféré par ces infections. Dans ce cadre, des études épidémiologiques ont établi une corrélation entre l'infection précoce au cours de la vie par le virus Epstein-Barr (EBV) et une diminution du risque de développer une sensibilisation IgE persistante. En parallèle, le laboratoire hôte a montré, dans un modèle murin, que le MuHV-4 protégeait du développement de l'asthme allergique. Ces effets positifs identifiés dans des contextes de réponses immunes hétérologues reflètent l'importance de la modulation du système immunitaire par certaines infections virales. En particulier, les stratégies d'immuno-évasion développées par les  $\gamma$ HVs au cours de l'évolution ont abouti à l'établissement d'un état d'équilibre entre la réponse inflammatoire permettant l'élimination complète du pathogène et les voies d'immunorégulation du système immunitaire. Cependant, dans certaines pathologies associées aux infections par les  $\gamma$ HVs, cet équilibre est rompu et mène au développement d'immunopathologies. De manière similaire, cet équilibre entre réponse protectrice et délétère est rompu lors d'infections par des virus respiratoires hautement pathogènes. Pour mieux comprendre ce qui détermine cet état d'équilibre, nous avons décidé d'investiguer les acteurs immuns qui jouent un rôle pour réguler l'inflammation au niveau de la sphère pulmonaire lors d'une infection par le MuHV-4. Nous avons disséqué plus particulièrement le rôle des monocytes comme acteurs clés de la régulation de la réponse immune en modulant les réponses immunes excessives des lymphocytes T.



---

# Introduction

---



## ***Introduction***

### **1. Les gammaherpèsvirus**

#### **1.1. Taxonomie**

Les herpèsvirus rassemblent des virus très nombreux et diversifiés appartenant à l'ordre des *Herpesvirales*. La particularité principale des herpèsvirus réside dans la capacité d'induire une infection latente chez l'hôte. Tous les herpèsvirus présentent des caractéristiques communes. Historiquement, ces caractéristiques communes étaient basées sur des critères principalement morphologiques à savoir la morphologie caractéristique du virion, sphérique constitué d'une capsid, d'une couche protéique appelée tégument et d'une enveloppe. L'un des critères majeurs d'inclusion des virus dans l'ordre des *Herpesvirales* est la possession de deux gènes dérivés d'un ancêtre commun : un gène codant pour l'unité ATPase de l'enzyme terminase, un complexe protéique responsable de l'empaquetage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral dans les capsides et un gène codant pour l'ADN polymérase (Davison, 2010). L'ordre des *Herpesvirales* est divisé en 3 familles : les *Alloherpesviridae*, infectant les poissons et les grenouilles (Davison, Cunningham, Sauerbier, & McKinnell, 2006; Takashi et al., 2007), les *Malacoherpesviridae*, infectant les mollusques bivalves (Davison et al., 2005) et les *Herpesviridae*, infectant les mammifères, les reptiles et les oiseaux (Davison, 2010).

#### **La famille des *Alloherpesviridae***

Cette famille virale comprend des virus infectant des poissons téléostéens, chondrostéens et deux herpèsvirus infectant des grenouilles (Hanson, Dishon, & Kotler, 2011). Sur base d'études phylogénétiques, deux grands groupes viraux sont reconnus au sein de cette famille virale: les alloherpèsvirus à ADN double brin génomique de très grande taille (245-295 kilopaires de base; kpb), tels que les herpèsvirus de cyprinidés (Takashi et al., 2007) et les herpèsvirus d'anguillidés (Van Beurden et al., 2010); et les alloherpèsvirus à génome de taille moins importante (135-235 kpb), parmi lesquels on retrouve les herpèsvirus d'ictaluridés, de salmonidés et de ranidés notamment (Waltzek et al., 2009).

#### **La famille des *Malacoherpesviridae***

Cette petite famille virale contient deux virus: l'*Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1) infectant l'huitre japonaise (Davison et al., 2005) et l'*Haliotid herpesvirus 1* (AbHV) (Savin et al., 2010) infectant un gastéropode.

## La famille des *Herpesviridae*

La famille des *Herpesviridae* est extrêmement vaste et largement étudiée. Elle comprend des virus infectant les reptiles, les oiseaux et les mammifères, en ce compris les primates et l'homme. Sur base de ses propriétés biologiques, la famille des *Herpesviridae* se scinde en 3 sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. Cette division reposait initialement sur les seules propriétés biologiques des espèces. Cette classification a été confirmée par des analyses phylogéniques (Davison, 2002). La taxonomie des herpesvirus est régulièrement mise à jour par le comité international de taxonomie des virus (*International committee on taxonomy of viruses-ICTV*). Le **tableau 1** récapitule de façon non-exhaustive les principales espèces virales d'intérêt au sein de l'ordre des *Herpesvirales*.

**Tableau 1. L'ordre des *Herpesvirales***

Ordre	Famille	Sous-Famille	Genre	Espèce	Nom commun		
<i>Herpesvirales</i>	<i>Malacoherpesviridae</i>		<i>Ostreavirus</i>	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	Oyster herpesvirus (OsHV1)		
		<i>Alloherpesviridae</i>		<i>Ictalurivirus</i>	<i>Ictalurid herpesvirus 1</i>	Channel catfish virus (IcHV1)	
				<i>Cyprinivirus</i>	<i>Cyprinid herpesvirus (1-2-3)</i>	Carp pox herpesvirus (CyHV-1), Haematopoietic necrosis virus (CyHV-2), Koi herpesvirus (CyHV-3)	
				<i>Anguillid herpesvirus 1</i>	Japanese eel herpesvirus (AngHV1)		
	<b><i>Herpesviridae</i></b>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>		<i>Human alphaherpesvirus 1-2</i>	Herpes simplex virus type 1-2 (HHV1-HHV2)	
					<i>Bovine alphaherpesvirus 2</i>	Bovine mammillitis virus (BoHV2)	
			<i>Varicellovirus</i>		<i>Human alphaherpesvirus 3</i>	Varicella-zoster virus (HHV-3)	
					<i>Bovine alphaherpesvirus 1-5</i>	Infectious bovine rhinotracheitis virus (BoHV1), Bovine encephalitis herpesvirus (BoHV5)	
					<i>Canid alphaherpesvirus 1</i>	Canine herpesvirus (CaHV1)	
					<i>Equine alphaherpesvirus 1-3-4-(8-9)</i>	Equine abortion virus (EHV1), Equine coital exanthema virus (EHV3), Equine rhinopneumonitis virus (EHV4)	
				<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human betaherpesvirus 5</i>	Human cytomegalovirus (HHV5)

			<i>Muromegalovirus</i>	<i>Murid betaherpesvirus 1-2</i>	Mouse cytomegalovirus (MuHV1), Rat cytomegalovirus (MuHV2)
			<i>Roseolovirus</i>	<i>Human betaherpesvirus 6-7</i>	Human herpesvirus 6-7 (HHV6-7)
				<i>Suid betaherpesvirus 2</i>	Pig cytomegalovirus (SuHV2)
		<b><i>Gammaherpesvirinae</i></b>	<b><i>Lymphocryptovirus</i></b>	<b><i>Human gammaherpesvirus 4</i></b>	<b>Epstein-Barr virus (HHV4)</b>
			<b><i>Rhadinovirus</i></b>	<b><i>Human gammaherpesvirus 8</i></b>	<b>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)</b>
				<i>Bovine gammaherpesvirus 4</i>	Movar virus (BoHV4)
				<b><i>Murid gammaherpesvirus 4</i></b>	<b>Murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68 ou MuHV-4)</b>
			<i>Macavirus</i>	<i>Alcelaphine gammaherpesvirus 1-2</i>	Malignant catarrhal fever virus (AIHV1), Hartebeest malignant catarrhal fever virus (AIHV2)
				<i>Bovine gammaherpesvirus 6</i>	Bovine lymphotropic herpesvirus (BoHV6)
				<i>Ovine gammaherpesvirus 2</i>	Sheep-associated malignant catarrhal fever Virus (OvHV2)
			<i>Percavirus</i>	<i>Equid gammaherpesvirus 2-5</i>	Equine herpesvirus 2-5 (EHV2-5)

Adapté de (Davison, 2010) et *ICTV Virus Taxonomy* :2022

- Les ***Alphaherpesvirinae***. Les alphaherpèsvirus ( $\alpha$ HVs) sont principalement caractérisés par leur tropisme final pour les tissus nerveux, établissant la latence dans des populations spécifiques de neurones et sont donc dits neurotropes. Ces cellules quiescentes, différenciées et caractérisées par une longue durée de vie sont une cible idéale dans laquelle les virus à l'état latent peuvent persister quasi indéfiniment, avec une expression génique nulle ou très faible. De façon générale, les  $\alpha$ HVs présentent un spectre d'hôtes large, un cycle répliatif relativement court, une production *in vitro* rapide et un effet cytolytique important. Chez l'homme, on retrouve notamment l'herpèsvirus humain 1 ou herpès simplex de type 1 (HHV-1 ou HSV-1) (McGeoch et al., 1988) dans le genre *Simplexvirus* et l'herpèsvirus humain 3 ou virus de la varicelle et du zona (HHV-3 ou VZV) (Davison & Scott, 1986) dans le genre *Varicellovirus*. Chez les animaux domestiques, on peut citer l'herpèsvirus bovin 1 ou virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (BoHV-1) (Schwyzer & Ackermann, 1996), l'herpèsvirus félin 1 ou virus de la rhinotrachéite féline (FHV-1) (Tai et al., 2010) et l'herpèsvirus des gallinacés de type 2 ou virus de la maladie de Marek (GaHV-2) (Tulman et al., 2000), responsables de maladies respiratoires et/ou nerveuses importantes chez les bovidés, les félinés et les oiseaux galliformes, respectivement.

- Les **Betaherpesvirinae**. Les betaherpèsvirus ( $\beta$ HVs) sont, parmi les *Herpesviridae*, les virus qui présentent les plus grands génomes (jusqu'à 250 kpb). Par opposition aux  $\alpha$ HVs, les  $\beta$ HVs ont un spectre d'hôtes très restreint, un cycle répliatif long, une production *in vitro* lente et difficile. Les cellules infectées développent fréquemment une cytomégalie. Le représentant majeur de cette sous-famille virale est l'herpèsvirus humain 5 ou cytomégalovirus humain (HHV-5 ou *Human cytomegalovirus*-HCMV) appartenant au genre *Cytomegalovirus* (Cunningham et al., 2010). L'herpèsvirus murin 1 ou cytomégalovirus murin (*Murid herpesvirus 1*-MuHV-1 ou MCMV) (L. M. Smith, McWhorter, Masters, Shellam, & Redwood, 2008) du genre *Muromegalovirus* est utilisé comme modèle d'étude du HHV-5.

- Les **Gammaherpesvirinae**. Les gammaherpèsvirus ( $\gamma$ HVs) présentent un lymphotropisme marqué, la majorité infectant essentiellement les lymphocytes B à l'état latent (Barton, Mandal, & Speck, 2011). Ils présentent un spectre d'hôtes restreint *in vitro* et *in vivo* rendant leur étude difficile et nécessitant le recours à des modèles murins comme le gammaherpèsvirus murin 4 (*Murid gammaherpesvirus 4*-MuHV-4). Contrairement aux  $\alpha$ - et  $\beta$ HVs, tous les  $\gamma$ HVs caractérisés sont associés au développement de maladies lympho-prolifératives, de lymphomes ou même de cancers non lymphoïdes (Chang et al., 1994; Epstein, Achong, & Barr, 1964). Dans cette thèse, nous nous intéressons spécifiquement aux  $\gamma$ HVs. Dès lors, ce groupe viral est décrit de manière plus exhaustive. La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* inclut 7 genres (*Bosavirus*, *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Manticavirus*, *Patagivirus*, *Percavirus* and *Rhadinovirus*) composée au total de 43 espèces reprises par l'ICTV (<http://ictvonline.org>). 7 genres établis sont décrits ici (Davison, 2010):

- Les **Lymphocryptovirus**. Ce genre viral comprend 8 virus, tous spécifiques de l'homme et des primates. L'espèce-type est l'herpèsvirus humain 4 ou virus d'Epstein-Barr (HHV-4 ou *Epstein-Barr Virus*-EBV) (Baer et al., 1984), notamment responsable du syndrome de la mononucléose infectieuse chez l'homme (Young & Rickinson, 2004). Nous reviendrons en détails plus loin sur la pathogénie causée par l'EBV.
- Les **Rhadinovirus**. Ce genre viral comprend 9 virus, spécifiques de différents mammifères. Chez l'homme, on retrouve l'herpèsvirus humain 8 ou herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*-KSHV ou HHV-8) (Russo et al., 1996). Historiquement, ce virus fut découvert en 1994 dans des lésions de sarcomes cutanés chez des patients sidéens (Chang et al., 1994). L'herpèsvirus murin 4 ou herpèsvirus murin 68 (MuHV-4 ou MHV-68) (Nash, Dutia, Stewart, & Davison, 2001; Virgin et al., 1997) est le représentant des rhadinovirus que nous avons choisi d'utiliser comme modèle expérimental des infections par les gammaherpèsvirus au long de cette étude. Le MuHV-4 est un pathogène naturel de rongeurs sauvages (*Myodes glareolus*) (Blaskovic, Stancekova, Svobodova, & Mistrikova, 1980). Capable

d'infecter la souris de laboratoire, il offre un modèle d'étude robuste de la pathogénie des  $\gamma$ HVs. Nous reviendrons également plus en détails dans les prochains points sur la pathogénie du MuHV-4.

- Les ***Macavirus***. Ce troisième genre viral, créé et officialisé par l'ICTV en 2009, provient de la contraction des termes « malignant » et « catarrhal fever ». Il comprend 9 virus dont l'herpèsvirus alcelaphin 1 ou virus associé à la fièvre catarrhale maligne des gnous (AIHV-1) (Ensser, Pflanz, & Fleckenstein, 1997) et l'herpèsvirus ovin 2 ou virus associé à la fièvre catarrhale maligne des ovidés (OvHV-2) (Hart et al., 2007), responsables respectivement des formes africaine et européenne de la fièvre catarrhale maligne et d'importance épidémiologique majeure (Russell, Stewart, & Haig, 2009).
- Les ***Percavirus***. Ce quatrième genre viral a également été créé en 2009. Il provient de la contraction des termes « perissodactyl » et « carnivore » et comprend 3 virus uniquement, dont l'herpèsvirus équin 2 (EHV-2) (Telford, Watson, Aird, Perry, & Davison, 1995).
- Les ***Bossavirus*** : Ce cinquième genre comprend uniquement un virus infectant le dauphin : *Delphinid gammaherpesvirus 1* (Davison et al., 2017).
- Les ***Manticavirus*** : Ce sixième genre infecte les espèces marsupiales d'où le nom *Mantica* en référence à la poche marsupiale. Deux virus sont inclus dans ce genre : *Phascolarctid gammaherpesvirus 1* (PhaHV1) and *Vombatid gammaherpesvirus 1* (VoHV1) infectant respectivement les koalas et les wombats (Vaz et al., 2019).
- Les ***Patagivirus*** : Ce dernier genre établi comprend l'espèce virale *Vespertilionid gammaherpesvirus 3* avec comme hôte la chauve-souris (James, Donato, de Thoisy, Lavergne, & Lacoste, 2020).

D'autres  $\gamma$ HVs sont également décrits mais n'ont pas été, jusqu'ici, intégrés à l'un des 7 genres viraux reconnus par l'ICTV (<http://ictvonline.org>).

## 1.2. Les gammaherpèsvirus humains

Deux virus d'intérêt majeur infectent l'homme à ce jour : l'EBV et le KSHV. Alors que l'infection persistante par les  $\gamma$ HVs reste généralement asymptomatique ou associée à de faibles signes cliniques, elle peut favoriser le développement de cancers, notamment chez les personnes immunodéprimées (Ackermann, 2006). Aussi, ces agents infectieux peuvent, en fonction des contextes et des moments de l'infection, être considérés comme des agents « symbiotiques » ou au contraire, « pathogènes ». En effet, bien qu'associée à des désordres prolifératifs chez une minorité de patients, l'infection par ces virus très prévalents a aussi été corrélée à des effets bénéfiques pour l'hôte. Au cours d'une adaptation et d'une co-évolution de millions d'années avec l'hôte, ces virus ancestraux ont

développé une relation de tolérance, pouvant même conférer un avantage sélectif à l'hôte. Ainsi, il a été suggéré que l'infection par l'EBV dans le jeune âge prévenait le développement d'une sensibilisation persistante de type IgE, alors que l'infection restait asymptomatique pour l'hôte pendant toute la durée de vie (Saghafian-Hedengren, Sverremark-Ekström, Linde, Lilja, & Nilsson, 2010). L'infection est donc associée à des bénéfices mutuels tels que l'établissement et la persistance à long terme du virus au sein de l'hôte et une éducation du système immunitaire de l'hôte suite à l'infection. A l'inverse, en cas de rupture de l'équilibre, ces virus peuvent être requalifiés de virus pathogènes, induisant des effets délétères pour l'hôte infecté tels que l'émergence de cancers ou le développement d'immunopathologies qui seront décrites plus en détails par la suite.

### *1.2.1. Le virus de l'Epstein-Barr*

L'EBV a été identifié à l'origine en 1964 par Sir Anthony Epstein au sein d'un lymphome de Burkitt, tumeur la plus commune chez l'enfant en Afrique subsaharienne (Epstein et al., 1964). Ce virus, transformant, est également le pathogène humain le plus répandu et infecte plus de 90% de la population humaine (Pariante, Bartolomé, Lorente, & Crespo, 2007). Malgré son potentiel cancérigène, l'infection par l'EBV n'induit généralement jamais de développement de tumeurs associées à l'EBV (Cesarman, 2014). L'EBV est également l'agent responsable de la mononucléose infectieuse lorsque l'infection primaire se produit à un âge plus tardif comme à l'adolescence (Balfour et al., 2013; Jayasooriya et al., 2015). En effet, l'infection primaire se produit le plus souvent tôt dans l'enfance. Elle reste généralement asymptomatique. L'infection primaire peut causer dans de rares cas de la fièvre, de la toux, des nausées, un gonflement des ganglions lymphatiques et de la fatigue.

L'EBV infecte et se réplique principalement dans les cellules épithéliales de l'oropharynx et les glandes parotides et s'établit de façon latente principalement dans les lymphocytes B. Les pathologies associées au virus de l'EBV sont majoritairement liées à des désordres prolifératifs et apparaissent à la suite d'un traitement immunosuppresseur ou chez des patients présentant une immunodéficience, par exemple le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Parmi ces désordres prolifératifs, on retrouve notamment en plus du lymphome de Burkitt, la maladie d'Hodgkin, le lymphome à grandes cellules B, le lymphome plasmoblastique ainsi que les hyperplasies plasmocytaires et à cellules B (Cesarman, 2014; Farrell, 2019). Ces pathologies traduisent cliniquement le tropisme cellulaire du virus pour les lymphocytes B (Thorley-Lawson & Allday, 2008). Des lymphomes extra-nodaux à cellules T et *Natural killer cells* (NK) sont également associés à l'infection par l'EBV et sont divisés en 3 sous-types : nasaux, non-nasaux et disséminés. Ces tumeurs peuvent être situées au niveau du nasopharynx mais également au niveau du système digestif et dans des organes multiples lors d'atteinte par la forme disséminée entraînant des signes cliniques majeurs (Tse & Kwong, 2019).

Au niveau du cycle biologique, les virions sont transmis par la salive (Casper et al., 2007). Jusqu'il y a peu, il était accepté que l'EBV réalisait son cycle lytique de primo-infection dans l'épithélium tonsillaire de l'anneau de Waldeyer (amygdales). Aujourd'hui, ce modèle d'entrée est controversé, notamment parce qu'il n'est basé que sur des indices épidémiologiques indirects et que d'autres modèles d'entrée ont été proposés chez les  $\gamma$ HVs, par l'étude *in vivo* du cycle pathogénique du MuHV-4 (Gillet, Frederico, & Stevenson, 2015). Les amygdales seraient quant à elles le site majeur de transmission virale. Indépendamment de la voie d'entrée, l'EBV atteint ensuite les lymphocytes B naïfs quiescents de tissus lymphoïdes sous-jacents au site de primo-infection, qui deviennent des sites de persistance de l'EBV. Une fois dans les lymphocytes B, l'EBV met en place ses programmes de latence pour établir et maintenir l'infection latente, via l'attachement de son épisode aux chromosomes cellulaires. Les épisodes de réactivation virale assurent la transmission du virus par la différenciation de lymphocytes B mémoires infectés latents en plasmocytes en rétablissant le cycle lytique (Thorley-Lawson, 2015). Les plasmocytes réactivés libèrent des virions infectieux qui peuvent, soit infecter des cellules épithéliales des amygdales et assurer la transmission virale par la salive, soit infecter d'autres lymphocytes B naïfs pour entamer un nouveau cycle d'infection latente (Thorley-Lawson & Allday, 2008).

Alors que ces infections sont majoritairement bien tolérées par l'hôte, certaines immunopathologies comme la sclérose en plaque (*Multiple Sclerosis-MS*) (Sollid, 2022) ou la lymphohistiocytose hémophagocytaire (*Hemophagocytic lymphohistiocytosis-HLH*) (Mărginean, Molnar, & Chinceșan, 2020) sont associées à l'infection par l'EBV dans différents contextes.

### 1.2.2. L'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi

Le KSHV a été découvert en 1994 dans des lésions de sarcomes cutanés, appelés sarcomes de Kaposi, chez des patients sidéens (Chang et al., 1994) et est à l'origine du sarcome de Kaposi, une tumeur vasculaire dérivée des cellules endothéliales principalement observée chez des personnes atteintes du SIDA et chez des personnes transplantées soumises à un traitement immunosupresseur. Au niveau histologique, les cellules tumorales infectées par le KSHV sont peu différenciées, hautement prolifératives et présentent une forme caractéristique dite en fuseau (*spindle cells*) (Dupin et al., 1999). Le sarcome de Kaposi se présente cliniquement sous forme de lésions dermiques de couleur rouge-brune qui peuvent se développer au niveau de la peau, des muqueuses ou des viscères. L'ADN viral du KSHV est détecté dans plus de 95% des lésions de sarcome de Kaposi (Wen & Damania, 2010), confirmant le lien de causalité qui existe entre l'infection virale et le développement de ce cancer. L'infection par le KSHV est toujours nécessaire au développement du sarcome de Kaposi bien qu'elle ne soit, à elle seule, pas suffisante. En effet, d'autres cofacteurs doivent être présents. Le cofacteur le plus important est la co-infection par le HIV (Gallo, 1998). Le KSHV est aussi associé à des maladies lymphoprolifératives liées aux cellules B, comme le lymphome d'effusion primaire (*Primary effusion lymphoma-PEL*), la

maladie multicentrique de Castelman (*Multicentric castelman disease-MCD*) (Cesarman, 2014; Wen & Damania, 2010). Comme pour l'EBV, les symptômes liés à l'infection par le KSHV chez les personnes immunocompétentes sont quasiment inexistantes. Les modes de transmission du KSHV incluent principalement la salive (Blackbourn, Lennette, Ambroziak, Mourich, & Levy, 1998). Le KSHV infecte initialement les cellules endothéliales et la pathogénie est liée à des réactions angiogéniques et inflammatoires. Comme pour l'EBV, la réactivation lytique peut être induite par divers stimuli exogènes. Elle est contrôlée par la protéine RTA (*Replication and Transcription Activator protein*) de l'ORF50 (Lukac, Renne, Kirshner, & Ganem, 1998).

Comme l'EBV, l'infection par le KSHV peut également être à l'origine d'immunopathologies comme le syndrome inflammatoire cytokinaire (*KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome-KICS*) (Polizzotto et al., 2016).

### 1.3. Le MuHV-4 comme modèle expérimental

Étant donné que les infections par l'EBV et le KSHV sont strictement limitées aux humains et qu'il n'est donc pas possible de les étudier chez d'autres espèces, la découverte d'un  $\gamma$ HV capable d'infecter les souris de laboratoire a permis le développement d'un modèle d'étude robuste de la pathogénie des  $\gamma$ HVs. L'exploitation du modèle a permis de comprendre la relation hôte-pathogène et notamment les mécanismes précis par lesquels ces virus interagissent avec le système immunitaire de l'hôte.

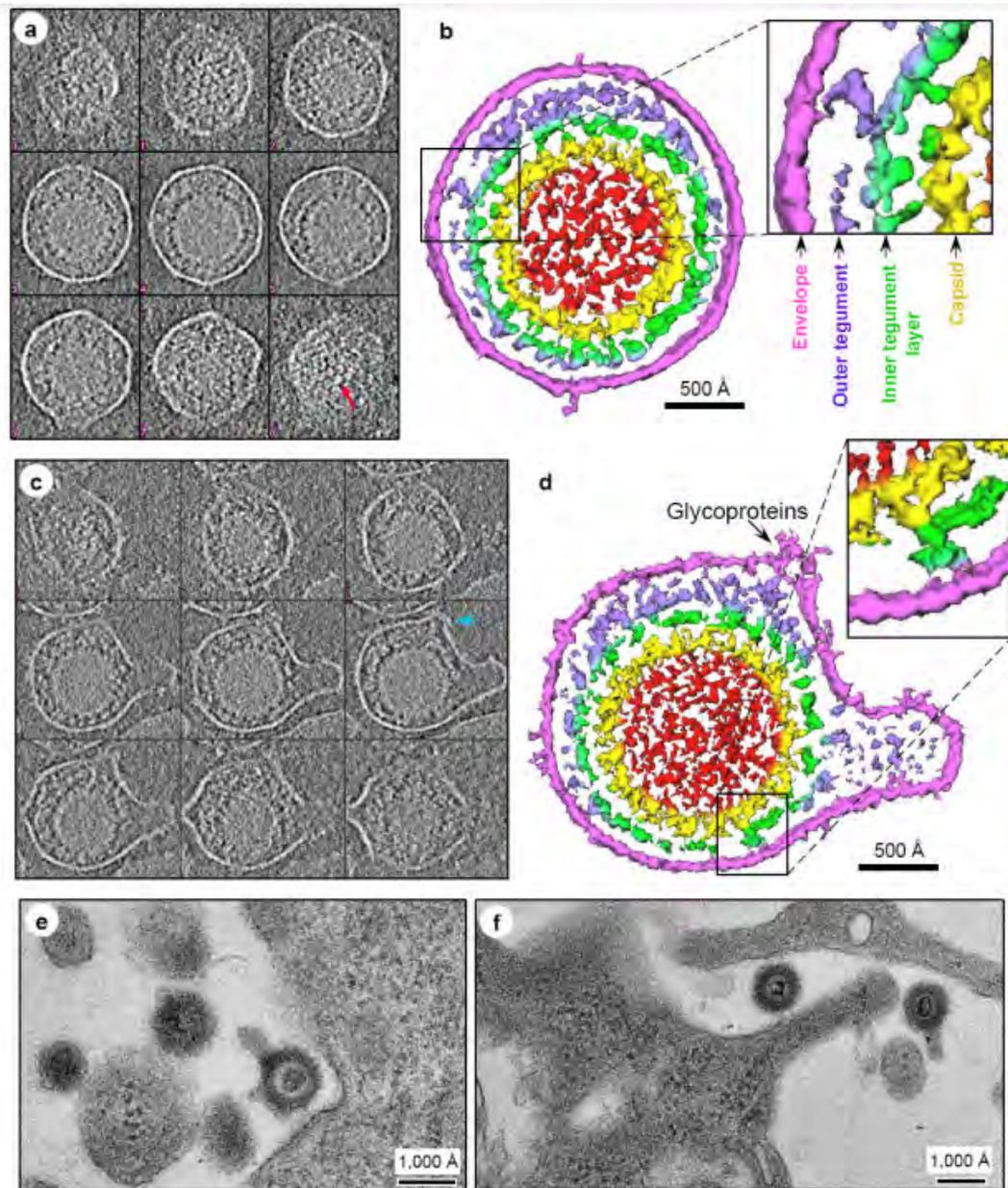
#### 1.3.1. Spectre d'hôtes

Le MuHV-4 est un *Gammaherpesvirinae* appartenant au genre *Rhadinovirus*, présent dans le milieu naturel et infectant les rongeurs sauvages. La souche MHV-68, telle qu'utilisée dans nos études, a été isolée en premier lieu chez le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) en Slovaquie en 1980 (Blaskovic et al., 1980). L'hôte naturel le plus probable semble être en réalité le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*) (Telfer, Bennett, Carslake, Helyar, & Begon, 2007). Le virus est génétiquement proche de l'EBV et du KSHV. Impliquant les mêmes acteurs immunologiques, le même cycle viral avec un cycle d'infection similaire, l'infection par le MuHV-4 permet d'étudier la pathogénie des infections par les  $\gamma$ HVs humains dans un modèle animal murin. Ces caractéristiques font du MuHV-4 un pathogène d'intérêt majeur à utiliser chez la souris de laboratoire (*Mus musculus*) et son cycle viral a été décrit en détail (Gaspar et al., 2011; Milho et al., 2009).

#### 1.3.2. Structure des virions

L'ensemble des herpesvirus exhibe une morphologie similaire. Les particules virales infectieuses (virions) sont sphériques et ont un diamètre d'approximativement 200 nm. Les virions ont

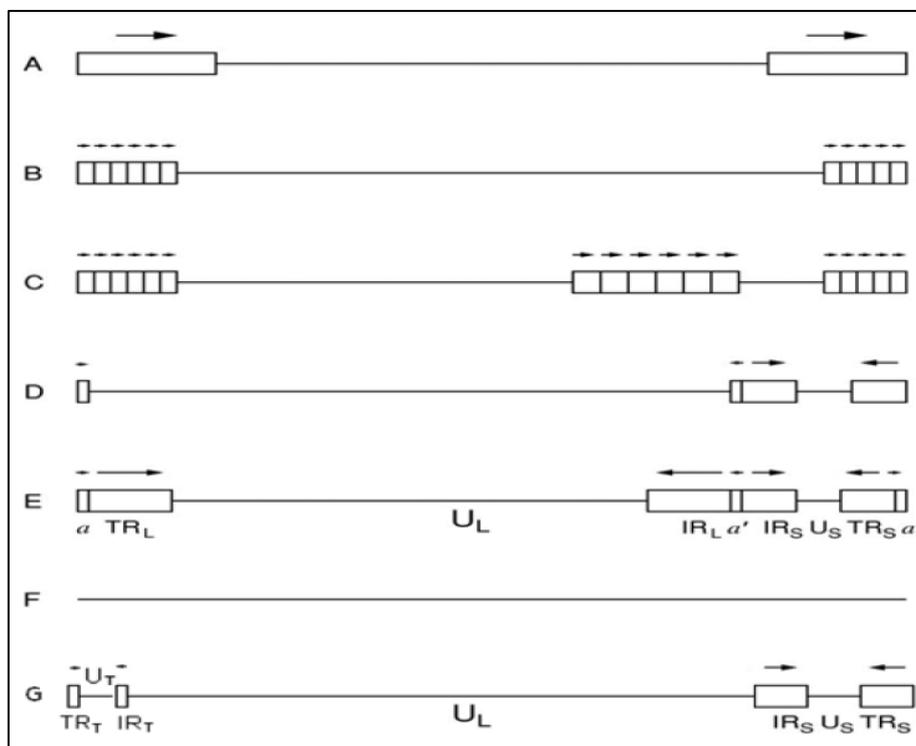
une architecture complexe et caractéristique constituée de composants symétriques et asymétriques. Quatre composants composent le virion sphérique (**Figure 1**) : le cœur central composé du génome, la capsid, le tégment et l'enveloppe. Le génome d'ADN double brin, linéaire est contenu dans une capsid icosahédrique composée de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères) de 125 à 130 nm de diamètre (T=16), entourée par une matrice protéique appelée tégment. Le matériel génétique et la capsid forment la nucléocapsid. Le tégment contient une trentaine de protéines différentes qui occupent environ 2/3 du volume du virion et est divisé en une couche externe du côté de l'enveloppe lipidique et d'une couche interne du côté de la capsid. Finalement, une enveloppe lipidique, dérivée de membranes cellulaires et contenant diverses glycoprotéines (gp) virales et protéines cellulaires enchâssées, constitue la couche externe de la particule. Les gp virales sont pour la plupart fortement immunogéniques. Elles permettent l'entrée et la sortie du virus dans la cellule-hôte (Bohannon, Yonggun, Gross, & Allan, 2013; Mettenleiter, Klupp, & Granzow, 2006). La **figure 1** présente une reconstruction de virions MuHV-4 par cryo-tomographie et cryo-microscopie électronique (W. Dai et al., 2008).



**Figure 1. Reconstruction de virions MuHV-4 par cryo-tomographie et cryo-microscopie électronique** (a, c) Coupes en série espacées uniformément qui ont été sélectionnées au départ de deux tomogrammes de virions MuHV-4 représentatifs; (a) la capside occupe une position centrale ; (c) le tégment et l'enveloppe externe sont déformés. La flèche rouge en (a) indique des capsomères visibles et la flèche bleue en (c) indique un groupement dense de glycoprotéines. (b,d) Représentations en surface ombragée de parties centrales (150 Å d'épaisseur) de virions segmentés au départ des tomogrammes montrés en (a) et (c). Les agrandissements exposent les interactions tégment-capside et tégment-enveloppe. Le code couleur est établi sur base de la distance par rapport au centre de la capside: rouge, densités internes dans la capside; jaune, capside; vert, couche interne du tégment; violet, couche externe non homogène du tégment (épouse la forme de l'enveloppe virale); magenta, enveloppe virale. (e,f) Images par microscopie électronique à transmission de sections fines de cellules 3T3 infectées par le MuHV-4. Pendant les phases d'attachement et d'entrée, à la fois des virions de forme circulaire homogène et des virions présentant des protrusions de l'enveloppe (en nombres et tailles variables) peuvent être observés en conditions d'infection physiologique (W. Dai et al., 2008).

### 1.3.3. Génome

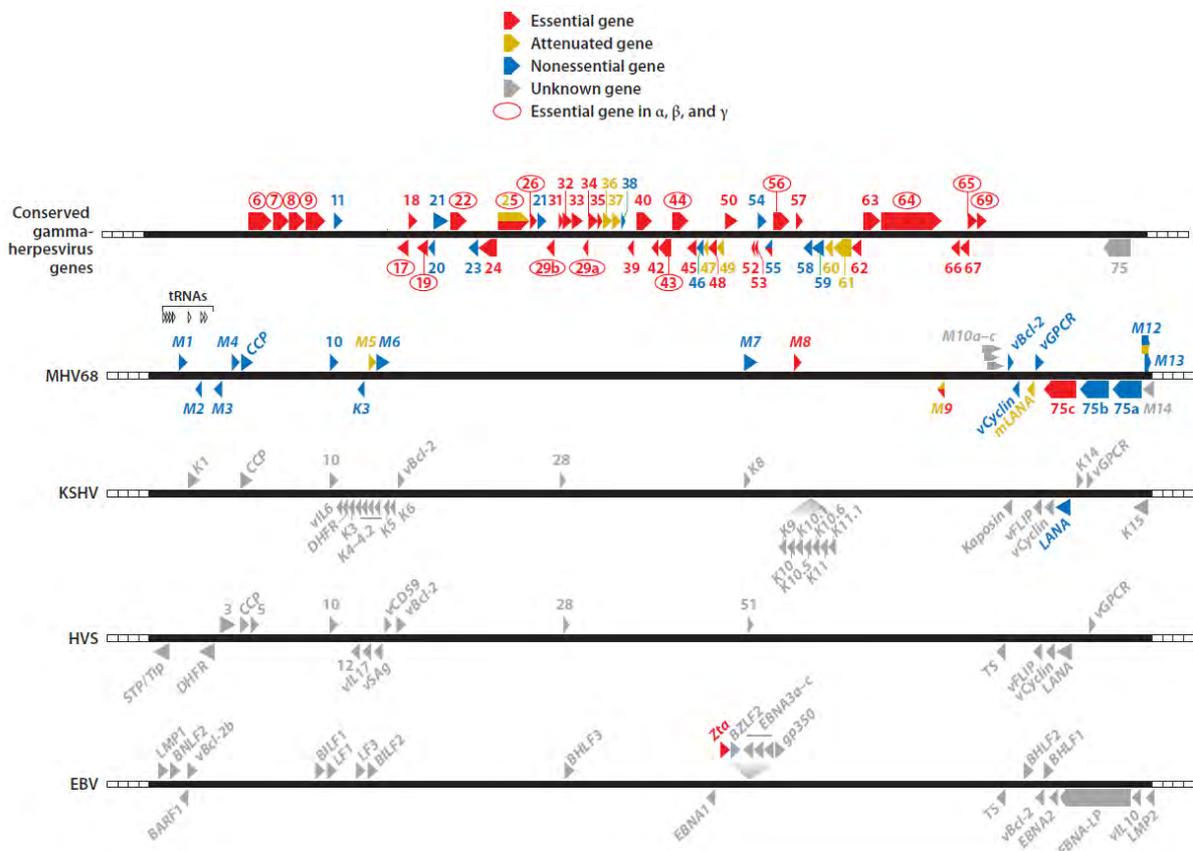
Les herpesvirus possèdent un génome composé d'une molécule d'ADN double brin linéaire de grande taille (125 à 295 kpb avec une composition variable de 32 à 75% de séquences G+C). L'arrangement des séquences répétées, directes ou inversées résulte en un nombre différent de structures génomiques, permettant de classer les *Herpesviridae* en 7 groupes (**Figure 2**). De façon générale, les génomes des herpesvirus contiennent tous un grand nombre de gènes codants. Une façon de les classer consiste à identifier les cadres de lecture ouverts (*Open reading frames-ORFs*). Le génome du MuHV-4 a une taille approximative de 120 kb, composé d'une longue région unique flanquée de part et d'autre par un nombre important de répétitions terminales directes (Virgin et al., 1997). Il s'agit d'un génome de classe B. La figure suivante représente les différentes structures génomiques rencontrées au sein de l'ordre des *Herpesvirales*.



**Figure 2. Les différentes classes de structure génomique des herpesvirus.** A. Les génomes consistent en une séquence unique flanquée d'une séquence répétée directe. Ce type de structure se retrouve essentiellement chez les  $\beta$ HVs. B. Répétitions en tandem: les génomes présentent des séquences répétées directes, contenant elles-mêmes un nombre variable de répétitions d'une même séquence (0,8 à 2,3 kbp). Cet arrangement caractérise la plupart des  $\gamma$ HVs du genre Rhadinovirus. C. Structure dérivée de la classe B. La différence est la présence d'un set interne de répétitions directes, indépendantes des répétitions des sets terminaux. L'EBV présente ce type de structure. D. Les génomes de cette classe contiennent deux régions uniques (UL et US), chacune présentant des répétitions terminales et internes directes ou inversées (TRL/IRL et TRS/IRS). Cet arrangement se retrouve chez les  $\alpha$ HVs du genre Varicellovirus. E. Organisation génomique la plus complexe, qui fut pourtant la première à être décrite, pour l'HSV-1. La structure est semblable à la classe D. Cependant, les TRL/IRL sont plus longues et peuvent s'inverser, donnant lieu à quatre isomères d'ADN viral en proportions équimolaires. De plus, les extrémités génomiques sont

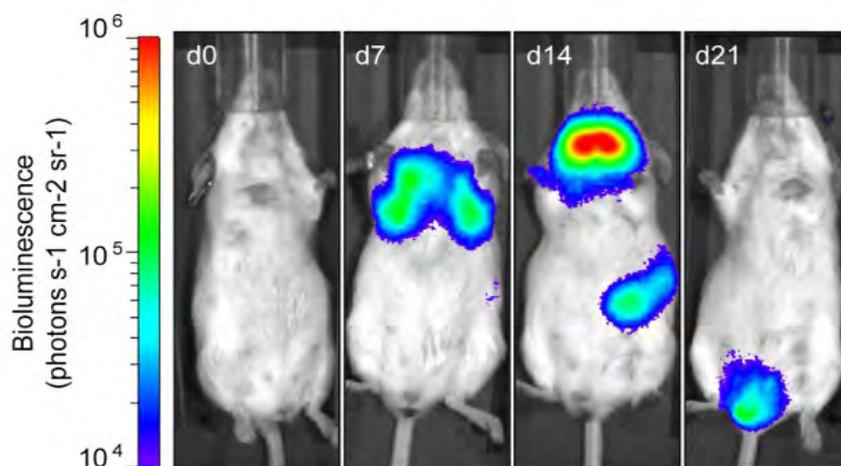
redondantes: elles contiennent une séquence identique de quelques centaines de bp, en répétitions directes aux extrémités ( $\alpha$ ) mais aussi en répétitions inversées à la jonction IRL - IRS ( $\alpha'$ ). Ce type de structure est caractéristique des  $\alpha$ HVs du genre Simplexvirus mais se retrouve également chez certains  $\beta$ HVs tels que le HCMV. F. Structure génomique sans aucune répétition. Cette classe fait figure d'exception chez les herpesvirus. Le *Tupaiaid herpesvirus 1* présente ce type de génome. G. Nouvelle organisation génomique décrite récemment chez l' $\alpha$ HV TeHV-3. Le génome contient 3 régions uniques: UL, US et UT. US et UT présentent des répétitions terminales et internes (TRT/IRT et TRS/IRS). A-F. les régions uniques et répétées sont représentées par les lignes et les rectangles, respectivement. L'orientation des répétitions est indiquée par les flèches. La nomenclature des régions uniques et répétées est illustrée pour les classes E et G. Adapté de (Davison, 2014).

Le génome du MuHV-4 contient 80 ORFS dont une grande partie sont homologues au génome du KSHV (Virgin et al., 1997). La plupart sont également encodés par l'EBV. Le MuHV-4 partage en effet 90% d'homologie de ses gènes avec le KSHV et 80% avec l'EBV. Les gènes conservés sont notamment impliqués dans la réplication de l'ADN génomique, dans la formation des capsides virales ainsi que dans l'empaquetage de l'ADN nouvellement synthétisé dans ces dernières (Dunn et al., 2003; Ward & Roizman, 1994). En plus de ces gènes communs conservés au sein des  $\gamma$ HVs, chaque espèce virale est également caractérisée par la présence de gènes acquis qui résultent de l'acquisition de gènes de l'hôte ou d'autres virus au cours de l'évolution. Ce processus est particulièrement marqué chez les  $\gamma$ HVs et joue un rôle important dans les stratégies d'immunoévasion des  $\gamma$ HVs. A côté de ces gènes partagés, le MuHV-4 contient 14 gènes uniques, dénommés *M1* à *M14*, dont la majorité code pour des protéines jouant un rôle lors du cycle lytique. La **figure 3** présente une illustration schématique des gènes conservés et uniques alignés chez le MuHV-4, le KSHV et l'EBV (Barton et al., 2011).



**Figure 3. Illustration schématique des gènes conservés et uniques présents dans les génomes de différents gammaherpèsvirus.** Les gènes conservés par tous les  $\gamma$ HVs sont présentés sur le premier génome illustré. Les gènes uniques de chaque  $\gamma$ HV étudié sont présentés sur leur génome respectif. Par souci de clarté et de respect de l'alignement des positions relatives des gènes uniques, les génomes viraux ne sont pas à l'échelle (Barton et al., 2011).

Des manipulations génétiques du MuHV-4 notamment par la technique de clonage en chromosome bactérien artificiel (*Bacterial Artificial Chromosome*-BAC) (Adler, Messerle, Wagner, & Koszinowski, 2000) ont permis de produire une souche de MuHV-4 recombinant exprimant l'enzyme luciférase (initialement issue de la luciole, *Photinus pyralis*) (Milho et al., 2009). Milho *et al* ont en effet généré une souche MuHV-4 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du gène lytique M3, abondamment exprimé en phases lytiques précoce et tardive. Le promoteur M3, promoteur intergénique viral, dépend de l'ORF50 qui est exprimé uniquement lors de l'infection lytique. Un candidat idéal pour le gène rapporteur serait un gène capable d'être exprimé aussi bien en phase de latence qu'en phase lytique. Cependant, en lien avec le niveau presque inexistant d'expression de gènes en phase de latence, il n'était pas possible d'investiguer l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules infectées latentes. La luciférine est injectée *in vivo* par voie intra-péritonéale (i.p.) chez la souris infectée et est oxydée par la luciférase, codée par le génome du MuHV-4, aboutissant à la libération de photons. Ce principe d'émission de lumière par bioluminescence permet la quantification des photons par un système d'imagerie *in vivo imaging system* (IVIS) et le suivi du cycle pathogénique viral *in vivo*. Cette technique a notamment permis d'identifier une voie de transmission sexuelle au sein de notre laboratoire (François et al., 2013). La **figure 4** représente les sites de répllication lytique suite à l'infection intra-nasale (i.n.) sous anesthésie générale par le MuHV-4.



**Figure 4 : Infection *in vivo* par le MuHV-4 exprimant la luciférase.** Les femelles étaient infectées avec  $1.10^4$  particules virales (*Plaques-forming units*, PFUs) sous anesthésie générale. Les souris ont ensuite été imagées après injection de luciférine tous les jours (François et al., 2013).

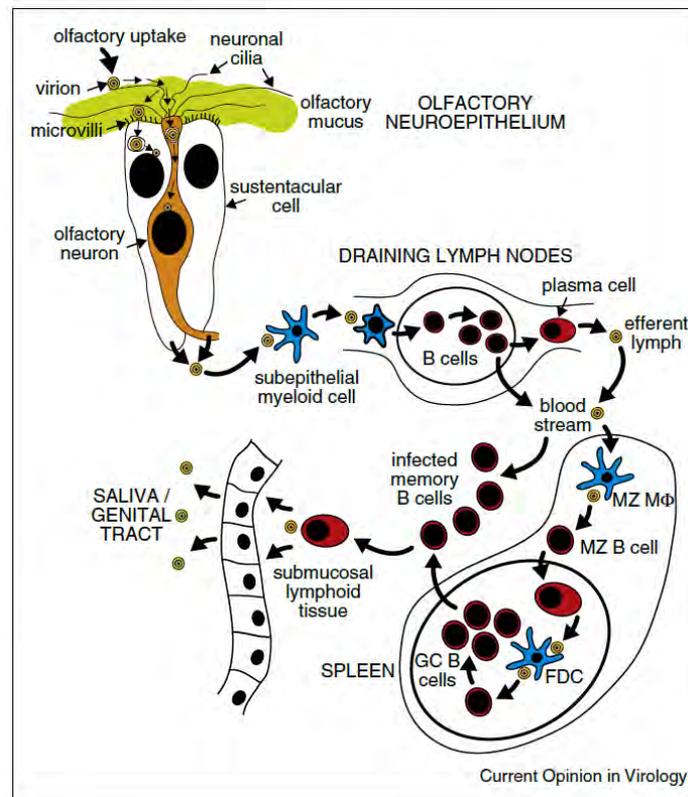
### 1.3.4. Cycle viral

Les herpèsvirus réalisent deux types principaux d'infection : l'infection lytique dite productive et l'infection latente. Le cycle lytique est globalement conservé et transposable entre les herpèsvirus. Le cycle de multiplication virale sera décrit dans le cadre de l'infection par le MuHV-4 dépendamment de deux voies d'inoculation, la voie i.n. sans anesthésie générale et la voie pulmonaire par inoculation i.n. sous anesthésie générale. La latence s'établit dans différents types cellulaires, principalement dans les lymphocytes B pour le MuHV-4. Cette latence correspond à un état « invisible », sans production de particules virales infectieuses (Virgin, Wherry, & Ahmed, 2009) et où le nombre de protéines transcrites est limité, permettant uniquement au génome viral de se maintenir au sein de la cellule hôte. La notion de latence s'applique aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle de l'organisme hôte. Pour la cellule, la latence permet uniquement le maintien du génome viral alors que pour l'hôte infecté de manière latente, aucune réplication lytique, résultat de l'infection primaire ou de la réactivation n'est observée (Barton et al., 2011). Après l'établissement de la latence, des épisodes de réactivation surviennent, qui sont caractérisés par la remise en place périodique de cycles réplicatifs efficaces permettant la transmission virale.

Dans le cadre de cette étude, l'infection expérimentale par le MuHV-4 s'opérera par voie i.n. sous anesthésie générale. Malgré que cette voie d'infection soit artificielle, les acteurs de la réplication primaire et de la colonisation splénique sont identiques. Que ce soit lors de l'infection primaire du neuroépithélium olfactif ou suite à l'amplification pulmonaire, le virus établit alors sa latence dans les tissus lymphoïdes en colonisant principalement les lymphocytes B. Cette thèse ayant pour but d'étudier les mécanismes régulateurs clés et les acteurs immuns responsables d'une immunomodulation dans la sphère pulmonaire lors de l'infection primaire, nous nous intéresserons donc à l'infection de souris par le MuHV-4 par voie respiratoire sous anesthésie générale, permettant une standardisation de la voie d'infection.

La voie d'infection naturelle n'est toujours pas établie à l'heure actuelle. Jusqu'à récemment, le tractus respiratoire supérieur était considéré comme le site d'entrée le plus probable. Des études ont testé l'infection du MuHV-4 par les voies i.n., i.p., sous-cutanée (s.c.), intracérébrale et orale. Pour chacune de ces voies, le MuHV-4 est capable d'infecter l'hôte. Cela reflète la capacité du MuHV-4 à coloniser de nombreux sites tissulaires différents grâce à son large tropisme pour diverses lignées cellulaires épithéliales et fibroblastiques. Toutes les voies d'inoculation mènent à l'infection des lymphocytes B et les cellules B infectées latentes peuvent en théorie transporter le MuHV-4 d'un site à l'autre. Il est donc admis que les différents modes d'infections sont sensiblement équivalents. Cependant, l'infection i.n. était associée au développement de signes cliniques ainsi qu'à des modifications histo-pathologiques qui se rapprochaient le plus des signes observés lors de l'infection naturelle (Sunil-Chandra, Efstathiou, Arno, & Nash, 1992). Le cycle viral du MuHV-4 a été caractérisé en détails et la **figure 5** récapitule les

différentes étapes de l'infection et du cycle viral du MuHV-4 suite à une infection par voie i.n sans anesthésie, mimant une infection naturelle.



**Figure 5 : Schéma de la circulation du MuHV-4 dans son hôte murin.** Les virions se lient aux cils neuronaux recouverts de mucus du neuroépithélium olfactif. Les cils constituent un pont à travers le mucus vers les neurones olfactifs et les cellules sustentaculaires. Le virus libéré par voie basale rencontre des cellules myéloïdes sous-épithéliales. L'infection d'une cellule myéloïde CD11c+ permet au MuHV-4 d'atteindre les cellules B dans les ganglions lymphatiques drainants. Après avoir proliféré dans les centres germinatifs, certains lymphocytes B infectés se différencient en plasmocytes dans les cordons médullaires des ganglions lymphatiques et libèrent le virus dans la lymphe éfférente. De là, il passe dans la rate via le sang et est pris en charge par les macrophages de la zone marginale (MZ Mφ). Ils transmettent l'infection aux cellules B de la zone marginale, qui migrent dans la pulpe blanche et se différencient en plasmocytes pour libérer davantage de virions, que les cellules dendritiques folliculaires transfèrent à leur tour aux cellules B folliculaires. Ces derniers émergent ensuite des centres germinatifs en tant que cellules B mémoires. Cela permet le transport du virus vers des sites distants. La différenciation des plasmocytes est associée à la réactivation du virus (Liang, Collins, Mendel, Iwakoshi, & Speck, 2009), et la différenciation des plasmocytes au niveau de la sous-muqueuse permettrait l'excrétion du virus salivaire et génital via l'épithélium sus-jacent (Gillet et al., 2015).

Dans le cas d'une infection i.n. sans anesthésie générale, la réplication lytique a lieu dans le neuroépithélium olfactif en infectant des cellules sustentaculaires et/ou des neurones olfactifs (Gillet et al., 2015; Milho et al., 2009). Si l'inoculation des souris est réalisée sous anesthésie générale, le MuHV-4 infecte les cellules épithéliales alvéolaires du poumon où il réalise une phase de réplication aiguë (Lawler, Milho, May, & Stevenson, 2015). Plus précisément, après l'inoculation i.n., les antigènes

viraux sont exprimés par les cellules épithéliales alvéolaires de type I (*Alveolar epithelial cells type I-AECs*) exprimant la podoplanine (PDP) qui possèdent des projections cytoplasmiques dans les espaces aériens. En terme de cinétique, un jour après l'infection, des antigènes viraux sont déjà présents au niveau des cellules CD68+ (Lawler et al., 2015). Lawler *et al* ont suivi l'infection des cellules en utilisant un virus exprimant la protéine *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) sous le contrôle d'un promoteur viral fort IE1 du HCMV. Ils ont identifié que les cellules CD68+ sont les premières cibles de l'infection. Au sein de cette population CD68+, plus de 80% des cellules expriment le marqueur F4/80 (marqueur de macrophages tissulaires) et le marqueur CD11c (marqueur des macrophages alvéolaires et des cellules dendritiques), concluant que la majeure partie des cellules infectées sont des macrophages alvéolaires (*Alveolar macrophages-AMs*). En supprimant les macrophages du poumon par utilisation de souris transgéniques CD169DTR, la majorité des cellules ne sont plus infectées par le MuHV-4, la voie d'entrée principale du MuHV-4 étant supprimée. Après l'infection précoce des AMs, plus de la moitié des cellules positives à l'infection sont PDP+ signant une infection des AECs de type I à partir du jour 4 p.i. Cette même étude a identifié également l'héparan sulfate comme protéoglycan indispensable au mécanisme d'entrée des virions dans les cellules hôtes : une souche MuHV-4, qui n'est pas capable de lier l'héparan sulfate, par mutation de gp70 et gL, est 100 fois moins infectante. Les AMs n'expriment pas d'héparan sulfate mais ces molécules sont cependant présentes du côté apical de la surface des AEC.

Pour résumer, les AECs de type 1 fixent la plupart des virions arrivant en surface en se liant à l'héparan sulfate sans en subir l'infection. Les antigènes viraux ne s'accumulent pas au sein des cellules PDP+ mais sont présentés aux AMs. Les AMs endocytent ensuite les virions, de par leur fonction de phagocytose et de nettoyage des débris environnants au niveau de la sphère pulmonaire, le virus utilisant les voies d'entrées normales de l'hôte pour permettre le déroulement de son cycle. L'infection locale résulte en une réplication productive au niveau des macrophages et ensuite un transfert d'infection au niveau des AEC de type I (Lawler et al., 2015). La réplication virale dans les poumons induit une pneumonie interstitielle avec une infiltration leucocytaire périvasculaire et péribronchiolaire. L'infection primaire est contrôlée en 10 à 14 jours. La cinétique de réplication et son pic dépendent des doses. Des inoculations i.n. à des doses de  $10^4$  PFUs résultent en un pic de réplication dans les poumons au jour 7. Le virus n'est plus détectable aux jours 10 et 12 post-infection (p.i.). Nous reviendrons plus en détails dans le cadre de cette étude sur la cinétique de cette infection aiguë et les différents événements se produisant lors de cette infection.

Après l'infection de l'épithélium olfactif ou alvéolaire, le virus infecte de façon commune des cellules myéloïdes (macrophages et/ou cellules dendritiques) CD11c+ qui rejoignent les ganglions lymphatiques drainants, permettant l'infection des cellules B (Gaspar et al., 2011). Ces cellules B prolifèrent au sein de centres germinatifs. Certaines se différencient en plasmocytes et réexcrètent des virions infectieux dans les vaisseaux lymphatiques efférents. Via la circulation sanguine, ces virions

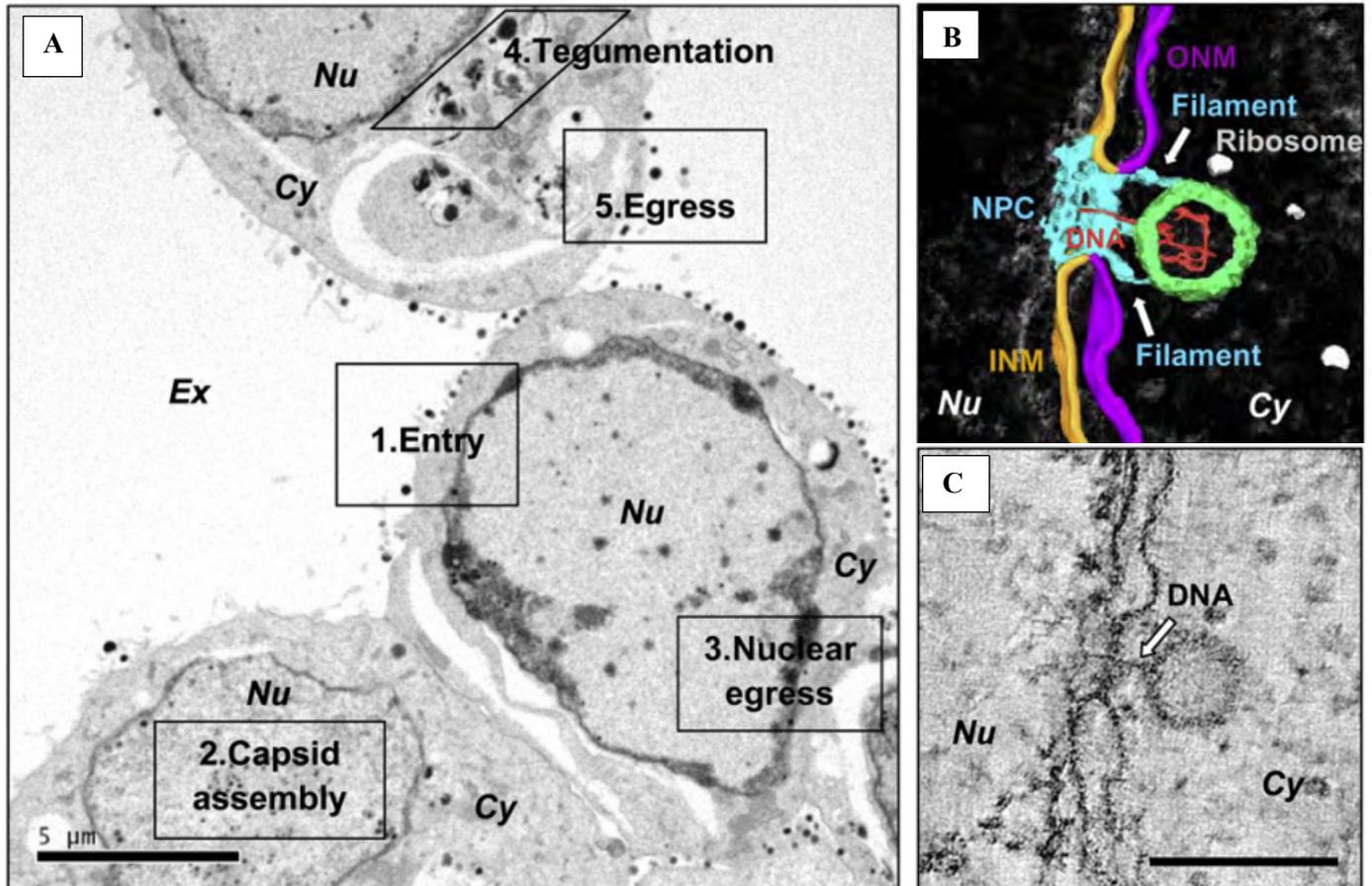
gagnent la rate et infectent les macrophages de la zone marginale. Ils transmettent l'infection aux cellules B de la zone marginale, qui migrent dans la pulpe blanche et se différencient en plasmocytes pour libérer davantage de virions, que les cellules dendritiques folliculaires transfèrent aux cellules B folliculaires. Ces derniers émergent ensuite des centres germinaux en tant que cellules B à mémoire. Cela permet le transport du virus vers des sites éloignés. La différenciation des plasmocytes est associée à la réactivation du virus (Liang et al., 2009) et la différenciation des plasmocytes sous-muqueux permettrait l'excrétion du virus aux niveaux salivaire et génital via l'épithélium sus-jacent (François et al., 2013; Gillet et al., 2015).

La latence est caractérisée par une lymphadénomégalie et par une splénomégalie, résultat d'une augmentation du nombre de cellules principalement des lymphocytes T CD8 et des cellules B. Ces remaniements sont similaires à ceux observés lors de mononucléose chez les humains. La fréquence de splénocytes infectés latents est de l'ordre de 1%, 16 à 18 jours p.i. Ce pic décroît progressivement pour atteindre un niveau basal de l'ordre d'une cellule infectée latente pour  $10^4$  cellules, à trois mois p.i. A cette période, les épisomes latents se retrouvent presque exclusivement au niveau des lymphocytes B mémoires (Barton et al., 2011). La latence virale du MuHV-4 peut également s'établir dans des sous-populations de macrophages, de cellules dendritiques (*Dendritic cells*-DCs) et même de cellules épithéliales (Nash et al., 2001). Après trois mois d'infection, le virus n'est quasiment plus détecté ni dans les lymphocytes B naïfs ni dans les populations cellulaires myéloïdes. Cette restriction du tropisme cellulaire est observée de façon concomitante à la contraction du pool total de splénocytes infectés latents (0,01% à trois mois p.i.) (Barton et al., 2011). A ce stade, le MuHV-4 persiste presque exclusivement dans les lymphocytes B mémoires qui ont subi une réaction du centre germinatif et une commutation isotypique. Comme l'EBV et le KSHV, le MuHV-4 utilise la machinerie de différenciation normale des lymphocytes B afin d'atteindre des sous-populations mémoires à longue durée de vie, type cellulaire idéal pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte.

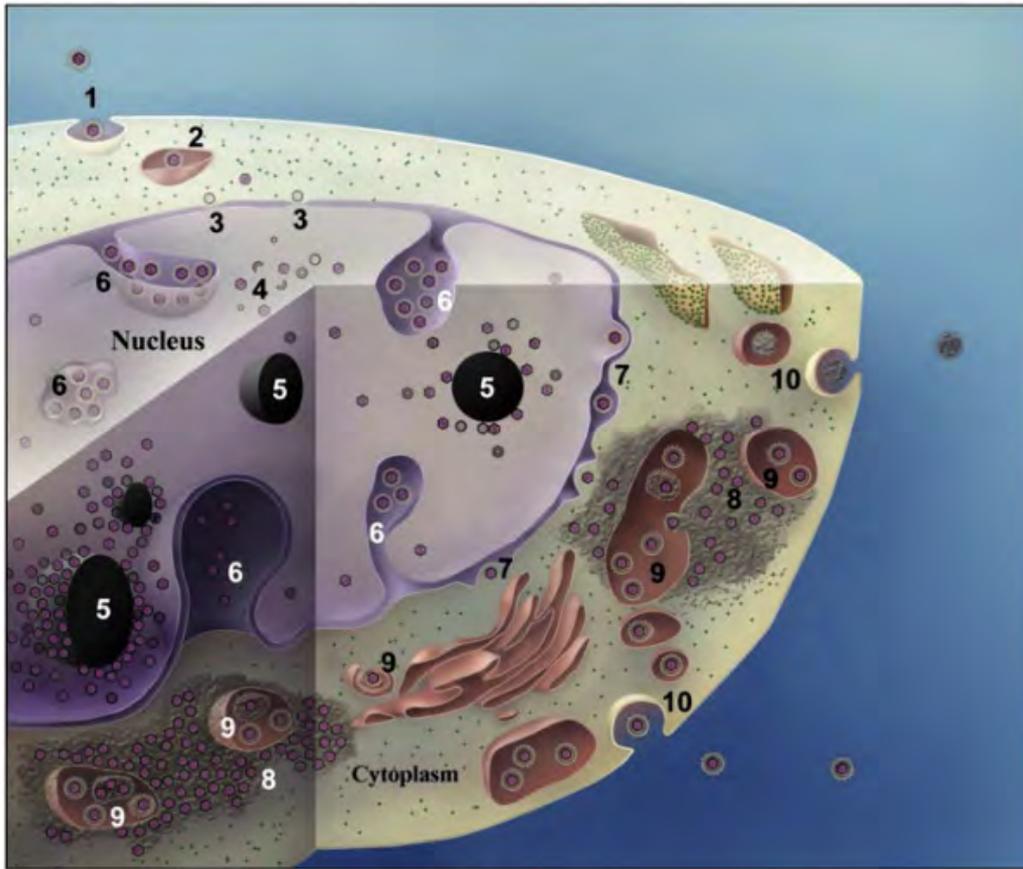
Au même titre que les  $\gamma$ HVs humains, le MuHV-4 est associé au développement de lymphomes chez des individus immunodéprimés (Nash et al., 2001). En outre, en cas de réponse immunitaire déficiente, l'infection par le MuHV-4 peut également provoquer des maladies cliniques sévères et potentiellement létales en conséquence directe d'une réplication virale non contrôlée. A titre d'exemple, l'infection par le MuHV-4 entraîne le développement d'une artérite systémique chez des souris déficientes pour le récepteur de l'interféron (IFN)  $\gamma$  et qui ne peuvent donc pas développer une réponse immune antivirale appropriée (Weck et al., 1997).

### 1.3.5. Infection lytique

Le cycle lytique reste similaire au sein des herpesvirus. En utilisant la technique de tomographie électronique, le cycle du MuHV-4 a été visualisé en 3D dans des cellules permissives à l'infection, permettant de détailler les différentes étapes du cycle lytique à savoir l'attachement, l'entrée, l'assemblage et la sortie des particules infectieuses néoformées (Peng, Ryazantsev, Sun, & Zhou, 2010). Les **figures 6** et **7** reprennent différentes étapes du cycle lytique du MuHV-4.



**Figure 6 : Cycle viral lytique du MuHV-4.** (A) Récapitulatif des événements majeurs du cycle viral lytique du MuHV-4 : 1. Entrée des virions infectieux par endocytose et transport dans les endosomes. 2. Injection de l'ADN viral dans le noyau cellulaire, assemblage des pro-capsides et encapsidation de l'ADN viral. 3. Sortie du noyau par invagination de la membrane nucléaire. 4. Tégumentation. 5. Acquisition de l'enveloppe secondaire et sortie virale par exocytose ; (B-C) Vue en 3D d'une capsidie amarrée au niveau du complexe du pore nucléaire (*Nuclear pore complex*-NPC) et injection de l'ADN viral au sein du noyau (Peng *et al.*, 2010).



**Figure 7. Représentation schématique du cycle de multiplication du MuHV-4 dans sa cellule-hôte.** Successivement, on observe l'entrée des virions infectieux par endocytose (1), le transport dans les endosomes (2), l'injection de l'ADN viral dans le noyau cellulaire (3), l'assemblage des pro-capsides et l'encapsidation de l'ADN viral (4), les corps d'inclusion intranucléaires (5), les invaginations de la membrane nucléaire (6), la sortie du noyau par enveloppement/développement (7), la tégumentation (8), l'enveloppement secondaire (9), et la sortie virale par exocytose (10) (Peng et al., 2010).

Comme premier évènement du cycle, l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire résulte d'interactions entre une ou plusieurs gp virales (Shukla & Spear, 2001) et des récepteurs cellulaires de la cellule hôte. Ces interactions sont généralement peu spécifiques et dépendent principalement de la présence de glycosaminoglycans (GAGs) et de protéoglycans comme l'héparan sulfate présent à la surface des AECs de type I comme discuté précédemment. Suite à ce premier contact, des interactions de plus forte affinité entre les gp virales et des récepteurs cellulaires spécifiques peuvent avoir lieu. La spécificité des protéines virales pour leurs récepteurs, ligands de la cellule hôte, détermine le tropisme du virus et donc sa voie d'entrée dans l'organisme ainsi que sa propagation. Nous avons vu *in vivo* quels types de cellules étaient ciblées par l'infection ainsi que la cinétique d'infection au sein des AMs et des cellules épithéliales pulmonaires. Concernant le mécanisme d'entrée en lui-même, une fois le virion attaché en surface, l'enveloppe virale va interagir avec la membrane cellulaire pour permettre l'entrée de la particule virale. L'interaction et l'entrée de la particule virale au sein de la cellule se fait dans le cas du MuHV-4 par un processus d'endocytose (Gill et al., 2006; Peng et al., 2010). La fusion fait intervenir, au minimum, les gp gB, gH et gL, qui constituent *de facto* le noyau central de la

machinerie de l'entrée virale chez tous les *Herpesviridae*. gB est la protéine de fusion proprement dite (Backovic, Leser, Lamb, Longnecker, & Jardetzky, 2007; Pertel, 2002). Le complexe formé par gH/gL n'a pas un rôle direct en tant que protéine de fusion, mais agit plutôt en régulant la fusion via ses interactions avec gB. Ces interactions sont cependant nécessaires pour permettre la fusion puisque celle-ci n'est pas observée en l'absence de gH/gL (Connolly, Jackson, Jardetzky, & Longnecker, 2011). Suite à la fusion, la nucléocapside, unité composée de l'ADN viral encapsidé au sein de la capsidite et entourée de la couche protéique qui forme le tégument, est libérée au sein du cytoplasme. En utilisant le réseau de microtubules cellulaires, la capsidite virale atteint un pore nucléaire et délivre son ADN dans le noyau (Peng et al., 2010; Sodeik, Ebersold, & Helenius, 1997). Dès son arrivée dans le noyau, l'ADN viral se circularise en l'absence de toute synthèse protéique virale (Lieberman, 2013). Divers signaux activent ensuite le programme de réplication lytique. Dans ce programme, l'expression de la plupart des ORFs du génome viral est activée, dans une cascade régulée, où différents gènes sont transcrits par vagues successives. Les gènes sont exprimés en cascade grâce à une régulation stricte permettant de distinguer trois groupes de gènes dont l'expression diffère dans le temps. Concernant les gènes cellulaires, certains herpèsvirus ont la capacité de réprimer leur expression lors de l'infection productive par un phénomène appelé « *host shutoff* » (Covarrubias, Richner, Karen, Lee, & Glaunsinger, 2009).

Trois phases de transcription des gènes viraux peuvent être distinguées:

(1) La phase IE ou  $\alpha$ , qui correspond à la transcription des gènes dits « *immediate-early* » (IE). Une fois le génome viral circularisé dans le noyau cellulaire, des protéines virales de tégument interagissent avec divers composants cellulaires pour initier la transcription des gènes IE. Cette étape initiale est rendue possible par l'utilisation de l'acide ribonucléique (ARN) polymérase II cellulaire. Les protéines des gènes IE sont essentiellement des activateurs de transcription. Une fois produites, les protéines vont être importées dans le noyau pour contrôler la suite des événements de transcription, en éteignant la transcription des gènes  $\alpha$  et en activant l'expression des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ .

(2) La phase E ou  $\beta$ , qui correspond à la transcription des gènes dits « *early* » (E). L'ADN polymérase virale est exprimée durant cette phase. Les protéines codées par les gènes  $\beta$  atteignent le pic d'expression dans les 4 à 8 heures après l'infection. Elles sont impliquées dans le métabolisme nucléotidique et les événements nécessaires à la réplication de l'ADN viral.

(3) La phase « *late* » (L) ou  $\gamma$ , qui correspond à la synthèse des protéines de structure telles que les protéines de capsidite et les gp d'enveloppe. La réplication de l'ADN viral marque la séparation entre les phases E et L. L'expression des gènes L est maximale peu après le début de la réplication du génome viral (Gruffat, Marchione, & Manet, 2016). Les protéines de structure (capsidite, tégument, enveloppe) sont produites en grande quantité dans le cytoplasme alors que certaines d'entre elles migreront dans le

noyau pour s'assembler et former de nouvelles capsides (Henson, Perkins, Cothran, & Prashant, 2009; Perkins et al., 2008).

La réplication du génome des  $\gamma$ HVs se fait par l'action de l'ADN polymérase virale synthétisée *de novo* pendant la phase E. Elle se déroule selon le mode des « cercles roulants ». Cette réplication aboutit à la production de concatémères, des longs polymères d'acides nucléiques constitués de plusieurs monomères répétés qui correspondent aux copies génomiques virales séparées par des séquences cibles qui seront clivées par des enzymes spécifiques afin d'insérer une seule copie génomique à l'intérieur des nucléocapsides néoformées (McVoy, Nixon, Hur, & Adler, 2000). Alors que l'encapsidation du génome a lieu dans le noyau, la maturation finale comprenant la tégumentation et l'acquisition de l'enveloppe a lieu dans le cytoplasme. Une fois les nucléocapsides formées, le processus de morphogénèse virale comprend la sortie du noyau, l'acquisition des protéines du tégument, le passage dans le réseau *trans*-Golgi pour y subir le processus d'enveloppement et enfin la sortie des virions par exocytose. La sortie de la nucléocapside du noyau se fait par le modèle d'enveloppement, désenveloppement, réenveloppement (Mettenleiter, 2002). Le virion acquiert une première enveloppe par bourgeonnement au niveau de la membrane nucléaire interne et se retrouve dans l'espace périnucléaire. Cette première enveloppe fusionne ensuite avec la membrane nucléaire externe, libérant la nucléocapside nue dans le cytoplasme.

Une fois libérée dans le cytoplasme, la nucléocapside doit acquérir les protéines de tégument et son enveloppe secondaire finale. Un réseau d'interactions physiques entre des protéines de capsidite, les protéines de tégument et des gp contrôle la tégumentation des capsides (Mettenleiter et al., 2006). Les herpèsvirus acquièrent leur enveloppe virale secondaire par bourgeonnement dans des vésicules du réseau *trans*-Golgi. Dès lors, l'enveloppement final se réalise dans ce compartiment cellulaire. Les virions matures contenus dans les vésicules sont finalement transportés jusqu'à la surface cellulaire et libérés par exocytose (Bigalke & Heldwein, 2017; Mettenleiter, Klupp, & Granzow, 2009; Peng et al., 2010).

### 1.3.6. Infection latente

La latence, observée chez tous les herpèsvirus, se définit comme un état unique de transcription et de traduction virales où le cycle de réplication lytique et les antigènes associés sont absents (Virgin et al., 2009). A l'état latent, le génome persiste au sein du noyau sous forme circulaire appelée épisome. Excepté lors de l'infection par le HHV-6, l'ADN viral des herpèsvirus ne s'intègre pas au sein de l'ADN de l'hôte. La latence est le reflet d'une infection persistante mais réversible de par les phénomènes de réactivation (Speck & Ganem, 2010). Le programme d'expression des gènes viraux est limité aux ARNs non codants et à quelques protéines associées à la latence. Au vu de son lymphotropisme, le MuHV-4 s'établit le plus souvent au sein des sous-populations de lymphocytes B et dans certains lymphocytes T

(Speck & Ganem, 2010). Afin d'assurer la transmission du génome au sein des générations de cellules qui se divisent, l'épisome est répliqué en même temps que l'ADN génomique de la cellule. Un ORF code pour la protéine de maintenance du génome (*Genome maintenance protein-GMP*) qui maintient l'épisome viral et réprime l'expression des gènes lytiques. La GMP est la protéine majeure exprimée lors de la latence. Cette protéine correspond à la protéine **ORF73** pour le MuHV-4 (Fowler, Marques, Simas, & Efstathiou, 2003), **EBNA-1** (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1*) pour l'EBV (Leight & Sugden, 2000), **LANA** (*Latency-associated nuclear antigen*) pour le KSHV (Uppal, Banerjee, Sun, Verma, & Robertson, 2014).

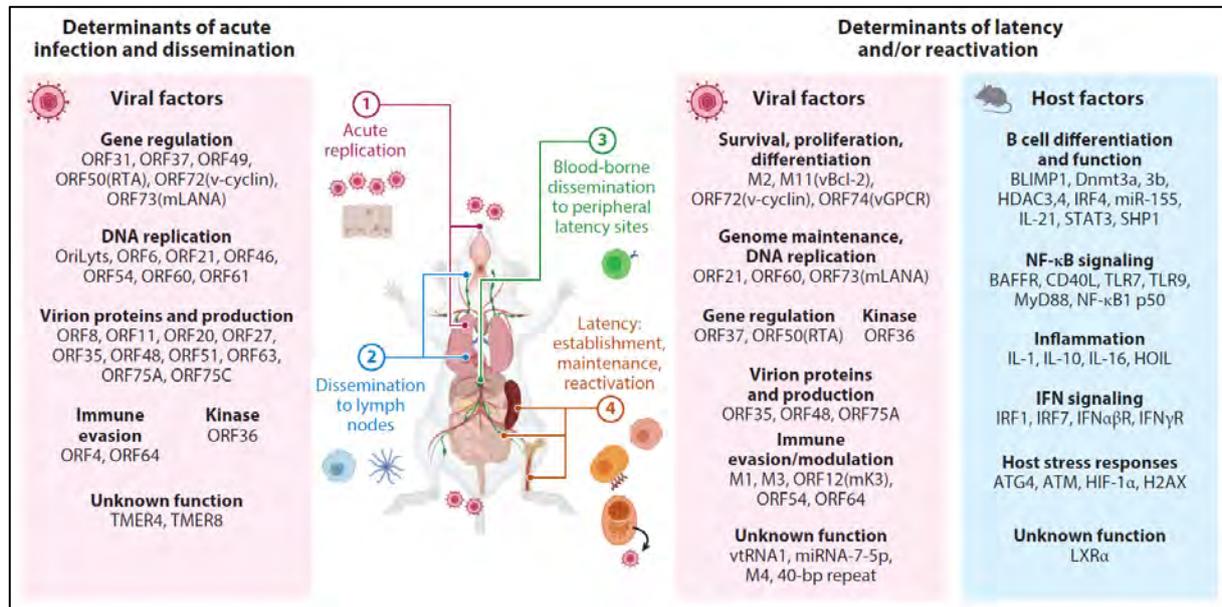
Le virus peut se réactiver sous l'effet de divers stimuli, interrompant ainsi l'état de latence. La réactivation correspond alors à une phase lytique de réplication et à la libération de nouvelles particules virales infectieuses. Des protéines spécifiques activatrices de la réplication et de la transcription, RTA, jouent un rôle central dans l'initiation de l'expression des gènes lytiques viraux et la réactivation lytique à partir de la latence. Elles sont le résultat de l'expression des gènes respectifs ORF50 pour le KSHV (Lukac et al., 1998) et le MuHV-4 (Ting-Ting, Usherwood, Stewart, Nash, & Ren, 2000) et BRLF1 pour l'EBV (Tobias, Lee, & George, 1998).

L'établissement et le maintien de l'infection latente mettent en lumière la capacité des herpèsvirus à moduler la réponse cellulaire de l'hôte. Des stratégies d'immunoévasion sont développées par le virus et ces mécanismes cruciaux nous amènent à disséquer de façon plus précise les principales stratégies d'immunoévasion développées par le MuHV-4 pour persister au sein de l'hôte.

#### 1.4. Stratégies virales d'immunoévasion

Les herpèsvirus ont coévolué avec leur hôte depuis plus de 100 millions d'années (McGeoch, Rixon, & Davison, 2006). Ces virus persistent au sein de l'hôte en contournant les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs de l'hôte. En effet, en conséquence de leur tropisme spécifique pour des cellules directement impliquées dans les réponses immunes, les  $\gamma$ HVs en particulier ont dû développer de nombreuses stratégies originales d'immunoévasion. Ces dernières reposent sur plusieurs voies principales impliquant soit l'immunité innée, soit l'immunité adaptative. Ces stratégies ont pour conséquence d'atteindre un état d'équilibre entre la prolifération cellulaire incontrôlée et virale observée chez l'hôte immunodéprimé et l'élimination complète des cellules infectées par les réponses immunitaires, permettant une infection asymptomatique et persistante. Pour les différentes étapes du cycle d'infection par le MuHV-4, différents produits de gènes agissent de concert pour modifier les processus biologiques de l'hôte et échapper à la réponse immune de l'hôte. A titre informatif, le **figure 8** provenant d'un article récent de revue (Wang, Tibbetts, & Krug, 2021) dresse un schéma global des déterminants-clés de l'infection aiguë et chronique par le MuHV-4 associés au cycle viral. Nous

discuterons de plusieurs protéines codées par le génome du MuHV-4 en particulier qui agissent spécifiquement à différents niveaux de la réponse immune pour la moduler.



**Figure 8 : Déterminants génomiques viraux du cycle viral du MuHV-4.** Les facteurs viraux principaux responsables de l'infection aiguë et la dissémination sont présentés dans la colonne gauche. Le cycle viral ainsi que les déterminants principaux à l'origine de la latence et la réactivation sont présentés dans la partie droite du schéma (Wang et al., 2021).

#### 1.4.1. Immunité innée

Les herpesvirus codent pour des protéines virales homologues aux protéines cellulaires dans le but de les manipuler et d'échapper aux mécanismes de défense antivirale. L'immunité innée fournit de nombreux médiateurs servant de cibles manipulables par le virus : les IFNs, la reconnaissance des *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) par les *Toll-Like-Receptors* (TLRs), la cascade du complément, la modulation directe des cellules immunes innées, la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la modulation du cycle cellulaire et les processus de mort cellulaire associés, comme l'autophagie et l'apoptose.

#### -Réponse interféron

On décrit actuellement trois classes distinctes d'IFNs: type I (IFN- $\alpha/\beta$ ); type II (IFN $\gamma$ ); type III (IFN- $\lambda 1/\lambda 2/\lambda 3$ ) (Sadler & Williams, 2008). Ils possèdent de nombreuses fonctions parmi lesquelles l'inhibition de la réplication virale, la suppression de la croissance cellulaire ou encore la stimulation de la présentation antigénique. Les  $\gamma$ HVs interagissent avec l'activité des IFNs en codant principalement pour des protéines virales (*viral IFN Regulatory Factors*; vIRFs) homologues des facteurs de transcription cellulaires de la famille des facteurs de régulation de l'IFN (*Interferon Regulatory Factors*,

IRFs) (Zimring, Goodbourn, & Offermann, 1998). Ces IRFs régulent la traduction protéique des IFNs. Les vIRFs inhibent, par divers mécanismes, l'activité des IRFs cellulaires et sont *de facto* des répresseurs indirects de la synthèse des IFNs. Le MuHV-4 bloque la transduction du signal de l'IFN en ciblant le récepteur de l'IFN de type I, probablement par l'intermédiaire de l'ORF54 (Lopušná et al., 2016). Il bloque également la production d'IFN- $\beta$  par l'intermédiaire de l'ORF11 (Kang et al., 2014) qui bloque également la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription IRF3 (Stempel, Chan, & Brinkmann, 2019). Enfin, il peut induire l'expression de SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling protein 1*) qui contrecarre l'effet antiviral de l'IFN $\gamma$  pendant l'infection (Y. Shen et al., 2018). Les  $\gamma$ HVs peuvent également moduler la voie *cyclic GMP-AMP synthase/ Stimulator of interferon genes* (cGAS-STING), voie principale de la production des IFN de type I, en inhibant la phosphorylation de STING et son activation concomitante (Z. Ma et al., 2015). L'ORF64 du MuHV-4, qui code pour une protéine du tégument stabilise les capsides et bloque la voie cGAS-STING (C. Sun et al., 2015)

De la même façon, durant l'infection lytique, l'EBV code pour diverses protéines (BZLF-1, BRLF-1) qui interfèrent avec les IRFs cellulaires afin d'inhiber leurs activités de transcription des IFNs de type I, bloquant dès lors la réponse antivirale (Bentz, Liu, Hahn, Shackelford, & Pagano, 2010; Hahn, Huye, Ning, Webster-Cyriaque, & Pagano, 2005). Chez le KSHV, les protéines vIRF-1,-2,-3 et -4 contrôlent la production d'IFNs en interagissant avec la voie des IRFs pendant les infections lytiques et latentes (H. Lee, Kim, Lee, Liang, & Jung, 2009; Offermann, 2007).

### **-Modulation des TLRs**

Les TLR-2,-3,-4,-7,-8 et -9 sont impliqués dans la détection des virus, par la reconnaissance de PAMPs (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006) spécifiques comme les motifs d'ARN, d'ADN ou de gp virales. La protéine BGLF-5 de l'EBV agit par un processus global de dégradation d'ARNm (protéine à activité *shutoff*) (Rowe et al., 2007) qui affecte notamment la production des TLR2 et TLR9 (van Gent et al., 2014). L'exonucléase ORF37 du MuHV-4 possède également une activité *shutoff* (Sheridan, Polychronopoulos, Dutia, & Ebrahimi, 2014). Enfin, de nombreuses études s'intéressent aux interactions entre les TLRs et le KSHV. A titre d'exemple, l'infection de cellules endothéliales par le KSHV inhibe l'expression du TLR4 par des mécanismes cellulaires indépendants et/ou dépendants de l'expression de gènes viraux, par le biais de vIRF-1 et vGPCR (Lagos et al., 2008).

### **-Modulation du système du complément**

La réponse du complément est le résultat d'une action coordonnée de protéines plasmatiques où le clivage d'une forme circulante inactive (zymogène) en forme active se fait sous l'action de protéines régulatrices de l'hôte. Ces activations sont le résultat d'activation de trois voies : la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines. La régulation de la cascade du complément est complexe, impliquant un grand nombre de protéines qui sont responsables de la dégradation de composants du complément en fragments inactifs ou des protéines inhibitrices capables de lier de façon irréversible les

protéines du complément afin de les inhiber. Les  $\gamma$ HVs codent pour des gènes viraux qui interfèrent avec cette régulation. Le MuHV-4 code pour une protéine ORF4 (Kapadia, Levine, Speck, & Virgin IV, 2002), homologue des régulateurs de l'activation du complément. Celle-ci est un homologue des régulateurs endogènes du complément et fonctionne en empêchant le dépôt des molécules C3 sur la surface cellulaire (Spiller et al., 2003). Elle régule par ce biais deux voies de régulation du complément en régulant la fonction des enzymes convertase C3 de la voie classique et de la voie alternative. Le KSHV code également pour une protéine ORF4 (ou KCP: *KSHV complement control protein*) (Spiller et al., 2003).

### **-Modulation des voies de communication dépendant des cytokines**

Les  $\gamma$ HVs, codent pour des homologues viraux de cytokines cellulaires et/ou de leurs récepteurs ou sécrètent des protéines se liant à des chimiokines cellulaires (Heidarieh, Hernáez, & Alcamí, 2015). La protéine M2 du MuHV-4 facilite la latence et la différenciation des cellules B. Elle stimule également la production d'interleukine-10 (IL-10) par les lymphocytes B (Liang et al., 2009; Rangaswamy & Speck, 2014; Terrell & Speck, 2017). Le MuHV-4 code également pour M3, une protéine liant les chimiokines. Elle agit sur diverses chimiokines spécifiques en inhibant la liaison sur leurs récepteurs et leurs cascades d'activation, ce qui altère les gradients de chimiokines notamment responsables de l'attraction des lymphocytes T cytotoxiques (Hughes et al., 2011; Šebová et al., 2019; P. G. Stevenson, 2004). Chez l'EBV, on retrouve un homologue viral de l'IL-10 (vIL-10) qui permet de réduire l'expression de l'IL-12 cellulaire (Kanegane, Wakiguchi, Kanegane, Kurashige, & Tosato, 1997). L'EBV code également pour une forme soluble du récepteur cellulaire de CSF1 (*colony-stimulating factor 1*), BARF-1, qui neutralise *in vitro* les activités de CSF1. Chez le KSHV, il existe un homologue viral de l'IL-6 (Molden, Chang, You, Moore, & Goldsmith, 1997). Ce virus sécrète également trois chimiokines virales (vCCL-1, -2 et-3) qui agissent comme des agonistes de récepteurs de chimiokines présents essentiellement sur les lymphocytes Th2 (H.-R. Lee, Brulois, Wong, & Jung, 2012).

### **-Cycle cellulaire**

Le blocage des inhibiteurs du cycle cellulaire est une stratégie communément partagée par les  $\gamma$ HVs. Le MuHV-4 contient l'ORF72, qui code pour une homologue de la cycline cellulaire de type D (v-cyclin), interagissant avec les *Cyclin-dependent kinases* (CDKs) de l'hôte pour permettre la progression du cycle cellulaire. Le KSHV code également pour la même v-cycline, aux propriétés fonctionnelles identiques (K. Lee et al., 2012; van Dyk, Virgin, & Speck, 2000).

### **-Apoptose**

Les  $\gamma$ HVs ont la capacité de favoriser la prolifération et la survie des lymphocytes B, principales cellules infectées latentes. Comme dit précédemment la protéine M2 du MuHV-4 modifie les voies cellulaires des lymphocytes B pour promouvoir leur prolifération et inhiber leur apoptose. Le MuHV-4

(*M11*) et le KSHV (*ORF16*) codent tous deux pour un homologue viral de Bcl-2 (vBcl-2) qui inhibe les voies d'apoptose et d'autophagie cellulaire (Gangappa, van Dyk, Jewett, Speck, & Virgin 4th, 2002; Qiulong, Petros, Virgin, Fesik, & Olejniczak, 2002). La protéine LMP-1 de l'EBV protège notamment les lymphocytes B de l'apoptose via l'inhibition de la protéine cellulaire pro-apoptotique BAX (*bcl2-associated protein X*) (Grimm et al., 2005). Les protéines de la famille Bcl-2 régulent la perméabilité mitochondriale et l'apoptose cellulaire en intégrant différents signaux de survie et de mort cellulaire. La protéine cellulaire p53, aux propriétés anti-tumorales, est également un facteur clé modulé par les  $\gamma$ HVs. Les  $\gamma$ HVs utilisent diverses protéines pour contourner ou inhiber les fonctions de suppression de croissance et/ou d'induction d'apoptose de p53. Les vIRFs du KSHV et la protéine LANA interfèrent avec p53 (W. Chen, Hilton, Staudt, Burd, & Dittmer, 2010; Si & Robertson, 2006). LMP-2a, encodé par l'EBV durant les programmes de latence, stimule la voie NF- $\kappa$ B de telle sorte que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 cellulaire est activée (Swanson-Mungerson, Bultema, & Longnecker, 2010). La protéine vFLIP, produit du gène K13 du KSHV, inhibe la voie extrinsèque d'apoptose (Djerbi et al., 1999) et stimule l'expression de protéines anti-apoptotiques via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (L. Liu et al., 2002).

#### 1.4.2. Immunité adaptative

Les mécanismes de réponse adaptative comprennent la réponse immune humorale dirigée par les lymphocytes B, la réponse immune cellulaire permettant l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T CD8 et la polarisation des réponses antivirales par les lymphocytes T CD4 *Helper*.

#### - Evasion de la réponse immune humorale

Les stratégies mises en place par le virus consistent à échapper à la reconnaissance par les anticorps neutralisants produits par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Le MuHV-4 a permis d'investiguer ces stratégies d'immunoévasion mises en place par le virus.

L'un de ces mécanismes repose sur la modification de conformation antigénique des gp d'enveloppe au cours du processus d'entrée du virion. La forme active de la gp n'est pas reconnue empêchant la neutralisation par les anticorps et le blocage subséquent de sa fusion (Gillet, Gill, Colaco, Smith, & Stevenson, 2006; Gillet & Stevenson, 2007).

La gp150 du MuHV-4, fortement immunogénique, est une gp non-essentielle à l'entrée du virus. Sa forte immunogénicité induit la production d'anticorps anti-gp150 en grande quantité. Il a été démontré que cette gp agit en fait comme un leurre, en biaisant la réponse immune humorale vers une production d'anticorps, incapables de neutraliser les particules virales et en favorisant de surcroît l'infection des cellules exprimant les récepteurs Fc (Gillet, May, Colaco, & Stevenson, 2007).

Enfin, la glycosylation spécifique de gp est également un mécanisme de protection contre la production d'anticorps neutralisants. En particulier, la gp180 du BoHV-4, homologue de gp350, gp

majeure de l'enveloppe de l'EBV, joue elle-même un rôle de bouclier en protégeant les épitopes neutralisants des gp gB, gH et gL qui sont toutes trois essentielles à l'entrée virale. La protection spatiale conférée par gp180 provient de ses nombreuses O-glycosylations (Machiels et al., 2011). La conservation des sites d'O-glycosylation chez tous les homologues de gp350 suggère qu'il s'agit d'une stratégie d'immunoévasion probablement conservée chez les  $\gamma$ HVs.

### **-Evasion des réponses immunes cellulaires: inhibition de la présentation antigénique**

Les  $\gamma$ HVs ont également la capacité d'affecter la présentation antigénique. Les GMPs des  $\gamma$ HVs ont développé des stratégies d'immunoévasion intrinsèques afin de réguler elles-mêmes leur propre présentation dans le contexte de présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (*Major histocompatibility complex type I-MHCI*) lors de la latence permettant de rester de façon persistante au sein des cellules infectées (Bennett, May, & Stevenson, 2005; Blake, 2010). Lors de l'infection lytique, des protéines immunomodulatrices sont également exprimées par les  $\gamma$ HVs.

La protéine K3 du MuHV-4 (P. G. Stevenson et al., 2002), les protéines K3 et K5 du KSHV (P. G. Stevenson, Efstathiou, Doherty, & Lehner, 2000) ainsi que les protéines BGLF-5, BNLF-2 et BILF-1 de l'EBV (Ressing et al., 2008) se lient aux molécules du MHC I et causent leur dégradation par la voie des lysosomes. Le virus induit également une résistance à l'overexpression des molécules MHC I induites par l'IFN $\gamma$  en augmentant la dégradation des protéines TAP (*Transporter associated with antigen processing*) (P. G. Stevenson, 2004; P. G. Stevenson et al., 2000).

La présentation d'antigènes par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (*Major histocompatibility complex type II-MHCII*) est également contrôlée par les  $\gamma$ HVs. Chez l'EBV, la protéine BGLF-5 réduirait l'expression des protéines MHCII via la dégradation des ARN messagers d'HLA-DR (Rowe et al., 2007). Chez le KSHV, vIRF-3 affecte l'expression des molécules du MHCII en inhibant l'expression d'IFN $\gamma$  et des protéines *CIITA* (*Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator*) (Schmidt, Wies, & Neipel, 2011). La protéine LANA inhiberait également la présentation en MHCII en bloquant la transcription des protéines *CIITA* (Cai et al., 2013).

## **1.5. Réponse immunitaire**

Comme dit précédemment, la réplication virale dans les poumons induit une pneumonie interstitielle avec une infiltration leucocytaire périvasculaire et péribronchiolaire (Sunil-Chandra et al., 1992). Dans ce paragraphe, nous aborderons les principaux acteurs connus à ce jour, impliqués dans le contrôle à court et long terme de l'infection par MuHV-4.

Le rôle de la réponse immune adaptative a été principalement investigué dans le contrôle de l'infection à long terme par le MuHV-4 (P. G. Stevenson, 2020; P. G. Stevenson, Simas, & Efstathiou, 2009). Nous décrirons brièvement les principaux acteurs effecteurs, responsables du contrôle de

l'infection, principalement à long terme. Le contrôle immunitaire à long terme, empêchant les cycles de réactivation, est principalement important pour la survie de l'hôte et le maintien de la fonctionnalité des organes. Les organes, touchés par les cycles de réactivation et de réplication virale successifs présentent des dommages tissulaires et des altérations de leur fonction. Ce contrôle doit se faire avec la collaboration des fonctions effectrices des cellules B, des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes T CD8 ainsi que la production continue d'IFN $\gamma$ . L'absence de l'un ou l'autre de ces effecteurs entraîne une infection chronique non régulée ayant des effets délétères sur l'hôte. Cela souligne l'importance du concept selon lequel l'infection aiguë et l'infection latente doivent être considérées comme des entités immunologiques distinctes. Nous aborderons ensuite les acteurs connus à ce jour permettant le contrôle de l'infection primaire, aiguë.

### *1.5.1. Réponse immune adaptative*

#### **Lymphocytes T CD8 conventionnels**

Les lymphocytes T CD8 apparaissent dans le poumon dans les 6 jours après l'infection. Ils sont abondants dans le poumon et les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes T CD8 jouent des rôles cruciaux dans de multiples phases de l'infection et leurs mécanismes effecteurs de cytotoxicité (Perforine-1 (Prf-1), Granzyme (Grz), Fas) permettent de contrôler l'infection, de façon indépendante des lymphocytes T CD4 (Lawler & Stevenson, 2020; Loh, Thomas, Revell, Ley, & Virgin, 2004; Tibbetts, van Dyk, Speck, & Virgin, 2002; Topham et al., 2001). Spécifiques de protéines virales exprimées durant le cycle lytique, ces cellules T CD8 spécifiques subissent rapidement la phase de contraction (Gredmark-Russ, Cheung, Isaacson, Ploegh, & Grotenbreg, 2008). Durant l'infection primaire, les lymphocytes T CD8 diminuent la réplication virale. Des lymphocytes T CD8 persistent tout au long de l'infection par le MuHV-4 et ces cellules mémoires spécifiques ne requièrent pas de présentation antigénique pour leur survie et démontrent des capacités effectrices de production d'IFN $\gamma$ , TNF (*Tumor necrosis factor*)  $\alpha$  et une capacité cytotoxique lors de réexposition à l'antigène (Barton et al., 2011).

#### **Lymphocytes T CD8 non-conventionnels V $\beta$ 4+**

D'autres lymphocytes T CD8 sont également connus dans le cadre de l'infection par le MuHV-4. Une large population de lymphocytes T CD8 non-conventionnels ne dépendent pas d'une présentation antigénique via le MHC I de classe Ia. Ces cellules utilisent un TCR V $\beta$ 4+, suggérant que ces cellules peuvent se développer suite à l'exposition à une molécule M1 faisant office de superantigène (Evans et al., 2008). Ces lymphocytes T CD8 non-conventionnels sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ . Bien qu'ils jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'infection, leur capacité cytotoxique n'est pas

démontrée et les mécanismes permettant le contrôle effectif du virus ne sont pas déterminés (Braaten et al., 2006).

### **Lymphocytes T CD4**

Les lymphocytes T CD4 jouent également un rôle majeur dans le contrôle de l'infection. Les souris déficientes pour le MHCII ne sont pas capables de contrôler le virus à long terme (Ehtisham, Sunil-Chandra, Nash, & Stewart, 1993). Un médiateur clé est notamment l'IFN $\gamma$ , dont la production est partagée par les lymphocytes T CD8 mais également par les lymphocytes T CD4 (Sparks-Thissen et al., 2005). De ce fait, l'IFN $\gamma$ , au moins partiellement dérivé des cellules T CD4, est essentiel à l'arrêt de la réplication lytique persistante et au contrôle adéquat de la réactivation. Les lymphocytes T CD4 régulent l'infection MuHV-4 par la production d'IFN $\gamma$ , par des fonctions cytotoxiques directes (Freeman et al., 2014) et la suppression d'infection des cellules myéloïdes (Tan, Lawler, & Stevenson, 2017). Durant l'infection aiguë, les lymphocytes T CD4 sont également des sources majeures d'IL-10, immunosuppressive (Kimball, Oko, Kaspar, van Dyk, & Clambey, 2019). Les lymphocytes T CD4 participent au contrôle à long terme de l'infection en augmentant la réponse des lymphocytes T CD8, suggérant un rôle des lymphocytes T CD4 pour primer les DCs par un mécanisme dépendant de CD40-CD40L et permettant l'activation à long terme des lymphocytes T CD8 (Giannoni, Shea, Inglis, Lee, & Sarawar, 2008). De plus, les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent contrôler la réplication du MuHV-4 indépendamment des cellules T CD8 ou des cellules B, suggérant des rôles supplémentaires aux fonctions CD4 *Helper* classiques (Sparks-Thissen, Braaten, Kreher, Speck, & Virgin, 2004). Une autre population (CD107<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), distincte de celle productrice d'IFN $\gamma$  est décrite durant l'infection latente, exhibe des propriétés cytotoxiques et sont capables de tuer des cibles présentant des antigènes viraux (Stuller, Cush, & Flaño, 2010; Stuller & Flaño, 2009). La contribution relative de chaque sous-population et de chaque mécanisme effecteur, par la production d'IFN $\gamma$  (vraisemblablement non cytotoxique) ou via les fonctions cytotoxiques des cellules T CD4 lors de l'infection n'est pas définie clairement lors de l'infection.

Les souris déficientes en lymphocytes T CD4 ne sont pas capables à long terme de contrôler l'infection persistante (Cardin, Brooks, Sarawar, & Doherty, 1996; Christensen, Cardin, Branum, & Doherty, 1999). Le MuHV-4 se réactive fortement, résultant en une réplication lytique persistante, induisant des dommages tissulaires progressifs, aboutissant à la mort de l'animal dans les 3 mois après l'infection. Le tableau clinique est similaire chez des souris déficientes en lymphocytes T CD8. De la même façon, les souris déficientes pour le signal IFN $\gamma$  développent au fil de l'infection persistante des pneumonies létales (K. S. Lee, Cool, & van Dyk, 2009), de la fibrose au niveau de différents organes (Mora et al., 2007), des maladies lymphoprolifératives (K. S. Lee, Groshong, Cool, Kleinschmidt-DeMasters, & van Dyk, 2009) ainsi que des dilatations gastro-intestinales (H. Chen et al., 2018). La déficience en récepteur de l'IFN $\gamma$  induit des vasculites sévères (Weck et al., 1997).

## Lymphocytes B

Les cellules B et les anticorps contribuent au contrôle de l'infection. La réponse en anticorps spécifiques se développe lentement suite à l'infection, les hauts taux d'anticorps n'apparaissant qu'après que l'infection aiguë soit résolue (Sangster et al., 2000; P. G. Stevenson & Doherty, 1998). La réponse anticorps présente une capacité de neutralisation faible (Rosa, Gillet, Smith, de Lima, & Stevenson, 2007). Les anticorps spécifiques du virus bloquent l'infection secondaire du virus au niveau de l'épithélium olfactif, site d'infection primaire. Par contre, les anticorps neutralisants ne sont pas suffisants pour bloquer la réactivation du virus et l'excrétion au niveau de la muqueuse vaginale (Glauser, Milho, Lawler, & Stevenson, 2019). L'infection par le MuHV-4 entraîne également une activation et une expansion polyclonale de cellules B au sein de la rate (Sakakibara et al., 2020) avec une production d'anticorps autoréactifs. La diminution de réplication *in vivo* du MuHV-4 par les anticorps dépend d'un mécanisme impliquant les récepteurs à la portion Fc des IgG. Le mécanisme le plus probable impliqué semble être la cytotoxicité dépendante des anticorps (*Antibody-dependent cellular cytotoxicity-ADCC*) via les macrophages (Wright, Colaco, Colaco, & Stevenson, 2009).

Les souris déficientes en lymphocytes B présentent une réactivation accrue à partir de réservoirs de latence indépendants des cellules B ainsi qu'une réplication persistante du virus au niveau des poumons (Weck, Kim, Virgin, & Speck, 1999). Les cellules B ont également une fonction cruciale, indépendamment de la production d'anticorps. Celles-ci jouent un rôle auxiliaire pour notamment l'activation des lymphocytes T de par la capacité de présenter les antigènes et permettant un contrôle effectif de l'infection chronique en augmentant les niveaux de lymphocytes V $\beta$ 4<sup>+</sup> et l'expression de l'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD4 et CD8 (McClellan, Gangappa, Speck, & Virgin IV, 2006).

### 1.5.2. Réponse immune innée

L'étude de la réponse immune innée a principalement investigué l'interaction avec les senseurs innés présents constitutivement au sein des cellules de l'hôte plutôt que la fonction des cellules de l'immunité innée recrutées spécifiquement suite à l'infection.

La réponse innée a donc été principalement étudiée au niveau de la réponse immunitaire intrinsèque cellulaire. Dans les mécanismes de défense, la voie des IFNs, l'activation de NF- $\kappa$ B, l'activation de TLRs spécifiques, l'action des ADN méthyltransférases sont les principaux mécanismes de défense innée. Les facteurs antiviraux, IFNs de type I et II sont produits massivement lors de l'infection aiguë. Des souris déficientes pour le récepteur aux IFNs de type I (IFN  $\alpha\beta$ / Ifnar1<sup>-/-</sup>) ou pour le facteur de transcription STAT 1, un facteur de transcription de la voie cellulaire IFN de type I, ne survivent pas à l'infection, montrant l'importance capitale de cette voie (Barton, Lutzke, Rochford, & Virgin, 2005). D'autres facteurs qui permettent de monter une réponse IFN comme l'activation des voies

cGAS/STING, TLR7, TLR9, IRF1, IRF3 et IRF7 limitent la réplication virale *in vitro* et *in vivo* (Stempel et al., 2019). Les ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b sont cruciales également pour le contrôle de la réplication aiguë, leur absence corrélant avec une hypométhylation du promoteur du gène RTA (ORF50) et un défaut de contrôle de la réplication virale (Gray, Forrest, & Speck, 2010). La voie NF- $\kappa$ B regroupant une famille de facteurs de transcription sont également des régulateurs clés de l'immunité innée. L'activation de cette voie est cruciale pour le contrôle de la réplication primaire et l'établissement de la latence. Le membre de la famille NF- $\kappa$ B p50 a un rôle antiviral essentiel contre le MuHV-4 (Krug, Collins, Gargano, & Speck, 2009). En l'absence de p50, les souris présentent une réplication persistante dans les poumons suite à une infection i.n ainsi qu'une charge virale latente au sein de la rate plus élevée.

Outre le rôle des activateurs innés des voies intrinsèques de défense antivirale, le rôle des cellules immunitaires innées et leur communication avec les cellules de l'immunité adaptative n'ont pas encore été caractérisés en détails aux temps précoces de l'infection pulmonaire. Dans le cadre de cette étude, nous reviendrons plus en détails sur la cinétique immune de cette infection aiguë. Cette thèse ayant pour but d'étudier les mécanismes régulateurs clés et les acteurs immuns responsables d'une immunomodulation dans la sphère pulmonaire lors de l'infection primaire, nous nous intéresserons donc aux différents acteurs immuns recrutés dans le poumon suite à cette infection.

### **NK cells**

Les cellules NK acquièrent leurs propriétés effectrices suite à une cascade d'activation de cellules présentatrices d'antigènes et de recrutement de lymphocytes T CD4 au niveau du poumon. Par la production de Prf-1 et d'IFN $\gamma$ , elles sont capables de lyser les cellules infectées et de contrôler la réplication virale dans les poumons (Lawler & Stevenson, 2020). Les cellules présentatrices d'antigènes locales, activées par les lymphocytes T CD4 recrutent et activent les cellules NK notamment via la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18.

### **Macrophages alvéolaires**

Les AMs apparaissent plus comme des facilitateurs de la propagation de l'infection comme vu précédemment dans la description du cycle pulmonaire du MuHV-4. De par leurs propriétés de phagocytose, ils internalisent les particules virales pour permettre des cycles de réplication et un transfert vers les AECs de type I. Les AMs semblent donc être surtout une voie d'entrée pour le virus plutôt qu'un moyen de défense de l'hôte, la déplétion des macrophages par utilisation de souris CD169 DTR induisant <10% de cellules infectées par rapport aux souris WT (Lawler et al., 2015). La liaison à l'héparan sulfate en surface des cellules épithéliales permet aux virions d'être endocytés par les macrophages et l'interaction avec les macrophages permet l'infection des cellules épithéliales à leur tour (Lawler et al., 2015).

## **Monocytes**

De façon intéressante, le laboratoire hôte a montré que l'infection par le MuHV-4 induisait un recrutement pulmonaire massif de monocytes depuis la moelle osseuse, associé à des modifications phénotypiques sur les monocytes avant l'infiltration dans la niche alvéolaire du poumon infecté. Ces monocytes aux propriétés régulatrices se différencient en AMs dérivés des monocytes après l'infection et permettent une protection hétérologue contre le développement de l'asthme allergique (Machiels et al., 2017). Alors que ces cellules myéloïdes montrent une modification et un rôle dans la protection dans le cadre de réponses hétérologues, leur rôle dans l'infection aiguë primaire n'a pas encore été investigué. Le virus ayant co-évolué avec l'hôte dans une relation symbiotique, le recrutement de monocytes sur le site d'infection pourrait conférer un avantage pour le virus lui-même mais également pour l'hôte. C'est ce rôle potentiellement régulateur dans l'inflammation aiguë qui sera investigué au long de cette étude. Nous voulons notamment investiguer leur potentiel pouvoir d'instruction et de dialogue avec notamment les lymphocytes T, les monocytes apparaissant comme des intermédiaires clés dans le développement et l'amplification des réponses immunes innées et adaptatives (Lauvau, Chorro, Spaulding, & Soudja, 2015; Soudja, Ruiz, Marie, & Lauvau, 2012).

## 2. Les monocytes

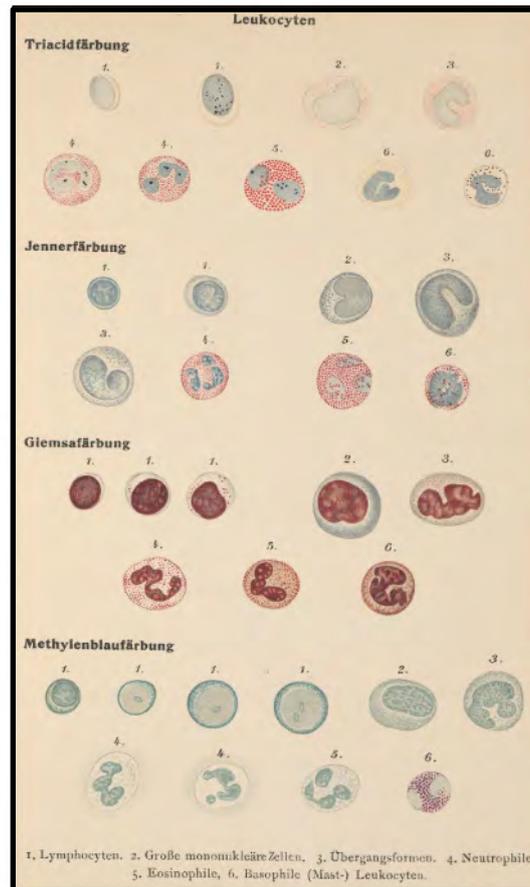
Nous présenterons dans le chapitre suivant les caractéristiques générales des monocytes : leur développement, les différentes populations, les mécanismes de recrutement et leurs différentes fonctions, distinctes en condition homéostatiques ou inflammatoires. Nous investiguerons ensuite leurs implications spécifiques dans les infections par les  $\gamma$ HVs.

### 2.1. Introduction

Les monocytes font partie du système phagocytaire mononucléé (*Mononuclear phagocyte system*-MPS) comprenant également les macrophages et les cellules dendritiques conventionnelles (*Conventional dendritic cells*-cDCs) (Guilliams et al., 2014). Ils sont définis comme des cellules circulantes sanguines, constituant ~10% des leucocytes périphériques chez l'humain et ~4% chez l'espèce murine. Historiquement, il est établi que les monocytes sanguins proviennent de la différenciation dans la moelle osseuse de monocytes matures à partir d'un progéniteur myéloïde commun (*Common myeloid progenitors*-CMP) aux érythrocytes, plaquettes, cDCs et aux granulocytes. Nous reviendrons plus tard sur l'ontogénie et la différenciation des monocytes à partir de différents précurseurs de la moelle osseuse qui apparaît aujourd'hui plus complexe. Jusqu'à récemment, les monocytes ont été considérés comme un stade intermédiaire cellulaire entre les précurseurs de la moelle osseuse et les macrophages et cDCs différenciés dans le tissu (Jakubzick, Randolph, & Henson, 2017). Cependant, de récentes études challengent ce paradigme en établissant que les cDCs et la plupart des macrophages tissulaires ont une origine embryonnaire et se maintiennent indépendamment de l'afflux de monocytes circulants en conditions homéostatiques (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013). En conséquence, les monocytes se sont récemment dissociés de leur fonction de stade intermédiaire, immature donnant lieu systématiquement aux macrophages et au cDCs. En effet, les monocytes recrutés en conditions inflammatoires donnent naissance de façon plus large à une population de cellules appelées « cellules-dérivées des monocytes » fonctionnellement distinctes des macrophages résidents et des cDCs présentes en conditions d'homéostasie (Guilliams, Mildner, & Yona, 2018). Ces monocytes circulants, présentent déjà à la sortie de la moelle, des fonctions et des propriétés fonctionnelles spécifiques et distinctes en fonction des conditions inflammatoires et du pathogène rencontré. Cette plasticité de fonction est un point crucial dans cette thèse de doctorat et sera investiguée dans le contexte des infections par les  $\gamma$ HVs. Ces monocytes sont notamment recrutés massivement depuis la moelle osseuse vers le poumon suite à l'infection respiratoire par le MuHV-4. Cette capacité à être mobilisé en grand nombre vers différents sites enflammés de l'organisme, constitue l'une des principales caractéristiques de cette catégorie de cellules immunes. Ces particularités, dont la plasticité de fonction, font des monocytes un type cellulaire particulièrement intéressant à investiguer.

## 2.2. Classification

Historiquement, les monocytes ont été définis par Paul Erlich en 1880 comme les cellules transitionnelles d'Erlich (*Übergangsformen*) au noyau en forme d'haricot (Ehrlich, 1880). Cette classification avait été réalisée grâce au développement des techniques de microscopie et de colorations cytologiques permettant de distinguer les cellules maintenant connues sous le nom de monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles.



**Figure 9 : Identification historique des leucocytes.** En 1908, les leucocytes sanguins sont classifiés sur base de leur morphologie et leurs propriétés de coloration. Différentes techniques de coloration sont réalisées ici. 1. *Lymphocyten*: lymphocyte, 2. *Grosse mononukleäre Zellen*: Great mononuclear cell, 3. *Übergangsformen*: Ehrlich's transitional cell (monocyte), 4. *Neutrophile*: neutrophil, 5. *Eosinophile*: eosinophile, 6. *Basophile (Mast) Leukocyten*: basophil or mast cell. (Naegeli, 1908).

L'apparition de la cytométrie en flux et l'évolution des techniques d'identification des cellules immunitaires a permis de caractériser avec plus de précision les caractéristiques phénotypiques des monocytes permettant de mettre en lumière l'hétérogénéité des monocytes dans différentes espèces, notamment chez l'humain (Passlick, Flieger, & Ziegler-Heitbrock, 1989) et chez la souris (Geissmann, Jung, & Littman, 2003). Le terme monocyte regroupe une population hétérogène de cellules aux

fonctions distinctes composées de différentes sous-populations définies sur base de leur expression de différents marqueurs myéloïdes. Chez l'humain et chez la souris, au moins 2 sous-populations de monocytes sont décrites : les monocytes classiques (Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> pour la souris correspondant aux monocytes CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> chez l'humain), également appelés monocytes « inflammatoires » et les monocytes non classiques (Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup> correspondant aux monocytes CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> chez l'humain) aussi appelés monocytes *patrolling* (Cros et al., 2010; Geissmann et al., 2003; Ginhoux & Jung, 2014; Passlick et al., 1989). De plus, une troisième population de monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) décrite chez l'humain est également caractérisée. Les fonctions de cette population sont moins bien définies à l'heure actuelle, représentant plutôt un stade transitionnel. Chez l'humain, les monocytes classiques représentent 80 à 90% de la population monocyttaire, les populations de monocytes *patrolling* et intermédiaires représentant 10 à 20% de la population restante de monocytes (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Chez la souris, les différentes sous-populations sont présentes de façon équivalente à ce qui est observé chez l'homme (Guilliams et al., 2018). Les comparaisons transcriptomiques ont permis de corréler les deux sous-populations de monocytes murins et humains avec les monocytes murins Ly6C<sup>hi</sup> associés aux monocytes humains CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> dits « classiques » et les monocytes murins Ly6C<sup>low</sup> corrélés aux monocytes humains CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> « non classiques ». Certaines expressions géniques diffèrent, notamment au niveau de l'expression de HLA-DR chez les monocytes humains, qui n'est pas identifiable en conditions d'homéostasie chez les souris. Comme autre différence, les monocytes murins expriment le récepteur  $\gamma$  activé par les proliférateurs de peroxyosomes (*Peroxisome proliferator-activated receptor-PPAR $\gamma$* ) (Cros et al., 2010; Ingersoll et al., 2010).

**Table 2 : Comparaison des sous-unités de monocytes chez la souris et l'homme**

Sous-population	Marqueurs	Récepteurs chimiokines	Fonctions
<b>Souris</b>			
Ly6C <sup>hi</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> Ly6C <sup>hi</sup>	CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low</sup> CCR2 <sup>+</sup>	Rôles pro-inflammatoires (Geissmann et al., 2003) et anti-microbiens (N. V. Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008)
Ly6C <sup>low</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> Ly6C <sup>low</sup>	CX <sub>3</sub> CR1 <sup>hi</sup> CCR2 <sup>-</sup>	Surveillance intégrité vasculaire (Auffray et al., 2007), réparation tissulaire (Aldridge et al., 2009)
<b>Humain</b>			
Classique	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	CCR2 <sup>+</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>low</sup>	Similaires au Ly6C <sup>hi</sup> murins (Geissmann et al., 2003)

<b>Intermédiaire</b>	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	CX <sub>3</sub> CR1 <sup>hi</sup> CCR2 <sup>-</sup>	Rôles pro-inflammatoires (Ziegler-Heitbrock, 2007)
<b>Non-classique</b>	CD14 <sup>int</sup> CD16 <sup>+</sup>	CX <sub>3</sub> CR1 <sup>hi</sup> CCR2 <sup>-</sup>	Surveillance, rôles antiviraux (Cros et al., 2010)

Adapté de (Shi & Pamer, 2011).

La construction de souris rapportrices pour l'expression du gène CX3CR1 a permis de compléter la caractérisation phénotypique des 2 sous-populations de monocytes (S. Jung et al., 2000; Yona et al., 2013). Dans le modèle murin, les monocytes classiques sont caractérisés par une combinaison de marqueurs exprimés en surface Ly6C<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>int</sup>CCR2<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD43<sup>low</sup> alors que les monocytes non classiques expriment les marqueurs Ly6C<sup>low</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup> (Geissmann et al., 2003; Jakubzick et al., 2013; S. Jung et al., 2000). Ces deux populations partagent l'expression des marqueurs F4/80, CD11b et CD115 (CSF1R) (Geissmann et al., 2003; Hettinger et al., 2013; Mildner et al., 2017; Yona et al., 2013).

Dans la suite du manuscrit, une brève description des monocytes *patrolling* sera réalisée et nous nous intéresserons ensuite plus en détails aux monocytes Ly6C<sup>hi</sup> dits classiques/inflammatoires.

Les monocytes *patrolling* vérifient l'intégrité de la paroi vasculaire et supportent la fonction des cellules endothéliales. Ils requièrent l'expression du facteur de transcription Nr4a1 pour leur développement depuis les précurseurs de la moelle osseuse (Carlin et al., 2013). Ils agissent comme des cellules de support des cellules endothéliales en accomplissant différentes fonctions : phagocytose de débris cellulaires, élimination des microparticules, examen de l'intégrité des capillaires (Auffray et al., 2007). Le comportement de *patrolling* des monocytes Ly6C<sup>low</sup> est principalement médié par Mac-1 et est dépendant de l'expression du récepteur 1 de la chemokine au motif C-X3- (CX3CR1). Ils monitorent l'intégrité du système vasculaire au niveau des capillaires, artérioles et veinules par un mécanisme de « *crawling* » dépendant de l'expression des adhésines LFA-ICAM-1 (Auffray et al., 2007; Carlin et al., 2013). Cette activité de patrouilleurs est indispensable pour maintenir l'intégrité endothéliale. Les monocytes humains CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> montrent le même comportement quand ceux-ci sont transférés adoptivement à des souris immuno-déficientes (Cros et al., 2010).

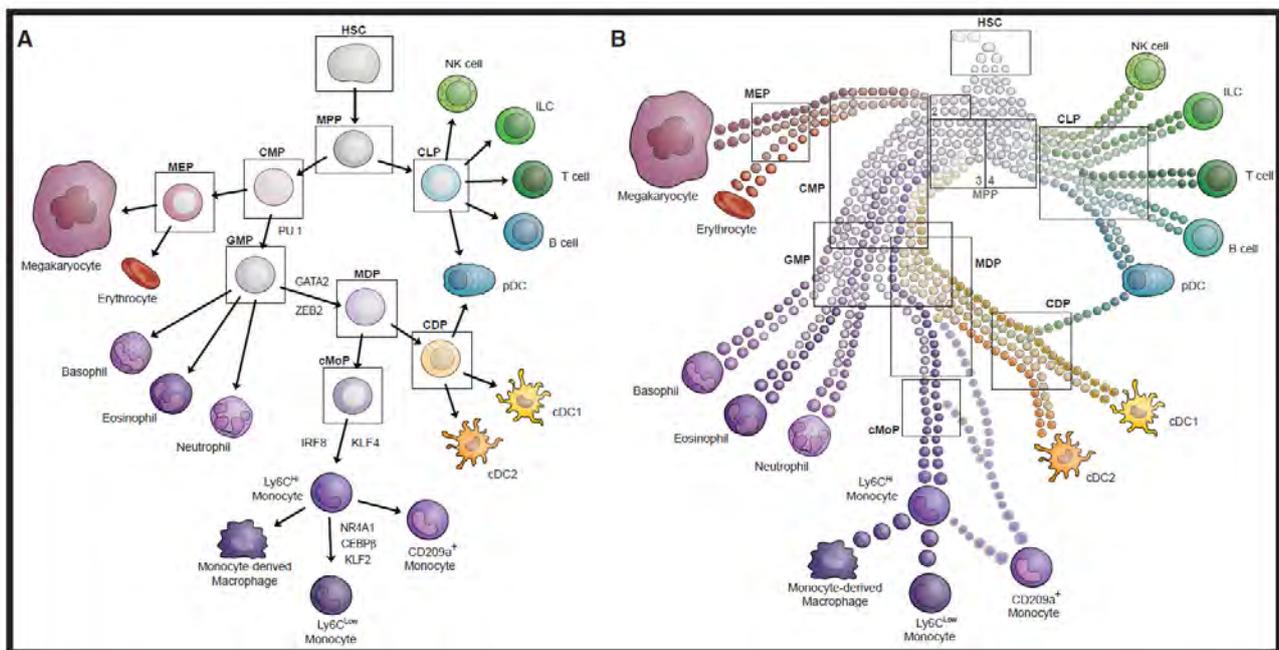
Les monocytes classiques, aussi appelés « inflammatoires » seront décrits désormais dans le modèle murin, notre étude s'intéressant à cette population de monocytes dans le cadre de l'infection par le MuHV-4. Nous aborderons d'abord les concepts généraux concernant le développement des monocytes classiques et nous aborderons ensuite les concepts novateurs d'hétérogénéité de fonctions des monocytes évaluée grâce aux techniques de *fate-mapping* et d'analyse par *single cell* de ces

dernières années qui ont permis et permettent encore de découvrir de nouvelles perspectives dans la recherche sur les monocytes pour caractériser de nouvelles sous-populations de monocytes.

### 2.3. Ontogénie et développement des monocytes classiques

Les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> quittent la moelle pour entrer dans la circulation sanguine par un mécanisme dépendant du récepteur CCR2 (N. V. Serbina & Pamer, 2006) et sont recrutés dans les tissus en réponse à des signaux appropriés afin de remplir différents rôles comme le contrôle direct des pathogènes, la stimulation du système immunitaire adaptatif ou la réparation des tissus (Lauvau, Chorro, et al., 2015). La moelle osseuse est le lieu de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic stem cell*-HSC). En conditions physiologiques, le modèle hiérarchique classique (**Figure 10a**) postule que les monocytes se développent à partir de précurseurs situés dans la moelle osseuse dans un processus de différenciation établi (Pietras et al., 2015). Au sommet de cet arbre, les HSCs ont la capacité de s'auto-renouveler et génèrent une population hétérogène de progéniteurs multipotents (*Multipotent progenitors*-MPP) qui se différencient ensuite en deux branches : les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (*Common lymphoid cell progenitors*-CLP). Brièvement, les CLP donnent lieu aux lymphocytes T et B, aux cellules lymphoïdes innées ainsi qu'aux NKs. Les CMP ont la capacité de se différencier en cellules myéloïdes ou érythroïdes via les progéniteurs des granulocytes et macrophages (*Granulocyte-monocyte progenitors*-GMP) et les progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes (*Megakaryocyte-erythroid progenitors*-MEP) respectivement. Concernant les GMP, une différenciation supplémentaire s'établit donnant lieu aux progéniteurs des monocytes et des DCs (*Myeloid and dendritic progenitors*-MDP) et les granulocytes constitués des basophiles, éosinophiles et neutrophiles. Ensuite, une dichotomie s'opère au niveau des MDP donnant lieu aux progéniteurs des monocytes communs (*Common monocyte progenitors*-cMoP) unipotents et les progéniteurs des DCs (*Common dendritic cell progenitors*-CDP). Les recherches ayant permis d'établir cette dichotomie sont principalement basées sur l'étude par cytométrie en flux des marqueurs exprimés en surface de ces cellules. Ces cellules sont triées sur base d'un nombre prédéfini de marqueurs de surface, isolées et mises en culture ou transférées par un mode de transfert adoptif pour voir leur différenciation subséquente en cellules complètement différenciées. Il existe un nombre de biais important et le destin de chaque cellule *in vivo* est sans doute plus complexe qu'il n'y paraît. La technologie d'analyse par « *single-cell analysis* » a revisité ce diagramme de différenciation à partir des HSCs. Ce modèle hiérarchique classique (**Figure 10a**) a en effet été récemment remis en question étant donné que des modèles proposent un engagement dans la lignée monocyttaire dès le stade de HSCs composé d'un continuum de différenciation de ces cellules plutôt qu'un processus séquentiel nécessitant des précurseurs pluripotents intermédiaires (Guilliams et al., 2018) (**Figure 10b**). Il semblerait que l'engagement dans une lignée cellulaire soit déjà établi dans les progéniteurs oligopotents (Faiyaz et al., 2016; Perié & Duffy, 2016). De plus, il a aussi été démontré

qu'un progéniteur unipotent pouvait *bypasser* la voie classique de différenciation et émerger directement d'une HSC (Naik et al., 2013; Velten et al., 2017). Comme acteurs de cette différenciation, les cytokines jouent un rôle prépondérant (Mossadegh-Keller et al., 2013). La **figure 10b** illustre le concept. Les différentes populations de précurseurs, communes par leur profil phénotypique de surface, constituent donc en réalité des mélanges hétérogènes de cellules, dont l'engagement dans une voie serait déjà établi à des degrés divers au niveau transcriptomique (Guilliams et al., 2018). De plus, en conditions inflammatoires, la population murine MDP peut directement découler du compartiment CMP en amont de la différenciation en GMP. En effet, il a été récemment démontré que les GMP et les MDP peuvent de façon indépendante produire des monocytes inflammatoires fonctionnellement distincts en fonction des stimulations. La régulation des voies de différenciation des monocytes à partir des GMP ou des MDP est influencée par les différents stimuli microbiens, déterminant la mobilisation et l'extravasation des monocytes et trouve son origine dans une différenciation de CMP en CMP Flt3<sup>+</sup> ou - (Yáñez et al., 2017).



**Figure 10: Développement des monocytes murins dans des conditions physiologiques. (A)** Représentation du modèle hiérarchique classique du développement hématopoïétique dans la moelle osseuse. Les précurseurs oligopotents tels que les HSCs ou les MPP deviennent progressivement plus restreints et donnent naissance, à travers des stades précurseurs intermédiaires, à toutes les formes de cellules sanguines circulantes. **(B)** Développement du système hématopoïétique basé sur l'analyse *single cell*. Dans cette vue, le développement hématopoïétique commence par quelques HSCs actives, qui remplissent un pool de MPP. Il existe des sous-ensembles de MPP (indiqués par les chiffres 2 à 4 selon Pietras et al., 2015) qui sont déjà orientés vers certaines lignées cellulaires ou qui présentent même une identité cellulaire comparable (mais non identique) aux cellules différenciées terminales (indiquées par des cercles de couleur claire). Les populations de précurseurs plus différenciés sont donc un mélange hétérogène de cellules engagées (pool de cellules dans les rectangles en B), qui partagent un profil de marqueurs de surface commun parfois superposé (les rectangles correspondent aux précurseurs supposés homogènes présentés en (A)) (Guilliams et al., 2018).

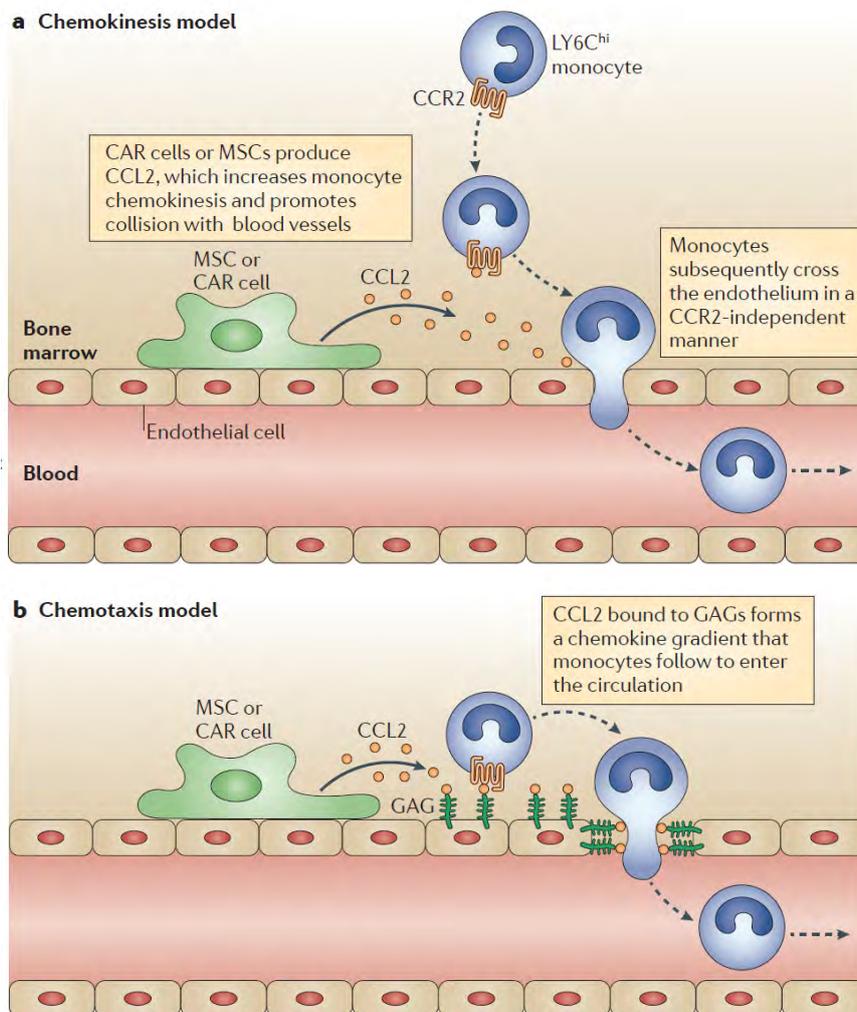
Le développement des monocytes et leur survie chez la souris dépend du CSF1 aussi connu comme *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Les souris déficientes pour ce facteur de croissance ou pour son récepteur (CSF1R/CD115/ M-CSFR) ont une monocytopenie marquée (Cecchini et al., 1994; X.-M. Dai et al., 2002). Les facteurs de transcription importants pour la différenciation en monocytes matures impliquent Spl1 (codant pour PU.1), IRF8, GATA2 et KLF4 (Feinberg et al., 2007; Friedman, 2007; Kurotaki et al., 2013). La délétion de ces facteurs impacte la composition des précurseurs des monocytes dans la moelle entraînant une diminution du nombre de monocytes circulants. La différenciation des cMoP en monocytes matures implique le passage par un stade « prémonocytaire » caractérisé par l'expression de CXCR4 (Teh, Ding, Ng, & Chong, 2019). Les cellules à ce stade prolifèrent et se différencient en 24 heures en monocytes CXCR4-Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>. Ce stade a été découvert suite à l'observation de deux populations de monocytes distinctes Ly6C<sup>hi</sup> dans la moelle osseuse exprimant ou non CXCR4. Les monocytes CXCR4<sup>hi</sup> constituent le stade de transition des pré-monocytes aussi appelés monocytes transitionnels (*Transitional pre-monocytes*-TpMOs) et dérivent directement des cMoP. Ils sont retenus dans la moelle où ils prolifèrent rapidement pour remplir le stock de monocytes matures sortants de la moelle. Les monocytes CXCR4<sup>low</sup> constituent les monocytes matures Ly6C<sup>hi</sup> *bona fide* qui sont sortis du cycle cellulaire et sont rapidement mobilisés depuis la moelle osseuse. Comme les TpMOs prolifèrent rapidement et sont immobilisés dans la moelle, leur présence permet une régulation des taux de libération de monocytes dans la circulation et prévient d'une libération incontrôlée de monocytes de la moelle (Chong et al., 2016). Outre la moelle osseuse, la rate peut également être un lieu de myélopoïèse. Les monocytes résident dans la pulpe rouge, sous la capsule et constituent un réservoir secondaire de monocytes (Swirski et al., 2009). Ce stock de monocytes n'est pas issu d'une différenciation *in situ* mais provient d'un stock de monocytes circulants ayant migré dans la rate et constituant un réservoir de monocytes matures. Les monocytes de la rate constituent donc une réserve de monocytes en cas d'urgence lors d'inflammation qui permet en parallèle de générer des grandes quantités de monocytes dans la moelle osseuse.

## 2.4. Circulation des monocytes : émigration, diapédèse, recrutement

### Emigration

En lien avec les mécanismes décrits précédemment, il est nécessaire de s'intéresser aux mécanismes permettant aux monocytes de sortir de la moelle osseuse après leur différenciation. Les cellules stromales de la moelle osseuse produisent des chimiokines nécessaires pour garder les monocytes dans la moelle (notamment via CXCR4) (Teh et al., 2019). La sortie des monocytes de la moelle est dépendante de l'interaction entre les récepteurs-ligands CCR2-CCL2 (Chong et al., 2016; H. Jung, Mithal, Park, & Miller, 2015). Dans un modèle de souris déficientes pour CCR2 (souris CCR2<sup>-/-</sup>), les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> ne sont pas présents dans le sang des souris déficientes pour le récepteur CCR2 mais s'accumulent dans la moelle osseuse (N. V. Serbina & Pamer, 2006).

Dans la moelle, les monocytes sont relativement immobiles et sont en étroit lien avec les cellules stromales Nestin<sup>+</sup> (H. Jung et al., 2015; Shi et al., 2011). Les cellules souches mésenchymateuses (*Mesenchymal stem cells*-MSCs) et les cellules réticulaires expriment CCL2 en réponse à une activation par des cytokines pro-inflammatoires et des stimulations des TLRs par des agents microbiens. Lors d'une activation de TLRs, les cellules stromales expriment CCL2 rendant les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> mobiles. Cette exposition à la chimiokine CCL2 rend les monocytes incapables de répondre à CXCL12 (ligand du récepteur CXCR4), résultant en l'émigration des monocytes hors de la moelle. La réponse à CCL2 implique un niveau de différenciation des monocytes suffisant comme il a été montré que les TpMOs ne sont pas capables de répondre à CCL2 (Chong et al., 2016). La **figure 11** présente deux modèles de sortie des monocytes de la moelle osseuse dans un mécanisme dépendant de CCL2-CCR2. Une attention est portée à cet axe car nous utiliserons au long de cette étude un modèle de souris déficientes en monocytes circulants par l'utilisation de souris CCR2<sup>-/-</sup> (N. V. Serbina & Pamer, 2006) ou par l'utilisation d'un anticorps anti-CCR2 (anticorps MC21) (Mack et al., 2001).



**Figure 11 : Modèles de sortie des monocytes de la moelle osseuse médiée par CCL2.** La libération des monocytes Ly6C<sup>hi</sup> de la moelle osseuse pendant l'infection par *Listeria monocytogenes* est pilotée par le *CC-chemokine ligand 2* (CCL2). CCL2 est produit par les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules réticulaires abondantes en CXCL12 (CAR) suite

à une stimulation par des ligands circulants des récepteurs Toll-like (TLR). Deux modèles sont proposés pour l'émigration des monocytes suite à l'expression de CCL2 par ces cellules stromales de la moelle osseuse. Dans le premier modèle, la production de CCL2 dans la moelle osseuse augmente la chimiokinèse des monocytes, ce qui accroît la probabilité que les monocytes entrent en contact avec les vaisseaux sanguins. Le mouvement ultérieur des monocytes dans la lumière peut être indépendant du récepteur CC-chemokine 2 (CCR2) **(a)**. Dans le second modèle, le CCL2 produit à proximité des sinus vasculaires se lie aux GAG et forme un gradient de chimiokines qui attire les monocytes vers l'endothélium, puis guide leur transmigration dans la circulation **(b)** (Shi & Pamer, 2011).

Une fois dans la circulation, les monocytes ont un temps de demi-vie court, d'approximativement 20-24h (Patel, Ginhoux, & Yona, 2021; Patel et al., 2017) durant lequel, s'ils ne sont pas recrutés dans les compartiments périphériques, se différencient en monocytes Ly6C<sup>low</sup>.

### **Diapédèse, recrutement**

Les monocytes sont recrutés dans les tissus enflammés via l'expression de différents récepteurs à chimiokines. Les molécules d'adhésion permettant la margination et la sortie des monocytes depuis le sang vers les tissus incluent notamment l'expression des intégrines et adhésines comme CD11b, VLA-4 et PECAM-1 (Rosseau et al., 2000). Nous nous intéresserons principalement aux mécanismes de recrutement des monocytes dans le poumon qui représente un site majeur de diapédèse. Les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> forment des interactions étroites avec le système vasculaire pulmonaire même en conditions homéostatiques (Ginhoux et al., 2010). En lien avec l'expression de CCR2 et CCR5 par les monocytes, CCL5 (RANTES) et CCL2 (MCP-1) peuvent être produits par les cellules épithéliales pulmonaires en présence de cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes sont mobilisés depuis la moelle osseuse, grâce à la chimiokine CCL2, libérée dans la circulation sanguine suite à une stimulation principalement dépendante de la voie cellulaire des IFNs de type I dans le cadre des infections pulmonaires virales (Crane, Hokeness-Antonelli, & Salazar-Mather, 2009; S.-U. Seo et al., 2011). L'inflammation induit une augmentation des chimiokines CCL2 mais également CCL7 (MCP-3) qui induisent une uprégulation du récepteur CCR2 et promeuvent le recrutement de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> (Tsou et al., 2007). Le rôle de CCR2 pour l'entrée des monocytes au sein des tissus enflammés est controversé. Selon Serbina et Pamer, l'expression de CCR2 est requise pour l'émigration depuis la moelle osseuse mais n'est pas requise pour la migration dans le tissu. Le mécanisme d'action de CCL2 n'est pas encore complètement compris notamment pour l'entrée des monocytes dans les tissus. Il a cependant été démontré que les cellules épithéliales alvéolaires produisent CCL2 après une infection par le virus *influenza* pouvant faciliter le trafic de monocytes à travers une monocouche de cellules épithéliales *in vitro* (Herold et al., 2006). Cependant, le stade auquel CCR2 et ses ligands contribuent au recrutement des monocytes pendant une infection virale respiratoire *in vivo* n'est pas clair. Il est possible qu'en plus de la médiation du recrutement des monocytes de la moelle osseuse vers la circulation sanguine, CCR2 contribue au recrutement direct des monocytes inflammatoires de la circulation sanguine vers les poumons infectés mais également vers les ganglions lymphatiques. Un rôle pour CXCR4 a été établi

récemment. Il a été démontré que CXCR4 régule la margination des monocytes dans le poumon (Chong et al., 2016). La migration des monocytes dans les tissus ne serait pas dépendante de CCR2 mais de CXCR4 comme il a été montré qu'une inhibition de CXCR4 empêchait les monocytes de transiter dans le poumon. De plus, les monocytes varient en fonction du rythme circadien correspondant également aux fluctuations de niveaux de CXCR4 sur les monocytes (Nguyen et al., 2013). La voie CXCR4 permet également de réguler le pool de monocytes circulants en permettant aux monocytes de retourner dans la moelle osseuse et la rate dans un mécanisme dépendant de CXCR4.

## 2.5. Spécialisations fonctionnelles

Il est important de distinguer le sort et la fonctionnalité des monocytes en conditions homéostatiques ou inflammatoires. L'avenir fonctionnel des monocytes en homéostasie inclut principalement l'accumulation d'une réserve de cellules dans les réservoirs périphériques comme la rate ainsi que le remplacement de macrophages résidents dans certains tissus. En conditions pathologiques, les monocytes peuvent acquérir différentes fonctions effectrices mais également régulatrices. En effet, les monocytes recrutés lors d'inflammation sont fonctionnellement distincts des macrophages résidents et des cDCs.

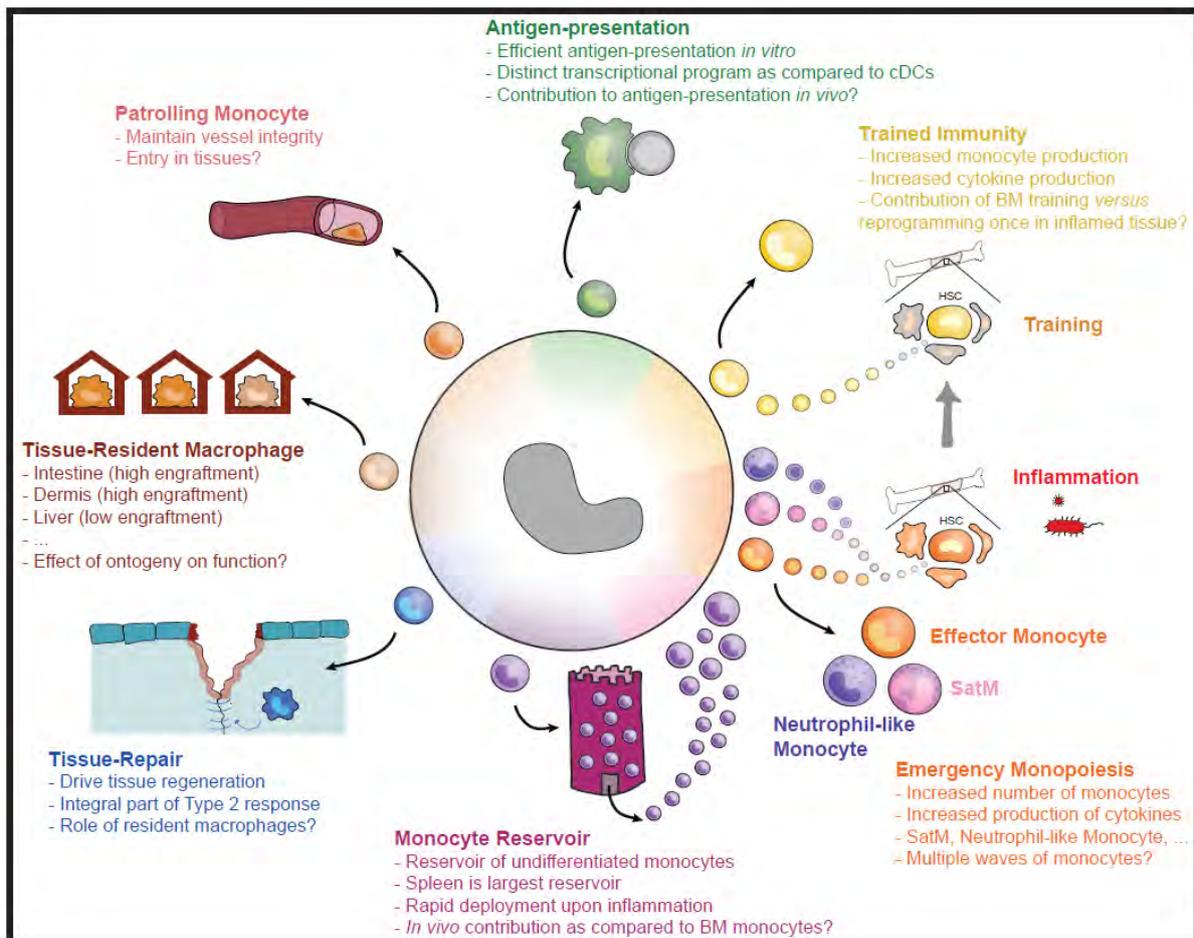


Figure 12 : Diversité de fonctions des monocytes dans des conditions physiologiques et pathologiques (Guilliams et al., 2018).

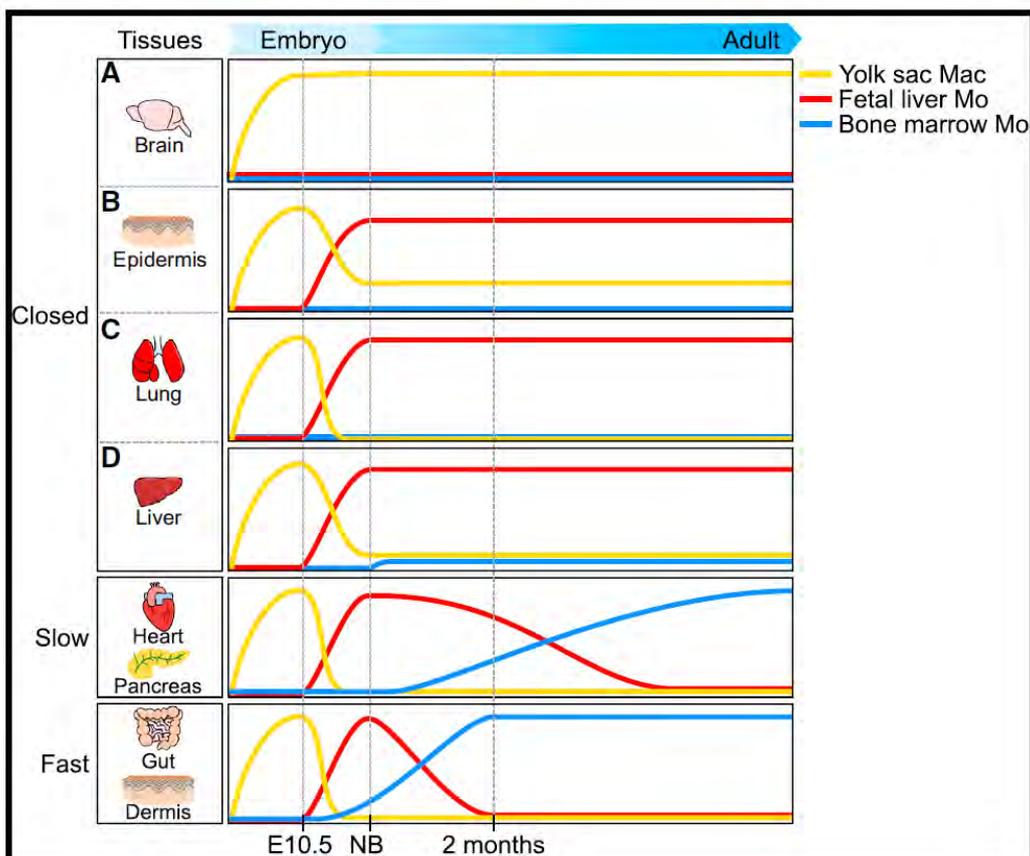
### 2.5.1. Devenir des monocytes en conditions homéostatiques

De façon générale, les monocytes circulants migrent dans les organes du corps en conditions physiologiques, participant de façon plus ou moins importante au pool de macrophages tissulaires résidents. L'ancien paradigme communément accepté que tous les macrophages tissulaires proviennent de monocytes circulants et sont dépendants des HSCs et des progéniteurs de la moelle osseuse a été revisité. Il a été démontré avec les récentes avancées technologiques permettant des approches de *fate-mapping* et l'utilisation de souris parabiontes, que la plupart des macrophages tissulaires résidents ont une origine embryonnaire et ont colonisé les organes lors des différentes vagues d'hématopoïèse, se maintenant par un processus d'auto-renouvellement indépendamment d'une contribution de la moelle osseuse (Ginhoux & Jung, 2014; Z. Liu et al., 2019; Yona et al., 2013). Les principales vagues d'hématopoïèses embryonnaires proviennent du sac vitellin de l'embryon et du foie foetal. Les précurseurs embryonnaires sont issus d'îlots de précurseurs érythro-myéloïdes (*Erythro-myeloid progenitors*-EMP) présents dans le sac vitellin de l'embryon (Palis, Robertson, Kennedy, Wall, & Keller, 1999). Ces EMP donnent lieu directement à des macrophages qui colonisent les différents organes en formation de l'embryon (Takahashi, Yamamura, & Naito, 1989). Ces EMP, une fois la circulation établie, migrent et s'établissent dans le foie foetal donnant lieu à de multiples lignées de cellules myéloïdes comme les monocytes (Gomez Perdiguero et al., 2015). Ces monocytes fœtaux colonisent toutes les niches qui ne sont pas encore occupées par les macrophages primitifs issus du sac vitellin, à l'exception du cerveau (Epelman et al., 2014; Hoeffel et al., 2015, 2012).

La génération d'un modèle de *fate-mapping* par utilisation de souris exprimant le gène *Ms4a3* a permis de retracer l'ontogénie des cellules dérivées des monocytes et a permis de distinguer l'origine embryonnaire ou monocyttaire des macrophages résidents tissulaires. Dans cette étude, Liu *et al* ont identifié *Ms4a3* comme un gène spécifique exprimé par les GMP et ils ont ensuite généré différents modèles murins rapporteurs pour le gène *Ms4a3* (*Ms4a3<sup>TdT</sup>reporter* mice), des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de ce gène (*Ms4a3<sup>Cre</sup>\*Rosa<sup>TdT</sup>*) et des souris exprimant la Cre-recombinase de façon inductible par la présence d'un récepteur aux oestrogènes, activé suite à l'injection de tamoxifène (*Ms4a3Cre<sup>ERT2</sup>\*Rosa<sup>TdT</sup>*) permettant d'évaluer la contribution des monocytes au pool de macrophages résidents tissulaires en conditions homéostatiques ou dépendamment des conditions inflammatoires (Z. Liu et al., 2019).

Les tissus sont donc colonisés à la naissance par différents précurseurs issus de différentes vagues d'hématopoïèses embryonnaires et adultes (Hoeffel & Ginhoux, 2015). La contribution de chaque vague pour constituer le pool de macrophages résidents tissulaires est dépendante du tissu (Ginhoux & Williams, 2016). Hashimoto *et al.* ont montré que certaines populations de macrophages résidents tissulaires (les AMs, les macrophages de la pulpe rouge du foie, les macrophages péritonéaux) se maintiennent par eux-mêmes par auto-renouvellement avec une contribution minoritaire des

monocytes au remplacement des macrophages embryonnaires en conditions homéostatiques (Hashimoto et al., 2013). A l'inverse, les macrophages de l'intestin (au niveau de la *lamina propria*) et du derme sont constamment remplacés par les monocytes circulants (Bain & Mowat, 2014; Tamoutounour et al., 2013; Zigmond et al., 2012). Hormis ces extrêmes, les macrophages tissulaires sont en fait un intermédiaire et peuvent avoir une origine mixte (Sieweke & Allen, 2013). Par exemple, les monocytes dérivés de la moelle osseuse peuvent se différencier en macrophages artériels immédiatement après la naissance et s'auto-renouveler localement à partir de ce moment (Ensan et al., 2016), ce qui suggère que ce tissu n'est que temporairement "ouvert" à la naissance mais reste "fermé" à l'âge adulte. Les tissus adultes peuvent donc être classés comme suit : (1) fermés, sans recrutement de monocytes à l'état stable (cerveau, épiderme, poumon et foie) et auto-entretenus tout au long de la vie, sans contribution ou avec une contribution minimale de monocytes sanguins de par leur haut potentiel de renouvellement et l'accès limité de ces endroits à cause des barrières épithéliales et nerveuses ; (2) ouverts, avec un recrutement rapide à l'état stable (intestin et derme) ; ou (3) ouverts, avec un recrutement lent à l'état stable (cœur et pancréas) (Ginhoux & Guilliams, 2016). La **figure 13** récapitule ces notions avec l'origine des différents macrophages résidents tissulaires, spécifiques à chaque organe en fonction des différentes vagues de colonisation.



**Figure 13 : Hétérogénéité des macrophages résidents tissulaires au sein des tissus adultes en conditions homéostatiques.** Les macrophages résidents tissulaires peuvent provenir des macrophages dérivés du sac vitellin (*Yolk sac*, YS), des monocytes du foie fœtal ou des monocytes dérivés de la moelle osseuse (Ginhoux & Guilliams, 2016).

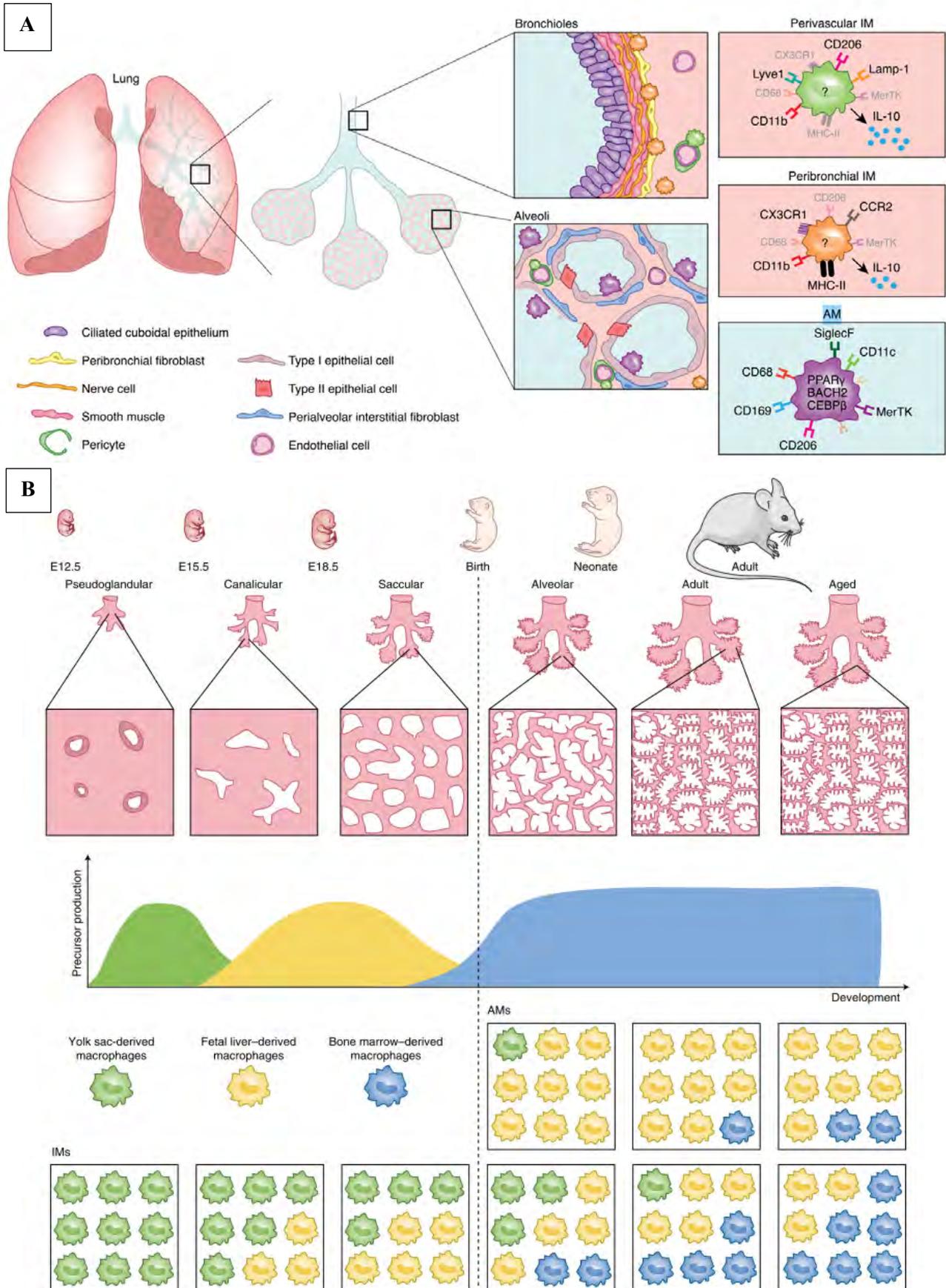
Etant donné que notre étude aborde le recrutement de monocytes au sein des alvéoles pulmonaires suite à l'infection par le MuHV-4, il est intéressant de détailler les différentes populations de macrophages établies au sein du poumon suite à la colonisation du tissu pendant le développement. Les macrophages du poumon sont constitués de 3 différentes populations (Guilliams & Svedberg, 2021) :

- 1) Les AMs Siglec<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup> (AMs)
- 2) les macrophages interstitiels (*Interstitial macrophages-IMs*) CD206<sup>hi</sup>Lyve1<sup>hi</sup>
- 3) les IMs MHCII<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>

Les AMs constituent la population la plus abondante et résident dans les alvéoles pulmonaires, en étroit contact avec les cellules épithéliales pulmonaires de type I et II qui produisent le CSF2 aussi appelé GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) essentiel à leur maintien (Gschwend et al., 2021; Guilliams et al., 2013). Les AMs en conditions homéostatiques travaillent comme sentinelles de l'immunité innée pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. Leurs fonctions de phagocytose et de surveillance immunitaire leur permettent l'élimination du surfactant et des débris cellulaires ainsi que la reconnaissance des pathogènes, l'initiation et la résolution de l'inflammation et la réparation des dommages tissulaires au sein de l'espace alvéolaire (Joshi, Walter, & Misharin, 2018).

Deux populations principales d'IMs ont été identifiées (Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019). Il est proposé que les IMs caractérisés par l'expression du CD206 se localisent au niveau péri-vasculaire et les IMs caractérisés par l'expression du MHCII se localisent autour des bronches (Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019; Schyns, Bureau, & Marichal, 2018). Ces IMs sont également importants pour l'homéostasie tissulaire, produisent de l'IL-10 et sont acteurs de la protection contre les réponses allergiques respiratoires de type 2 (Bedoret et al., 2009; Kawano et al., 2016; Liegeois, Legrand, Desmet, Marichal, & Bureau, 2018; Schyns et al., 2018). Schyns *et al.*, ont confirmé par la méthode d'analyse *single cell* l'existence des deux principales sous-populations d'IMs ainsi que d'une population issue de monocytes *patrolling* dans un mécanisme de différenciation dépendant de NR4A1+, démontrant également la contribution sous-estimée des monocytes *patrolling* dans l'établissement et le maintien du pool de macrophages pulmonaires. Alors que les AMs sont principalement d'origine embryonnaire dans des conditions homéostatiques, les IMs sont remplacés lentement par les monocytes chez la souris adulte à partir de la naissance. Les IMs possèdent également des capacités d'auto-renouvellement et de maintenance indépendamment de l'influx de monocytes dérivés de la moelle (Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017).

La **figure 14** récapitule l'organisation histologique du poumon ainsi que les différentes populations constituant les niches de macrophages et leur origine.



**Figure 14 : Les macrophages résidents pulmonaires, localisation et ontogénie. (A)** Trois sous-ensembles de macrophages résident dans le poumon. Les plus abondants sont les SiglecF<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup> AMs, localisés dans les alvéoles. Les AMs sont situés à proximité des cellules épithéliales de type I/II et des fibroblastes interstitiels péri-alvéolaires. Deux populations principales d'IMs ont été identifiées : Lyve1<sup>hi</sup>CD206<sup>hi</sup> et les IM CX3CR1<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup>. Leur localisation précise dans le parenchyme et la composition de leur niche n'ont pas été déterminées. Cependant, des rapports ont décrit des IMs Lyve1<sup>hi</sup>CD206<sup>hi</sup> (périvasculaires) et CX3CR1<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup> (péribronchiques) comme étant préférentiellement associés aux vaisseaux sanguins et aux cellules nerveuses proximales des bronchioles, respectivement. **(B)** Les macrophages pulmonaires se développent au sein du poumon à partir de plusieurs vagues séquentielles et superposées de précurseurs embryonnaires dérivés de sites distincts de l'hématopoïèse embryonnaire. Le poumon se développe en plusieurs étapes qui se chevauchent, du stade pseudoglandulaire (e12,5- e15,5) au stade alvéolaire (de la semaine postnatale 1 à la semaine postnatale 3), en passant par le stade canaliculaire (e15,5-e17,5) et le stade sacculaire (e17,5 jusqu'à la naissance). Les grossissements montrent l'augmentation séquentielle des ramifications et la formation de l'alvéole. On y voit également la contribution des différentes vagues de précurseurs au fil du développement de l'organisme pour la population d'AMs et d'IMs. Adapté de (Guilliams & Svedberg, 2021).

### 2.5.2. Devenir des monocytes en conditions inflammatoires

Les monocytes recrutés sous conditions inflammatoires donnent lieu aux cellules dérivées des monocytes, fonctionnellement différentes des macrophages résidents et des cDCs. Leurs fonctions sont influencées par le microenvironnement et les signaux inflammatoires libérés suite à la réponse immunitaire. En fonction des conditions, ils peuvent montrer des activités pro-inflammatoires et microbicides, présenter des antigènes, participer au remodelage tissulaire mais encore posséder des propriétés régulatrices.

#### Activité pro-inflammatoire et microbicide

La fonction pro-inflammatoire des monocytes est notamment décrite dans la pathogénie de maladies auto-immunes comme dans le modèle murin de la MS, l'encéphalomyélite auto-immune (*Experimental autoimmune encephalomyelitis-EAE*) (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, & Gran, 2011). Lors de cette pathologie, les cellules myéloïdes ont un rôle prédominant dans la pathologie MS et les monocytes sont recrutés dans le système nerveux central (Mishra & Wee Yong, 2016). La microglie est constituée de macrophages résidents tissulaires alors que les macrophages associés aux bordures (*Border-associated macrophages-BAMs*) se retrouvent au niveau des interfaces des méninges, des espaces périvasculaires et des plexus choroïdes (Prinz, Masuda, Wheeler, & Quintana, 2021). La neuroinflammation induite lors de l'EAE provoque l'infiltration de différentes sous-populations de monocytes dont certaines sont particulièrement pathogènes et présentent des caractéristiques très agressives (Giladi et al., 2020). Un autre exemple où les monocytes présentent des propriétés pro-inflammatoires délétères est observé dans le modèle expérimental de colite ulcéraire induite par le *Dextran Sulfate Sodium* (DSS). L'utilisation de souris CCR2<sup>-/-</sup> et leur résistance à l'induction de l'EAE et de la colite induite par le DSS a permis de montrer le rôle délétère des monocytes recrutés lors de l'inflammation dans ce contexte (Fife, Huffnagle, Kuziel, & Karpus, 2000; Izikson, Klein, Charo,

Weiner, & Luster, 2000; Platt, Bain, Bordon, Sester, & Mowat, 2010). En utilisant un modèle de souris où l'activité de la Cre recombinase est inductible sous le contrôle du gène CCR2 par administration de tamoxifène (CCR2CreER<sup>T2</sup>), Croxford et al., ont démontré que la voie CSF2R est requise pour la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dérivées des monocytes, délétères dans le cadre de l'EAE (Croxford et al., 2015). Pour la colite induite par le DSS, les monocytes recrutés produisent moins d'IL-10 et plus de TNF $\alpha$  que les macrophages résidents (Bain et al., 2013).

A l'inverse, les propriétés inflammatoires des monocytes peuvent être associées à des propriétés microbicides permettant de limiter la charge microbienne lors d'infections. Beaucoup d'études ont investigué la fonction microbicide des monocytes dans les infections bactériennes, parasitaires et fongiques (Lauvau, Loke, & Hohl, 2015; N. V. Serbina et al., 2008; Shi & Pamer, 2011) où ils apparaissent également comme des intermédiaires clés dans le développement et l'amplification des réponses immunes innées et adaptatives (Lauvau, Chorro, et al., 2015; Soudja et al., 2012). Une sous-population de monocytes effecteurs produisant du TNF et iNOS (*TNF and iNOS producing DCs*, Tip-DCs) a été notamment identifiée dans des infections par *Listeria monocytogenes* (N. V. Serbina, Salazar-Mather, Biron, Kuziel, & Pamer, 2003), *Trypanosoma brucei* (Bosschaerts et al., 2010; Guillems et al., 2009), *Toxoplasma gondii* (Dunay et al., 2008). Suite à ces infections, les souris CCR2<sup>-/-</sup> présentent une charge plus élevée en pathogènes démontrant l'importance des monocytes dans le contrôle de l'infection par leur production de molécules microbicides et mettant en évidence que les macrophages seuls ne sont pas suffisants pour éliminer les pathogènes et requièrent l'assistance de monocytes recrutés. Il faut noter que le terme employé pour dénommer la population (Tip-DC) est un peu abusif car il a été montré que le rôle de ces cellules dendritiques dérivées des monocytes pour le priming des lymphocytes T CD4 lors d'infection par *Listeria* est limité (N. V. Serbina et al., 2003).

### **Présentation antigénique par les monocytes**

Les monocytes humains sont caractérisés par l'expression de HLA-DR alors qu'en conditions homéostatiques, une fraction minoritaire de monocytes murins exprime le MHCII. Suite à l'infection par le MuHV-4, on observe notamment une overexpression de la molécule MHCII sur les monocytes recrutés. Cette expression du MHCII exprimée à la base par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles comme les DCs, les cellules B et les macrophages suggèrent des capacités de présentation d'antigènes par les monocytes. De nombreuses études *in vitro* ont démontré que les monocytes sont capables de processer l'antigène et le présenter mais la contribution à une réelle éducation des cellules T comme les cDCs est soumise au débat et semble dépendre du contexte inflammatoire (Jakubzick et al., 2017). De plus, il est important de préciser que la plupart des études investiguant le potentiel de capacité de présentation antigénique des monocytes ont été réalisées en se basant sur une capacité de présentation de peptides *ex vivo* et non d'antigènes dans leur entièreté, rendant difficile l'interprétation de leur capacité de présentation *in vivo*.

## Remodelage tissulaire et propriétés anti-inflammatoires

La résolution de la phase inflammatoire est un processus actif permettant le retour à l'homéostasie tissulaire. Le système MPS joue des rôles clés dans la résolution de cette phase, notamment par l'élimination de débris cellulaires, le catabolisme de cytokines et la libération de médiateurs régulateurs (Newson et al., 2014). Les monocytes peuvent également acquérir un phénotype régulateur avant l'arrivée dans le tissu comme il a été montré dans le cadre d'une infection par *Toxoplasma gondii* (Askenase et al., 2015) où les monocytes acquièrent leurs propriétés régulatrices dans la moelle osseuse. Dans un modèle de blessure provoqué au niveau de la moelle épinière, les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> possèdent un phénotype anti-inflammatoire et secrètent de l'IL-10 permettant de contre-balancer l'activité pro-inflammatoire de la microglie (Shechter et al., 2009).

## Rôle des monocytes dans les infections virales

Les monocytes jouent des rôles différents dépendamment du contexte d'infection virale. Alors que les propriétés microbicides des monocytes ont été évaluées principalement dans le contexte d'infections parasitaires, bactériennes et fongiques, le rôle des monocytes dans les infections virales serait plutôt de servir d'orchestrateur des réponses immunes innées et adaptatives. La production de cytokines inflammatoires par les monocytes permet notamment de polariser les lymphocytes T CD4 Th1 (Nakano et al., 2009). Les monocytes participent également directement à l'élimination du virus dans une infection par *influenza* en permettant une expansion clonale de lymphocytes T CD8 spécifiques au sein du poumon (Aldridge et al., 2009). Dans un contexte d'infection par un alphavirus, un fort recrutement de monocytes est observé, produisant des niveaux élevés d'IFN de type I lors de la détection de cellules infectées par le virus. Ces monocytes CCR2<sup>+</sup> contribuent à la clairance virale et à une diminution marquée de la gravité de la maladie (Haist, Burrack, Davenport, & Morrison, 2017). Les monocytes sont également importants dans les infections par les pneumovirus où le virus respiratoire syncytial (*Respiratory syncytial virus*-RSV) chez l'homme infecte les monocytes et les cellules dendritiques dérivées, diminuant leur capacité d'activation des lymphocytes T CD4 (de Graaff et al., 2005). Les monocytes peuvent par contre contribuer directement à la production d'IFN $\beta$  et aux réponses cytotoxiques des lymphocytes T CD8 dans ce contexte d'infection (Kim, Kim, Oh, Jung, & Lee, 2021).

Les monocytes peuvent également jouer un rôle de dissémination du virus au sein de l'organisme faisant office de réservoirs viraux (Nikitina, Larionova, Choinzonov, & Kzhyshkowska, 2018) et de cheval de Troie notamment dans le cas des infections par HIV (Cassol, Alfano, Biswas, & Poli, 2006), HCMV (E. Stevenson et al., 2014), le virus de l'encéphalite japonaise (Dutta, Mishra, Nazmi, Kumawat, & Basu, 2010), le virus Zika (Ayala-Nunez et al., 2019) et récemment dans l'infection par le SARS-CoV-2 (Percivalle et al., 2021). Les monocytes véhiculent le virus au sein de la circulation sanguine, formant des réservoirs au sein desquels le virus peut également se multiplier. Les cellules

myéloïdes que ce soit les monocytes ou les macrophages peuvent supporter la réplication lors d'infections virales comme c'est le cas pour l'EBV (Ariza, Glaser, Kaumaya, Jones, & Williams, 2009), le KSHV (Rappocciolo et al., 2006), le HCMV (E. Stevenson et al., 2014), le VIH (Tuofu et al., 2002), le virus de la Dengue (Ashhurst et al., 2013) et le virus *influenza* (Pawelek, Dor Jr, Salmeron, & Handel, 2016).

Le recrutement de monocytes est observé dans différentes infections à herpèsvirus notamment le HCMV (Daley-Bauer, Wynn, & Mocarski, 2012), l'HSV-2 (Iijima, Mattei, & Iwasaki, 2011) et l'EHV-1 (Zhao, Poelaert, Van Cleemput, & Nauwynck, 2017). Lors de l'infection par le MuHV-4, leur rôle reste à définir.

### **Etablissement de monocytes dans le pool de macrophages résidents lors de pathologies**

Les monocytes recrutés peuvent garder un état d'activation avec des effets au long cours en s'intégrant dans le pool de macrophages résidents (Bonnardel et al., 2019). Dans certains modèles, la déplétion des AMs associée à l'inflammation (Barth, Hendrzak, Melnicoff, & Morahan, 1995) induit le recrutement et l'établissement de monocytes recrutés pour reconstituer la niche initialement constituée de macrophages embryonnaires. Dans le cadre d'une étude réalisée au sein de notre laboratoire (Machiels et al., 2017), il a été montré que les monocytes recrutés s'établissent au sein de la niche alvéolaire et protègent du développement de l'asthme allergique par des propriétés régulatrices acquises dès la sortie de la moelle. Ces monocytes ont été "entraînés", "primés" dans le contexte de l'infection par le MuHV-4. Ces derniers s'établissent dans le pool d'AMs et ont la capacité de persister pour une longue période tout en gardant certaines propriétés effectrices permettant une protection contre l'asthme allergique.

Cet établissement de monocytes dans le pool de macrophages résidents nous amène à définir de façon plus précise le concept de la niche et les mécanismes sous-jacents induisant le remplacement de la niche constituée d'AMs embryonnaires par des macrophages dérivés des monocytes.

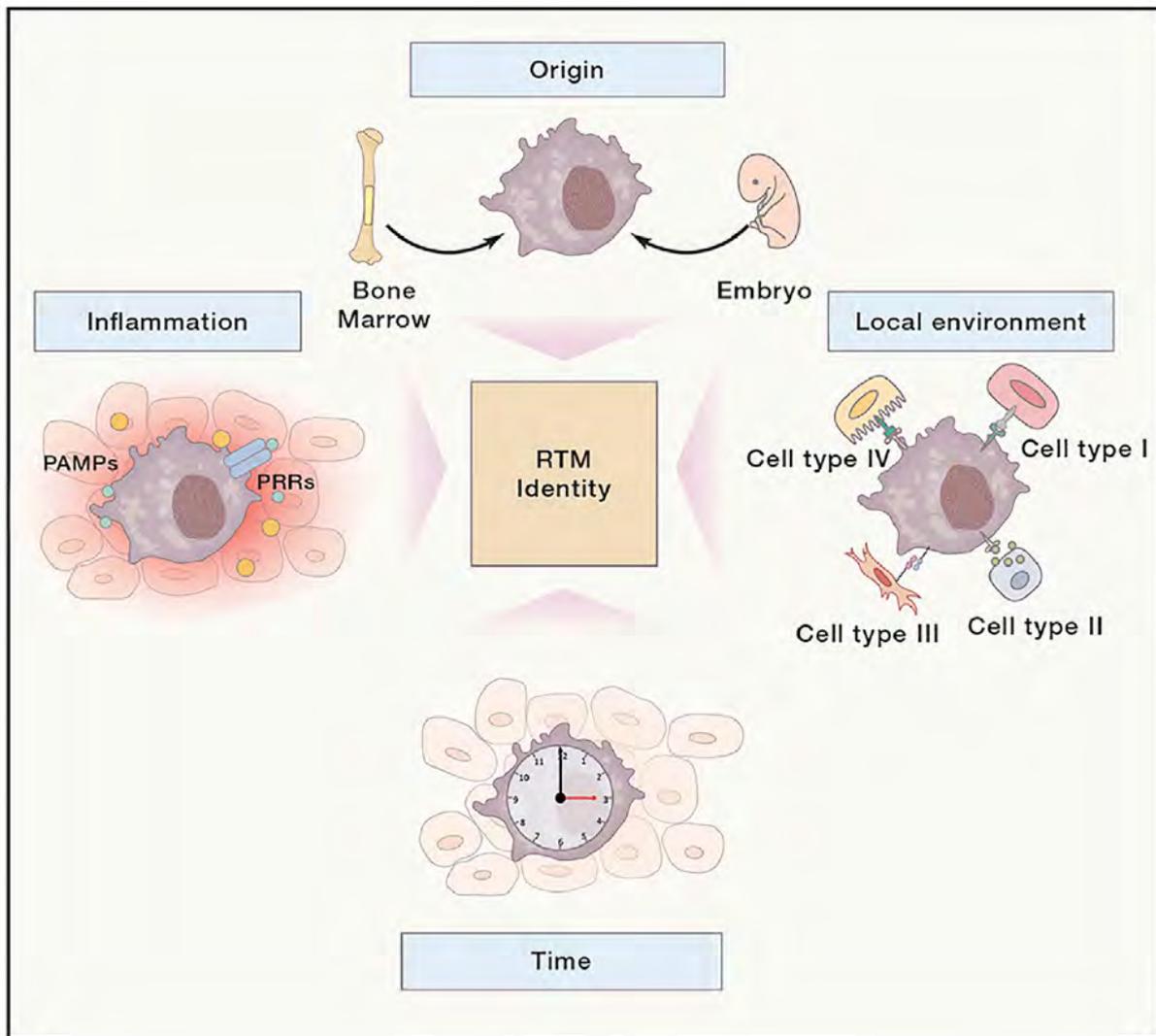
## **2.6. Concept de la niche**

Comme dit précédemment, les macrophages possèdent des capacités pour se maintenir sur le long terme de façon autonome. Ceci explique pourquoi la plupart des souris adultes possèdent des macrophages d'origine embryonnaire (Ginhoux & Guilliams, 2016), constituant une niche assimilable à un écosystème constitué de différents acteurs, différents signaux permettant leur établissement à long terme au sein de l'organe (Guilliams, Thierry, Bonnardel, & Bajenoff, 2020). Quand les monocytes recrutés dans un organe remplacent le pool de macrophages embryonnaires résidents dans des conditions d'homéostasie, les monocytes acquièrent les mêmes capacités de maintenance, d'auto-renouvellement, d'identité transcriptomique spécifique aux tissus ainsi qu'une spécialisation fonctionnelle identique

(van de Laar et al., 2016). La niche qu'offre l'organe permet aux monocytes de s'établir fonctionnellement au sein de celle-ci en recevant les signaux nécessaires *in situ* à sa différenciation quelle que soit leur origine cellulaire (Blériot, Chakarov, & Ginhoux, 2020). Le modèle propose que les principaux facteurs qui définissent l'origine cellulaire des macrophages sont l'accessibilité et le degré d'ouverture de la niche (Guilliams & Scott, 2017). L'*imprinting* de la niche est un facteur prédominant pour donner aux macrophages leur identité et leur capacité d'auto-renouvellement et de maintenance plutôt que leur origine. Dans un contexte inflammatoire, l'établissement et le sort des monocytes circulants au sein de la niche déplétée diffèrent en fonction de l'agression immunitaire et du type de réponse immune induite (Guilliams & Svedberg, 2021). Ce sort est également dicté par le type de mort cellulaire induite sur les macrophages résidents (Ginhoux, Bleriot, & Lecuit, 2017) induisant des signaux inflammatoires différents. Par exemple, une infection systémique à *Listeria monocytogenes* induit la mort des cellules de Kupffer et est associée à un établissement de monocytes différent que lors d'une intoxication du foie induite par le paracétamol. L'infection par *Listeria monocytogenes* permet l'établissement et la différenciation des monocytes recrutés en macrophages (Blériot et al., 2015). Ceux-ci persistent dans le temps alors que la niche détruite par le paracétamol empêche tout établissement monocyttaire (Guilliams & Scott, 2017). Cet établissement différent est le résultat de deux mécanismes compétitifs ayant lieu au sein de la niche : la prolifération de la niche restante et la différenciation des monocytes sanguins en cellules de Kupffer. Les macrophages résidents semblent avoir un avantage compétitif sur les monocytes recrutés comme la prolifération des macrophages commence de façon plus précoce étant donné que les monocytes nouvellement arrivés doivent terminer leur différenciation en macrophages pour s'établir. Le degré d'inflammation est également corrélé à l'efficacité de l'établissement au sein de la niche (Bonnardel et al., 2019). Les mécanismes d'établissement de monocytes circulants au sein des niches sont également dépendants des organes et de leur degré d'accessibilité par les monocytes circulants. Au sein du laboratoire, nous avons mis au point différentes infections virales respiratoires générant un niveau de déplétion de la niche équivalente. Ce design expérimental a mis en évidence comme il a été décrit récemment (Aegerter et al., 2020), que même si les monocytes infiltrent la niche pour se différencier en AMs dérivés des monocytes, ce sont les AM résidents embryonnaires qui petit à petit reconstituent la niche sur le long-terme dans le cadre des infections aiguës mais pas dans le cas des infections chroniques avec l'adénovirus MAV-1 (*Mouse Adenovirus type 1*), ou persistantes comme avec le MuHV-4. Concernant les différences entre organes, les monocytes peuvent se greffer dans le cerveau dans le pool résident constituant la microglie dans des conditions bien précises (Prinz et al., 2021). Dans les conditions EAE, les monocytes sont recrutés dans le cerveau mais sont rapidement remplacés par le pool résident des macrophages constituant la microglie (Ajami, Bennett, Krieger, McNagny, & Rossi, 2011). Les monocytes participent également au remplacement du pool de cellules de Langerhans après une blessure ou une inflammation d'origine diverse (Ghigo et al., 2013). L'inflammation est nécessaire pour rendre la niche accessible et l'avantage compétitif des macrophages explique pourquoi la perte journalière de macrophages résidents ne résulte

pas en un établissement de monocytes circulants mais est compensée par la prolifération locale de macrophages résidents en conditions homéostatiques.

La **figure 15** présente les principaux facteurs influençant la biologie et le sort des macrophages résidents tissulaires.

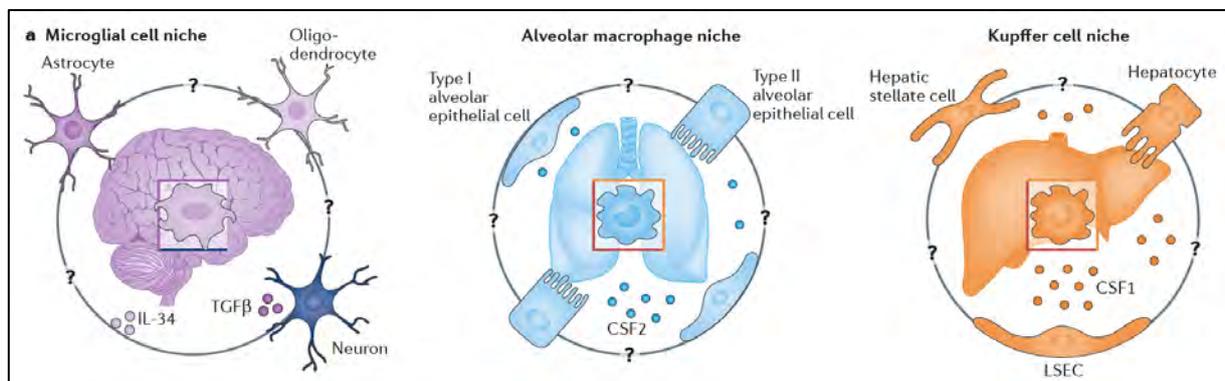


**Figure 15 : Les 4 points cardinaux de l'identité biologique des macrophages tissulaires résidents.** Le sort des macrophages tissulaires résidents dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui peuvent être résumés en 4 points cardinaux : l'origine, l'environnement local, le statut inflammatoire et la durée d'établissement au sein de la niche (Blériot et al., 2020).

La niche qui nous intéressera plus particulièrement est celle des AMs dans l'espace alvéolaire pulmonaire. Les AMs proviennent des monocytes fœtaux et colonisent l'espace alvéolaire relativement tard dans le développement, peu après la naissance (Guilliams et al., 2013). Cette ouverture tardive de la niche et la barrière épithéliale pulmonaire explique pourquoi l'accès du poumon aux monocytes dérivés de la moelle osseuse est difficile (Guilliams & Scott, 2017). Les macrophages d'origine embryonnaire se maintiennent en conditions homéostatiques et dans certains cas d'infections notamment suite à l'infection par *influenza* (Hashimoto et al., 2013).

Ces cellules résidentes se situent à l'interface de la couche épithéliale interne de l'alvéole et jouent un rôle crucial dans l'homéostasie, la surveillance immunitaire et le développement de l'organe. La niche est constituée des AECs de type I et II (Guilliams & Scott, 2017). Ces AECs produisent le CSF2, qui induit l'expression par les AMs de PPAR $\gamma$ , un facteur de transcription essentiel pour la différenciation des macrophages et leur fonction (Asada, Sasaki, Suda, Chida, & Nakamura, 2004; Schneider et al., 2014; Suzuki et al., 2008). En plus des AECs, le CSF-2 est également produit par les *innate lymphoid cells de type 2* (ILCs2) qui représentent une source majeure de production de CSF2 par les cellules hématopoïétiques au sein du poumon, révélant leur rôle également dans la constitution de la niche alvéolaire (Gschwend et al., 2021). Les AECs expriment aussi le CD200 dont le récepteur (CD200R) est exprimé par les AMs. Les macrophages jouant un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire, cette interaction régule négativement la réponse des TLRs présents en surface des AMs (Snelgrove et al., 2008). Le rôle anti-inflammatoire des macrophages résidents peut également être lié à leur production d'IFN de type I, comme les IFNs de type I diminuent la production d'IL-1 et augmentent la production d'IL-10 par les macrophages dérivés des monocytes (Guarda et al., 2011).

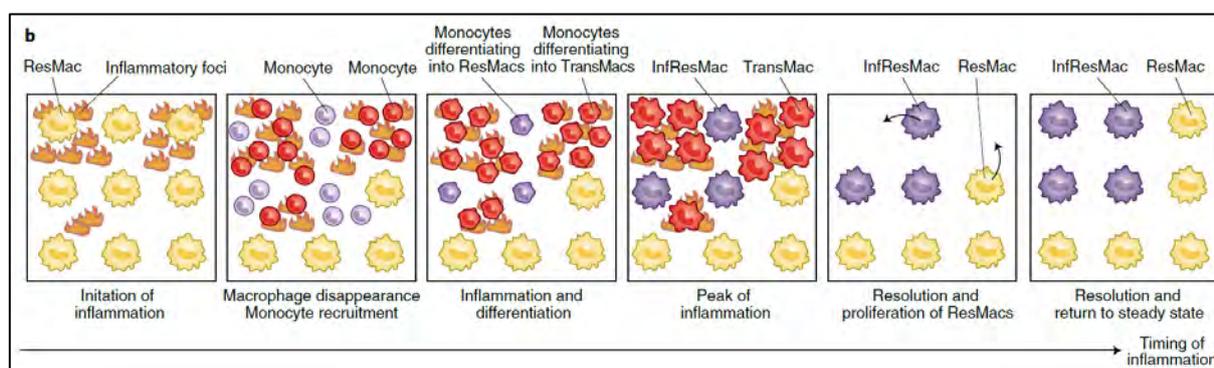
La figure suivante présente un comparatif de trois niches différentes et des facteurs régulant l'établissement des macrophages résidents spécifiques aux tissus.



**Figure 16 : Composition de la niche formée par la microglie dans le cerveau, les AMs dans le poumon et les cellules Kupffer au sein du foie.** Dans le cerveau, la niche pourrait être caractérisée par la production d'IL-34 et du facteur de croissance transformant- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-TGF $\beta$* ), et pourrait être composée d'astrocytes, de neurones ou d'oligodendrocytes, voire de toute combinaison de ces trois types de cellules. Dans le poumon, les cellules épithéliales alvéolaires de type I et/ou de type II sont susceptibles de contribuer à la niche des AMs en produisant le facteur 2 de stimulation des colonies (CSF2), tandis que dans le foie, la niche des cellules de Kupffer pourrait être composée de cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC) produisant du CSF1, d'hépatocytes et/ou de cellules stellaires hépatiques. Les points d'interrogation indiquent des mécanismes inconnus (Guilliams & Scott, 2017).

Au sein du poumon, la vieillesse et l'exposition à différentes insultes environnementales, comme les virus ou la pollution de l'air, induisent des modifications phénotypiques du pool de

macrophages résidents suggérant une contribution des monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse au cours de la vie (Morales-Nebreda, Misharin, Perlman, & Budinger, 2015). Le mécanisme permettant de remplir la niche, déplétée suite à différentes agressions semble dépendre du type d'agression et notamment du type de pathogènes induisant une inflammation causant la destruction de la niche. La **figure 17** présente la séquence générale d'évènements suite à une inflammation induisant la destruction de la niche alvéolaire. Les macrophages reconstituant la niche sont constitués d'un pool de macrophages résidents initiaux d'origine embryonnaire (*Resident macrophages-ResMac*) et d'un pool formé par les macrophages appelés résidents inflammatoires (*Inflammatory resident macrophages-InfResMac*) (Guilliams & Svedberg, 2021), c'est-à-dire dérivés des monocytes. La contribution de chaque population dépend du type d'inflammation et du pathogène, induisant la destruction de la niche alvéolaire. Les macrophages résidents au sein de la niche sont constitués d'une mosaïque de cellules aux origines embryonnaires et monocytaires au cours de la vie de l'individu.



**Figure 17 : Inflammation au sein de la niche.** L'apparition d'une inflammation et sa résolution modifie la composition du pool de macrophages pulmonaires. Un épisode inflammatoire entraîne le recrutement de monocytes. Certains monocytes recrutés peuvent se différencier en « *InfResMacs* » et persister dans le poumon (Guilliams & Svedberg, 2021).

Dans le cas d'une infection virale, la population d'AMs est déplétée et reconstituée par l'influx de monocytes provenant de la moelle osseuse, se différenciant en macrophages qualifiés par Guilliams *et al.* de macrophages résidents inflammatoires « *InfResAMs* ». Ces macrophages avaient été qualifiés de macrophages dérivés des monocytes dans le cadre de l'étude réalisée au sein de notre laboratoire (Machiels *et al.*, 2017). La proportion de monocytes s'établissant au sein de la niche est corrélée au niveau de déplétion de la niche, liée à la dose et à la virulence de l'agent pathogène. Si les AMs résidents sont présents en nombre suffisant, la prolifération locale de ceux-ci primera sur l'établissement des macrophages dérivés des monocytes. Cette variable ainsi que les conditions auxquelles sont soumises les souris expliquent notamment pourquoi certaines études montrent des incohérences sur la contribution des monocytes au pool d'AMs résidents en fonction du type de pathogène (Hashimoto *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2018). Dans la continuité de cette théorie de la niche et comme énoncé précédemment, le

laboratoire hôte a montré que l'infection respiratoire par le MuHV-4 induit la destruction de la niche alvéolaire, le recrutement de monocytes régulateurs se différenciant en AMs protégeant durablement du développement de l'asthme allergique (Machiels et al., 2017). Ces résultats challengent le paradigme des macrophages tissulaires résidents s'auto-renouvelant. Alors que la niche se reconstruit suite à une infection à *influenza* avec une contribution mineure à long terme de cellules dérivées de monocytes (Hashimoto et al., 2013), l'infection respiratoire par un  $\gamma$ HV mène au remplacement complet des AMs par les cellules dérivées des monocytes. La caractéristique de cette niche nouvellement formée réside dans l'identité phénotypique et l'expression de gènes des AMs modifiés suite à l'infection qui se maintiennent après l'infection permettant de moduler les réponses hétérologues de façon durable. Le laboratoire hôte continue l'investigation des mécanismes à l'origine de cette protection. L'infection par le MuHV-4 change l'identité phénotypique et le profil d'expression des AMs à long-terme. Concernant les signaux émanant de la niche alvéolaire suite à l'infection par le MuHV-4 et permettant la persistance des macrophages dérivés des monocytes au sein de la niche, le laboratoire a notamment mis en évidence le rôle des ILC2s comme cellules de la niche alvéolaire, essentielles à l'acquisition de l'identité des macrophages dérivés des monocytes, via potentiellement la production de GM-CSF (Loos et al., 2022). En parallèle, les monocytes maintiennent également un profil phénotypique différent caractérisé par l'expression des marqueurs MHCII et Sca-1+ dans la moelle osseuse, le sang et le poumon, cela même un mois après l'infection, indiquant que les changements induits par le virus affectent également les monocytes avant leur infiltration pulmonaire. Ces changements induits sur les AMs dérivés de monocytes sont fonctionnellement significatifs et persistants, car les AMs dérivés de souris infectées par MuHV-4 sont capables de conférer une protection contre l'asthme par transfert intratrachéal à des receveurs non infectés. Ces fonctionnalités à long-terme sur les cellules de l'immunité innée, une fois l'infection virale résolue, suggèrent des changements épigénétiques et sont associées au phénomène de *Trained immunity*.

## 2.7. Trained Immunity

Le concept de *Trained Immunity* définit la caractéristique de cellules immunitaires pouvant monter une mémoire immunitaire, non-spécifique, suite à l'exposition à un pathogène, se traduisant par une réponse différente à un challenge secondaire. De façon plus générale, la *Trained immunity* explique la cross-protection observée à l'encontre de différents pathogènes ou vaccins (Arts et al., 2018; Netea, Giamarellos-Bourboulis, et al., 2020; Netea, Quintin, & Meer, 2011) et revisite la dichotomie classique dissociant l'immunité innée, non-spécifique de l'immunité adaptative, capable de monter une mémoire immunitaire. Ce phénomène est principalement lié à des modifications épigénétiques et des reprogrammations métaboliques associées à des fonctions effectrices augmentées en cas de challenge secondaire (Netea, Domínguez-Andrés, et al., 2020). La figure suivante présente une comparaison de la mémoire générée par le système immunitaire inné et adaptatif.

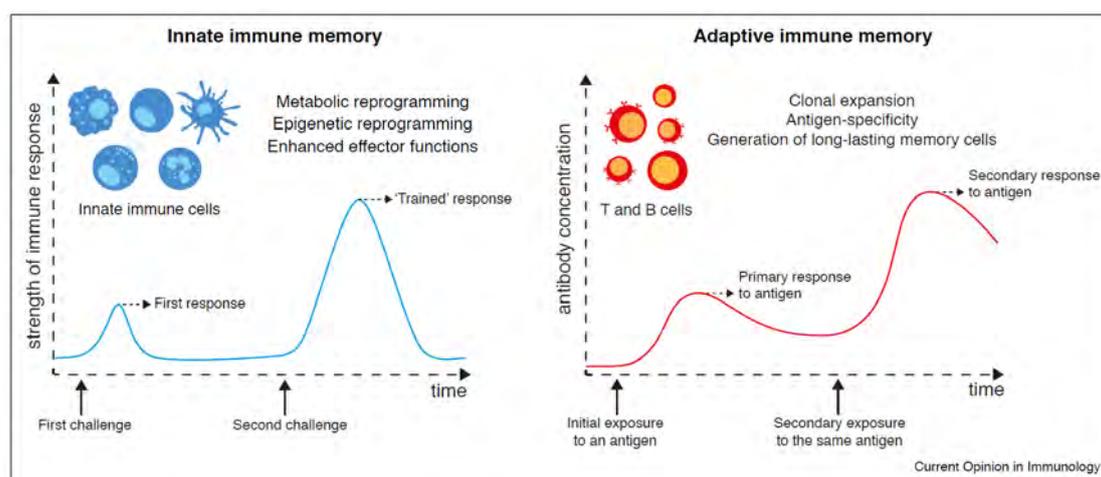


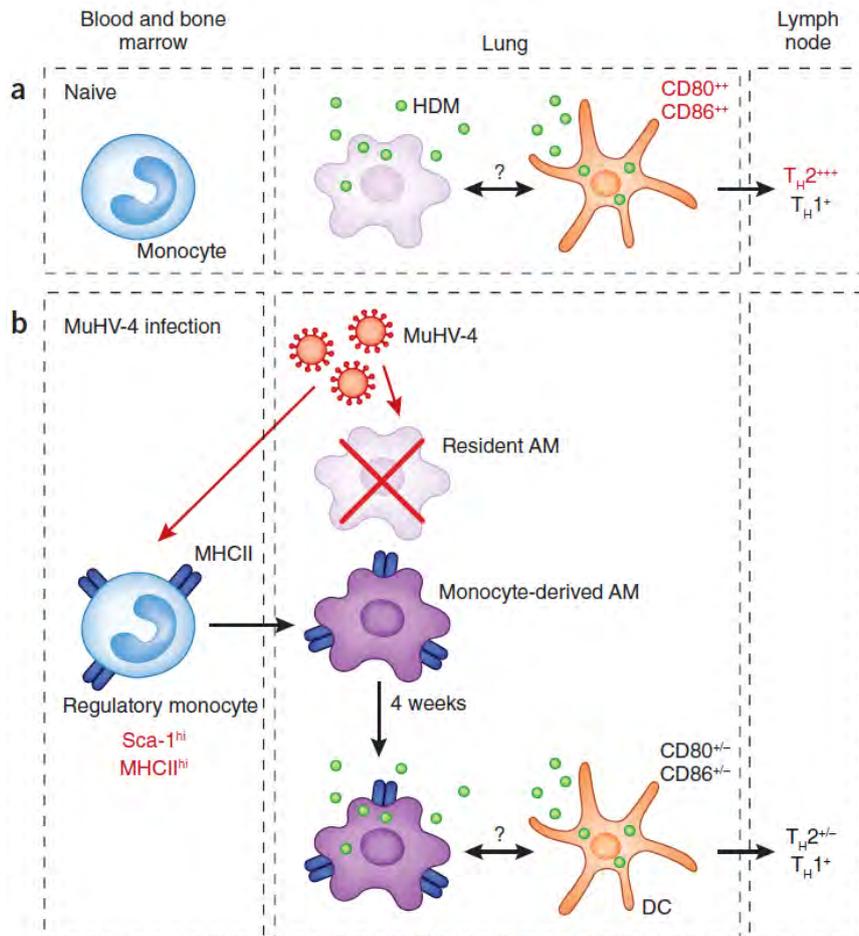
Figure 18: La mémoire immune de la réponse immune innée et adaptative (Domínguez-Andrés, Joosten, & Netea, 2019).

Alors que les réponses conduites par les lymphocytes T et B sont spécifiques d'antigènes précis, les réponses secondaires impliquant les cellules innées peuvent être déclenchées par une grande variété de stimuli différents. Le système immunitaire inné peut en effet générer une sorte de mémoire immunitaire, de façon non-spécifique, dépendante de mécanismes épigénétiques. La plupart de ces observations ont été faites initialement dans le cadre de la *Trained immunity* induite par le vaccin biliaire de Calmette et Guérin (BCG) (Kaufmann et al., 2018), l'exposition à *Candida albicans* (Domínguez-Andrés et al., 2017) ou par les  $\beta$ -glucan (Moorlag et al., 2020). La vaccination BCG induit notamment le phénomène de *Trained immunity* par l'éducation des HSCs dans la moelle et promeut la myélopoïèse (Arts et al., 2018; Kaufmann et al., 2018). Il a été démontré que la vaccination par le BCG protégeait contre les infections secondaires à *Candida albicans* (Van't Wout, Poell, & Van furth, 1992), *Schistosoma mansoni* (Tribouley, Tribouley-Duret, & Appriou, 1978) et *Mycobacterium tuberculosis* (Kaufmann et al., 2018). De même, une infection antérieure bénigne par *Candida albicans* protège contre l'exposition ultérieure à une candidose normalement létale (Bistoni et al., 1986) chez les souris athymiques et chez les souris déficientes en gène 1 activant la recombinaison (*Recombination activating gene 1-RAG1*), démontrant des mécanismes indépendants des lymphocytes T. Dans ces études, la capacité d'une infection antérieure à fournir une protection contre une infection par des pathogènes non apparentés dépendait des macrophages et de la production de cytokines pro-inflammatoires. Il est important de noter qu'une étude récente a montré que des passages multiples de *Candida albicans* dans l'intestin de souris, conduisant à une adaptation du champignon à la colonisation, entraînent une plus grande capacité à induire une immunité entraînée et une meilleure protection contre les infections non spécifiques d'une manière indépendante des lymphocytes (Wan et al., 2018).

Peu de choses sont cependant connues sur la façon dont les virus peuvent « entraîner » le système immunitaire inné. Il a été montré que l'infection par le MuHV-4 contribuait à une protection contre des infections bactériennes, indépendamment de la réponse immune adaptative. Cette protection associée à la latence augmentait la résistance à l'infection par *Listeria monocytogenes* et *Yersinia pestis*,

par une production augmentée d'IFN $\gamma$  et d'activation systémique des macrophages péritonéaux (Barton et al., 2007).

Concernant l'effet de l'infection par le MuHV-4 sur la niche alvéolaire, le MuHV-4 donne son empreinte sur l'immunité pulmonaire à deux niveaux : l'infection induit le remplacement des macrophages résidents par des monocytes et cette infection module la fonction des AMs au long-terme en réponse à des challenges hétérologues (De Laval & Sieweke, 2017). La figure suivante présente une vue d'ensemble des mécanismes décrits dans cette étude.



**Figure 19 : L'infection par le MuHV-4 protège du développement de l'asthme allergique.** L'infection par le MuHV-4 induit la mort des macrophages résidents et un afflux massif de monocytes quelques jours après l'infection. Alors qu'en conditions homéostatiques, une contribution minimale des macrophages dérivés des monocytes est observée, les AMs résidents sont complètement remplacés par des AMs dérivés des monocytes suite à l'infection. L'infection par le MuHV-4 modifie l'identité phénotypique et le profil d'expression génétique des AMs même un mois après l'infection. Les monocytes conservent un profil de régulation MHCII<sup>hi</sup>Sca-1<sup>hi</sup> dans la moelle osseuse, le sang et le poumon et ce même 3 semaines après l'infection par le MuHV-4, ce qui indique que les changements induits par le virus ont également affecté les monocytes avant qu'ils n'infiltrent le poumon. Ces observations suggèrent qu'une population de macrophages dérivés de monocytes remplaçant un pool de macrophages résidents pourrait avoir une identité épigénétique différente et des différences fonctionnelles persistantes par rapport à la population résidente qu'elle remplace. Ces résultats indiquent que le remplacement des AMs embryonnaires par des monocytes régulateurs pré-éduqués dans la moelle est un mécanisme clé façonnant la réponse immune du poumon à long-terme après une infection par un  $\gamma$ HV (De Laval & Sieweke, 2017).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire afin d'investiguer, en lien avec la théorie de l'hygiène, l'impact des infections par les  $\gamma$ HVs sur le développement de l'asthme allergique. Cette étude se basait sur l'observation faite selon laquelle dans les années 1980, les enfants ayant grandi dans des conditions les exposant à des infections (vie avec des animaux de compagnie, de ferme, environnement extérieur,...) étaient moins enclins à développer une réaction asthmatique allergique. Ces observations ont conduit à la formulation de l'hypothèse de l'hygiène postulant que la diminution d'exposition durant l'enfance à des agents infectieux était liée à une augmentation de l'incidence de l'asthme et des allergies dans la vie future. Concernant les  $\gamma$ HVs, il a été montré que l'infection dans l'enfance par l'EBV chez l'homme protégeait du risque de développer une sensibilisation IgE (Saghafian-Hedengren et al., 2010). En parallèle, il faut noter que l'infection par l'EBV a lieu de plus en plus tard dans les populations issues de pays industrialisés et ne permet donc pas de rencontrer le pathogène durant la fenêtre de vie où le système immunitaire est le plus susceptible de réagir, appuyant également la théorie de l'hygiène (Fourcade et al., 2017; Kuri et al., 2020).

On peut se demander à quel endroit et à quel moment, la fonction des monocytes est établie. Comme expliqué précédemment, la vision classique selon laquelle les signaux tissulaires locaux permettent l'acquisition de la fonctionnalité des monocytes se différenciant en macrophages propres à chaque tissu est revisitée. Une étude a en effet challengé ce paradigme en montrant un modèle séquentiel de différenciation des monocytes après une infection par *Toxoplasma gondii*, où les monocytes sont éduqués dans la moelle osseuse (Askenase et al., 2015). Cette étude met en évidence les signaux et les connexions entre les tissus enflammés et la moelle osseuse, productrice de monocytes à partir des HSCs. La nature de l'infection dans l'éducation du système immunitaire revêt également toute son importance soulignant le rôle crucial des  $\gamma$ HVs dans l'éducation du système immunitaire de l'hôte. Alors que le MuHV-4 induit une protection contre l'asthme, une infection par un pneumovirus murin (*Pneumonia virus of mice*-PVM) induit des exacerbations de l'asthme (Busse, Lemanske, & Gern, 2010) et un désordre de la balance Th1/Th2 au profit de la réponse allergique (P. Wu & Hartert, 2011). Il est intéressant également d'observer que l'infection par le MuHV-4 permet d'apporter une protection contre les immunopathologies induites par les pneumovirus en modifiant également le phénotype des lymphocytes T CD8 (Dourcy et al., 2020; Gurczynski & Moore, 2020). Les mécanismes ne sont pas complètement compris et la potentielle contribution de monocytes primés de façon différente dans différents contextes d'infections à partir de la moelle reste inconnue. La compréhension des voies qui régulent la diversité fonctionnelle des monocytes et des cellules dérivées des monocytes est une question importante. Bien que bénéfiques dans certaines situations, ces monocytes peuvent notamment être impliqués dans l'exacerbation de l'inflammation dans certaines maladies aiguës et chroniques et être à l'origine d'immunopathologies.

### 3. Les immunopathologies virales

Une immunopathologie se définit comme un état de déséquilibre entre les mécanismes immunitaires visant à éliminer l'agent infectieux et les dommages induits chez l'hôte par la réponse immunitaire elle-même. Les immunopathologies d'origine respiratoire sont majoritairement décrites dans les infections virales à *influenza*. Récemment, le SARS-CoV-2 a également montré ses capacités pathologiques par l'induction d'une tempête cytokinique et de dysrégulation des réponses immunitaires. La menace permanente que représente l'émergence de nouveaux virus respiratoires hautement pathogènes comme le SARS-CoV-2 ou les épidémies à *influenza* souligne la nécessité de comprendre les mécanismes immunitaires qui participent à l'équilibre de la réponse immune. Alors que l'infection respiratoire par le MuHV-4 est un modèle d'infection virale pulmonaire induisant une faible symptomatologie, nous souhaitons investiguer les mécanismes cellulaires et moléculaires, activés par les  $\gamma$ HVs, pour mieux comprendre sur quoi repose l'équilibre entre les mécanismes de régulation et les immunopathologies induites par les virus respiratoires hautement pathogènes. Nous investiguerons particulièrement le rôle des monocytes recrutés au sein du poumon dans le maintien de cet équilibre. Nous présenterons dans ce chapitre un aperçu des événements menant au déclenchement d'une tempête cytokinique d'origine pulmonaire.

#### 3.1. La sphère pulmonaire

Les agents infectieux symbiotiques ou pathogènes sont des facteurs environnementaux clés qui jouent un rôle fondamental dans l'induction, la maintenance et le profil des réponses immunes de l'hôte (Belkaid & Harrison, 2017; Belkaid & Tamoutounour, 2016; Thaïss, Zmora, Levy, & Elinav, 2016). De telles interactions dynamiques entre l'hôte et les pathogènes doivent être finement régulées pour équilibrer l'induction d'une réponse immune protectrice et l'induction de mécanismes régulateurs de cette dernière. En effet, le tractus respiratoire est continuellement exposé à l'environnement extérieur de par sa fonction d'interface et d'échanges gazeux sanguins entre le monde extérieur et l'organisme. Un dialogue étroit a lieu entre les microbes et les cellules résidentes du poumon et est essentiel pour façonner la réponse immune au long-terme (Lloyd & Marsland, 2017).

Dans le cadre d'une infection virale, l'élimination des particules virales et la résolution de l'infection requièrent une réponse immunitaire complexe, aux facettes multiples et sont initiées par les cellules résidentes du tractus respiratoire. Un cocktail de médiateurs est libéré afin d'activer les cellules de l'immunité innée et recruter les cellules de l'immunité adaptative dans une cinétique complexe, multiple et organisée. Alors qu'une réponse antivirale est indispensable pour répondre rapidement aux agressions, une réponse prolongée ou exagérée peut avoir des conséquences néfastes à long terme pour l'organe et les échanges gazeux induisant des répercussions systémiques pour l'hôte. La réponse immunitaire antivirale doit donc être équilibrée de façon à permettre un contrôle de l'agent viral tout en

limitant les dommages créés par la réponse immunitaire elle-même. L'infection par un virus induit des dégâts cellulaires et une modification des fonctions des organes infectés dans les cas majeurs. La destruction de cellules constituant le tissu et l'organe fonctionnel peut résulter directement de la réplication du virus mais peut être également due à une réponse immunitaire exagérée envers le pathogène. De par ces caractéristiques, le poumon est une cible particulièrement sensible aux phénomènes d'immunopathologies.

### 3.2. La tempête cytokinique

L'intensité de la réponse inflammatoire est le résultat d'une balance entre les mécanismes pro-inflammatoires et les mécanismes anti-inflammatoires mis en place. En effet, pour chaque stimulation, des boucles de régulation négative sont mises en place comme frein, que ce soit par le contrôle de l'activation des cellules effectrices en limitant leur activité et la production de molécules pro-inflammatoires. La production de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 produites par les cellules myéloïdes et lymphoïdes dans des niveaux dépendant du contexte d'infection, représente un mécanisme nécessaire à la régulation négative de la réponse inflammatoire. Le cocktail de médiateurs pro-inflammatoires libérés lors de l'infection peut mener au développement d'une tempête cytokinique.

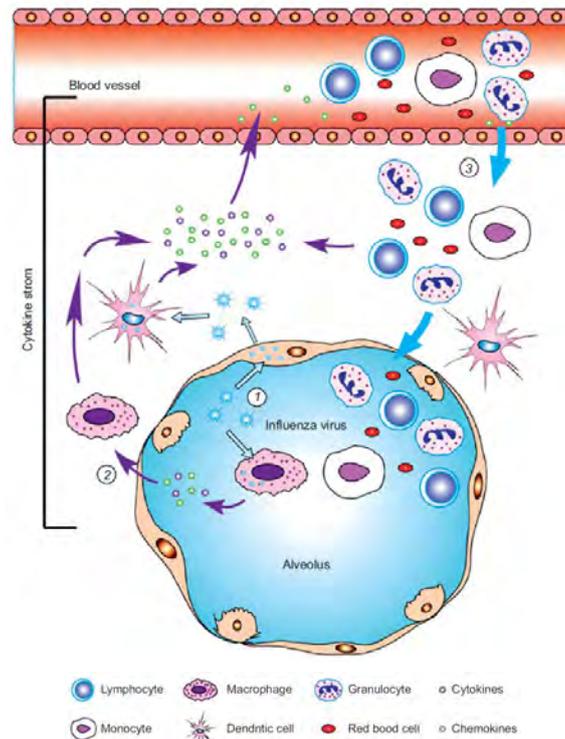
Avant d'aller plus en détails dans la notion d'immunopathologie et les conséquences systémiques d'une tempête cytokinique, il est important de bien comprendre la notion de processus inflammatoire. L'inflammation commence premièrement au site local qui subit l'agression d'origine diverse (mécanique, infectieuse, ...). Les signes distinctifs de l'inflammation sont la rougeur (*rubor*), le gonflement et l'œdème (*tumor*), la chaleur (*calor*), la douleur (*dolor*) et la perte de fonction (*functio laesa*). Localisée dans un tissu, cette inflammation permet l'augmentation du flux sanguin, l'arrivée par voie vasculaire et l'extravasation des leucocytes et des protéines plasmatiques sur le site de l'inflammation ainsi qu'une augmentation locale de la température. Ces réponses inflammatoires engendrent parfois en fonction de l'intensité de la réponse, des effets fonctionnels sur l'organe notamment par l'œdème généré, augmentant la pression extravasculaire et diminuant la perfusion tissulaire.

La définition générale de la *tempête cytokinique* est la libération massive et incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires. Le terme apparaît pour la première fois en 1993 dans un phénomène de GVHD (*graft-versus-host-disease*), se caractérisant par la réaction du greffon contre l'hôte où les cellules immunocompétentes du donneur réagissent contre les tissus du receveur (Ferrara, Abhyankar, & Gilliland, 1993). Historiquement, les études s'étaient intéressées à l'origine de la tempête cytokinique responsable de syndromes et de pathologies comme le GVHD, la sclérose en plaque, les phénomènes de pancréatite aiguë et le syndrome de dysfonction multiple d'organes. Les tempêtes cytokiniques et les réactions immunitaires indésirables lors de traitements médicaux (*Immune-related Adverse Effects-*

irAES) sont également observées très fréquemment lors de thérapies à l'aide de la technologie « CAR T-cell » (*Chimeric antigen receptors*) où les lymphocytes T sont prélevés du patient, modifiés *ex-vivo* par addition d'un gène codant pour un récepteur particulier, permettant la reconnaissance d'un antigène spécifique de la cellule cancéreuse par les lymphocytes T réadministrés au patient (Adkins, 2019). Les traitements à l'aide d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaires comme les inhibiteurs PD-1, PD-L1 sont également très fréquemment à l'origine de réactions inflammatoires systémiques (Sonpavde, Grivas, Lin, Hennessy, & Hunt, 2021). L'utilisation de ce terme dans des maladies infectieuses apparaît dans les années 2000 dans le cadre d'infection par le CMV (Barry, Johnson, & Janossy, 2000), par la bactérie *Streptococcus* (Bisno, Brito, & Collins, 2003), par l'EBV et la HLH associée (Imashuku, 2002). Le terme est maintenant largement utilisé principalement dans les infections pulmonaires virales à *influenza* (Yokota, 2003) et à SARS-CoV-2 (Tang et al., 2020) et est une cause majeure de morbidité et mortalité dans ces infections. Bien que la tempête cytokinique soit facilement objectivée, les mécanismes qui induisent cette cascade d'événements incontrôlés ne sont pas bien compris. La compréhension des mécanismes moléculaires permettrait de mettre en place des cibles thérapeutiques afin de diminuer l'intensité de la réponse. Dans le contexte d'infection virale, les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiels ont été investigués principalement dans le cadre d'infections à *influenza* (J. Peiris, Hui, & Yen, 2010; J. S. M. Peiris, Cheung, Leung, & Nicholls, 2009).

### 3.3. Acteurs et mécanismes

Suite à l'infection virale, les mécanismes cytotoxiques détruisent les cellules infectées pour éliminer le virus et le tissu se réorganise pour restaurer son architecture initiale. Les symptômes induits par les virus respiratoires hautement pathogènes peuvent être le résultat de dommages collatéraux induits par les cellules effectrices de l'immunité. Ces cellules en produisant et libérant des cytokines inflammatoires induisent notamment la destruction d'autres cellules non-infectées. Par exemple, la production trop importante d'IFN de type I et III est notamment connue pour aggraver l'infection pulmonaire à *influenza* en empêchant la réparation du tissu épithélial (Major et al., 2020). Cet état d'hyperactivation du système immunitaire est la cause de la pneumonie aiguë et est responsable des dommages tissulaires principaux. Au-delà des effets locaux sur le tissu, les cytokines sont libérées dans la circulation sanguine induisant des effets systémiques plus larges. Les principaux acteurs impliqués lors de tempête cytokinique par l'infection à *influenza* sont décrits dans la **figure suivante** :



**Figure 20 : Tempête cytokinique dans le poumon lors d'infection à *influenza*.** Tempête de cytokines dans le poumon après infection par *influenza*. (1) Les virus infectent les cellules épithéliales pulmonaires et les AMs pour produire des virions et libérer des cytokines/chimiokines (principalement composées des IFNs). (2) Les AMs activés par les cytokines/chimiokines et les DCs infectées par le virus entraînent une réponse immunitaire plus étendue et le déclenchement d'une tempête de cytokines. (3) Les chimiokines libérées attirent davantage de cellules inflammatoires qui migrent des vaisseaux sanguins vers le site de l'inflammation, et ces cellules libèrent des chimiokines/cytokines supplémentaires pour amplifier la tempête de cytokines (Q. Liu, Zhou, & Yang, 2016).

Les cellules épithéliales sécrètent une large gamme de cytokines pro-inflammatoires (IFN, IL-6, TNF $\alpha$ , GM-CSF) suite à l'infection virale à *influenza* (J. Peiris et al., 2010). Les cellules endothéliales jouent également un rôle orchestrateur central dans l'amplification de la réponse en cytokines lors d'infection par *influenza* (Teijaro et al., 2011). Enfin, les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, neutrophiles), activées par l'action des premières cytokines libérées par les cellules épithéliales et endothéliales, libèrent à leur tour des taux importants de cytokines permettant l'activation et le recrutement des cellules de l'immunité adaptative (Q. Liu et al., 2016; Vanderbeke et al., 2021). Les lymphocytes T CD4 et CD8 jouent également un rôle majeur dans les immunopathologies par leur sécrétion en cytokines et leurs rôles effecteurs notamment au niveau de la magnitude de la lyse des cellules infectées. Comme nous nous intéresserons particulièrement au rôle des monocytes au cours de cette étude, il est important de rappeler que les monocytes en fonction des conditions peuvent avoir un rôle d'exacerbation de l'inflammation ou au contraire de régulation de l'inflammation lors d'infection microbienne. En effet, l'accumulation de monocytes observée dans les infections à *influenza* induit une aggravation de la maladie. En utilisant des souris CCR2<sup>-/-</sup>, l'infection par une souche *influenza* réduit l'infiltration leucocytaire, la tempête cytokinique et l'expression d'*iNOS* (Lin et al., 2014). Dans le cas

d'une infection à *Toxoplasma gondii*, les monocytes possèdent des propriétés régulatrices et acquièrent ces compétences dans la moelle osseuse (Askenase et al., 2015).

Les cytokines associées à la tempête cytokinique regroupent principalement le groupe **des IFNs, les ILs, les chimiokines, les CSFs, et le TNF**. Elles sont définies comme un groupe de protéines de petite taille qui sont sécrétées par les cellules dans un but de communication intercellulaire et d'activation de voies de signalisations spécifiques. Suite à la liaison du récepteur, la réponse peut être très variée dépendant de la cytokine elle-même, de sa concentration, du contexte d'inflammation, de la cellule cible et du récepteur associé. Les cytokines produites de façon différenciée forment un cocktail cytokinique spécifique déterminant l'orientation de la réponse immune et expliquant notamment leurs fonctions pléomorphes. La liaison de la cytokine à son récepteur engendre une cascade d'activation au sein de la cellule permettant la mise en place de réponses effectrices. Parmi les fonctions biologiques, ces cytokines augmentent les voies d'activation de la phase aiguë de l'inflammation, augmentent le trafic des cellules effectrices jusqu'au site d'infection primaire, activent les cellules épithéliales et la production secondaire de cytokines. De par la diversité de fonctions, la classification des cytokines reste un challenge. Les réponses pléomorphiques de chaque cytokine induisent un réseau avec un grand nombre de chevauchements entre chaque voie d'activation stimulée. Cette combinaison de chevauchements et de redondance a des implications importantes pour identifier les étapes clés de la réponse cytokinaire suite à une infection.

Les **IFNs** sont classifiés en 3 types majeurs : type I, II et III. Les IFN de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) agissent en liant le récepteur IFNAR1 et IFNAR2. L'IFN de type II (IFN $\gamma$ ) lie le récepteur IFN- $\gamma$ R1 et IFN- $\gamma$ R2 alors que les IFN  $\lambda$  (type III) agissant en liant le récepteur IFNLR, constituent une nouvelle classe d'IFNs aux propriétés antivirales, protégeant notamment la souris contre les infections à *influenza* (Klinkhammer et al., 2018). La liaison du récepteur induit une cascade de signalisation en aval menant à l'activation de facteurs de transcription et l'induction de gènes stimulés par les IFNs.

Parmi les **ILs**, les principales molécules pro-inflammatoires sont l'IL1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-18. Ces ILs sont libérées rapidement après l'infection et sont des marqueurs biologiques pour évaluer la magnitude de la réponse en cytokine associée aux syndromes respiratoires sévères aigus. L'IL-6 est notamment utilisée comme un marqueur biologique permettant d'objectiver la magnitude de la réponse en cytokines, le *sepsis* et les syndromes respiratoires aigus sévères dans le cas des infections à SARS-CoV-2 (Santa Cruz et al., 2021).

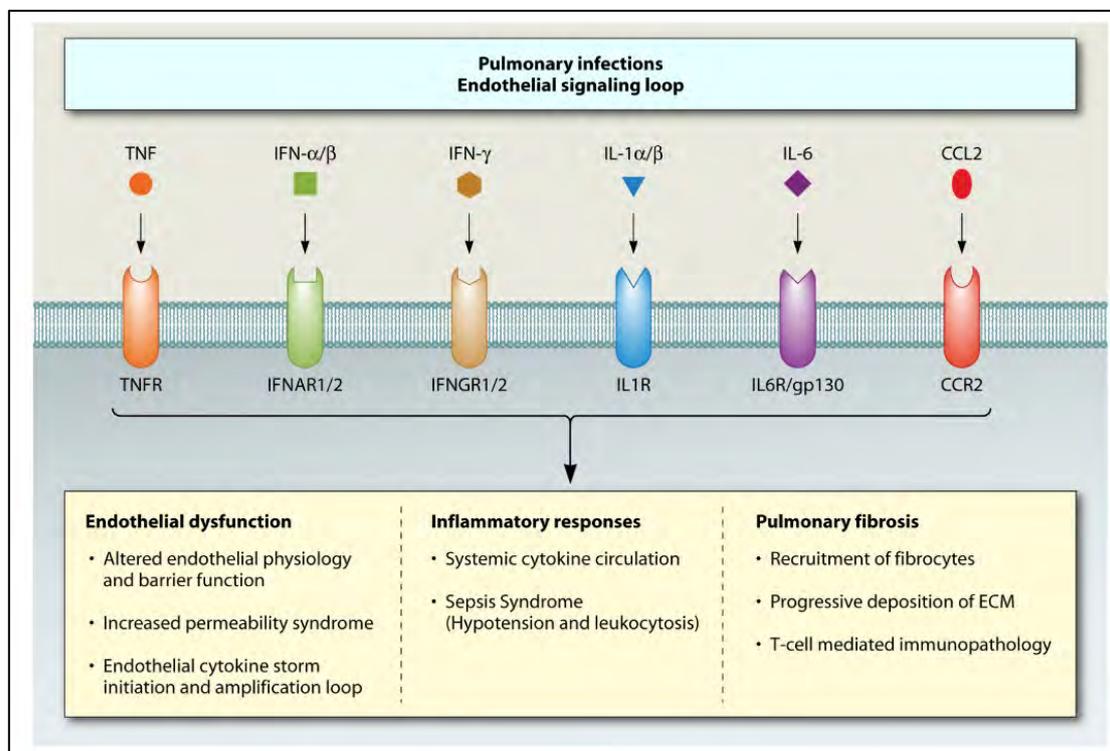
Les chimiokines représentent la famille la plus vaste de cytokines et se lient à des récepteurs couplés à des protéines-G. Ces protéines sécrétées sont divisées en 4 groupes de par leurs motifs (CXC, CC, C, CX<sub>3</sub>C), dépendant des deux premiers résidus cystéine. Les chimiokines comme leur nom l'indique, sont chemoattractantes et contrôlent la migration des cellules immunes, le développement et

la fonction du système immunitaire inné et adaptatif et contribuent également à différents processus majeurs divers comme l'embryogenèse et les processus métastatiques des cancers (Raman, Sobolik-Delmaire, & Richmond, 2011). Les chimiokines induisent le recrutement sélectif de cellules spécifiques à l'interaction ligand-récepteur. La libération de chimiokines pro-inflammatoires permet le recrutement coordonné de cellules immunitaires comme les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes jusqu'au site d'infection. L'exemple le plus évident dans notre cas est la sécrétion de la chimiokine CCL2 pour le recrutement des monocytes, portant à leur surface le récepteur CCR2.

Les CSF comme le GM-CSF, le M-CSF ou le *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) stimulent la prolifération et la différenciation des HSCs dans la moelle. Outre les mécanismes dans la moelle osseuse permettant la différenciation de cellules en réponse à l'infection, ces facteurs peuvent également faire partie d'une boucle d'auto-amplification *in situ* pour maintenir les réactions inflammatoires (Tisoncik et al., 2012).

Le TNF fait partie des cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées et son rôle est largement reporté dans la littérature comme acteur de la tempête cytokinique. Il est considéré comme une cytokine majeure dans les infections virales aiguës. A l'instar des ILs, le récepteur du TNF (TNFR1) est exprimé sur tous les types cellulaires, impliquant la fonction pléomorphique de cette cytokine.

La figure suivante récapitule les principaux médiateurs pro-inflammatoires au niveau du poumon et les effets associés.



**Figure 21 : Médiateurs de la tempête de cytokines et phénotypes associés à l'issue de l'infection.** Le diagramme montre les rôles fonctionnels des principales cytokines et chimiokines et leurs récepteurs dans le développement des principaux symptômes cliniques associés à la tempête de cytokines. La redondance des voies de signalisation des cytokines et des chimiokines est soulignée (Tisoncik et al., 2012).

Concernant les cytokines d'intérêt liées à l'infection par les  $\gamma$ HVs, une attention particulière sera accordée au cours de cette étude sur les IL-6 et IL-10. Le KSHV exprime notamment un homologue viral de l'IL-6 (vIL-6) qui est induit par la liaison des IRFs de l'hôte à la région promotrice de vIL-6 (Chatterjee, Osborne, Bestetti, Chang, & Moore, 2002). L'IL-6 joue un rôle central dans la tempête cytokinique. Associé notamment à la sévérité du syndrome cytokinique dans le cas du SARS-CoV-2 (C. Zhang, Wu, Li, Zhao, & Wang, 2020), c'est une cytokine aux multiples fonctions avec des effets principalement pro-inflammatoires. La liaison de l'IL-6 à son récepteur induit l'activation de voies intracellulaires. Dans le signal classique de transduction du signal, l'IL-6 forme avec son récepteur (IL-6R) un complexe et se lie à la gp130 pour initier le signal intracellulaire et l'expression de gènes spécifiques. Cette liaison active les voies JAK-STAT et notamment l'expression des facteurs de transcription STAT1, STAT3 et les voies MAPK, AKT-PI3K et SRC-YAP-NOTCH (Villarino, Kanno, & O'Shea, 2017; Zegeye et al., 2018). Ces différentes voies d'activation permettent la prolifération de cellules T, l'activation et la différenciation des cellules B ainsi que des modifications biologiques à l'échelle de l'hôte de façon plus générale comme des altérations au niveau du métabolisme des lipides, de l'insuline, l'activation de la production par les hépatocytes de protéines réactives associées à la phase aiguë (*C-reactive protein*-CRP) et l'activation des HSCs. L'IL-6 sert également comme biomarqueur de l'inflammation ayant également une valeur pronostique chez les patients admis aux soins intensifs, les hauts taux sanguins étant corrélés à la sévérité et au développement de maladies cardiaques et inflammatoires lors d'ischémie cardiaque, d'athérosclérose coronaire, d'hypertension et d'arthrite rhumatoïde (Fraunberger et al., 2006; Hunter & Jones, 2015; Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014).

L'EBV code pour un homologue viral de l'IL-10 (vIL-10) (Ressing et al., 2008). Cette cytokine est codée par le gène BCRF1 et montre des propriétés structurales et fonctionnelles similaires à la cytokine humaine IL-10 (Moore et al., 1990). Fonctionnellement, les IL-10 humaine et virale suppriment la production d'IL-2 et la prolifération des cellules T en réponse à un antigène, inhibent la production d'IFN $\gamma$  et diminuent la production de cytokines par les cellules immunes (Kanegane et al., 1997). L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice qui régule et supprime notamment l'expression de cytokines pro-inflammatoires et limite le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif. C'est une cytokine considérée comme un régulateur négatif de l'inflammation. De la même façon que pour les autres cytokines et en fonction des contextes, l'IL-10 peut également avoir un rôle pro-inflammatoire. Au niveau pulmonaire, la signalisation de l'IL-10 semble nécessaire pour que les macrophages induisent leurs fonctions anti-inflammatoires. L'induction de l'IL-10 se fait de façon concomitante aux voies pro-inflammatoires activées suite à l'infection virale notamment via

l'engagement des TLRs et la production d'IFN de type I, en contrebalançant les signaux inflammatoires induits par les PAMPs (Rojas, Avia, Martín, & Sevilla, 2017). L'IL-10 se lie au niveau de son récepteur (IL-10R) et active la voie JAK-STAT permettant l'activation de facteurs de transcription STAT1 et STAT3 où leur phosphorylation permet la translocation vers le noyau en quelques secondes pour activer l'expression de gènes cibles de la réponse anti-inflammatoire et réprimant l'activation des gènes pro-inflammatoires comme l'expression des cytokines TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 (Hutchins, Diez, & Miranda-Saavedra, 2013).

Lors d'une infection par MuHV-4, une augmentation de la production d'IL-10 endogène est observée, associée à une augmentation de la charge virale latente, une diminution de la production d'IL-12 et une limitation de la splénomégalie et de la leucocytose (Peacock & Bost, 2001). Nous investiguerons le rôle des IL-6 et IL-10 dans la réponse inflammatoire lors de la phase aiguë de l'infection pulmonaire par le MuHV-4.

### 3.5. Effets systémiques

Les infections au niveau de la sphère pulmonaire induisent des inflammations si massives lors d'immunopathologies que les éléments sont également captés et mesurables dans la circulation sanguine. Ces éléments libérés dans la circulation sanguine ont également des effets majeurs sur les organes. La localisation précise de l'infection primaire au sein du tissu n'est pas un déterminant de l'intensité et la sévérité des effets locaux et systémiques de la tempête cytokinique. En effet, alors que les virus induisent des destructions et la lyse de cellules différentes, ces infections mènent en cas d'immunopathologies à un tableau clinique semblable quel que soit l'agent pathogène initiateur, de syndrome respiratoire aigu avec une détresse respiratoire, un sepsis et une tempête cytokinique démontrant bien le rôle de cette dysfonction immunitaire plutôt que l'origine de l'agent infectieux et la destruction localisée de cellules permissives à l'infection (Ragab, Salah, Taeimah, Khattab, & Salem, 2020).

La tempête cytokinique est en effet amplifiée par une infection locale sévère qui se répercute au niveau de la circulation sanguine produisant un sepsis systémique. Le sepsis est défini comme un état inflammatoire systémique aigu suite à une infection (bactérienne, parasitaire, fongique ou virale), entraînant la perte de fonction des organes vitaux et un risque vital pour le patient. Ce profil inflammatoire induit des désordres systémiques majeurs associés à des phénomènes d'hypotension, de vasodilatation, de phénomènes d'ischémie-reperfusions, d'hyper/hypothermie, des phénomènes de leucocytose ou de leucopénie et parfois de thrombocytopénie (Chousterman, Swirski, & Weber, 2017), entraînant à terme des modifications vasculaires majeures et le syndrome de dysfonctionnement multiple des organes (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome-MODS*) (Fry, 2012).

Au niveau cinétique, les cytokines apparaissent dans la circulation sanguine à différents moments. L'IL-1 $\beta$  est précoce (dans les premières minutes et heures post-infection) alors que l'IL-6 arrive plus tardivement. La figure suivante représente les différents organes et signes cliniques associés à un syndrome inflammatoire aigu lors d'une infection par le SARS-CoV-2. Les reins, le foie, le poumon, le système gastro-intestinal et le cœur sont les organes les plus impactés.

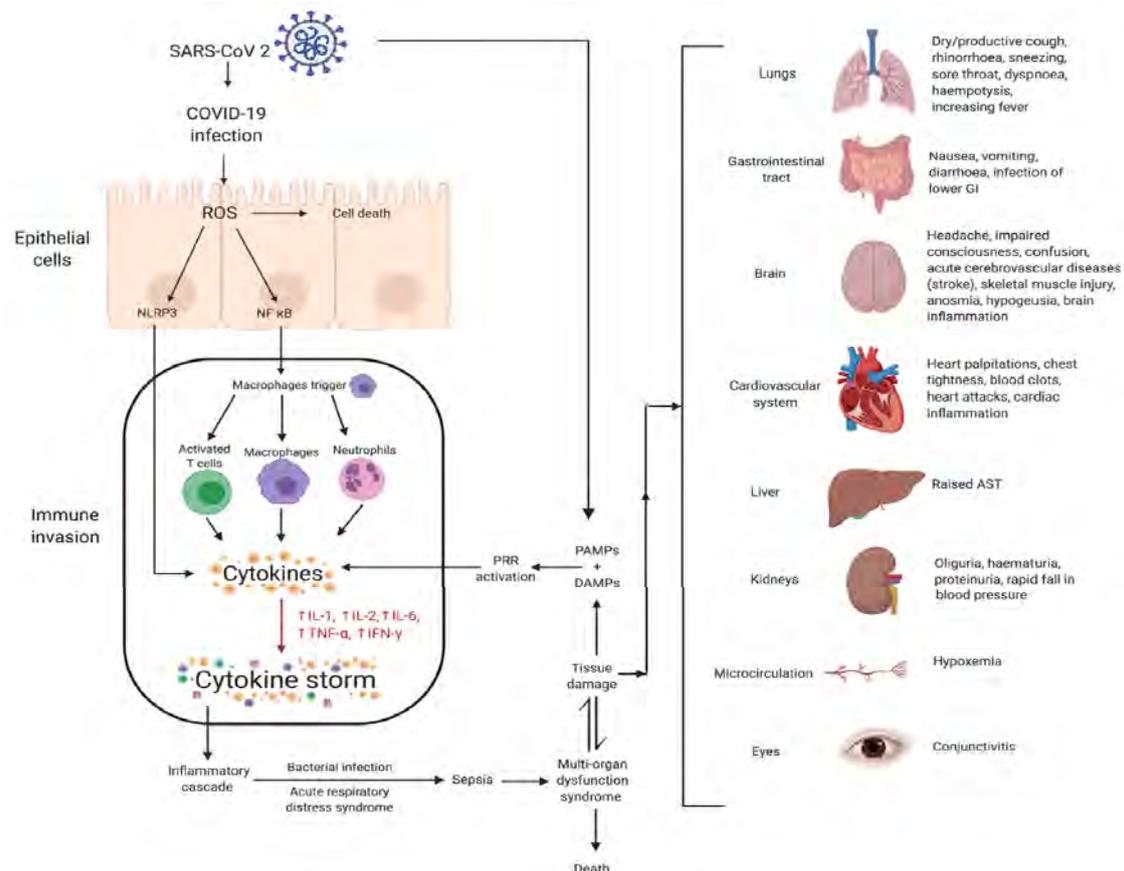


Figure 22 : Mécanismes de la tempête cytokinique induite par l'infection à SARS-CoV-2 et dommages associés (Bhaskar et al., 2020).

### 3.6. Les immunopathologies liées à l'EBV et le KSHV

Outre les virus respiratoires hautement pathogènes comme *influenza* ou le SARS-CoV-2, les  $\gamma$ HVs induisent des immunopathologies notamment chez des patients immunodéprimés ou soumis à des traitements anti-cancéreux par immunothérapie tels que lors du blocage des axes de régulation PD-1, PD-L1 (Caro-Vegas *et al.*, 2020; Mărginean, Molnar and Chinceșan, 2020). Comme dit précédemment, les  $\gamma$ HVs ont co-évolué avec leur hôte dans une relation symbiotique depuis plusieurs millions d'années et ont développé des mécanismes d'adaptation et de régulation du système immunitaire de l'hôte lui-même. Dans un état d'équilibre, les infections par les  $\gamma$ HVs induisent des infections majoritairement inaperçues, n'induisant pas d'inflammation majeure, avec une réplication virale contrôlée et la mise en place d'une latence asymptomatique. Dans certains cas, par des mécanismes encore incompris

aujourd'hui, une rupture s'opère dans le système d'équilibre et l'infection par EBV peut notamment causer des symptômes majeurs et débilissants pour l'hôte comme le développement de la HLH (Marsh, 2018), la sclérose en plaque (Kjetil et al., 2022) et la maladie inflammatoire chronique du colon (S. Wu, He, Tang, & Li, 2019). Ces maladies sont le résultat d'une immunopathologie et les mécanismes doivent être investigués. Parmi ces immunopathologies d'importance majeure liées à l'EBV, la HLH est un syndrome sévère, d'hyperinflammation (Marsh, 2018). Les symptômes incluent de la fièvre, une splénomégalie, une cytopénie, une coagulopathie ainsi que des désordres neurologiques et peuvent se révéler fatal pour le patient (Mărginean et al., 2020). Il a été établi dans les années 1950 que la pathologie HLH avait une composante héréditaire et génétique par l'observation de phénomènes de HLH familiale (Farquhar & Claireaux, 1952). Cette pathologie est retrouvée notamment chez des patients présentant des mutations au niveau du gène codant pour la Prf-1 (Stepp et al., 1999). La Prf-1 est contenue dans les granules cytotoxiques des cellules NK et des cellules T qui sont libérées de façon ciblée pour tuer spécifiquement les cellules infectées. Lorsque la machinerie nécessaire à ce processus est brisée, les cellules cibles visées ne meurent pas et continuent de stimuler les cellules immunitaires, ce qui entraîne une activation et une prolifération continues des cellules immunitaires et un cercle vicieux d'hyperinflammation pouvant être à l'origine du syndrome HLH. Il est reporté également que des patients atteints d'HLH présentent des défauts génétiques au niveau des récepteurs du TNF et des fonctions de l'inflammasome ainsi que des altérations de la voie de régulation des lymphocytes T via CTLA-4 (Arnold, Chellapandian, & Leiding, 2021; Yabal et al., 2014).

Un autre syndrome inflammatoire observé lors d'infection par les  $\gamma$ HVs est le KICS. Ce syndrome inflammatoire apparaît chez des patients infectés par le KSHV et atteints d'immunodéficience sévère. Le tableau clinique est identique à celui décrit pour l'HLH : désordres gastro-intestinaux, hypoalbuminémie, thrombocytopenie, syndrome de détresse respiratoire aiguë, choc hémodynamique (Polizzotto et al., 2016). Parmi les patients atteints par le KSHV et le HIV, le KICS est une importante cause de morbidité et de mortalité (Karass, Grossniklaus, Seoud, Jain, & Goldstein, 2017). Le KICS représente la forme la plus grave et fatale d'infection par le KSHV. Il est associé à une réplication virale systémique élevée et une tempête cytokinique dominée par la production d'IL-6 et d'IL-10 (Caro-Vegas et al., 2020).

Comprendre quelles voies sont dérégulées dans le cas des immunopathologies associées à l'EBV et au KSHV est d'une importance majeure afin de trouver des cibles thérapeutiques permettant le contrôle des voies inflammatoires hyperactivées lors de ces syndromes. En utilisant le MuHV-4 dans un modèle d'infection pulmonaire, nous investiguons dans cette étude les différentes populations de cellules immunes qui jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation développée lors de l'infection primaire. En comprenant les mécanismes d'immunorégulation induits par les  $\gamma$ HVs, acteurs

majeurs de la modulation de l'immunité de l'hôte, cette étude a pour but de disséquer les mécanismes à la base des maladies inflammatoires pulmonaires et systémiques.



---

# Objectifs

---



## *Objectifs*

Les agents infectieux symbiotiques ou pathogènes sont des facteurs environnementaux clés qui jouent un rôle fondamental dans l'induction, la maintenance et le profil du système immunitaire de l'hôte. De telles interactions dynamiques entre l'hôte et les pathogènes doivent être finement régulées pour équilibrer l'induction d'une réponse immune protectrice et l'induction de mécanismes régulateurs de cette dernière. Comprendre les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire antivirale est un point crucial afin de trouver des pistes thérapeutiques lors de syndromes inflammatoires systémiques, résultant d'une activation excessive du système immunitaire, délétères pour l'hôte.

Le laboratoire hôte a montré que l'infection par le MuHV-4 protégeait du développement de l'asthme allergique en induisant le remplacement de la niche alvéolaire constituée de macrophages embryonnaires par des macrophages alvéolaires dérivés des monocytes. Alors que les monocytes jouent un rôle crucial dans cette protection hétérologue, nous voulons investiguer désormais l'importance et les fonctions des monocytes recrutés dans la sphère pulmonaire dans le cycle viral et l'infection aiguë des  $\gamma$ HVs.

Nous souhaitons investiguer les mécanismes cellulaires et moléculaires, induits par les  $\gamma$ HVs pour moduler la réponse immune et permettre une infection aiguë asymptomatique. Nous investiguerons particulièrement le rôle des monocytes recrutés au sein du poumon dans le maintien de cet équilibre entre la régulation de l'inflammation et les mécanismes pro-inflammatoires.



---

# Section expérimentale

---



---

# Section expérimentale

## **Ly6C<sup>hi</sup> monocytes balance regulatory and cytotoxic CD4 T cell responses to control virus-induced immunopathology**

---

*Accepted in principle in Science Immunology*

Céline Maquet<sup>1</sup>, Jérôme Baiwir<sup>1</sup>, Pauline Loos<sup>1</sup>, Lucia Rodriguez-Rodriguez<sup>1</sup>, Justine Javaux<sup>1</sup>, Rémy Sandor<sup>1</sup>, Fabienne Perin<sup>4</sup>, Padraic G. Fallon<sup>2</sup>, Matthias Mack<sup>3</sup>, Didier Cataldo<sup>4</sup>, Laurent Gillet<sup>1,†,\*</sup>, Bénédicte Machiels<sup>1,†,\*</sup>.

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Vaccinology, Faculty of Veterinary Medicine, FARAH, ULiège, Liège, 4000, Belgium.

<sup>2</sup>School of Medicine, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland.

<sup>3</sup>Department of Nephrology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.

<sup>4</sup>Laboratory of Biology of Tumor and Development, GIGA-Cancer ULiège and “Centre Hospitalier Universitaire de Liège (CHU)”, Liège, 4000, Belgium.

† co-senior authors



## ***Abstract***

Gammaherpesviruses ( $\gamma$ HVs) have co-evolved with their host, leading to a remarkably high infection prevalence and establishment of latency. The lifelong persistence of  $\gamma$ HVs in hosts appears to broadly shape host immunity, and we show here that pulmonary infection with Murid herpesvirus 4 (MuHV-4), a mouse  $\gamma$ HV, drives the recruitment of Ly6Chi monocytes (MOs) into the airway, thereby modulating the host immune response. The absence of Ly6Chi MOs is associated with severe virus-induced immunopathology and the systemic release of inflammatory mediators. Mechanistically, MuHV-4-imprinted MOs recruit CD4 T cells to the airways and trigger immunosuppressive signalling pathways through the PD-L1/PD-1 axis, thereby dampening the deleterious activation of cytotoxic CD4 T cells. These results uncover a role for Ly6Chi MOs in modulating CD4 T cell functions and reveal pathways that could be targeted therapeutically to reduce detrimental immunopathological responses associated with respiratory viral infections.

### **One Sentence Summary:**

$\gamma$ HV-imprinted monocytes prevent the development of lethal disease by orchestrating the balance between regulatory and detrimental cytotoxic properties of CD4 T cells.



## *Introduction*

Microorganisms are major environmental factors that play fundamental roles in training and modulating the host immune responses (1). In particular, the crosstalk between microbes and immune cells at the mucosal surface is critical for establishing an appropriate immune landscape (2). Viruses frequently infect the respiratory tract and outcomes can range from asymptomatic to fatal illness. Attributes associated with the virus itself, the external environment, and the host contribute to disease heterogeneity. Variability in innate immune responses is one of the main factors associated with diverse disease responses to respiratory viral infections (3). A better understanding of these innate pathophysiological mechanisms is critical to identifying targets for specific therapeutic intervention. Of the players in innate immunity, monocytes (MOs) display remarkable plasticity and heterogeneity and play important roles in pathogen killing, immunomodulation or sustaining inflammation in a context-dependant manner (4,5). Understanding the balance between pro-inflammatory and immunomodulatory pathways triggered by MOs upon viral infections is therefore of major importance.

Among the most prevalent human viruses, Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) are two gammaherpesviruses ( $\gamma$ HVs) associated with lifelong persistence in immune cells (6). Through co-evolution with their host,  $\gamma$ HVs have established a reciprocal beneficial relationship and appear to broadly influence the function of the immune system (7). The vast majority of EBV and KSHV infections are associated with mild symptoms in immunocompetent individuals, but they can dramatically alter immune responses against unrelated antigens (8). The manipulation of B cells and evasion of T cell responses by  $\gamma$ HVs has been widely studied, but how these viruses interact with the innate arm of the immune response is still poorly defined (9). We have recently shown that Murid herpesvirus 4 (MuHV-4), a  $\gamma$ HV that infects mice, can protect against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages (AMs) by MOs primed to have regulatory properties (10). However, the function of these MOs in  $\gamma$ HV lifecycle is not well understood, nor is their potential contributions to host- $\gamma$ HV interactions.

Here, we show that pulmonary infection with MuHV-4 induces the early recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> MOs in the airways, which contributes to the fine control of the host immune response. MuHV-4-imprinted MOs form clusters with CD4 T cells in their vicinity and promote regulatory crosstalk through immune checkpoint proteins. These results reveal a role for Ly6C<sup>hi</sup> MOs in shaping the function of effector CD4 T cells and identify a key pathway that could be targeted by therapeutic strategies to mitigate host hyperinflammation.

## Results

### MO deficiency leads to a severe MuHV-4 associated disease without affecting virus-specific adaptive immunity.

MuHV-4 respiratory infection triggers the massive recruitment of MOs into the alveolar space at early time points post infection (p.i.) (10). These MOs exhibit increased expression of stem cell antigen 1 (Sca-1) and major histocompatibility complex class II (MHCII), which is associated with the acquisition of a regulatory profile (11). Indeed, expression of Sca-1 and MHCII on MOs trafficking from the bone marrow to the airways peaked at day 8 p.i. (**Figure S1 A-D**) and correlated with production of the canonical regulatory interleukin (IL)-10 upon LPS stimulation (**Figure S1 E-F**), suggesting immunomodulatory functions. Upon inflammation, emigration of Ly6C<sup>hi</sup> MOs from the bone marrow requires signals mediated by chemokine receptor CCR2 (12). We explored the role of Ly6C<sup>hi</sup> MOs in the regulation of  $\gamma$ HV lifecycle by comparing the course of MuHV-4 pulmonary infection between wild-type (WT) and CCR2-deficient (CCR2<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice (**Figure 1 A**). As expected, WT mice had a massive increase of CCR2<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> MOs in the blood and bronchoalveolar fluids (BALF) during MuHV-4 infection (**Figure 1 B-C**) and did not display any clinical symptoms or substantial weight loss (**Figure 1 D**). In contrast, the absence of Ly6C<sup>hi</sup> MOs was associated with severe disease as indicated by weight loss and a massive inflammatory infiltrate into the lung parenchyma upon infection (**Figure 1 D-E**). Similarly, MuHV-4-infected BALB/c mice, treated with anti-CCR2 antibody (MC21 mAb) (13) displayed transient depletion of MOs and showed greater weight loss and a more severe clinical score than counterparts treated with isotype control mAb (**Figure S2**). To examine changes to the biophysical properties of the lung over the course of MuHV-4 infection in absence of MOs, we mechanically ventilated WT or CCR2<sup>-/-</sup> mice via tracheostomy and performed forced oscillation tests. WT mice showed normal lung biomechanics at day 8 p.i., but CCR2<sup>-/-</sup> mice had markedly abnormal values for most parameters, such as an increased respiratory system resistance and elastance, reduced compliance, increased tissue damping and tissue elasticity (**Figure 1 F**). Besides, an alteration of blood parameter was also present with the increased haematocrit level (**Figure 1 G**). Although weight loss is transient and the alveolar niche is efficiently reconstituted in a CCR2-independent manner (**Figure S3**), this does not discount the crucial role of MOs in controlling acute infection. To evaluate the overall impact of MO deficiency on the disease phenotype, we measured survival after infection of WT or CCR2<sup>-/-</sup> mice with high doses of MuHV-4. Although WT mice recovered rapidly from the infection, all CCR2<sup>-/-</sup> mice succumbed to the same infection within 8 days (**Figure 1 I-J**), demonstrating the major importance of MOs in preventing lethal virus-induced disease.

MOs are described to exert direct antiviral functions and to restrict viral replication (14, 15). However, WT or CCR2<sup>-/-</sup> infected mice presented similar viral loads in the lung at days 8 and 15 p.i.

(**Figure 1 H**), supporting the idea that MuHV-4 imprinted MOs are not essential for viral clearance, but instead, may regulate excessive inflammation. We verified the absence of earlier viral replication in MO-depleted mice using a luciferase expressing MuHV-4 strain (MuHV-4-Luc) (16), in C57BL/6 albino WT mice, treated with MC21 mAb or control mAb (**Figure 1 K**). While the depletion of MOs was associated with severe weight loss (**Figure 1 L**), we quantified comparable levels of light emission and observed similar MuHV-4 replication rates (**Figure 1 M-N**). MOs are known to be involved in T cell priming in various infection models (17). However, the establishment of MuHV-4-specific adaptive responses was comparable in the presence or absence of MOs, as demonstrated by the similar frequency and number of lung MuHV-4 specific CD8<sup>+</sup> T cells and by the similar level of MuHV-4 specific IgG, measured at days 8, 15 and 30 p.i. (**Figure 1 O-R**). Taken together, these data suggest a critical role for MuHV-4-recruited MOs in the regulation of deleterious innate immune responses rather than in the priming of virus-specific adaptive responses.

### **MuHV-4 imprinted MOs prevent from the development of the cytokine storm response**

Evaluation of changes in innate cells during MuHV-4 infection in WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice allowed us to identify a massive accumulation of neutrophils in the BALF of CCR2<sup>-/-</sup> mice (**Figure 2 A-C**). This accumulation of neutrophils correlated with higher production of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), and Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in BALF (**Figure 2 D**). Of note, IL-6, type I IFN and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) concentrations also increased during infection in the blood of CCR2<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice (**Figure 2 E**), suggesting that the absence of MOs has broader consequences than local tissue production of cytokines. Neutrophils play multiple roles in acute viral infections and are detrimental in some viral respiratory diseases (18). To assess whether neutrophil accumulation in the airways contributed to the immunopathological responses to infection, we treated WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice with anti-Ly6G depleting antibodies from day 4 to day 8 post MuHV-4 infection (**Figure 2 F**). The systemic injection of anti-Ly6G antibodies led to efficient neutrophil depletion but weight loss and BALF cytokine concentrations were comparable in presence or absence of neutrophils for infected CCR2<sup>-/-</sup> mice (**Figure 2 G-J**), indicating that recruited neutrophils are not the major drivers of the disease. Uncontrolled release of pro-inflammatory cytokines, commonly described as a ‘cytokine storm’, has detrimental systemic consequences in several respiratory viral infections, including influenza (19) and COVID-19 (20). To assess if similar mechanism occurred in MuHV-4 infected mice in the absence of recruited MOs, we quantified the cytokine response in the BALF and blood of WT and MO-depleted mice over the course of infection (**Figure 2 K-N**). Similar to CCR2<sup>-/-</sup> mice, MO depletion was accompanied by massive neutrophil infiltration in the BALF of MuHV-4 infected mice (**Figure 2 L**). Furthermore, we confirmed that absence of MOs triggered a massive release of pro-inflammatory cytokines in the BALF and the blood of MuHV-4 infected mice lacking MOs (**Figure 2 M-N**). This experiment also showed a higher concentration of IL-10 in the BALF of

MuHV-4 infected WT mice compared to MO-depleted mice. This observation suggested that recruited MOs may protect against virus-induced immunopathology through local production of regulatory cytokines.

### **MuHV-4 imprinted MOs drive the recruitment of IL-10 producing CD4 T cells in the airways**

To determine whether IL-10 plays an essential role in the control of MuHV-4-associated pathology, we followed disease progression during infection in WT and IL-10-deficient (IL-10<sup>-/-</sup>) mice (**Figure 3 A**). Absence of IL-10 led to a severe worsening of pathology as evidenced by higher weight loss (**Figure 3 B**), BALF neutrophilia (**Figure 3 C**), and a massive release of IFN $\gamma$  in both BALF and blood (**Figure 3 D**). To decipher whether IL-10 production by MOs is a key mechanism controlling disease severity, we generated an inducible conditional mutant mouse Ccr2-creER<sup>T2</sup> IL-10<sup>lox/lox</sup>, in which Cre recombinase requires the presence of tamoxifen for activity (21) (**Figure 3 E**). This targeted depletion (**Figure 3 F**) did not increase weight loss nor lung neutrophilia compared to MuHV-4 infected WT mice (**Figure 3 G-H**), thus demonstrating that IL-10 produced by MOs is not the direct driver of the protective phenotype. To rule out any anomalous results due to Cre excision efficiency, we confirmed these results using mixed chimeras (**Figure S4**). Mice reconstituted with a mix (50:50) of CCR2<sup>-/-</sup> and IL-10<sup>-/-</sup> bone marrow cells, which are deficient of any circulating IL-10-producing MOs, did not display any weight loss upon MuHV-4 infection (**Figure S4 B**). Hence, we assessed IL-10 expression upon MuHV-4 infection across all lung cell populations using IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB mice (22). This unbiased approach confirmed that MuHV-4 infection induced an increase of IL-10 producing cells in the airways and identified CD4 T cells as the main producers of IL-10 following MuHV-4 infection (**Figure 3 I**), raising the idea that MOs could play an essential regulatory role, affecting indirectly CD4 T cell function. Based on these findings, we monitored CD4 T cell infiltration in the BALF of MuHV-4 infected mice, treated with MC21-depleting antibody or control mAb. This experiment revealed that the absence of MOs correlated with dramatic impairment of CD4 T cell infiltration over the course of MuHV-4 infection (**Figure 3 J**). To more precisely determine whether MuHV-4 imprinted MOs affect the accumulation of IL-10 producing CD4 T cells in the lung, we treated ITIB mice with the MC21 or isotype control upon infection. The absence of MOs was associated with a strong reduction of IL-10 producing CD4 T cells in the airways (**Figure 3 K-L**), suggesting that MuHV-4-imprinted MOs control disease severity by modulating the trafficking and functional properties of CD4 T cells.

As MO-derived IL10 appeared to be dispensable for direct control of viral pathology, we next assessed the relative importance of IL-10-producing T cells in maintaining homeostasis upon MuHV-4 infection by comparing the disease severity between CCR2<sup>-/-</sup> mice and conditional mutant mice CD4-cre IL-10<sup>lox/lox</sup> with respective littermates (**Figure 3 M**). Interestingly, the striking reduction of IL-10-producing CD4 T cells induced a partial phenotype characterized by weight loss, neutrophilia in the

airways, and IFN $\gamma$  release that was intermediate between WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice (**Figure 3 N-P**). These results suggested that a defect in IL-10 production by CD4 T cells is critical but not sufficient to fully recapitulate the disease phenotype. A decrease in lung CD4 T cells in absence of MOs could be the result of a defect in initial priming in the mediastinal lymph node (MLN), or a defect in lung tissue recruitment and local immune responses. Efficient priming of CD4 T cells was observed both in WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice upon infection, as evidenced by similar numbers of CD4 T cells in the MLN (**Figure S5 A-B**) and equivalent proliferative capacities of these cells in the MLN and lung (**Figure S5 C-F**). Accordingly, we observed comparable activation and migratory capacities of conventional DCs (cDCs) in WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice upon infection. We detected negligible numbers of MO-derived DCs in the MLN (**Figure S5 G-H**), consistent with the low capacity of these DCs to migrate to LNs and prime T cell responses (23, 24). We also assessed the ability of CD4 T cells to differentiate into regulatory T cells (Tregs) upon infection. This experiment revealed similar numbers of forkhead box P3 (FOXP3)<sup>+</sup> MLN CD4 T cells in the infected groups, and a reduced number of FOXP3<sup>+</sup> lung CD4 T cells in CCR2<sup>-/-</sup> mice (**Figure S5 I-J**). Therefore, these findings support the hypothesis that lung MOs may locally regulate the recruitment and activation of CD4 T cells rather than modulating initial priming or potential plasticity in the MLN.

During priming and activation, T cell trafficking into inflamed tissues is a dynamic process involving extravasation and chemotaxis via critical chemokines such as CXC ligand (CXCL) 9, 10 and 11. In particular, CXCL9, whose expression is dependent on IFN $\gamma$  (25), interacts with the CXCR3 receptor and plays pleiotropic roles in migration, differentiation, and activation of CD8 and CD4 T cells (26, 27). To address the importance of the CXCL9/CXCR3 axis in the control of MuHV-4 associated disease, we investigated CXCL9 production by lung leukocytes in WT and MO-depleted mice after infection. Our data revealed that MuHV-4 imprinted MOs from WT mice produce high concentrations of CXCL9 in the airways (**Figure 3 Q-R**). Importantly, in MuHV-4 infected WT mice, the main producers of CXCL9 were MOs and AMs, and these cells are mainly derived from MOs in MuHV-4-infected WT mice (10) (**Figure 3 S-T**). In accordance with CXCL9 overproduction during infection, we observed a concomitant increase in CXCR3 expression on CD4 T cells (**Figure 3 U**), confirming the importance of the CXCL9/CXCR3 axis in bringing together MOs and MuHV-4-imprinted CD4 T cells in the airways. Overall, these data revealed a key role of MuHV-4 imprinted MOs in promoting local recruitment of CD4 T cells, including IL-10-producing CD4 T cells, and raised the hypothesis of potential crosstalk between these cell types to control the inflammatory response.

### **MuHV-4 infection promotes profound changes on both MO and CD4 T cell transcriptional programs**

To assess the transcriptional diversity of MOs and CD4 T cells upon MuHV-4 infection, and to decipher potential transcriptomic alterations of CD4 T cells in the absence of MOs, both cell types were

sorted from Mock or MuHV-4-infected WT or *CCR2*<sup>-/-</sup> mice at day 8 p.i. and profiled by droplet-based single cell RNA-sequencing (scRNA-seq). To identify the potential functional heterogeneity between BALF and lung cells, hashtag oligomers were used as described (28) to multiplex cells across both sub-localizations (**Figures 4 and S6 A-B**). A total of 9682 cells (MOs and CD4 T cells from lung and BALF of Mock and MuHV-4 infected WT or *CCR2*<sup>-/-</sup> mice) were analysed (**Figure S6 C-D**). We initially merged data from all samples, performed unsupervised clustering on highly variable genes and projected cells in two dimensions using Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) (**Figure 4 B**). This analysis confirmed the presence of two main populations corresponding to MOs and CD4 T cells. We then identified the origin of those cells based on respective hashtags.

Using an unsupervised clustering of single cells, we identified 3 and 4 major clusters of MOs and CD4 T cells, respectively (**Figure 4 C, F**). Then we selected the top 10 genes differentially expressed (DE) across clusters to define the phenotypic heterogeneity underlying each cell sub-cluster (**Figure 4 D, G**). MO and CD4 T cell clusters differ largely in proportions and numbers upon infection. We observed enrichment of cluster 1 within the MO population and of clusters 0 and 2 within the CD4 T cells upon infection (**Figure 4 E, H**). Analysis of DE genes on MOs and CD4 T cells identified 2511 DE genes in MOs and 2964 in CD4 T cells. Out of this list, the most relevant genes uniquely expressed between Mock and MuHV-4 infection conditions were highlighted (**Figure 4 I, K**) and selected for differential gene expression analysis within each specific clusters (**Figure 4 J, L**).

Focusing on MOs, we observed that cluster 1 exhibited mixed features upon infection, characterized by a prominent chemokine secretory profile (e.g. *CCL8*, *CCL7*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL16*), a regulatory signature (e.g. *Tgfb1*, *CD274*, *SPPI*, *Ly6a*), an IFN-induced response (*Gbp2*, *Stat1*, *Isg15*, *Ifi47*, *Irf7*, *Oasl2*, *Socs1*), and a typical antigen-presenting cell profile (e.g. *H2-Q7*, *H2-K1*, *H2-Ab1*, *H2-Aa*, *CD74*) (**Figure 4 J**). In addition, BubbleGUM analysis (29) (**Figure 4 M**) confirmed strong enrichment upon infection in processes such as response to type I or type II IFN, antigen processing and presentation, regulation of leukocyte chemotaxis, regulation of T cell mediated cytotoxicity and regulatory T cell differentiation. Interestingly, feature plots of key transcripts involved in T cells chemotaxis and regulation, such as *CD274* (Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)), *SPPI*, or *MHCII*, showed similar distribution, mainly within cluster 1, suggesting functional importance of this specific MO subset to regulate T cells function (**Figure 4 O**).

A parallel approach was conducted on CD4 T cells (**Figure 4 K-L**). Upon infection, cluster-specific analysis showed relatively reduced numbers of resting cells (expressing *Ccr7*, *Nr4a3*, *Emb*, *Il7r*, *Lef1*, *Sell*), enrichment of activated cells displaying canonical tissue resident memory/tissue effector memory markers (such as *CD44* and *Cxcr6* (30)), and enrichment of the Treg cell populations (expressing *Foxp3*, *Icos*, *Izumo1r*, *Ikzfr*, *Tnfrsf4*, *IL-10*). We also observed strong enrichment of activated cells with upregulated expression of genes associated with IFN responses (*Ly6a*, *Ifitm3*, *Ifitm1*,

*Isg15*, *Ly6c2*), chemotaxis (*Ccl5*, *Ccl4*), cytotoxicity (*GrzB*, *GrzA*, *Nkg7*) and costimulation or inhibition (*Pdcd1*, *Icos*, *Ctla4*, *Lag3*, *Tnfrsf18*, *c-Maf* (31), *Plac8* (32) (**Figure 4 K, L**). Accordingly, BubbleGUM pathway analysis (**Figure 4 N**) confirmed general upregulation of genes involved in IFN response, MO migration, cell-cell adhesion, leukocyte-mediated cytotoxicity, and IL-10 production. CD4 T cells exhibiting cytotoxic properties were initially identified in various viral infections (33–34), including MuHV-4 (35). Feature plots of highly DE genes revealed cosegregation of cells expressing *GrzB* with those expressing checkpoint mediators such as *Pdcd1* and *Ctla4* (**Figure 4 P**), suggesting that cytotoxic properties of CD4 T cell subsets could be strictly regulated during MuHV-4 acute infection in WT mice. Furthermore, concomitant expression of chemokines, such as *Cxcl9* and its receptor, *Cxcr3*, argues for key interactions between MuHV-4 imprinted MOs and activated CD4 T cells. NicheNET analysis (36) further supported this hypothesis by highlighting numerous ligand–target links between CD4 T cells and MOs involved in chemotaxis, intercellular adhesion, immune regulation and inhibitory checkpoints (**Figure S7 A-B**), strengthening the existence of an important regulatory crosstalk between MuHV-4 imprinted MOs and CD4 T cells. Finally, to determine any preferential sublocalization of MO and/or CD4 T cell subsets upon infection, we exploited hashtags identification of cells to analyse DE genes between BALF and lung compartments. Typical genes of MO cluster 1 were enriched in the BALF, indicating that MuHV-4 imprinted MOs mainly infiltrate the alveoli during infection. Similarly, activated CD4 T cells, exhibiting cytotoxic properties, were also enriched in the airways (**Figure S7 C-D**), demonstrating that these two populations of interest are located at the same place and are therefore likely to interact.

### **Absence of MuHV-4 imprinted MOs switches pre-armed cytotoxic CD4 T cells toward deleterious cell killers associated with severe tissue damages**

We analyzed scRNA-seq data from MuHV-4 infected WT and *CCR2*<sup>-/-</sup> mice to dissect potential transcriptional alterations in CD4 T cells in the absence of regulation by MOs (**Figure 5 A**). This analysis revealed 355 CD4 T cell DE genes between WT and *CCR2*<sup>-/-</sup> MuHV-4-infected mice and highlighted the immunological dysregulation of CD4 T cells in the absence of MOs. We observed striking upregulation of genes involved in cytotoxicity, such as *GrzA*, *GrzB*, *Nkg7*, *Prfl*, *GrzK*, *Ccl5*, *Runx3*, *IFN $\gamma$*  (**Figure 5 B**). BubbleGUM pathway analysis confirmed the enrichment in genes linked with cytotoxicity but also highlighted upregulation of genes associated with cytokinesis, Golgi vesicle transport and vesicle budding (**Figure 5 C**), suggesting not only exacerbated cytotoxicity but also enhanced secretion and degranulation of CD4 T cells from infected *CCR2*<sup>-/-</sup> mice. We evaluated the shift of CD4 T cells toward a cytotoxic phenotype in absence of MOs during MuHV-4 infection by flow cytometry. This analysis revealed higher percentages of Granzyme A (GrzA), Granzyme B (GrzB) and CD107a (**Figure 5 D-F**), confirming that CD4 T cells isolated from infected *CCR2*<sup>-/-</sup> mice exhibit stronger cytotoxic and degranulation activities than their counterparts isolated from WT infected mice.

In line with these findings, higher amounts of GrzB were detected in BALF by ELISA (**Figure 5 G**) and surface immunostainings (**Figure 5 H**). Moreover, while CD8 T cells and natural killer cells are the archetypal cytotoxic actors, we observed a large proportion of cells co-expressing CD4 and GrzB. Immunostaining of lung tissue revealed putative clusters of MOs and CD4 T cells in WT infected mice and highlighted the stronger cytotoxic and hyperinflammatory features of CD4 T cells in CCR2<sup>-/-</sup> mice. The difference in GrzB staining between WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice was much higher with respect to extracellular GrzB release (**Figure 5 I**) than that observed by intracellular immunostaining (**Figure S8 A-B**), confirming that pre-armed cytotoxic CD4 T cells are more prone to degranulate in the absence of MOs.

Cytotoxic CD4 T cells have been shown to play important roles both in mice and humans in antiviral (34, 37, 38) and antitumoral immunity (39, 40), as well as in response to vaccination (41). While beneficial in many situations, they can also drive pathogenic immune responses and trigger tissue damages in a MHCII restricted fashion (42-44). Epithelial and endothelial cells are known to overexpress MHCII molecules in an IFN $\gamma$  dependent-manner (45, 46). As such, in accordance with the high levels of IFN $\gamma$  released in the airways during MuHV-4 acute infection, we measured upregulation of MHCII molecules both on epithelial and endothelial cells of WT and CCR2<sup>-/-</sup> MuHV-4 infected mice (**Figure 5 J**). Importantly, immunostaining of lung tissue from CCR2<sup>-/-</sup> mice revealed co-localization of GrzB-secreting CD4 T cells in close proximity to MHCII-positive endothelial and epithelial cells, whereas such clusters were more rarely found in MuHV-4 WT infected mice (**Figure 5 K-L**, **Figure S8 C**). In line with these observations, we aimed at comparing tissue lesions and blood vessel damages. To this end, we first injected mice intravenously with tetramethylrhodamine (TRITC)-dextran to assess lung vascular permeability. Imaging of lung sections demonstrated larger diffusion of the fluorescent dye in the areas surrounding the blood vessels in CCR2<sup>-/-</sup> MuHV-4 infected mice, relative to their WT counterparts (**Figure 5 M-N**). This increased vascular permeability measured in CCR2<sup>-/-</sup> MuHV-4 infected mice was further validated in MO-depleted mice by Evan's blue quantification (47) in BALF and lung tissues after intravenous injection (**Figure 5 O**). Collectively, these data indicate that MuHV-4-imprinted MOs control the cytotoxic potential of recruited CD4 T cells and prevent them from mediating the detrimental killing of MHCII-expressing cells.

### **The PD-L1/PD-1 axis is crucial for the control of the cytotoxic features of CD4 T cells and for the maintenance of peripheral immune homeostasis**

Transcriptional profiling of MOs and CD4 T cells after infection revealed potential key regulatory ligand-receptor pairs involved in the fine control of MuHV-4 acute inflammation (**Figures 4** and **S6**). Among them, the PD-L1 (encoded by *CD274* gene)/PD-1 (encoded by *Pdcd1* gene) axis is known to play a fundamental role in evasion of immune defenses by tumor cells or chronic viral infections (48, 49). The priming of MuHV-4 specific T cells is similar in presence and absence of MOs (**Figures 1 K-**

**M** and **S4**), so we postulated that the PD-L1/PD-1 axis may inhibit hyperinflammation driven by cytotoxic CD4 T cells upon MuHV-4 infection. First, we confirmed that MuHV-4 infection triggers the recruitment of PD-L1/MHCII co-expressing MOs and of PD-1 expressing CD4 T cells to the airways (**Figure 6 A-C**). Second, we assessed the importance of the PD-L1/PD-1 pathway during MuHV-4 infection by comparing MuHV-4 infection in CCR2<sup>-/-</sup> mice and in WT mice, treated or not with anti-PD-L1/PD-1 neutralizing antibodies (**Figure 6 D**). Although this treatment did not affect the number of MOs in BALF or lung parenchyma (**Figure 6 E**), it induced severe disease associated with weight loss like that observed in CCR2<sup>-/-</sup> mice (**Figure 6 F**) and inflammatory cells infiltration in the lung upon MuHV-4 infection (**Figure 6 G**). Similar to what was observed in MuHV-4 infected CCR2<sup>-/-</sup> mice, we did not detect any difference in viral loads (**Figure 6 H**), suggesting that the PD-L1/PD-1 pathway protects from MuHV-4-induced immunopathology rather than limiting viral replication. To assess whether blocking the PD-L1/PD-1 axis recapitulates the cytotoxic features of CD4 T cells observed in CCR2<sup>-/-</sup> infected mice, we compared the phenotypic profiles of these cells between groups by flow cytometry and immunostaining. This analysis revealed a similar increase in GrzB, GrzA, Perforin 1 (Prf1) and IFN $\gamma$ , upon infection in CD4 T cells from MuHV-4 CCR2<sup>-/-</sup> and anti-PD-L1/PD-1 treated WT mice, in addition to a parallel release of GrzB and IFN $\gamma$  in BALF (**Figure 6 I-L**). Finally, in line with the exacerbated cytotoxic properties, we observed a loss of tissue integrity in CCR2<sup>-/-</sup> and in anti-PD-L1/PD-1-treated WT mice upon infection, as evidenced by a comparable increase in perivascular leakage of TRIC-dextran (**Figure 6 M-N**). These data demonstrated a central role for MuHV-4-imprinted MOs in positioning CD4 T cells in close proximity, and in providing them signals through the PD-L1/PD-1 axis that locally regulate their cytotoxicity.

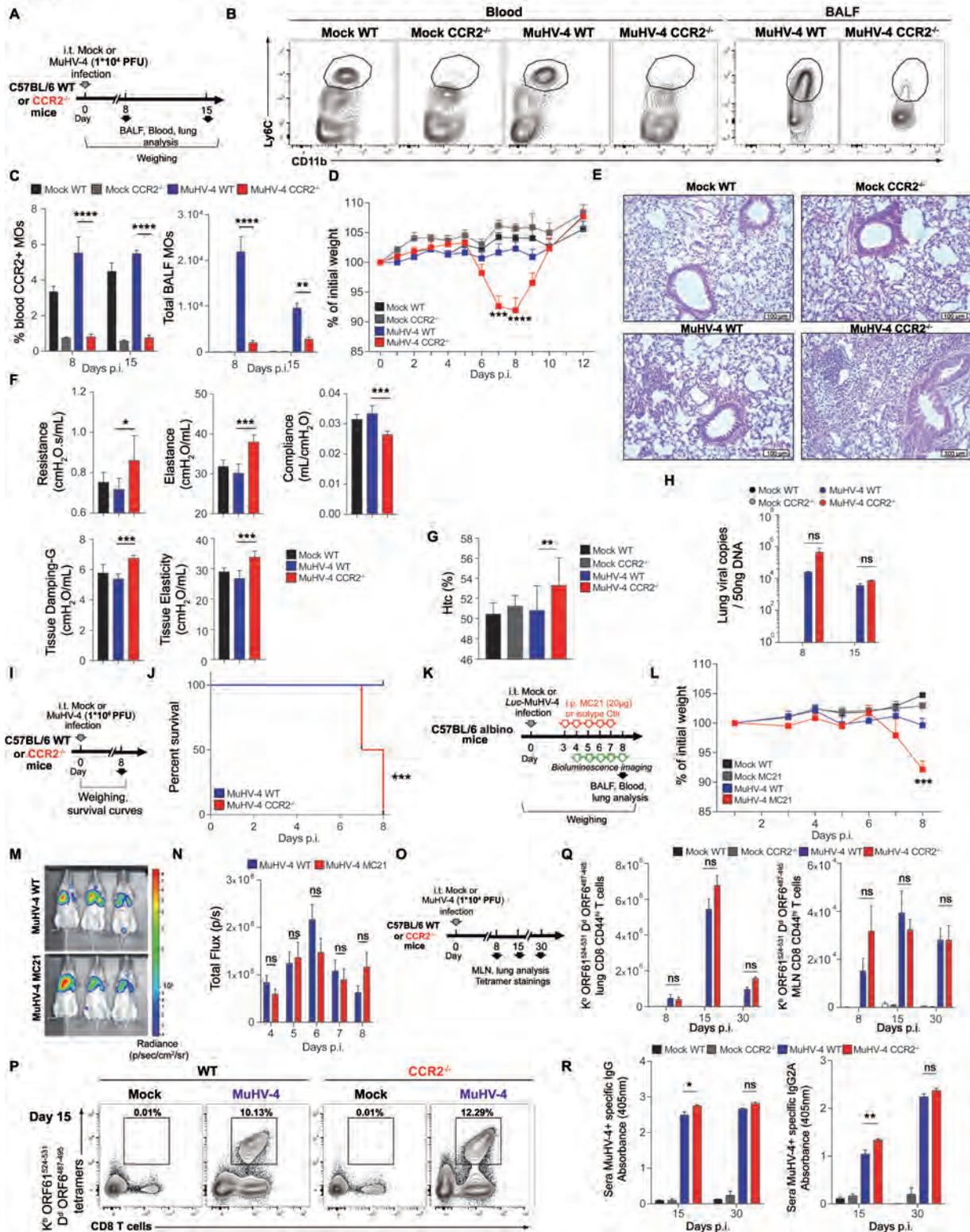
### **Selective expression of PD-L1 by MOs is necessary to control virus-induced immunopathology**

Our data support a key role of IL-10 and the PD-1/PD-L1 axis as regulators of MuHV-4 induced-immunopathology, so we investigated possible connections in the regulation of these two pathways. We compared levels of expression of PD-L1 on MOs, and of GrzB, GrzA and IFN $\gamma$  on CD4 T cells in IL10<sup>-/-</sup> mice (**Figure 7 A-B**) and in CD4-cre IL-10<sup>lox/lox</sup> with respective littermates (**Figure 7 C-D**). Both models showed that IL-10 deficiency increases IFN $\gamma$  production without affecting the cytotoxic properties of CD4 T cells, suggesting that IL-10 and PD-L1/PD-1 axes are two independent regulatory pathways that contribute to the protective phenotype in a complementary manner. We assessed the specific requirement of PD-L1-expressing MOs to prevent cytotoxic CD4 T cell-mediated damage. MOs and MO-derived AMs represent the main cell population in the airways expressing PD-L1 (**Figure 7 E-F**). Since PD-1 can also be bound by PD-L2, and PD-1 blockade alone could induce inflammation independently of PD-L1-derived MOs, we compared the global inhibition of the PD-L1/PD-1 axis with individual PD-1 and PD-L1 blockades, in MuHV-4 infected WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. We observed a

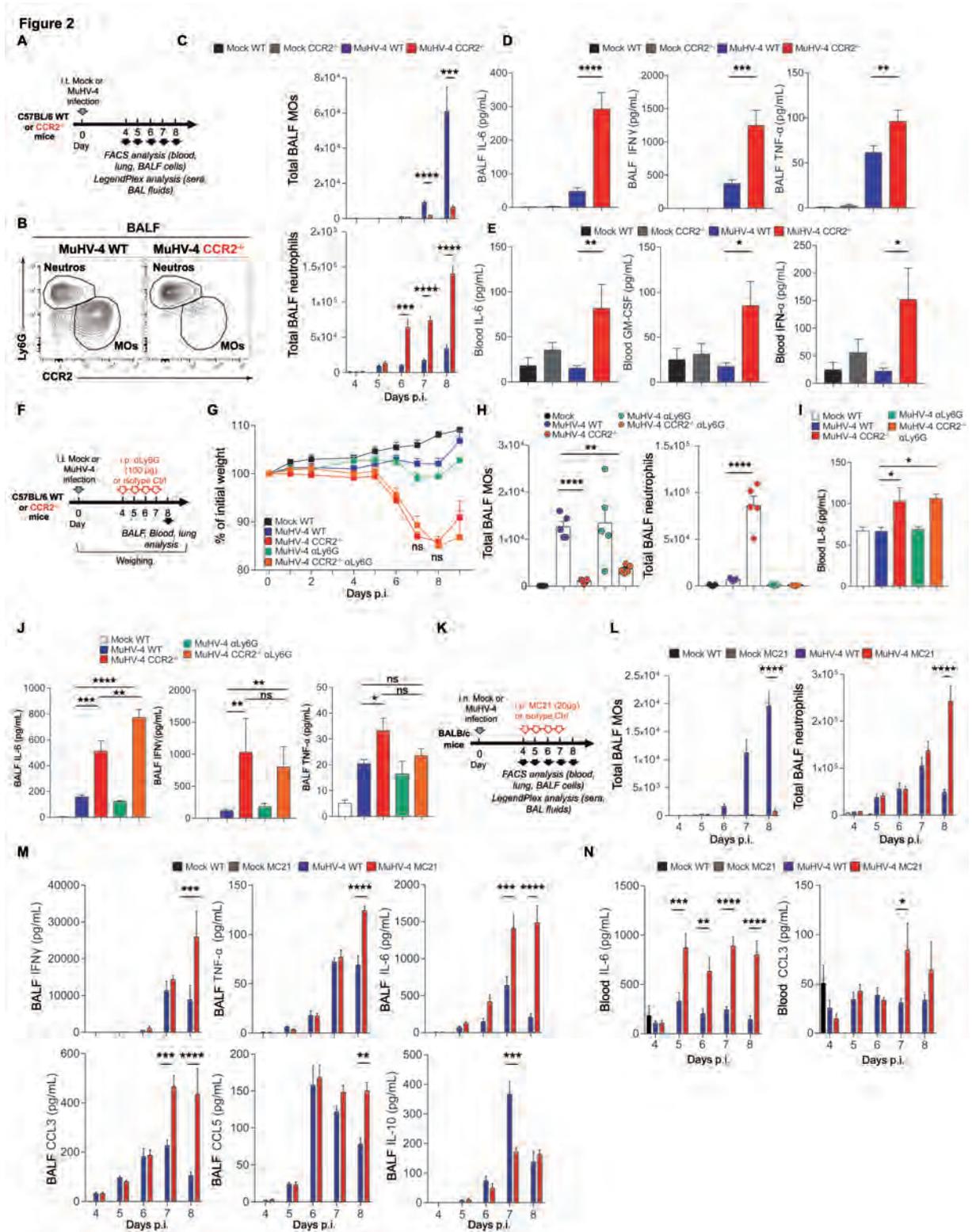
similar weight loss between PD-L1, PD-1 or PD-L1/PD-1 treated WT mice (**Figure 7 G-H**), in line with comparable production of GrzB, GrzA and IL-10 by CD4 T cells (**Figure 7 I-J**), supporting the statement, that PD-L1 alone is sufficient to inhibit cytotoxic CD4 T cell-mediated immunopathology. We did not observe any significant differences in the weight loss, nor in the level of GrzB, GrzA and IL-10 between untreated *CCR2<sup>-/-</sup>* and antibody-treated mice (**Figure 7 I-J**), suggesting that MO-derived PD-L1, alone, is sufficient to protect from cytotoxic CD4 T cell-mediated disease. To confirm this finding, we generated inducible conditional *Ccr2-creER<sup>T2</sup>* PD-L1<sup>lox/lox</sup> mice (**Figure 7 K**). *Ccr2-creER<sup>T2</sup>* PD-L1<sup>lox/lox</sup> mice treated with tamoxifen had great cell-specific excision of the PD-L1 gene, with >75% ablation on MO, that was sufficient to trigger weight loss upon infection with MuHV-4 (**Figure 7 L**). In validation of weight loss curves, the specific lack of PD-L1 expression by MOs correlated with enhanced cytotoxic properties of CD4 T cells, as evidenced by the increased amounts of intracellular GrzA, Prf-1, CD107a, and by the increased release of GrzB in the airways (**Figure 7 M-P**). Overall, these data confirm that MO-derived PD-L1 is specifically required to control the deleterious cytotoxic properties of CD4 T cells during MuHV-4 infection.

# Figures

Figure 1

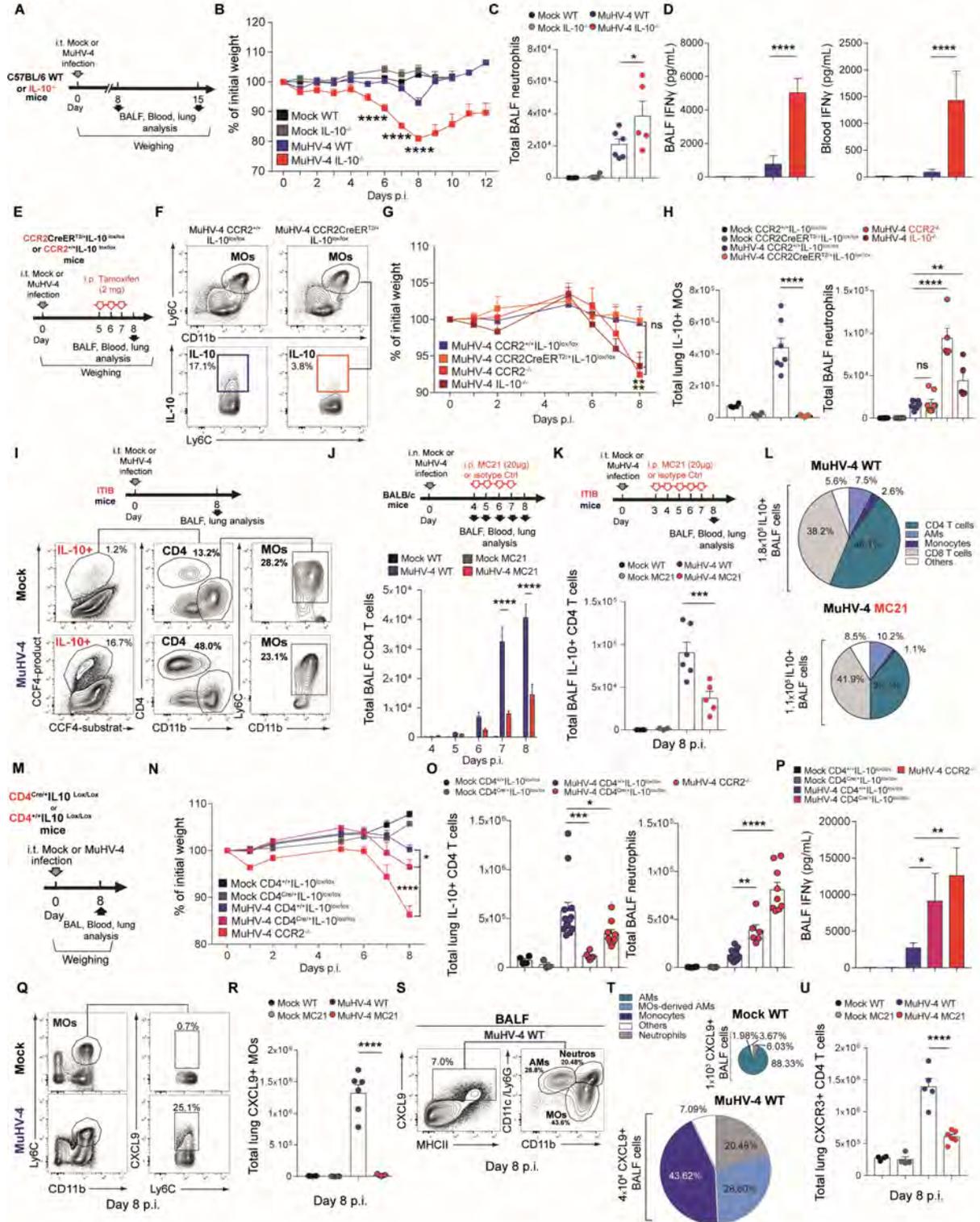


**Fig.1 MO deficiency leads to a severe MuHV-4 associated disease without affecting virus-specific adaptive immunity.** (A) Experimental layout of panels A-H. (B) FACS plots of Ly6C<sup>hi</sup> MOs from blood and BALF (gated as described in Fig.S1) at day 8 p.i. (C) Percentages and numbers of Ly6C<sup>hi</sup> CCR2<sup>+</sup> MOs in blood and BALF (n=4 to 5, three experiments). (D) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 6, three experiments). (E) Histological analysis of lung sections at day 8 p.i. stained with hematoxylin and eosin (H&E) (n=4, one experiment). (F) Respiratory mechanics parameters from the lung function assessment at day 8 p.i. (n=4 to 5, one experiment). (G) Haematocrit measurement (n=4 to 8, two experiments). (H) MuHV-4 genome copies in lung (n=4 to 5, three experiments). (I) Experimental layout of panels I-J. (J) Survival curves (n=6, one experiment). (K) Experimental layout of panels K-N. (L) Body weight as percentage of initial weight (n= 4 to 6, two experiments). (M) Luciferase signals from infected mice at day 8 p.i. (n= 4 to 6, two experiments). (N) Quantification of luciferase signals from infected mice (n= 4 to 6, two experiments). (O) Experimental layout of panels P-R. (P) FACS plots of D<sup>o</sup>ORF6<sup>487-495</sup> and K<sup>o</sup>ORF61<sup>524-531</sup> MuHV-4-specific tetramer stainings of lung CD8<sup>+</sup> T cells. Numbers in gates indicate mean percentages of tetramer-positive cells in CD8<sup>+</sup> T cells. (Q) Number of MuHV-4-specific tetramer+ CD8<sup>+</sup> T cells in the lung and MLN. (n= 4 to 8, three experiments). (R) Anti-MuHV-4 antibodies. (n= 4 to 8, three experiments). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used. (ns, not statistically different, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM. See also Fig.S1, S2 and S3.



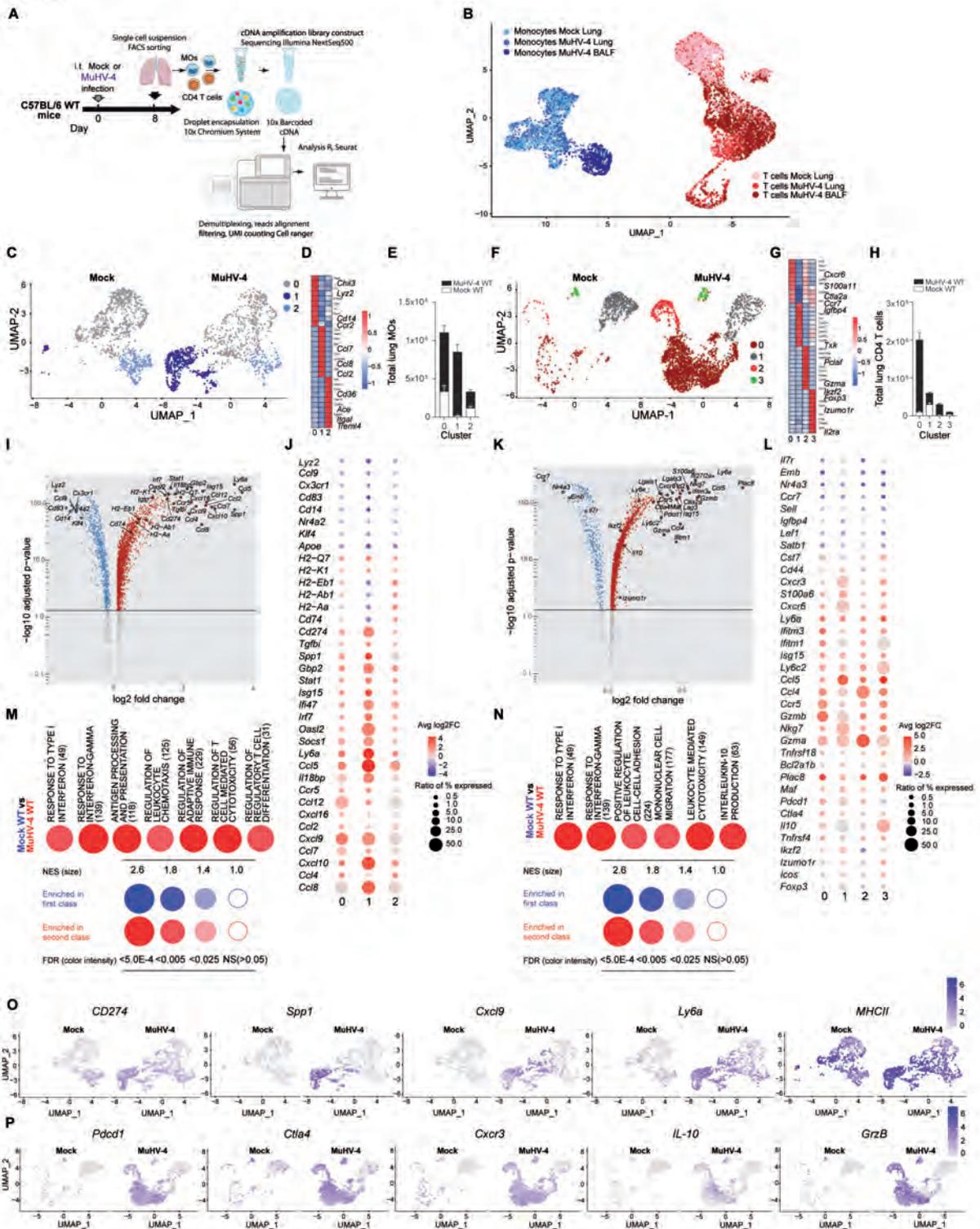
**Fig.2 MuHV-4 imprinted MOs prevent from the development of the cytokine storm.** (A) Experimental layout of panels A-E. (B) FACS plots of BALF MOs and neutrophils at day 8 p.i. (C) Numbers of BALF MOs and neutrophils (n=4 to 6, three experiments). (D-E) Cytokines production in BALF (D) and sera (E) at day 8 p.i. (n=4 to 6, two experiments). (F) Experimental layout of panels F-H. (G) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 6, three experiments). (H) Numbers of neutrophils and MOs in BALF at day 8 p.i. (n=4 to 6, three experiments). (I) ELISA measurement of IL-6 in blood at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment). (J) ELISA measurement of IL-6, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  in BALF at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment) (K) Experimental layout of panels I-M. (L) Numbers of BALF MOs and neutrophils (n=4 to 6, three experiments). (L-M) Cytokines production in BALF (M) and sera (N) from MC21-treated or untreated mock or MuHV-4 infected mice (n=4 to 6, one experiment). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way ANOVA was used. (ns, not statistically different, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

Figure 3



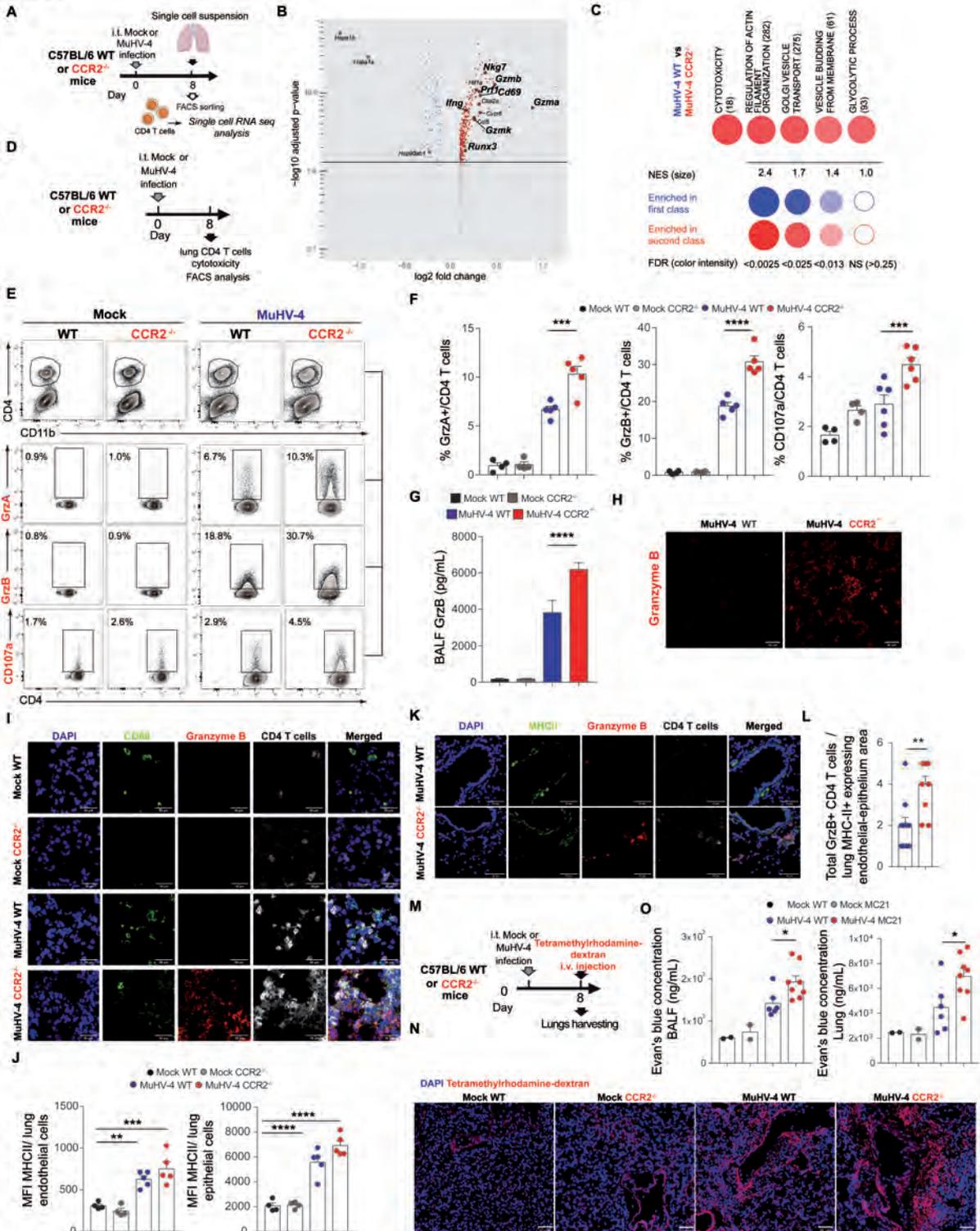
**Fig.3 MuHV-4 imprinting drives the recruitment of IL-10 producing CD4 T cells in the airways.** (A) Experimental layout of panels A-D. (B) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 6, three experiments). (C) Numbers of BALF neutrophils at day 8 p.i. (n=4 to 6, three experiments). (D) ELISA measurement of IFN $\gamma$  in BALF and blood at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment). (E) Experimental layout of panels F-H. (F) FACS plots of lung MOCs expressing IL-10 after ex vivo stimulation with LPS. Mean percentages are shown. (G) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 6, three experiments). (H) Numbers (day 8 p.i.) of lung MOCs expressing IL-10 after ex vivo stimulation with LPS and BALF neutrophils (n=4 to 6, three experiments). (I) Experimental layout and FACS plots of IL-10 signals in CD4 T cells and MOCs at day 8 p.i., assessed in lung cells from IT1B mice. Mean percentages are shown (n=4 to 6, three experiments). (J) Experimental layout and numbers of BALF CD4 T cells (n=4 to 6, three experiments). (K) Experimental layout of panels and numbers of BALF IL-10-expressing CD4 T cells (n=4 to 6, three experiments). (L) Pie charts depicting the mean number and the proportion of the different IL10<sup>+</sup> cells in BALF at day 8 p.i. (M) Experimental layout of panels N-P. (N) Body weight as percentage of initial weight (n=3 to 6, one experiment). (O) Numbers (day 8 p.i.) of lung CD4 T cells expressing IL-10 after ex vivo stimulation with  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 purified antibodies and BALF neutrophils (n=3 to 6, one experiment). (P) ELISA measurement of IFN $\gamma$  in BALF at day 8 p.i. (n=3 to 6, one experiment). (Q-R) FACS plots (Q) and numbers (R) of lung MOCs expressing CXCL9. Numbers in gates indicate means (n=4 to 6, three experiments). (S) FACS plots of CXCL9<sup>+</sup> BALF cells in MuHV-4 infected mice. Numbers in gates indicate means. (T) Pie charts depicting the mean number and the proportion of the different CXCL9<sup>+</sup> cells in BALF. (U) Numbers of lung CD4 T cells expressing CXCR3 (n=4 to 6, one experiment). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used. (ns, not statistically different, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM. See also Fig.S4 and S5.

Figure 4



**Fig.4 MuHV-4 infection promotes profound changes on both MO and CD4 T cell transcriptional programs.** (A) Experimental layout. (n= 4 pooled mice by group, one experiment). (B) UMAP representation of scRNA-seq landscape. (C) UMAP representation of the top 20 principal components (PCs) of MOs from mock and MuHV-4 infected mice. (D) Heatmap of the 10 most DE genes for each cluster of MOs identified in (C). (E) Numbers of lung MOs per cluster and per condition. (F) UMAP representation of the top 20 principal components (PCs) of CD4 T cells from mock and MuHV-4 infected mice. (G) Heatmap of the 10 most DE genes for each cluster of CD4 T cells identified in (F). (H) Numbers of lung CD4 T cells per cluster and per condition. (I) Volcano plot of genes expressed by MOs of mock (blue) and MuHV-4 (red) infected mice. Light grey dots under the line represent non-significant genes (FDR < 0.05). (J) Dot plot of DE genes (y axis) by MOs clusters (x axis). Dot size represents the ratio (MuHV-4/mock) of the number of cells in the cluster that express the gene and colour indicates the log2 fold change of the mean expression of each gene for a cluster. (K) Volcano plot of genes expressed by CD4 T cells of mock (blue) and MuHV-4 (red) infected mice. Light grey dots under the line represent non-significant genes (FDR < 0.05). (L) Dot plot of DE genes (y axis) by CD4 T cells clusters (x axis). Dot size represents the ratio (MuHV-4/mock) of the number of cells in the cluster that express the gene and colour indicates the log2 fold change of the mean expression of each gene for a cluster. (M) BubbleGUM analysis of 7 Gene Ontology pathways from MOs of mock and MuHV-4 infected mice. The number of genes considered in each pathway are indicated in brackets. The color indicates the cell subset showing enrichment for the gene set. The surface area of the dots is proportional to the absolute value of the normalized enrichment score (NES). (N) BubbleGUM analysis of 6 Gene Ontology pathways from CD4 T cells of mock and MuHV-4 infected mice. (O) UMAP representation of genes expression in MOs. (P) UMAP representation of genes expression in CD4 T cells. See also Fig.S6 and S7.

Figure 5



**Fig.5 Absence of MuHV-4 imprinted MOs switches pre-armed cytotoxic CD4 T cells toward deleterious cell killers associated with severe tissue damages.** (A) Experimental layout of panels A-C. (B) Volcano plot of genes expressed by CD4 T cells of MuHV-4 WT (blue) and MuHV-4 CCR2<sup>-/-</sup> (red) infected mice. Light grey dots under the line represent non-significant genes (FDR < 0.05). (C) BubbleGUM analysis of 5 Gene Ontology pathways from CD4 T cells from MuHV4 WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. (D) Experimental layout of panels D-L. (E-F) FACS plots (E), percentages (F) of lung CD4 T cells expressing GrzA, GrzB and CD107a at day 8 p.i. Numbers in gates indicate means (n=4 to 6, three experiments). (G) ELISA measurements of GrzB and IFN $\gamma$  in BALF at day 8 p.i. (n=4 to 6, three experiments). (H-I) Low (H) and high (I) magnification of confocal microscopy images of lung sections stained for extracellular antigens. (J) MFI of MHCII expression by endothelial cells and epithelial cells at day 8 p.i. (n=4 to 5, two experiments). (K) Confocal microscopy images of lung sections after immunofluorescent staining at day 8 p.i. (L) Quantification of GrzB<sup>+</sup> CD4 T cells in vicinity (<10  $\mu$ m) of MHC-II<sup>+</sup> expressing endothelial and epithelial cells in lungs. Data are collected from 10 different lung sections, zoomed on one area containing MHC-II<sup>+</sup> endothelial or epithelial structures. (M) Experimental layout of panel N. (N) Confocal microscopy images of lung sections from WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice intravenously injected with tetramethylrhodamin (TRITC)-conjugated dextran (n= 4, two experiments). (O) Quantification of Evan's Blue concentration in BALF and lung to identify vascular leakage at day 8 p.i. (n=2 to 8, one experiment). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Pictures are representative of more than 6 lungs analysed. Error bars represent SEM. See also Fig.S7.

Figure 6

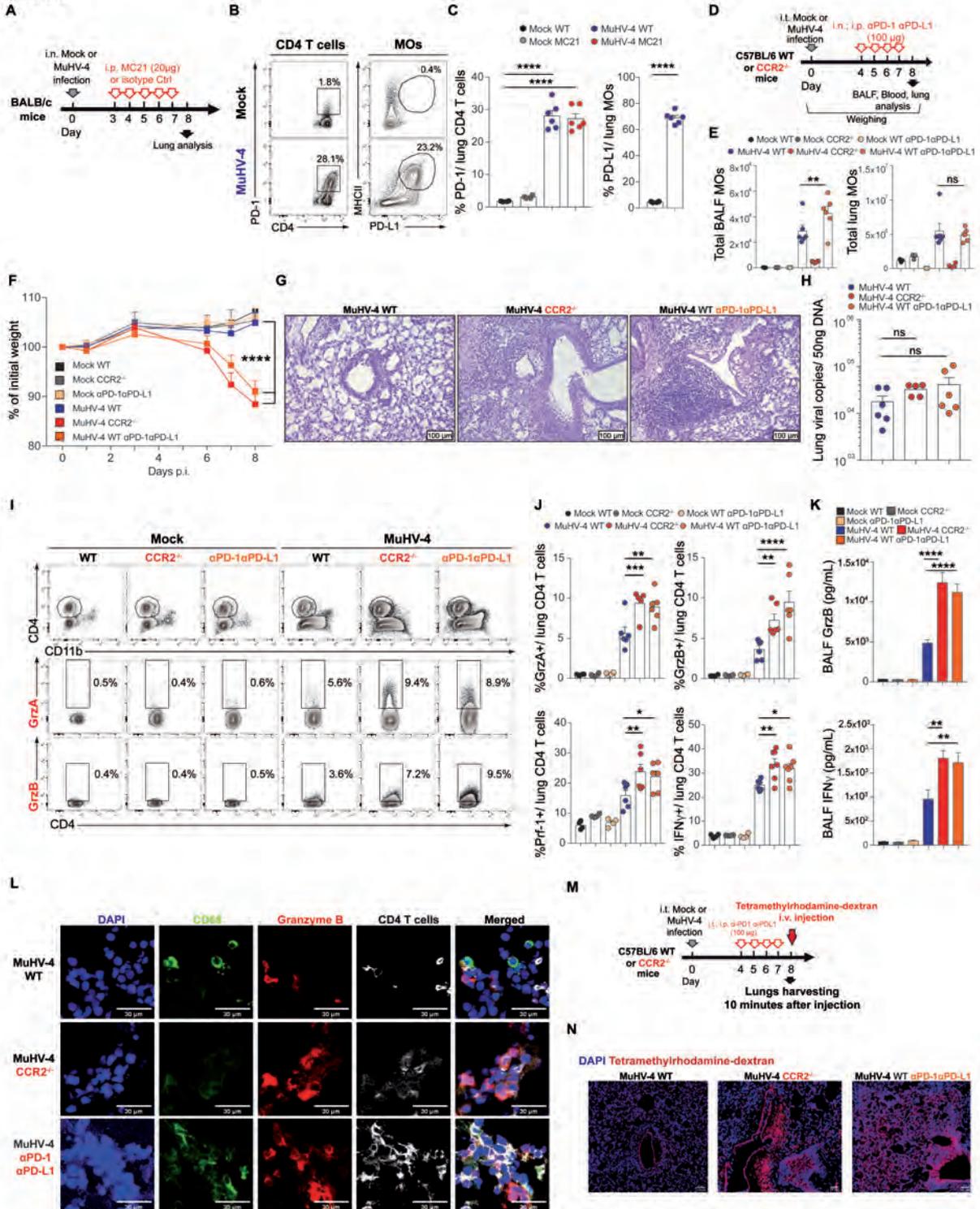
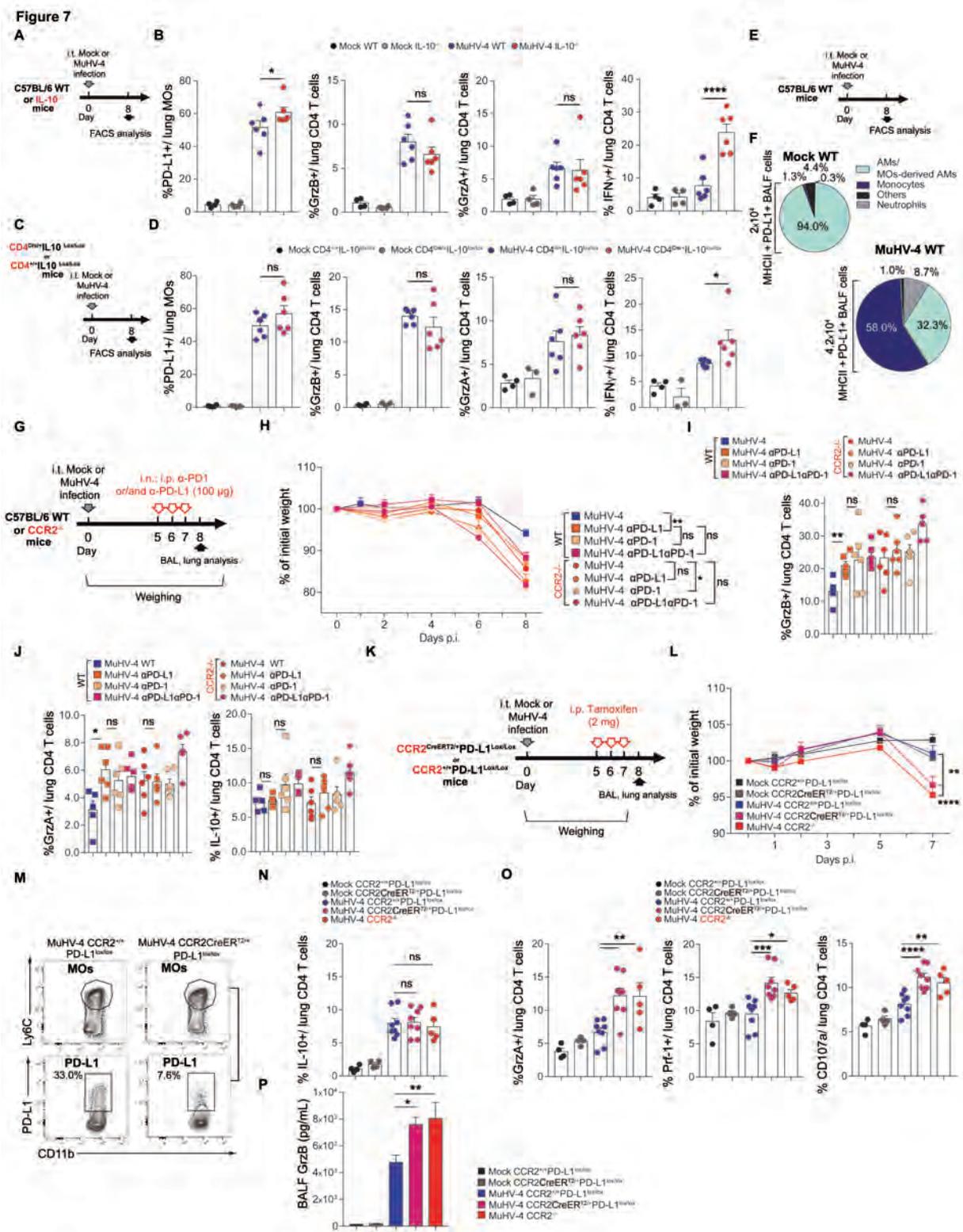


Fig.6 The PD-L1/PD-1 axis is crucial for the control of the cytotoxic features of CD4 T cells and for the maintenance of peripheral immune homeostasis. (A) Experimental layout of panels A-C. (B-C) FACS plots (B) and percentages (C) of PD-1 expressing CD4 T cells and PD-L1, MHC-II coexpressing MOs at day 8 p.i. (n=4 to 6, three experiments). (D) Experimental layout of panels E-L. (E) Numbers of MOs in BALF and lung (n=4 to 6, three experiments). (F) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 6, three experiments). (G) Histological analysis of lung sections at day 8 p.i. stained with H&E (n=4 to 6, one experiment). (H) MuHV-4 genome copies in lung at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment). (I) FACS plots of lung CD4 T cells expressing GrzA and GrzB at day 8 p.i. Numbers in gates indicate means. (J) Percentages of GrzA, GrzB, Perforin (Prf) and IFNγ-expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=4 to 7, three experiments). (K) ELISA measurement of GrzB and IFNγ in BALF at day 8 p.i. (L) Confocal microscopy images of lung sections of mock and MuHV-4 infected WT or CCR2<sup>-/-</sup> mice at day 8 p.i. (M) Experimental layout of panel N. (N) Confocal microscopy images of lung sections from WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice and intravenously injected with TRITC-dextran to identify vascular leakage at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used. (ns, not statistically different, \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM. Pictures are representative of more than 6 lungs analysed.



**Fig.7 Selective expression of PD-L1 by MOs is necessary to control virus-induced immunopathology.** (A) Experimental layout of panel B. (B) Percentages of PD-L1-expressing MOs, GrzB, GrzA, IFN $\gamma$ -expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=4 to 6, two experiments). (C) Experimental layout of panel D. (D) Percentages of PD-L1-expressing MOs, GrzB, GrzA, IFN $\gamma$ -expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=4 to 6, one experiment). (E) Experimental layout of panel F. (F) Pie charts depicting the average numbers and the proportions of the different PD-L1+ cells in BALF at day 8 p.i. (G) Experimental layout of panels H-J. (H) Body weight as percentage of initial weight (n=5 to 6, one experiment). (I) Percentages of GrzB-expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=5 to 6, one experiment). (J) Percentages of GrzA, IL-10-expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=5 to 6, one experiment). (K) Experimental layout of panels L-P. (L) Body weight as percentage of initial weight (n=4 to 8, one experiment). (M) FACS plots of lung MOs expressing PD-L1. Mean percentages are shown. (N) Percentages of IL-10-expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=4 to 8, one experiment). (O) Percentages of GrzA, Prf-1 and CD107a-expressing lung CD4 T cells at day 8 p.i. (n=4 to 8, one experiment). (P) ELISA measurement of GrzB in BALF at day 8 p.i. (n=4 to 8, one experiment). For comparisons between two groups, Student's two-tailed t test was used. For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used. (ns, not statistically different, \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

## *Discussion*

A large body of evidence has identified microorganisms, including resident viruses (50, 51), as major drivers of immune imprinting.  $\gamma$ HVs represent the archetype of persistent viruses that have co-evolved as ‘*old friends*’ with their host. Although the immune escape of  $\gamma$ HVs from specific adaptive responses has been extensively studied (52, 53), less is known about the subversion of innate immunity. We uncovered a critical role for  $\gamma$ HV-imprinted MOs to recruit and establish regulatory crosstalk with CD4 T cells in the airways. By promoting the initial IL-10 release and inhibitory signals through checkpoint molecules,  $\gamma$ HV-imprinted MOs prevent host damage by attracting CD4 T cells to their immediate vicinity and attenuating cytotoxic responses.  $\gamma$ HVs have developed numerous strategies to produce asymptomatic infections in immunocompetent hosts, and this study demonstrates the essential role of MOs mobilized during the early stages of infection to regulate the balance between antiviral vigilance and immune tolerance.

MuHV-4 infection has been shown to train immunity against various heterologous infections (54, 55). In addition to triggering regulatory pathways to dampen specific antiviral defenses,  $\gamma$ HVs license CD8 (56), and potentially CD4 T cells, to protect their own niche against heterologous pathogens. Here, we provide evidence supporting a role for  $\gamma$ HV-imprinted MOs in the activation of CD4 T cells, while finely regulating their cytotoxic and degranulation capacities. As  $\gamma$ HV-imprinted MOs persist for months with phenotypic changes (10), future studies are needed to examine whether equivalent regulation of cytotoxic CD4 T cells by these MO-derived AMs occur in the context of long-term heterologous immunity. Interactome analysis revealed a dialogue between MuHV-4 imprinted MOs and CD4 T cells. A recent study also showed a requirement of CD8 T cells for the long-term training of MO-derived AMs in the context of adenovirus infection (57), thus it would be interesting to assess whether MuHV-4 recruited CD4 T cells contribute similarly to imprint phenotypic alterations on MO-derived cells with lasting functional consequences.

CD4 T cells with cytotoxic functions are of increasing interest. Indeed, their presence in certain viral infections (41, 58) including primary EBV infection (59), anti-tumor responses (40) or autoimmune disorders (60), has been associated either with disease aggravation (61) or with induction of protective immunity. As such, supercentenarians exhibit a physiological accumulation of cytotoxic CD4 T cells, which may represent an essential adaptation to achieve exceptional longevity by sustaining efficient immune responses to infections (62). With regard to the ambivalent contribution of cytotoxic CD4 T cells to beneficial or pathogenic immune responses, deciphering the regulation of these super killer cells by MOs is of major importance.

IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by multiple cell types that restrain immune activation in response to infection (63). Many herpesviruses manipulate the IL-10 pathway to facilitate host infection, latency establishment and viral dissemination (64, 65). Consistent with previous findings (66), we

identified the CD4 T cell population as the major source of IL-10 in the airways during the early stages of MuHV-4 infection. In addition to classical Foxp3<sup>+</sup> Treg CD4 T cells, we noticed a striking enrichment of Foxp3<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> effector CD4 T cells. Furthermore, by infecting IL-10<sup>-/-</sup> mice or CD4-cre IL10<sup>lox/lox</sup> with MuHV-4, we observed that an absence of T cell-derived IL-10 during acute infection disrupts the host-virus interaction, and triggers a massive neutrophil infiltration and an uncontrolled release of pro-inflammatory cytokines including IFN $\gamma$ . In addition to dampening the overall inflammation, IL-10 produced by CD4 T cells may be part of an autocrine feedback loop, regulating directly their effector properties, and especially their production of IFN $\gamma$ , as described for other infections (67).

In parallel to the IL-10 dependent regulatory pathway, we discovered the specific expression of PD-L1 by MOs recruited in response to  $\gamma$ HV infection as an important adaptive mechanism that minimizes immunopathology. Overexpression of immune checkpoint proteins leading to T cell exhaustion is a key immune evasion strategy exploited by many tumor cells. Since ‘*old friend viruses*’ have converged to exploit a similar immune evasion strategy, a thorough understanding of the mechanisms regulating PD-L1/PD-1 signalling could provide important insights for both anti-tumor and antiviral therapies. The impact of PD-L1/PD-1 axis in chronic infection is well described, whereas its role during the acute phase of viral infection is less clear (68). Given the diversity of biological functions of the PD-L1/PD-1 pathway, including suppression of TCR or costimulatory signalling (69) and the regulation of development, maintenance, and function of IL-10 producing T cells (70), further studies are needed to reveal the precise molecular cascades mediated by PD-L1 expressing MOs during MuHV-4 infection. Our results highlight the importance of PD-L1 expression by MOs in controlling the cytotoxic profile of CD4 T cells and in modulating their degranulation. As cytotoxic CD8 T cells can also express PD-1, it would be of great interest to study whether a similar regulation of PD-1<sup>+</sup> CD8 T cells by PD-L1<sup>+</sup> MOs takes place and limits tissue damage after MuHV-4 infection.

This research also provides substantial insights for clinical findings in human. Indeed, striking observations are the severe immune-related adverse events, termed irAEs that occur in some patients treated with checkpoint inhibitors and that exhibit uncontrolled T cell activation (71). Although the molecular basis of irARs is poorly defined, EBV-induced cytotoxic CD4 T cells have been pointed out as the main culprit in anti-PD-L1/PD-1 associated encephalitis, supporting a link between  $\gamma$ HV infections and irARs. In other contexts, EBV infection has been identified as a major risk factor to develop severe immunopathologies such as multiple sclerosis, or hemophagocytic lymphohistiocytosis, (72). Therefore, it would be interesting to determine whether a possible failure in the MO-CD4 T cell synergy is involved in the development of such immunopathological manifestations in humans.

The early age of  $\gamma$ HV infection and the multiple confounding factors encountered during life, make it very complicated to study  $\gamma$ HV immune imprinting in humans. In contrast, mice serve as valuable animal models of  $\gamma$ HV infection for which genetic and microbiological variables can be tested.

Although one of the limitations of the study is that it is confined on the mouse model, it will be interesting in the future to investigate similar immune signatures and regulatory pathways in human samples. Furthermore, as this work has only focused on the importance of the MO-CD4 regulatory axis, further studies are needed to determine the importance of a similar regulatory interplay between MOs and cytotoxic CD8 T cells.

Overall, this work has dissected the complex interplay between MuHV-4 imprinted MOs and CD4 T cells recruited in the airways during  $\gamma$ HV infection. This study has revealed the importance of the IL-10 and PD-L1/PD-1 signalling pathways in curbing pathological inflammation prior to the development of severe respiratory injury and systemic disease. Although PD-1 agonism deserves increased attention in the control of autoimmunity (73), this study may open new perspectives, beyond the context of  $\gamma$ HV infection, in the therapeutic management of various viral immunopathologies.

## ***Materials and Methods***

(For full methods, see the Supplementary Materials).

### **Study design**

This study was designed to understand the function of Ly6C<sup>hi</sup> MOs in modulating inflammation induced by respiratory  $\gamma$ HV infection. To this end, we compared the development of the acute post-infection immune response between WT, MC21-depleted and MO-deficient (CCR2<sup>-/-</sup>) mice. To clarify the cellular and molecular mechanisms, we generated genetically modified mice. Mechanisms of immunopathology were investigated during peak disease symptoms in mice at day 8 post-infection. End-point analyses included flow cytometry, ELISA, qPCR, scRNA-seq, and histology. All experiments used randomly assigned mice without investigator blinding. All data points and *n* values reflect biological replicates. The specific numbers and genotypes of the mice and the statistics performed are included in the legend of each figure.

### **Mice**

This study was conducted in strict accordance with guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (CETS 123). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of ULiège (Permit numbers: 2015 and 2215). All efforts were made to minimize suffering and all inoculations were performed under isoflurane anesthesia. Dissections were performed after euthanasia of the animals.

Female BALB/c, C57BL/6 WT mice, C57BL/6 CD45.1, and C57BL/6 albino mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). CCR2<sup>-/-</sup>, IL-10<sup>-/-</sup>, IL-10<sup>lox/lox</sup>, IL-10- $\beta$ -lactamase reporter (ITIB) and CD4-Cre mice were provided by Prof. F. Bureau, Prof. T. Marichal and Dr. C. Desmet (ULiège). These mice are available at Jackson laboratory or were described elsewhere (38). PD-L1<sup>fl/fl</sup> mice (CD274<sup>tm1Pfal</sup>) were originally obtained from Prof. Padraic Fallon (Trinity Biomedical Sciences Institute, Dublin). Ccr2-creER<sup>T2</sup> mKate2 mice (37) were originally obtained from Prof. Burkhard Becher (Institute of Experimental Immunology, Zurich University). All cre strains were heterozygous. Six- to eight-week-old female littermates were randomly assigned to experimental groups. During experiments, four to five female mice were cohoused per cage, food and water were provided *ad libitum*. All the animals were bred and/or housed in the ULiège Department of Infectious Diseases or at GIGA animal facility.

### **Infection model**

Intranasal (i.n) or intratracheal (i.t.) administration of virions was performed under isoflurane anesthesia, with  $1 \times 10^4$  plaque-forming unit (PFU) of MuHV-4 WT (74) or MuHV-4-Luc (75) in 50  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS). As control, mock-infected mice received 50  $\mu$ L of PBS. Clinical scoring was performed following infection, based on a customized clinical evaluation grid.

For MuHV-4-Luc infection, light emission was monitored by *in vivo* bioluminescence imaging using an IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Perkin Elmer) after D-luciferin (150 mg/kg of body weight, Perkin Elmer) intraperitoneal (i.p.) injection. Living Image v4.1 software (Perkin Elmer) was used to obtain the total flux (photons/s) using a fixed-sized region of interest or average radiance (photons/s/cm<sup>2</sup>/steradians).

### **Antibody-mediated *in vivo* depletion**

CCR2<sup>+</sup> MOs were systemically depleted using the rat anti-mouse CCR2 antibody, MC-21(23). Mice were injected i.p with 20  $\mu$ g or 100  $\mu$ g of MC-21 or isotype control (dissolved in 200  $\mu$ l PBS) at the indicated times p.i. and were weighed until euthanasia.

Neutrophils were depleted by i.p. injection of 100  $\mu$ g of anti-Ly-6G antibody (InVivo Mab anti-mouse Ly-6G, clone 1A8, Bioxcell) at the indicated times p.i.

PD-1/PD-L1 axis was blocked by i.n. and i.p. injection of 100  $\mu$ g of anti-PD-1 neutralizing antibody (InVivoMab anti-mouse PD-1, clone RMP1-14, BioXCell) or/and anti-PD-L1 neutralizing antibody (InVivoMab anti-mouse PD-L1, clone 10F.9G2, BioXCell).

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Results were expressed as means  $\pm$  SEM. Student's two-tailed t test was done to compare two groups. For comparisons of means between more than two experimental groups, two-way analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA was used as appropriate.  $P > 0.05$  was considered not significant (n.s.);  $P < 0.05$  was considered significant. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Each dot represents one mouse. For scRNA sequencing data, all statistical analyses were performed in R (v.4.1.0) and with various Bioconductor packages.

**Supplementary Materials**

Materials and Methods

Figs. S1 to S9

Tables S1 to S2

Raw data file S1 (in Excel spreadsheet)

## *Acknowledgements*

**Acknowledgments:** The authors thank P. Fallon, B. Becher, C. Desmet, T. Marichal and F. Bureau for providing mice and for helpful discussion. In particular, CD274<sup>tm1Pfal</sup> were obtained (with MTA) from Prof. P. Fallon (Trinity College Dublin) and Ccr2-creER<sup>T2</sup> mKate2 were obtained (with MTA) from Prof. B. Becher (Institute of Experimental Immunology, Zurich University). The authors also thank Prof C. Clercx and K-T. Phan (Faculty of Veterinary Medicine, ULiège) for their valuable help in measuring the haematocrit parameter; staff members from the GIGA Mouse facility; C. Humblet from the GIGA Immunohistology Platform; L. Karim and members from the GIGA Genomics Platform; the NIH Tetramer Facility for the tetramers H-2D<sup>b</sup>-ORF6<sup>487-495</sup>, and H-2K<sup>b</sup>-ORF61<sup>521-531</sup>; B.G. Dewals and A. Vanderplassen for insightful discussions; the technician and administrative team of the Immunology-Vaccinology lab, especially L. Dams and C. Espert, for their very helpful assistance.

**Funding:** This work was supported in part by the F.R.S./FNRS (Research fellow for C.M., P.L., L.R., Research associate support for B.M.; F.R.S./FNRS “incentive grant for scientific research to B.M., 40003542”), in part by the ERC Starting Grant (to B.M.) (ERC-StG-2019 VIROME, ID:853608) (B.M.), in part by the grant from Leon Fredericq Foundation (to C.M.), and by the EOS joint programme of F.R.S./FNRS-FWO (EOS ID: 30981113) (to L.G.).

**Author contributions:** C.M., L.G. and B.M. initiated the study, designed the experiments. J.J., R.S., P.L., L.R., B.M., and C.M. did most of the experiments. C.M. compiled the data; J.B. performed the transcriptomic analyses and supervised the bioinformatics and statistical analyses; F.P. and D.C. prepared the slides for immunohistochemistry; M.M. provided the MC21-depleting antibody; C.M., L.G. and B.M. analyzed the data; C.M. prepared the figures; L.R. provided input for research design and interpretation and edited the manuscript; L.G., and B.M. wrote the manuscript and supervised the work.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Data and materials availability:** Single-cell RNA-seq data are deposited in GEO under accession number (GSE205923). All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper or the Supplementary Materials.

## References

1. Y. Belkaid, T. W. Hand, Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. **157**, 121–141 (2014).
2. C. M. Lloyd, B. J. Marsland, Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity*. **46**, 549–561 (2017).
3. J. L. Schultze, A. C. Aschenbrenner, COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. **184** (2021), pp. 1671–1692.
4. C. Shi, E. G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
5. M. Merad, J. C. Martin, Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 355–362 (2020).
6. E. Cesarman, Gammaherpesviruses and Lymphoproliferative Disorders. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 349–372 (2014).
7. E. S. Barton, D. W. White, J. S. Cathelyn, K. A. Brett-McClellan, M. Engle, M. S. Diamond, V. L. Miller, H. W. Virgin IV, Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*. **447**, 326–329 (2007).
8. D. W. White, R. Suzanne Beard, E. S. Barton, Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol. Rev.* **245**, 189–208 (2012).
9. E. Barton, P. Mandal, S. H. Speck, Pathogenesis and Host Control of Gammaherpesviruses: Lessons from the Mouse. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 351–397 (2011).
10. B. Machiels, M. Dourcy, X. Xiao, J. Javaux, C. Mesnil, C. Sabatel, D. Desmecht, F. Lallemand, P. Martinive, H. Hammad, M. Guilliams, B. Dewals, A. Vanderplasschen, B. N. Lambrecht, F. Bureau, L. Gillet, A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat. Immunol.* **18** (2017), doi:10.1038/ni.3857.
11. M. H. Askenase, S. J. Han, A. L. Byrd, D. MoraisdaFonseca, N. Bouladoux, C. Wilhelm, J. E. Konkel, T. W. Hand, N. Lacerda-Queiroz, X. zhuan Su, G. Trinchieri, J. R. Grainger, Y. Belkaid, Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection.

- Immunity*. **42**, 1130–1142 (2015).
12. N. V. Serbina, E. G. Pamer, Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–318 (2006).
  13. M. Mack, J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. I. Proudfoot, J. Plachý, H. Brühl, M. Frink, H.-J. Anders, V. Vielhauer, J. Pflister, M. Stangassinger, D. Schlöndorff, Expression and Characterization of the Chemokine Receptors CCR2 and CCR5 in Mice. *J. Immunol.* **166**, 4697–4704 (2001).
  14. T. Lenac Rovis, P. Kucan Brlic, N. Kaynan, V. Juranic Lisnic, I. Brizic, S. Jordan, A. Tomic, D. Kvestak, M. Babic, P. Tsukerman, M. Colonna, U. Koszinowski, M. Messerle, O. Mandelboim, A. Krmpotic, S. Jonjic, Inflammatory monocytes and NK cells play a crucial role in DNAM-1–dependent control of cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* **213**, 1835–1850 (2016).
  15. C. D. Conrady, M. Zheng, N. A. Mandal, N. van Rooijen, D. J. J. Carr, IFN- $\alpha$ -driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. *Mucosal Immunol.* **2013**, 6, 45–55 (2012).
  16. M. Rolot, A. M. Dougall, A. Chetty, J. Javaux, T. Chen, X. Xiao, B. Machiels, M. E. Selkirk, R. M. Maizels, C. Hokke, O. Denis, F. Brombacher, A. Vanderplasschen, L. Gillet, W. G. C. Horsnell, B. G. Dewals, Helminth-induced IL-4 expands bystander memory CD8<sup>+</sup> T cells for early control of viral infection. *Nat. Commun.* **9**, 4516 (2018).
  17. H. Xiong, E. G. Pamer, Monocytes and infection: Modulator, messenger and effector. *Immunobiology*. **220**, 210–214 (2015).
  18. J. V. Camp, C. B. Jonsson, A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Front. Immunol.* **0**, 550 (2017).
  19. Q. Liu, Y. H. Zhou, Z. Q. Yang, The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 3–10 (2016).
  20. Y. Tang, J. Liu, D. Zhang, Z. Xu, J. Ji, C. Wen, Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front. Immunol.* **11**, 1708 (2020).
  21. A. L. Croxford, M. Lanzinger, F. J. Hartmann, B. Schreiner, F. Mair, P. Pelczar, B. E. Clausen, S. Jung, M. Greter, B. Becher, The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2<sup>+</sup> Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*. **43**, 502–514 (2015).

22. H. Bouabe, Y. Liu, M. Moser, M. R. Bosl, J. Heesemann, Novel Highly Sensitive IL-10- - Lactamase Reporter Mouse Reveals Cells of the Innate Immune System as a Substantial Source of IL-10 In Vivo. *J. Immunol.* **187**, 3165–3176 (2011).
23. C. Bosteels, K. Neyt, M. Vanheerswyngheles, M. J. van Helden, D. Sichien, N. Debeuf, S. De Prijck, V. Bosteels, N. Vandamme, L. Martens, Y. Saeys, E. Louagie, M. Lesage, D. L. Williams, S. C. Tang, J. U. Mayer, F. Ronchese, C. L. Scott, H. Hammad, M. Guilliams, B. N. Lambrecht, Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity.* **52**, 1039-1056.e9 (2020).
24. C. Mesnil, C. M. Sabatel, T. Marichal, M. Toussaint, D. Cataldo, P.-V. Drion, P. Lekeux, F. Bureau, C. J. Desmet, Resident CD11b+Ly6C- Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice. *PLoS One.* **7**, e53242 (2012).
25. Y. Ohmori, T. A. Hamilton, IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J. Immunol.* **159** (1997).
26. R. A. Rahimi, A. D. Luster, Chemokines: Critical Regulators of Memory T Cell Development, Maintenance, and Function. *Adv. Immunol.* **138**, 71–98 (2018).
27. R. Tokunaga, W. Zhang, M. Naseem, A. Puccini, M. D. Berger, S. Soni, M. McSkane, H. Baba, H.-J. Lenz, CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - a target for novel cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **63**, 40 (2018).
28. M. Stoeckius, S. Zheng, B. Houck-Loomis, S. Hao, B. Z. Yeung, W. M. Mauck, P. Smibert, R. Satija, Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* **19** (2018).
29. L. Spinelli, S. Carpentier, F. Montanana Sanchis, M. Dalod, T. P. Vu Manh, BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics.* **16**, 814 (2015).
30. P. A. Szabo, H. M. Levitin, M. Miron, M. E. Snyder, T. Senda, J. Yuan, Y. L. Cheng, E. C. Bush, P. Dogra, P. Thapa, D. L. Farber, P. A. Sims, Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat. Commun.* **2019 101**. **10**, 1–16 (2019).
31. L. Gabryšová, M. Alvarez-Martinez, R. Luisier, L. S. Cox, J. Sodenkamp, C. Hosking, D. Pérez-Mazliah, C. Whicher, Y. Kannan, K. Potempa, X. Wu, L. Bhaw, H. Wende, M. H. Sieweke, G. Elgar, M. Wilson, J. Briscoe, V. Metzsis, J. Langhorne, N. M. Luscombe, A. O'Garra, c-Maf

- controls immune responses by regulating disease-specific gene networks and repressing IL-2 in CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* 2018 195. **19**, 497–507 (2018).
32. C. D. Slade, K. L. Reagin, H. G. Lakshmanan, K. D. Klonowski, W. T. Watford, Placenta-specific 8 limits IFN $\gamma$  production by CD4 T cells in vitro and promotes establishment of influenza-specific CD8 T cells in vivo. *PLoS One.* **15**, e0235706 (2020).
  33. A. E. Lukacher, L. A. Morrison, V. L. Braciale, B. Malissen, T. J. Braciale, Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* **162**, 171–187 (1985).
  34. J. J. Zaunders, W. B. Dyer, B. Wang, M. L. Munier, M. Miranda-Saksena, R. Newton, J. Moore, C. R. Mackay, D. A. Cooper, N. K. Saksena, A. D. Kelleher, Identification of circulating antigen-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with a CCR5<sup>+</sup>, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood.* **103**, 2238–2247 (2004).
  35. K. A. Stuller, E. Flaño, CD4 T Cells Mediate Killing during Persistent Gammaherpesvirus 68 Infection. *J. Virol.* **83**, 4700–4703 (2009).
  36. R. Browaeys, W. Saelens, Y. Saeys, NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat. Methods.* **17**, 159–162 (2020).
  37. P. J. Norris, H. F. Moffett, O. O. Yang, D. E. Kaufmann, M. J. Clark, M. M. Addo, E. S. Rosenberg, Beyond Help: Direct Effector Functions of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Virol.* **78**, 8844–8851 (2004).
  38. D. M. Brown, A. T. Lampe, A. M. Workman, The Differentiation and Protective Function of Cytolytic CD4 T Cells in Influenza Infection. *Front. Immunol.* **0**, 93 (2016).
  39. D. Y. Oh, S. S. Kwek, S. S. Raju, T. Li, E. McCarthy, E. Chow, D. Aran, A. Ilano, C. C. S. Pai, C. Rancan, K. Allaire, A. Burra, Y. Sun, M. H. Spitzer, S. Mangul, S. Porten, M. V. Meng, T. W. Friedlander, C. J. Ye, L. Fong, Intratumoral CD4<sup>+</sup> T cells mediate anti-tumor cytotoxicity in human bladder cancer. *Cell.* **181**, 1612-1625.e13 (2018).
  40. A. Cachot, M. Bilous, Y.-C. Liu, X. Li, M. Saillard, M. Cenerenti, G. A. Rockinger, T. Wyss, P. Guillaume, J. Schmidt, R. Genolet, G. Ercolano, M. P. Protti, W. Reith, K. Ioannidou, L. de Leval, J. A. Trapani, G. Coukos, A. Harari, D. E. Speiser, A. Mathis, D. Gfeller, H. Altug, P. Romero, C. Jandus, Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci. Adv.* **7** (2021).

41. S. Verma, D. Weiskopf, A. Gupta, B. McDonald, B. Peters, A. Sette, C. A. Benedict, Cytomegalovirus-Specific CD4 T Cells Are Cytolytic and Mediate Vaccine Protection. *J. Virol.* **90**, 650–658 (2016).
42. T. Maehara, N. Kaneko, C. A. Perugino, H. Mattoo, Jesper Kers, H. Allard-Chamard, V. S. Mahajan, H. Liu, S. J. H. Murphy, M. Ghebremichael, D. Fox, A. S. Payne, R. Lafyatis, J. H. Stone, D. Khanna, S. Pillai, Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* **130**, 2451–2464 (2020).
43. J. A. Juno, D. van Bockel, S. J. Kent, A. D. Kelleher, J. J. Zaunders, C. M. L. Munier, Cytotoxic CD4 T cells—friend or foe during viral infection? *Front. Immunol.* **8** (2017), , doi:10.3389/fimmu.2017.00019.
44. E. R. Jellison, S.-K. Kim, R. M. Welsh, Cutting Edge: MHC Class II-Restricted Killing In Vivo during Viral Infection. *J. Immunol.* **174**, 614–618 (2005).
45. N. A. Scott, Y. Zhao, B. Krishnamurthy, S. I. Mannering, T. W. H. Kay, H. E. Thomas, IFN $\gamma$ -Induced MHC Class II expression on islet endothelial cells is an early marker of insulinitis but is not required for diabetogenic CD4<sup>+</sup>T cell migration. *Front. Immunol.* **9**, 2800 (2018).
46. J. E. Wosen, D. Mukhopadhyay, C. Macaubas, E. D. Mellins, Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. *Front. Immunol.* **0**, 2144 (2018).
47. P. Smith, L. A. Jeffers, M. Koval, Measurement of Lung Vessel and Epithelial Permeability In Vivo with Evans Blue. *Methods Mol. Biol.* **2367**, 137–148 (2021).
48. M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
49. G. Schönrich, M. J. Raftery, The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **0**, 207 (2019).
50. H. W. Virgin, The virome in mammalian physiology and disease. *Cell.* **157**, 142–150 (2014).
51. P. Brodin, V. Jovic, T. Gao, S. Bhattacharya, C. J. Angel, D. Furman, S. Shen-Orr, C. L. Dekker, G. E. Swan, A. J. Butte, H. T. Maecker, M. M. Davis, Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell.* **160**, 37–47 (2015).
52. P. C. Doherty, J. P. Christensen, G. T. Belz, P. G. Stevenson, M. Y. Sangster, Dissecting the host

- response to a  $\gamma$ -herpesvirus. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **356** (2001), pp. 581–593.
53. P. G. Stevenson, Immune evasion by gamma-herpesviruses. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 456–462 (2004).
  54. F. Saito, T. Ito, J. M. Connett, M. A. Schaller, W. F. Carson, C. M. Hogaboam, R. Rochford, S. L. Kunkel, MHV68 Latency Modulates the Host Immune Response to Influenza A Virus. *Inflammation.* **36**, 1295–1303 (2013).
  55. A. Haque, N. Rachinel, M. R. Quddus, S. Haque, L. H. Kasper, E. Usherwood, Co-infection of malaria and  $\gamma$ -herpesvirus: Exacerbated lung inflammation or cross-protection depends on the stage of viral infection. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 396–404 (2004).
  56. M. Dourey, C. Maquet, L. Dams, G. Gilliaux, J. Javaux, D. Desmecht, M. Mack, B. G. Dewals, B. Machiels, L. Gillet, A gammaherpesvirus licenses CD8 T cells to protect the host from pneumovirus-induced immunopathologies. *Mucosal Immunol.* (2020), doi:10.1038/s41385-020-0293-7.
  57. Y. Yao, M. Jeyanathan, S. Haddadi, N. G. Barra, M. Vaseghi-Shanjani, D. Damjanovic, R. Lai, S. Afkhami, Y. Chen, A. Dvorkin-Gheva, C. S. Robbins, J. D. Schertzer, Z. Xing, Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell.* **175**, 1634-1650.e17 (2018).
  58. D. Weiskopf, D. J. Bangs, J. Sidney, R. V. Kolla, A. D. de Silva, A. M. de Silva, S. Crotty, B. Peters, A. Sette, Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E4256–E4263 (2015).
  59. B. J. Meckiff, K. Ladell, J. E. McLaren, G. B. Ryan, A. M. Leese, E. A. James, D. A. Price, H. M. Long, Primary EBV Infection Induces an Acute Wave of Activated Antigen-Specific Cytotoxic CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **203**, 1276–1287 (2019).
  60. L. M. Peeters, M. Vanheusden, V. Somers, B. van Wijmeersch, P. Stinissen, B. Broux, N. Hellings, Cytotoxic CD4+ T Cells Drive Multiple Sclerosis Progression. *Front. Immunol.* **8**, 1160 (2017).
  61. B. J. Meckiff, C. Ramírez-Suástegui, V. Fajardo, S. J. Chee, A. Kusnadi, H. Simon, S. Eschweiler, A. Grifoni, E. Pelosi, D. Weiskopf, A. Sette, F. Ay, G. Seumois, C. H. Ottensmeier, P. Vijayanand, Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in

- COVID-19. *Cell*. **183**, 1340-1353.e16 (2020).
62. K. Hashimoto, T. Kouno, T. Ikawa, N. Hayatsu, Y. Miyajima, H. Yabukami, T. Terooatea, T. Sasaki, T. Suzuki, M. Valentine, G. Pascarella, Y. Okazaki, H. Suzuki, J. W. Shin, A. Minoda, I. Taniuchi, H. Okano, Y. Arai, N. Hirose, P. Carninci, Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 24242–24251 (2019).
  63. W. Ouyang, S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez, S. G. Hymowitz, Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71–109 (2011).
  64. A. M. Siegel, J. H. Herskowitz, S. H. Speck, The MHV68 M2 Protein Drives IL-10 Dependent B Cell Proliferation and Differentiation. *PLoS Pathog.* **4** (2008), doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000039.
  65. K. W. Moore, P. Vieira, D. F. Fiorentino, M. L. Trounstein, T. A. Khan, T. R. Mosmann, Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. **248**, 1230–4 (1990).
  66. A. K. Kimball, L. M. Oko, R. E. Kaspar, L. F. van Dyk, E. T. Clambey, High-Dimensional Characterization of IL-10 Production and IL-10–Dependent Regulation during Primary Gammaherpesvirus Infection. *ImmunoHorizons*. **3**, 94–109 (2019).
  67. J. Sun, A. Cardani, A. K. Sharma, V. E. Laubach, R. S. Jack, W. Müller, T. J. Braciale, Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog.* **7** (2011), doi:10.1371/journal.ppat.1002173.
  68. J. Attanasio, E. J. Wherry, Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity*. **44**, 1052–1068 (2016).
  69. M. J. Butte, M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*. **27**, 111–122 (2007).
  70. L. Wang, K. Pino-Lagos, V. C. De Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, R. J. Noelle, Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9331–9336 (2008).

71. D. B. Johnson, J. M. Balko, M. L. Compton, S. Chalkias, J. Gorham, Y. Xu, M. Hicks, I. Puzanov, M. R. Alexander, T. L. Bloomer, J. R. Becker, D. A. Slosky, E. J. Phillips, M. A. Pilkinton, L. Craig-Owens, N. Kola, G. Plautz, D. S. Reshef, J. S. Deutsch, R. P. Deering, B. A. Olenchock, A. H. Lichtman, D. M. Roden, C. E. Seidman, I. J. Koralnik, J. G. Seidman, R. D. Hoffman, J. M. Taube, L. A. Diaz, R. A. Anders, J. A. Sosman, J. J. Moslehi, Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1749–1755 (2016).
72. R. A. Marsh, Epstein-Barr virus and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Front. Immunol.* **8**, 1–9 (2018).
73. S. Grebinoski, A. M. Gocher-Demske, D. A. A. Vignali, Catch and release: freeing up PD-L1 ameliorates autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2022 233. **23**, 344–346 (2022).
74. D. Blaskovic, M. Stanceková, J. Svobodová, J. Mistríková, Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol.* **24**, 468 (1980).
75. R. Milho, C. M. Smith, S. Marques, M. Alenquer, J. S. May, L. Gillet, M. Gaspar, S. Efstathiou, J. P. Simas, P. G. Stevenson, In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 21–32 (2009).
76. R. Browaeys, W. Saelens, Y. Saeys, NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat. Methods.* **17**, 159–162 (2020).
77. Z. Gu, L. Gu, R. Eils, M. Schlesner, B. Brors, Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics.* **30**, 2811–2812 (2014).

## ***Supplementary materials***

### **Ly6C<sup>hi</sup> monocytes balance regulatory and cytotoxic CD4 T cell responses to control virus-induced immunopathology**

**The file includes:**

#### **Materials and Methods**

#### **Figs. S1 to S9**

Fig.S1. MHCII<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> MOs mobilized during MuHV-4 infection exhibit regulatory properties, related to Fig.1

Fig.S2. Depletion of CCR2<sup>+</sup> MOs in BALB/c mice worsens MuHV-4 associated disease, related to Fig.1

Fig.S3. Alveolar niche is efficiently reconstituted after infection in a CCR2-independent manner, related to Fig.1

Fig.S4. IL-10 production by MOs is not the direct factor protecting against weight loss, related to Fig.3

Fig.S5. Absence of MOs does not affect the priming of CD4 T cells but rather modulates local instruction in lung, related to Fig.3

Fig.S6. Lung MOs and CD4 T cells were isolated from mock or MuHV-4 WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice for single-cell transcriptomic analysis, related to Fig.4

Fig.S7. MuHV-4 imprinted MOs preferentially infiltrate the alveoli and establish a reciprocal dialogue with recruited CD4 T cells, related to Fig.4

Fig.S8. Absence of MuHV-4 imprinted MOs increases the numbers of pre-armed cytotoxic CD4 T cells in the airways, related to Fig.5

Fig.S9. Gating strategy of lung MO and CD4 T cell populations identified by flow cytometry isolated from mock or MuHV-4 infected mice, related to Materials and Methods

#### **Tables S1 to S2**

Table S1. Key resources

Table S2. Clinical evaluation grid

## Materials and Methods

### Cell lines and Cell Culture

BHK-21 (Baby hamster kidney) fibroblasts (ATCC CCL-10, RRID:CVCL\_1915) were cultured in DMEM, supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 10% FCS in 5% CO<sub>2</sub> 37°C incubator. Cells were free of mycoplasma contamination.

### Viruses

The wild-type MHV-68 strain of MuHV-4 and a luciferase-expressing MuHV-4 strain (MuHV-4-Luc) were used and propagated on BHK-21 cells. Cells and supernatant were harvested at about 4 days p.i. (~85% of lysis) and debris were removed by low-speed centrifugation (1000 × g, 10 min, 4 °C). Virions present in the supernatant were harvested by ultracentrifugation (100,000 × g, 2 h at 4 °C) and purified through a 30% weight volume<sup>-1</sup> sucrose cushion (100,000 × g, 2 h at 4 °C), washed in PBS before being stored in PBS at -80 °C. Viral titers were determined by plaque assay on BHK-21 cells. Briefly, BHK-21 cells monolayers were incubated with 10-fold dilution of viral stock at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. Inoculum was then replaced by semisolid medium containing 0.6% carboxymethylcellulose. Cells were further incubated for 4 days then fixed in 4% paraformaldehyde and stained for plaques counting.

### Viral quantification

Viral genome loads were measured using a Taqman-based real-time PCR reaction (CFX). DNA was extracted from lungs using QIAamp DNA mini kit (Qiagen) and 50 ng per sample was used in iQ supermix (Biorad) to amplify a MuHV-4-specific sequence (genomic co-ordinates 43,015–43,138, NC\_001826.2): gene ORF25 with primers ORF25fwd, 5'- atggtatagccgcctttgtg-3' and ORF25rev 5'-acaagtggatgaagggtgc-3' and probe 5'-6- carboxyfluorescein [FAM]-caaccactggatcagcataaaacttatgaa-black hole quencher [BHQ1]-3'. Standard curves were obtained using pGEMT-easy (Promega) plasmid templates in which MuHV-4 ORF25 was cloned.

### Respiratory mechanics

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (Nembutal®) i.p. at a dose of 50 mg/kg. The trachea was isolated via dissection of the neck area and cannulated using an 18-gauge blunt metal cannula (typical resistance of 0.18 cmH<sub>2</sub>O/mL), which was secured in place with a nylon suture. The mouse was then connected to the flexiVent computer-controlled piston ventilator (SCIREQ) via the cannula, which was attached to the FX adaptor Y-tubing. Mice were ventilated using default settings for

mice, which consisted of a positive end expiratory pressure at 3 cm H<sub>2</sub>O, a 10mL/kg tidal volume, a respiratory rate at 150 breaths per minute and a fraction of inspired oxygen of 0.21 (that is, room air). Respiratory mechanics were assessed using the forced oscillation technique, using the latest version of the flexiVent operating software (flexiWare version 8.1.3).

### **Antigen-specific antibody titers**

Nunc Maxisorp ELISA plates (Nalgene Nunc) were coated overnight at 4 °C with MuHV-4 virions (10<sup>6</sup> PFU /mL of carbonate buffer pH 9.5 containing 0.1% Triton X-100) before being incubated for 1 h in wash/blocking buffer (0.1% Tween-20 and 3% BSA in PBS) at RT. Plates were then incubated with mouse sera (serial dilutions) in wash/blocking buffer for 2h at RT. After incubation 1h at RT with biotinylated goat anti-mouse IgG or IgG2A, detection was performed using Streptavidine-alkaline phosphatase in wash/blocking buffer for 1h at RT. Chromogenic reaction was performed using p-Nitrophenylphosphate (Sigma) and stopped in NaOH 1M before absorbance was read at 405 nm using an iMark ELISA plate reader (Biorad).

### **Tamoxifen treatment**

Tamoxifen (Sigma T5648) was dissolved in corn oil to 10 mg/mL and administered in 200 µL doses via i.p. injection (2 mg/dose) at the indicated times p.i.

### **BAL, cytology and cytokine measurement**

After euthanasia, the trachea was catheterized and BAL was performed by two consecutive flushes of the lungs with 1 mL of ice-cold PBS containing cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). One tablet of inhibitor cocktail was dissolved in 50 mL ice-cold PBS. Cell density in BALF was evaluated using a hemocytometer after Tuerk solution staining (Sigma-Aldrich). Cytokine production (IFN $\gamma$ , GrzB B) was measured by specific ELISA (Ready-SET-Go, eBioscience) according to manufacturer's instructions.

### ***In vivo* lung vascular permeability assay**

***Tetramethyl-rhodamin assay:*** Mice were i.v. injected with tetramethylrhodamin-conjugated (TRITC) dextran 10 minutes before euthanasia (50mg/kg; Thermofisher Scientific, D3307). After euthanasia, lungs were perfused, collected, fixed in 4% PFA-PBS overnight and embedded in paraffin. 5µm-thick sections were deparaffinized, rehydrated and mounted with DAPI Fluoromount-G. Sections were imaged using OLYMPUS VS200 ASW 3.2. scanner and analyzed using the OLYMPUS OlyVIA software.

**Miles assay:** Mice were i.v. injected with Evan's Blue (50mg/kg; SigmaAldrich, E2129) 30 minutes before euthanasia. After euthanasia, BALF was collected as described. Lungs were perfused before harvesting. Evan's Blue concentrations from lungs and BALF were measured by a spectrophotometer (620nm) after 24 hours of formamide extraction.

### **Lung histology**

Lungs were fixed in 5% formalin, paraffin embedded and cut into 5- $\mu$ m sections that were then stained with hematoxylin-eosin before analysis.

### **Cell suspension preparations from organs**

To harvest lung cells, mice were perfused with ice-cold PBS through the right ventricle. Then, lung lobes were collected into a C-Tube (Miltenyi) containing complete Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) medium, 1 mg/ml collagenase D (Roche) and 50  $\mu$ g/ml DNase I (Roche). These lung lobes were processed with a gentleMACS dissociator (Miltenyi) and, finally, were incubated for 30 min at 37 °C. BM cells were obtained from adult mice by crushing the femurs and tibiae. Blood was collected by cardiac puncture and was immediately suspended in ice-cold PBS complemented with 5 mM EDTA. Suspensions of cells were finally washed and treated for erythrocytes lysis (1X RBC Lysis Buffer, eBioscience™). To obtain mediastinal lymph nodes (MLN) cells, MLNs were harvested after euthanasia, and single-cell suspensions were prepared by crushing, using sterile syringe plunger. For all preparations, cells were finally strained through a 70- $\mu$ m filter. Cell density was evaluated using a hemocytometer after Trypan solution staining (Sigma-Aldrich).

### **MHC-tetramer stainings**

Lung cells were processed as described above from C57BL/6 WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. Cells were incubated with BV421-conjugated tetramers H-2D<sup>b</sup>-ORF6<sup>487-495</sup> (AGPHNDMEI, 90 nM) and H-2K<sup>b</sup>-ORF61<sup>521-531</sup> (TSINFKVI, 45 nM) (NIH Tetramer Core Facility) for 30 min at RT before further staining. Samples were analyzed on a BD LSR Fortessa X-20 flow cytometer (BD Biosciences).

### **Assessment of IL-10 expression in ITIB mice**

To assess IL-10 expression using IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB mice, BALF and lung cells isolated from IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB and control WT mice were resuspended in a CCF4-AM (Thermo Fisher Scientific, Cat. K1028)-containing solution supplemented with probenecid (Thermo Fisher Scientific, Cat. P36400) prepared according to manufacturer's instructions, and incubated 90 min at 29 °C. CCF4-AM is a lipophilic ester derivative that consists of a cephalosporin core bridging a 7-hydroxycoumarin to a fluorescein. Exciting intact CCF4 at 405 nm induces fluorescence resonance

energy transfer (FRET) from the coumarin to the fluorescein that subsequently emits green light. IL-10 expression is evaluated by detection of 450 nm fluorescence (blue fluorescent product of the cleaved CCF4 substrate by  $\beta$ -lactamase, under the control of the IL-10 gene promoter) in CCF4 loaded cells. Protocol for flow cytometry surface staining was classically used before analysis. CCF4-loaded WT cells were used as negative controls.

### **Analysis of cytokine concentrations**

Two different panels were used: 13-plex anti-virus mouse panel of cytokines/chemokines and 13-plex customized mouse panel from LEGENDplex bead array (BioLegend) according to the manufacturer's protocol on BALF samples. All samples were run on a BD LSR Fortessa X-20 flow cytometer and analysis was performed using LEGENDplex analysis software (BioLegend).

### **Flow cytometry**

Labeling of single-cell suspension was performed on ice in PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 2mM EDTA. Cells were first incubated for 20 min with a purified rat IgG2a anti-mouse CD16/CD32 antibody (BioLegend) to block Fc binding. Flow cytometry staining was performed for 30 min at 4 °C in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) with various panels of fluorochrome-conjugated antibodies. The gating strategy to identify the different cell populations included successive forward- and side-scatter gating, exclusion of multiplets and selection of living cells with the viability markers Zombie Aqua or Violet™ (Biolegend). The Foxp3 Transcription Factor Staining kit was purchased from eBioscience™ and used for intranuclear staining. Samples were processed on a BD LSR Fortessa X-20 equipped with 50-mW violet 405-nm, 50-mW blue 488-nm, 50-mW yellow-green 561-nm and 40-mW red 633-nm lasers and an ND1.0 filter in front of the FSC photodiode. Gating strategy used to identify MO and CD4 T cell populations is described in Supplementary Materials (**Figure S9**).

### ***Ex vivo* restimulation and cytokine production**

For IL-10 intracellular staining, single cell suspensions were stimulated in complete RPMI medium containing 2 $\mu$ M monensin and 2 $\mu$ M brefeldin (BD Biosciences) and 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Life Technologies) for 4 hours at 37°C. Depending on conditions, we added 10 ng/mL lipopolysaccharides (LPS) (Sigma-Aldrich) for MO intracellular staining, or 1  $\mu$ g/mL purified CD28 antibody (BioLegend) and 2  $\mu$ g/mL purified CD3 $\epsilon$  antibody (BioLegend) for CD4 T cells intracellular staining. For IFN $\gamma$  intracellular staining, single cell suspensions were stimulated in complete RPMI medium containing 2 $\mu$ M monensin and 2 $\mu$ M brefeldin (BD Biosciences) and 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Life Technologies) for 4 hours at 37°C with 1  $\mu$ g/mL purified CD28 antibody (BioLegend) and 2  $\mu$ g/mL purified CD3 $\epsilon$  antibody (BioLegend). For Grz A and B intracellular stainings, single cell

suspensions were accumulated in complete RPMI medium containing 2 $\mu$ M monensin and 2 $\mu$ M brefeldin (BD Biosciences) and 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Life Technologies) for 4 hours at 37°C. For Prf-1 intracellular staining, single cell suspensions were stimulated in complete RPMI medium containing 2 $\mu$ M monensin and 2 $\mu$ M brefeldin (BD Biosciences) and 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Life Technologies) for 4 hours at 37°C with 1  $\mu$ g/mL purified CD28 antibody (BioLegend), 2  $\mu$ g/mL purified CD3 $\epsilon$  antibody (BioLegend), 1  $\mu$ g/mL purified CD49d antibody (BioLegend) and 0,5  $\mu$ g/mL APC anti-mouse CD107a (LAMP-1) antibody (Biolegend).

### **Immunostainings and confocal microscopy analyses**

Lungs were collected from C57BL/6 WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. After euthanasia, 1 mL of OCT compound (Scigen<sup>TM</sup>) was injected i.t. and lungs were embedded in OCT compound prior to freezing in blocks. Sections were processed on a Leica CM3050S cryomicrotome (7-10  $\mu$ m), dried on slides for 30 min, and kept at -80°C until staining. Tissue sections were then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at RT, permeabilized or not in a solution composed of 0.4% v/v of Triton-X100 (Sigma) and 125 mM of glycine (Sigma) for 10 min at RT and blocked in PBS containing 5% v/v of BSA (Sigma) for 1h at RT. Sections were first stained with the following primary antibodies depending of the panels: rat IgG2a anti-mouse CD68 (1/50; Thermo Fisher Scientific; 14-0681-82) or polyclonal rabbit IgG anti-mouse MHC Class II (1:500, Invitrogen, PA5-116876), rat IgG2b anti-mouse CD4 (1:50; ThermoFisher; 14-0041-82), polyclonal goat IgG anti-mouse GrzB (1:100; R&D systems, AF1865) for 2h at RT. Sections were then stained with the following secondary antibodies respectively: anti-rat IgG2a AF488 (1:500; abcam; ab172332) or anti-rabbit IgG AF555 (1:1000; Thermo Fisher; A-21428), anti-rat IgG2b AF647 (1:500; BioLegend; 408208), NL557-conjugated anti-goat antibody (1:1000; R&D systems; NL001) for 1h at RT. Cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Biolegend) for 10 min at RT. Sections were mounted with Prolong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher) and stored for at least 5h at RT. Samples were rinsed 3 times in PBS between each of the above-mentioned steps. Regarding the GrzB staining, two distinct immunofluorescence staining protocols were used: the classical protocol as described above including the permeabilization and stainings steps with Triton X-100, and an alternative protocol excluding permeabilization steps and the use of Triton X-100. The alternative surface labeling process allows the distinction of proteins expressed only at the level of the cell surface and released in the extracellular medium separately from the proteins expressed within the cell. Images were acquired on a Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope and analyzed using the Fiji software. For the quantification of lung GrzB<sup>+</sup> CD4 T cells in the vicinity of MHCII<sup>+</sup> endothelial and epithelial cells, GrzB<sup>+</sup> CD4 T cells were quantified and categorized as “being in close contact with MHCII<sup>+</sup> endothelial and epithelial cells”, when the distance between the two was <10  $\mu$ m. Quantification was performed on 10 different areas on lung sections for each condition.

### **Generation of BM chimeras**

BM chimeras were constructed by exposure of C57BL/6 CD45.1.2+ mice to a whole body lethal irradiation protocol (Gammacell 40 Exactor, 6 Gy). The next day, recipient mice were reconstituted by intravenous injection of  $5 \times 10^6$  BM cells isolated from femurs and tibias of donor CD45.1+ WT and CD45.2+ IL-10<sup>-/-</sup> or CCR2<sup>-/-</sup> mice and mixed at a 1:1 ratio. From 1 week before to 3 weeks after irradiation, mice were given broad-spectrum antibiotherapy (Emdotrim 10% SOL, Emdoka). Mice were left untreated for 8 weeks to allow complete reconstitution and chimerism of the different blood leukocytes populations was then confirmed by flow cytometry.

### **Single cell RNA sequencing**

Libraries preparations for single-cell immune profiling, sequencing, and post-processing of the raw data were performed at the GIGA-Genomics Core Facility (Belgium). Sorted cells were washed with 1X PBS (calcium and magnesium free) containing 0,04% weight/volume BSA (400 µg/mL). BALF and lung cells were pooled together within each condition after cell hashing with barcoded antibodies (BioLegend). We equalized numbers of cells between conditions for the scRNA-seq profiling and cell concentration was adjusted to 1.000 total cells/µL and 16.000 cells were loaded on Chromium Controller (10x Genomics). Samples were further processed for droplet-based RNA sequencing and libraries were prepared using Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v3 according to manufacturer's protocol (10x Genomics). Amplified cDNA quality controls were performed with an Agilent bioanalyzer (Agilent) and final library profile were checked on Qiaxcel (Qiagen). Sequencing libraries were loaded on an Illumina Novaseq sequencer with NovaSeq SP 100 v1 kit (Illumina, CA, USA) using the following read lengths: 28 bp for Read1 (18 bp Barcode + 10 bp Randomer), 8 bp for Sample Index and 88 bp for Read2. Library quantification was processed with KAPA Library quantification kit (KAPA Biosystems). Gene counts were obtained by aligning reads to the mm10 genome using Cell Ranger software (10x Genomics).

### **Analysis of scRNA-seq samples**

Cell Ranger software (v.3.0.2) (10x Genomics) was used to demultiplex Illumina BCL files to FASTQ files (cellranger mkfastq), to perform alignment to mouse GRCm38/mm10 genome, filtering, UMI counting and to produce gene–barcode matrices (cellranger count). Subsequent analysis used R (v.4.1.0) and the R package Seurat (v.4.0.3). First, individual data sets were read into R as count matrices and converted into Seurat objects (min.cells = 3, min.features = 200 genes) cells with  $\leq 200$  distinct genes and  $\geq 10\%$  of mitochondrial reads were filtered out. Each matrix were integrated using FindIntegrationAnchors with anchor.features = 2000 and dims = 1:30 options. Based on an elbow plot, principal components 1:20 were used in the subsequent analyses.

**Cell types identification.** Cells were grouped in 82 metacells using the FindCluster function of Seurat with a resolution of 10. Identification was made using the SingleR package.

**UMAP representation.** Nonlinear dimensional reduction with UMAP was used to visualize the data sets, using the top 20 PCs. The integrated object of the data of all conditions was scaled on the top 2000 variable used for the integration. The clusters were calculated using the FindClusters function with a resolution of 0.10.

**BubbleGUM analysis.** Bubblegum (47) analysis was used as described previously with default settings and the gene sets (containing between 20 and 500 genes) from Gene Ontology and gene set arbitrarily determined based on literature (10). The results with a  $FDR \leq 0.25$  were considered as significant.

**NicheNet.** To study intercellular communication, the NicheNet package for R was used (76). The top 20 ligands were kept and ‘mouse’ was selected for option organism in the function `nichenet_seuratobj_aggregate`.

**Potential interaction scores.** In order to link NicheNet analysis with our data, we created the potential interaction score based on: average expression of ligand x average expression of receptor/target gene x weight of the interaction provide by the NicheNet package. The average expression of a gene is based on the Seurat package default calculation:  $\log_2(\text{RNA count for this gene} / \text{total RNA count} \times 10.000)$ . The weight of an interaction is retrieved from the corresponding databases of the NicheNet package.

**Circlize.** The circular visualisation was made with the R package circlize (77). The intensity of the colour of the link between ligands and receptors is proportional to the score of the ligand-receptor link for each sender cell type (alpha from 0.25 to 1). The genes were chosen based on literature.

Fig.S1. MHCII+ Sca-1+ MOs mobilized during MuHV-4 infection exhibit regulatory properties, related to Fig.1

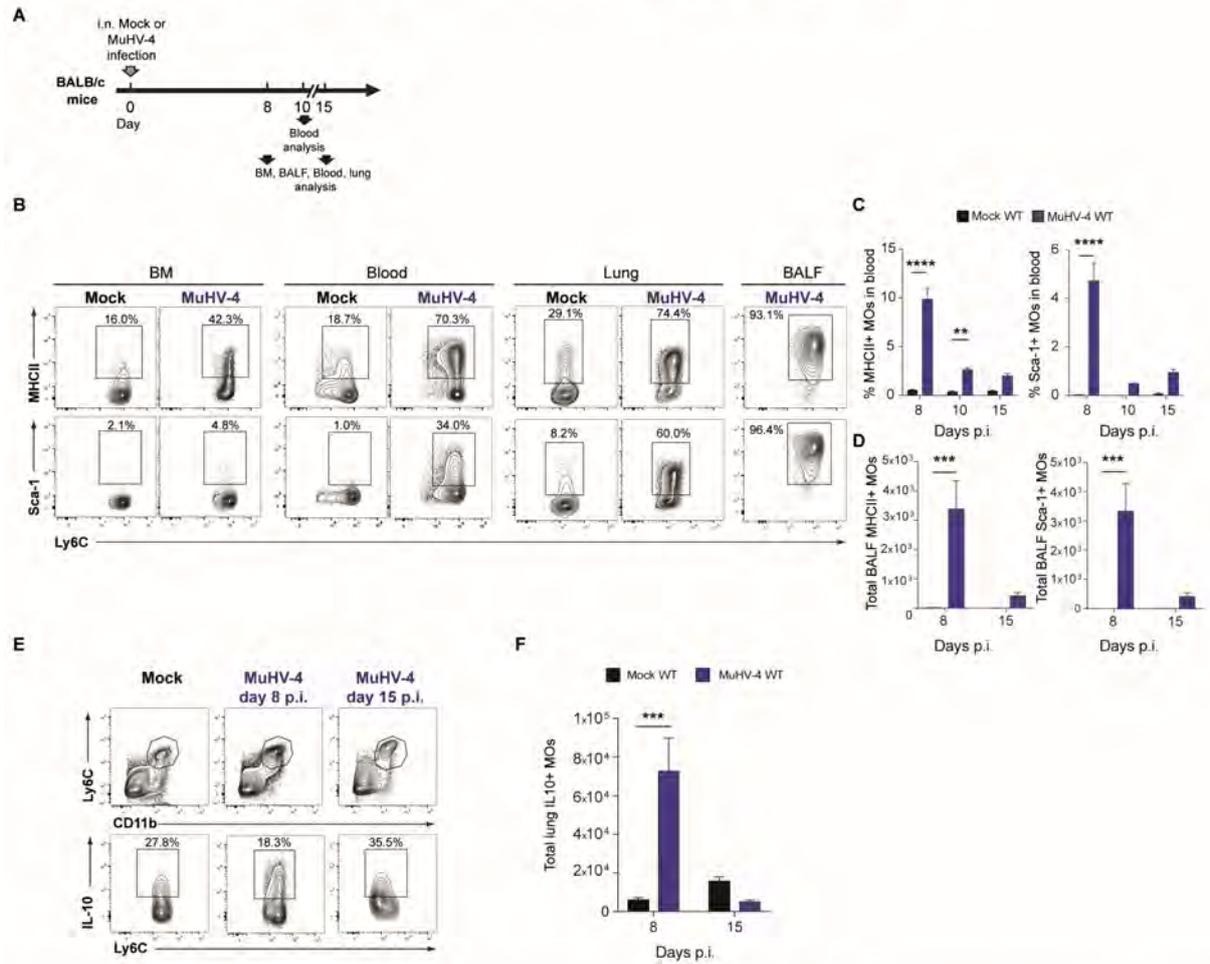
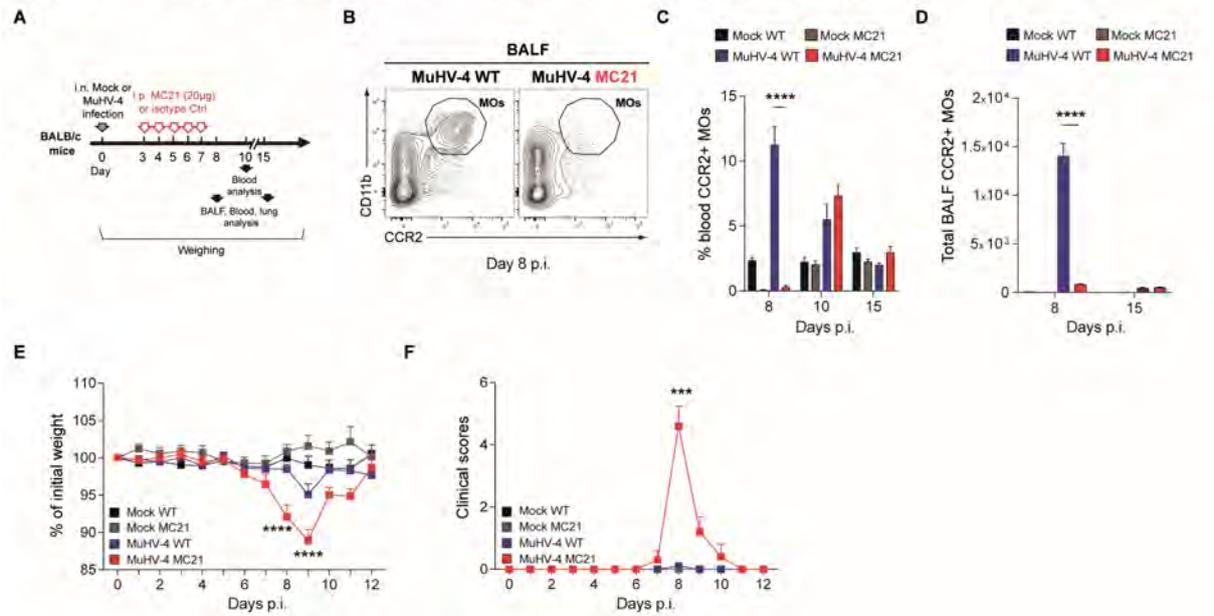


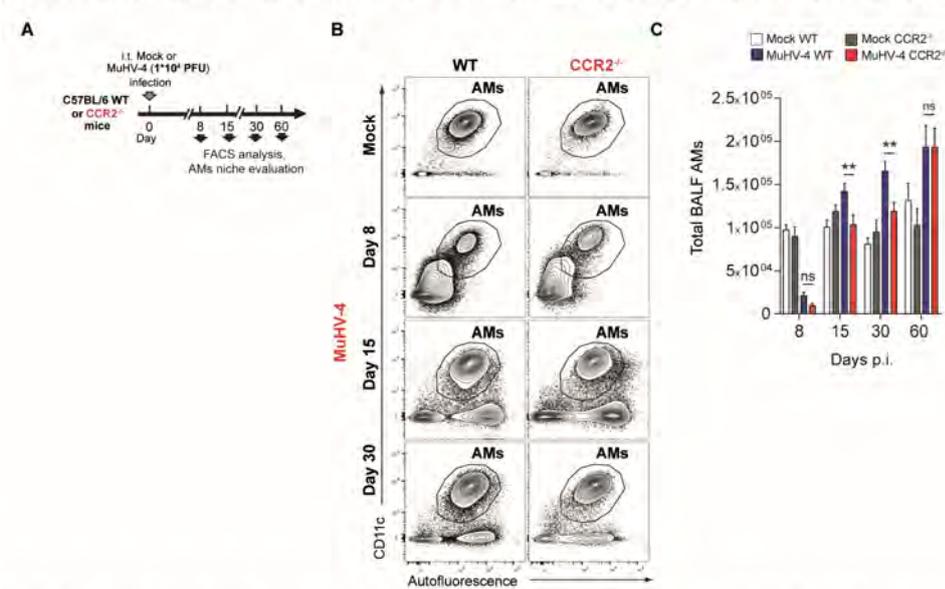
Fig.S1. MHCII+ Sca-1+ MOs mobilized during MuHV-4 infection exhibit regulatory properties, related to Fig.1 (A) Experimental layout of panels B-F (n= 5, three experiments). (B) FACS plots of MHCII and Sca-1 expression by MOs at day 8 p.i. BM and blood MOs were gated as Live, CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>. Lung and BALF MOs were gated as Live, CD11c<sup>-</sup>non-autofluorescent, CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>. (C-D) Percentages in blood (C) and numbers in BALF (D) of MHCII+ and Sca-1+ CCR2+ MOs from Mock or MuHV-4 infected mice. (E-F) FACS plots (E) and numbers (F) of lung MOs expressing IL-10. Numbers in gates (B-E) indicate mean percentages. Data were analysed by two-way ANOVA and Sidak's multiple-comparison test (\*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

**Fig.S2. Depletion of CCR2+ MOs in BALB/c mice worsens MuHV-4 associated disease, related to Fig.1**



**Fig.S2. Depletion of CCR2+ MOs in BALB/c mice worsens MuHV-4 associated disease, related to Fig.1** (A) Experimental layout (n= 4 to 10, three experiments). (B) FACS plots of MOs at day 8 p.i. in BALF of Mock-treated or MC21-treated MuHV-4 infected mice. (C-D) Percentages in blood (C) and numbers in BALF (D) of CCR2+ MOs from Mock or MuHV-4 infected mice. (E) Body weight as percentage of initial weight. (F) Clinical scores. Data were analysed by two-way ANOVA and Sidak or Tukey's multiple-comparison test (\*\*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

**Fig.S3. Alveolar niche is efficiently reconstituted after infection in a CCR2-independent manner, related to Fig.1**



**Fig.S3. Alveolar niche is efficiently reconstituted after infection in a CCR2-independent manner, related to Fig.1** (A) Experimental layout of panels B-C (n=4 to 10, three experiments) (B) FACS plots of BALF AMs in Mock and MuHV-4 infected WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. (C) Numbers (at days 8, 15, 30, 60 p.i.) of BALF AMs. Data were analysed by one-way ANOVA and Sidak's multiple-comparison test (ns, not statistically different, \*\*P < 0.01). Error bars represent SEM.

Fig.S4. IL-10 production by MOs is not the direct factor protecting against weight loss, related to Fig.3

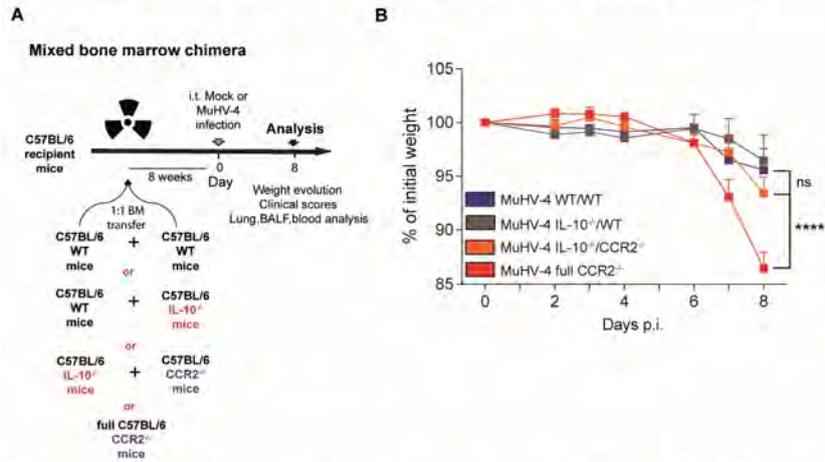
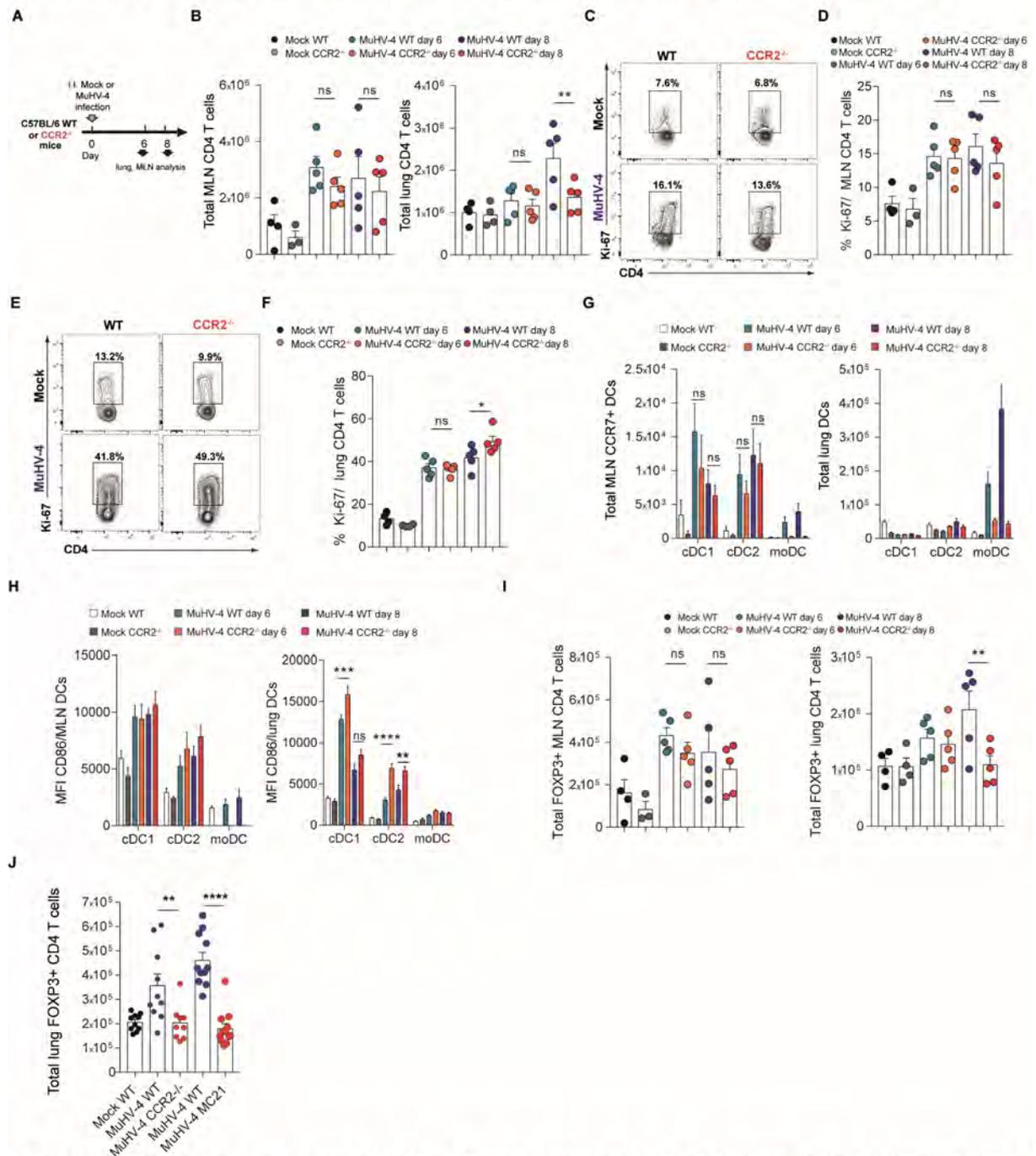


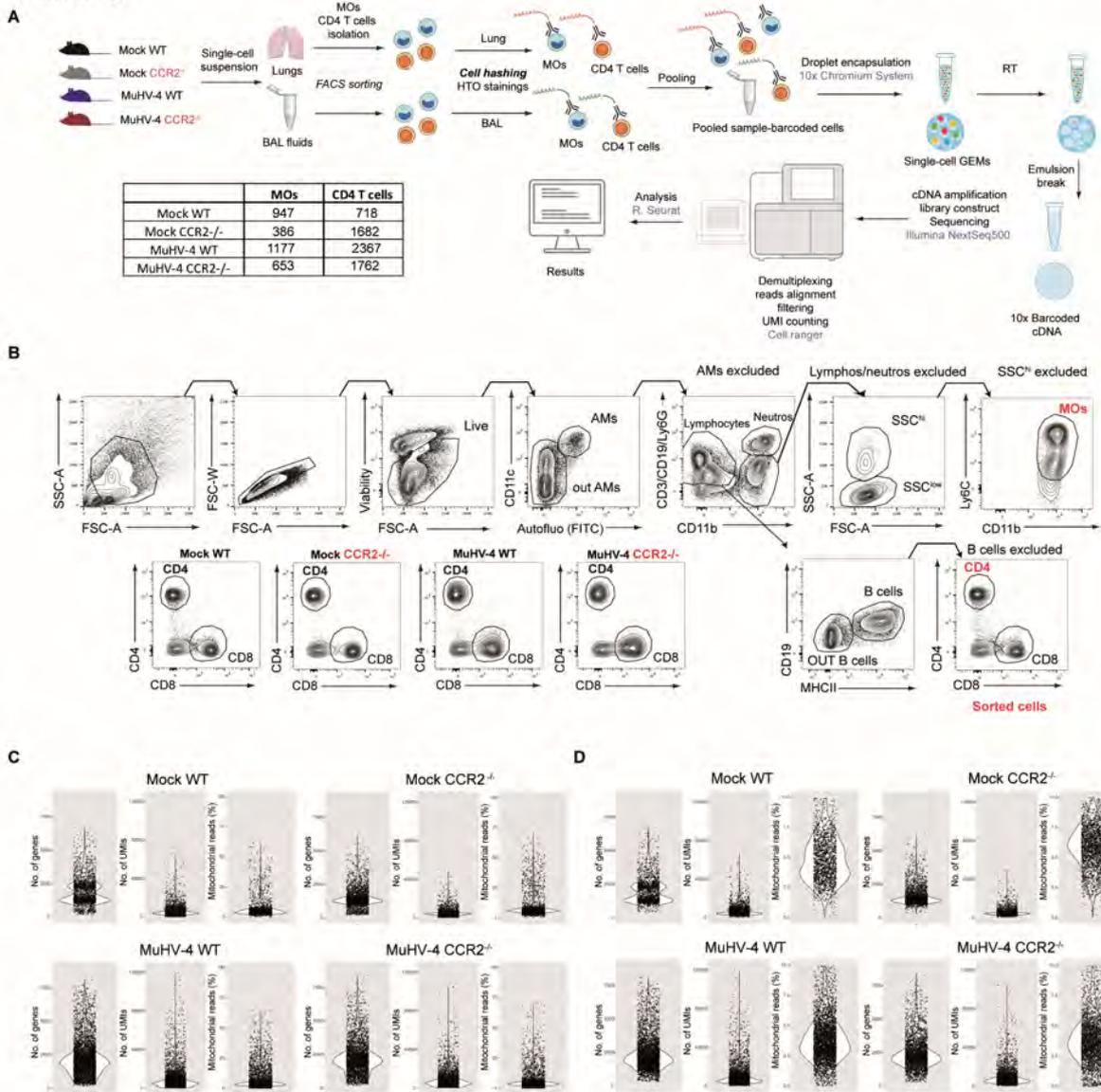
Fig.S4. IL-10 production by MOs is not the direct factor protecting against weight loss, related to Fig.3 (A) Experimental layout (n= 5 to 7, two experiments). (B) Body weight as percentage of initial weight. Data were analysed by two-way ANOVA and Tukey's multiple-comparison test (ns, not significant, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

**Fig.S5. Absence of MOs does not affect the priming of CD4 T cells but rather modulates local instruction in lung, related to Fig.3**



**Fig.S5. Absence of MOs does not affect the priming of CD4 T cells but rather modulates local instruction in lung, related to Fig.3** (A) Experimental layout of panels B-I (n = 4 to 5, one experiment). (B) Numbers of CD4 T cells in MLN and lung. (C-F) FACS plots (C and E) and numbers (D and F) of Ki67<sup>+</sup> CD4 T cells in MLN (C-D) and lung (E-F) of Mock and MuHV-4 infected mice. (G) Numbers of cDC1 (gated as Live, CD19<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>), cDC2 (gated as Live, CD19<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>-</sup>, Ly6C<sup>-</sup>) and moDC (gated as Live, CD19<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>) in MLN and lung of Mock and MuHV-4 infected WT and CCR2<sup>-/-</sup> mice. (H) MFI of CD86 staining on MLN and lung DCs. (I) Numbers of FOXP3<sup>+</sup> CD4 T cells in MLN and lung of Mock and MuHV-4 infected mice. (J) Numbers of lung FOXP3<sup>+</sup> CD4 T cells in Mock or MuHV4 WT or CCR2<sup>-/-</sup> or MC-21 treated mice at day 8 p.i. (n=9 to 12 mice, one experiment). For comparisons between multiple groups, one-way or two-way ANOVA were used with multiple-comparison tests. (ns, not statistically different, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

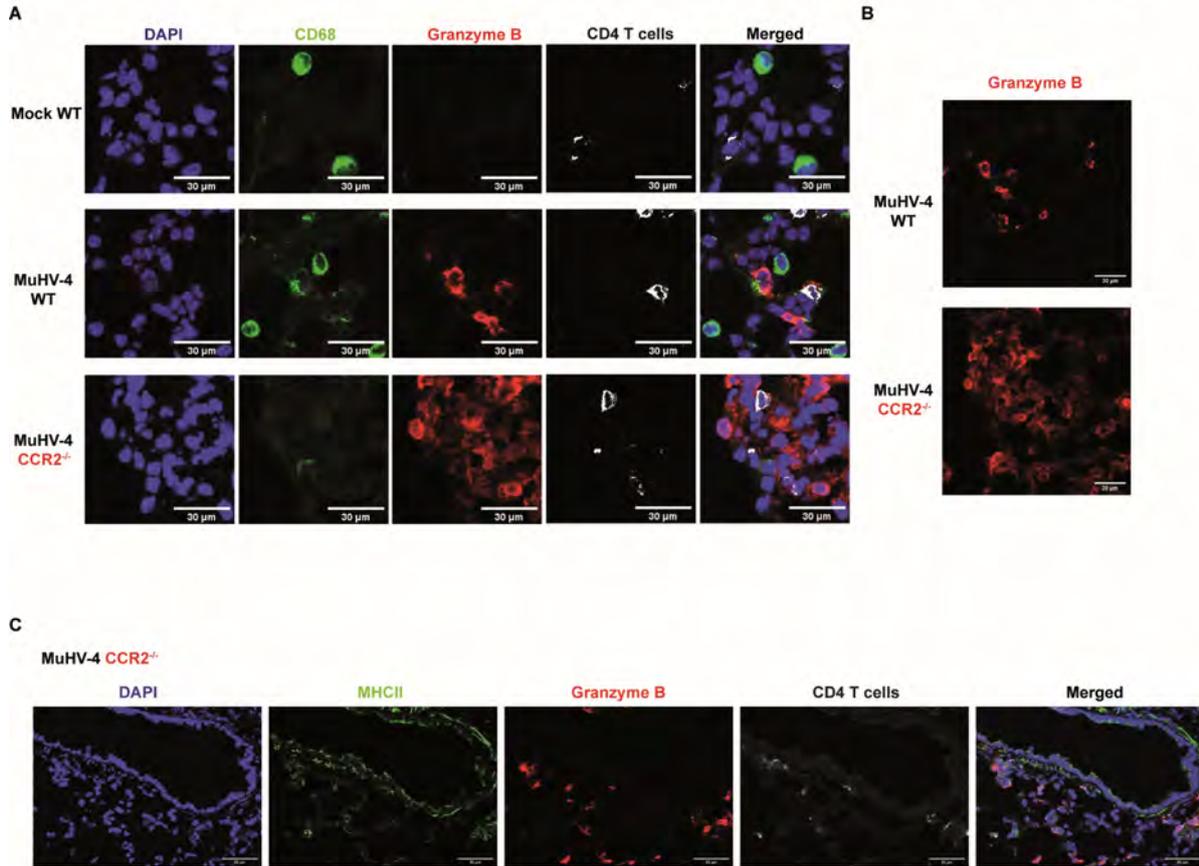
**Fig.S6. Lung MOs and CD4 T cells were isolated from mock or MuHV-4 WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice for single-cell transcriptomic analysis, related to Fig.4**



**Fig.S6. Lung MOs and CD4 T cells were isolated from mock or MuHV-4 WT and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice for single-cell transcriptomic analysis, related to Fig.4 (A) Experimental layout (n= 4 pooled mice by group, one experiment). (B) Gating strategy for FACS sorting of BALF and lung MOs and CD4 T cells. Cells from a MuHV-4-infected mouse are shown. (C and D) Gene counts, Unique Molecular Identifiers (UMI) counts and percentage of mitochondrial genes detected in the indicated conditions before (C) and after (D) selection and filtering as described in the methods, presented as violin plots (individual dots representing individual cells).**

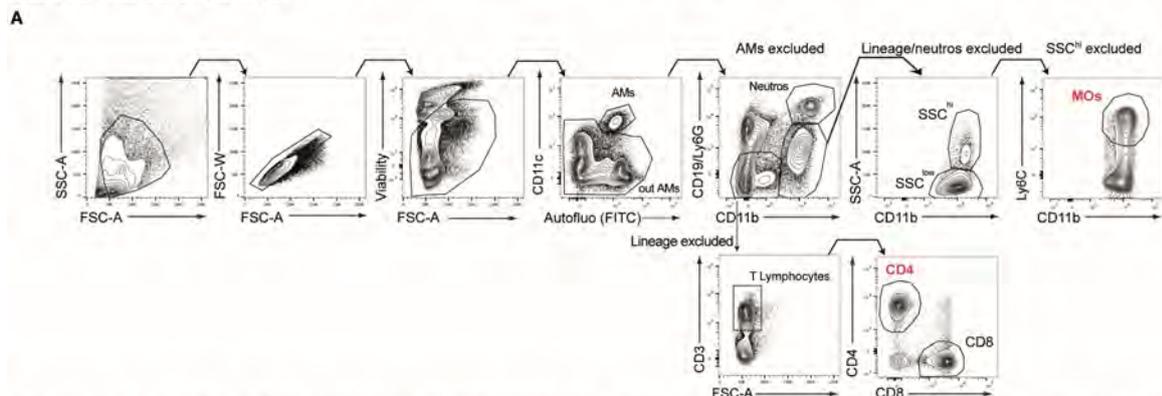


**Fig.S8. Absence of MuHV-4 imprinted MOs increases the numbers of pre-armed cytotoxic CD4 T cells in the airways, related to Fig.5**



**Fig.S8. Absence of MuHV-4 imprinted MOs increases the numbers of pre-armed cytotoxic CD4 T cells in the airways, related to Fig.5 (A)** Confocal microscopy intracellular stainings of CD4, CD68 and GrzB in lung of Mock or MuHV-4 infected WT or CCR2<sup>-/-</sup> mice at day 8 p.i. **(B)** Confocal microscopy stainings of GrzB in lung of MuHV-4 infected mice at day 8 p.i. **(C)** Confocal microscopy intracellular stainings of CD4, MHC-II and GrzB in lung of MuHV-4 infected CCR2<sup>-/-</sup> mice at day 8 p.i. Pictures are representative of more than 6 lungs analysed from 5 different mice.

**Fig.S9. Gating strategy of lung MO and CD4 T cell populations identified by flow cytometry isolated from mock or MuHV-4 infected mice, related to Materials and Methods**



**Fig.S9. Gating strategy of lung MOs and CD4 T cells identified by flow cytometry isolated from mock or MuHV-4 infected mice. (A)** BALF and lung MOs are gated as described with the representative FACS plots (Live, CD11c<sup>-</sup> non-autofluorescent, CD19<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>SSC<sup>low</sup>Ly6C<sup>-</sup>). BALF and lung CD4 T cells are gated as described with the representative FACS plots (Live, CD11c<sup>-</sup> non-autofluorescent, CD19<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>).

**Table S1. Key resources used in this study**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti-goat IgG NL557-conjugated Antibody	R&D systems	Cat#NL001,RRID:AB_663766
Anti-mouse CCR2 PE (clone 475301)	R&D Systems	Cat# FAB5538P; RRID:AB_10718414
Anti-mouse CD103 Brilliant Violet 711 (clone: 2E7)	BioLegend	Cat# 121435, RRID:AB_2686970
Anti-mouse CD103, FITC, eBioscience™ (clone: 2E7)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11-1031-82, RRID:AB_465176
Anti-mouse CD107a APC (clone: 1D4B)	BioLegend	Cat# 121613, RRID:AB_2134486
Anti-mouse CD11b Brilliant Violet 605 (clone M1/70)	BioLegend	Cat# 101237, RRID:AB_11126744
Anti-mouse CD11b Brilliant Violet 711 (clone M1/70)	BioLegend	Cat# 101241, RRID:AB_11218791
Anti-mouse CD11c Alexa Fluor 700 (clone N418)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 56-0114-82, RRID:AB_493992
Anti-mouse CD16/32 Fc block (clone 93)	BioLegend	Cat# 101301, RRID:AB_312800
Anti-mouse CD172 $\alpha$ PerCP/Cyanine 5.5 (clone: P84)	BioLegend	Cat# 144009, RRID:AB_2563547
Anti-mouse CD183 APC (clone CXCR3-173)	BioLegend	Cat# 126511, RRID:AB_1088994
Anti-mouse CD183 FITC (clone CXCR3-173)	BioLegend	Cat# 126535, RRID:AB_2566564
Anti-mouse CD19 Alexa Fluor 700 (clone 6D5)	BioLegend	Cat# 115528, RRID:AB_493735
Anti-mouse CD19 APC/Cyanine7 (clone 6D5)	BioLegend	Cat# 115529, RRID:AB_830706
Anti-mouse CD197 (CCR7) BV421 (clone: 4B12)	BD Biosciences	Cat# 562675, RRID:AB_2737716
Anti-mouse CD24 APC/Cyanine7 (clone:M1/69)	BioLegend	Cat# 101849, RRID:AB_2892262
Anti-mouse CD25 Alexa Fluor 700 (clone PC61)	BioLegend	Cat# 102024, RRID:AB_493709
Anti-mouse CD26 FITC (clone :H194-112)	BD Biosciences	Cat# 559652, RRID:AB_397295
Anti-mouse CD274 APC (clone 10F.9G2)	BioLegend	Cat# 124311, RRID:AB_10612935
Anti-mouse CD279 APC/Fire750 (clone 29F.1A12)	BioLegend	Cat# 135240, RRID:AB_2629768
Anti-mouse CD3 APC (clone 17A2)	BioLegend	Cat# 100236, RRID:AB_2561456
Anti-mouse CD31 PE (clone: MEC13.3)	BioLegend	Cat# 102507, RRID:AB_312914
Anti-mouse CD326 (Ep-CAM) Alexa Fluor 488 (clone: G8.8)	BioLegend	Cat# 118210, RRID:AB_1134099

Anti-mouse CD3e APC-Cy7 (clone 145-2C11)	BD Biosciences	Cat# 561042, RRID:AB_2034003
Anti-mouse CD3e FITC (clone 145-2C11)	BioLegend	Cat# 100306, RRID:AB_312671
Anti-mouse CD4 APC (clone RM 4-5)	BioLegend	Cat# 100515, RRID:AB_312718
Anti-mouse CD4 Brilliant Violet 421 (clone GK1.5)	BioLegend	Cat# 100438, RRID:AB_1120371 8
Anti-mouse CD4 Monoclonal Antibody, eBioscience™ (clone GK1.5)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 14- 0041-82, RRID:AB_ 467063
Anti-mouse CD44 PE/Cyanine 7 (clone IM7)	BioLegend	Cat# 103030,RRID: AB_830787
Anti-mouse CD45 Brilliant Violet 510 (clone 30-F11)	BioLegend	Cat# 103137, RRID:AB_2561392
Anti-mouse CD45 PE/Cyanine7 (clone 30-F11)	BioLegend	Cat# 103114, RRID:AB_312979
Anti-mouse CD45.1 APC (clone A20)	BioLegend	Cat# 110713, RRID:AB_313502
Anti-mouse CD45.2 Brilliant Violet 510 (clone 104)	BioLegend	Cat# 109837, RRID:AB_2561393
Anti-mouse CD49b APC (clone DX5)	BioLegend	Cat# 108910, RRID:AB_313417
Anti-mouse CD62L, eFluor450, eBioscience™ (clone: MEL-14)	Thermo Fisher Scientific	Cat#48-0621- 82,RRID: AB_1963590
Anti-mouse CD64 Alexa Fluor 647 (clone: X54-5/7.1)	BioLegend	Cat# 139322, RRID:AB_2566561
Anti-mouse CD68 purified (clone FA-11)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 14-0681-82, RRID:AB_2572857
Anti-mouse CD80 Brilliant Violet 421 (clone: 16-10A1)	BioLegend	Cat# 104725, RRID:AB_1090098 9
Anti-mouse CD86, PE, eBioscience™, (clone: GL1)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12-0862-81, RRID: AB_465767
Anti-mouse CD8a APC (clone 53-6.7)	BioLegend	Cat# 100711, RRID:AB_312750
Anti-mouse CD8 $\alpha$ Brilliant Violet 785 (clone 53-6.7)	BioLegend	Cat# 100749,RRID:AB_1 1218801
Anti-mouse CD8 $\alpha$ PE (clone 53-6.7)	BioLegend	Cat# 100708,RRID: AB_312747
Anti-mouse CD8 $\alpha$ PerCP/Cyanine5.5 (clone 53-6.7)	BioLegend	Cat# 100733, RRID:AB_2075239
Anti-mouse CXCL9 Alexa Fluor 674 (clone MIG-2F5.5)	BioLegend	Cat# 515606, RRID: AB_1877135
Anti-mouse Fc $\epsilon$ R1, PE, eBioscience™(clone: MAR-1)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12-5898-82, RRID: AB_466028
Anti-mouse FOXP3, APC, eBioscience™ (clone: FJK-16S)	Thermo Fisher Scientific	Cat#17-5773-80, RRID: AB_469456
Anti-mouse FOXP3, PE, eBioscience™ (clone: FJK-16S)	Thermo Fisher Scientific	Cat#12-5773-80, RRID: AB_465935

Anti-mouse Granzyme A PE (clone: 3G8.5)	BioLegend	Cat# 149703, RRID: AB_2565309
Anti-mouse Granzyme B antibody	R&D systems	Cat#AF1865,RRID: AB_2294988
Anti-mouse Granzyme B FITC (clone: GB11)	BioLegend	Cat# 515403, RRID: AB_2114575
Anti-mouse I-A/I-E Brilliant Violet 785 (clone: M5-114.15.2)	BioLegend	Cat# 107645, RRID:AB_2565977
Anti-mouse I-A/I-E PE/Cyanine7 (clone M5/114.15.2)	BioLegend	Cat# 107630, RRID:AB_2069376
Anti-mouse IFN- $\gamma$ Brilliant Violet 711 (clone XMG1.2)	BioLegend	Cat# 505836, RRID:AB_2650928
Anti-mouse IL-10 Alexa Fluor 674 (clone:JES5-16E3)	BioLegend	Cat# 505014,RRID: AB_493511
Anti-mouse IL-10 PE (clone: JES5-16E3)	BD Biosciences	Cat# 554467, RRID: AB_395412
Anti-mouse Ki-67 Alexa Fluor 488 (clone: 16A8)	BioLegend	Cat# 652417, RRID:AB_2564236
Anti-mouse Ly6A/E FITC (clone D7)	BioLegend	Cat# 122506, RRID:AB_756191
Anti-mouse Ly6C Brilliant Violet 785 (clone HK1.4)	BioLegend	Cat# 128041, RRID:AB_2565852
Anti-mouse Ly-6C PE/Cyanine 7 (clone HK1.4)	BioLegend	Cat# 128017,RRID: AB_1732093
Anti-mouse Ly-6G Alexa Fluor 700 (clone 1A8)	BioLegend	Cat# 127622, RRID:AB_10643269
Anti-mouse Ly6G APC-Cy7 (clone 1A8)	BD Biosciences	Cat# 560600, RRID:AB_1727561
Anti-mouse Perforin, PE, eBioscience™ (clone: eBioOMAK-D)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12-9392-80, RRID: AB_466242
Anti-mouse XCR1 Brilliant Violet 421 (clone: ZET)	BioLegend	Cat# 148216, RRID: AB_2565230
Anti-rat IgG2a heavy chain Alexa Fluor 488	abcam	Cat# ab172332 RRID:AB_2893134
Anti-rat IgG2b Alexa Fluor 647 Antibody (clone: MRG2b-85)	BioLegend	Cat#408208,RRID: AB_2715912
Goat Anti-Mouse IgG (H+L), BIOT	SouthernBiotech	Cat# 1036-08RRID:AB_2794349
Goat Anti-Mouse IgG2a, BIOT	SouthernBiotech	Cat# 1080-08 RRID:AB_2794479
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21428, RRID:AB_2535849
MHC Class II (I-Ab) Polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific	Cat#PA5-116876, RRID: AB_2893126
Purified anti-mouse CD16/32 Antibody	BioLegend	Cat#101302,RRID: AB_312801
Purified anti-mouse CD28 Antibody	BioLegend	Cat#102102,RRID: AB_312867
TotalSeq™-A0305 anti-mouse Hashtag 5 Antibody	BioLegend	Cat#155809,RRID: AB_2750036
TotalSeq™-A0306 anti-mouse Hashtag 6 Antibody	BioLegend	Cat#155811,RRID: AB_2750037

Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD3ε Antibody	BioLegend	Cat#100340,RRID: AB_11149115
<b>Bacterial and Virus strains</b>		
MHV-68 pHA3 strain (MuHV-4)	Stevenson Laboratory, Gillet Laboratory	Adler et al., 2000
Luciferase-expressing MuHV-4	Stevenson Laboratory, Gillet Laboratory	Milho et al., 2009
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
1X RBC Lysis Buffer	Thermo Fisher Scientific	Cat# 00433357
AKP Streptavidin	BD Biosciences	Cat# 554065
Brefeldin A Solution	BioLegend	Cat# 420601
Collagenase D	Roche	Cat# 11088866001
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Cat# 11697498001
Corn oil	Sigma-Aldrich	Cat# C-8267
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)	BioLegend	Cat# 422801
Dextran, Tetramethylrhodamine, 3000 MW, Anionic	Thermo Fisher Scientific	Cat# D3307
DNase I	Roche	Cat# 11284932001
Emdotrim 10% SOL	Emdoka	N/A
Evan's Blue	Sigma-Aldrich	Cat# E2129
Fixable Viability Dye eFluor 780	Thermo Fisher Scientific	Cat# 65-0865-14
H-2D(b) Murid herpesvirus 4 ORF6 487-495 AGPHNDMEI Brilliant Violet 421-Labeled Tetramer	NIH Tetramer Core Facility	N/A
H-2K(b) Murid herpesvirus 4 ORF61 524-531 TSINFVKI Brilliant Violet 421-Labeled Tetramer	NIH Tetramer Core Facility	N/A
InVivoMAb anti-mouse Ly6G	BioXCell	Cat# BE0075-1
InVivoMAb anti-mouse PD-1 (CD279)	BioXCell	Cat# BE0146
InVivoMAb anti-mouse PD-L1 (B7-H1)	BioXCell	Cat# BE0101
Lipopolysaccharides from Escherichia coli O55:B5	Sigma-Aldrich	Cat# L2880
LiveBLAzer™ FRET-B/G Loading Kit with CCF4-AM	Thermo Fisher Scientific	Cat# K1095
Monensin Solution	BioLegend	Cat# 420701
Probenecid, Water Soluble, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific	Cat# P36400
ProLong™ Gold Antifade Mountant mounting media	Thermo Fisher Scientific	Cat# P10144
Scigen O.C.T compound cryostat embedding medium	Fisher scientific	Cat# 23-730-625
SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets	Sigma-Aldrich	Cat# N-1891

Tamoxifen	Sigma-Aldrich	Cat# T-5648
Tuerk solution	Sigma-Aldrich	Cat# 93770
XenoLight D-Luciferin - K <sup>+</sup> Salt Bioluminescent Substrate	PerkinElmer	Cat# 122799
Zombie Aqua Fixable Viability Kit	BioLegend	Cat# 423101
Zombie Violet Fixable Viability Kit	BioLegend	Cat# 423113
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Cat# 3148
<b>Critical commercial assays</b>		
FoxP3/transcription factor staining buffer kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 00-5523-00
GentleMACS C tube	Miltenyi	Cat# 130-093-237
iQ <sup>TM</sup> Supermix	Bio-Rad	Cat# 170-8860
LEGENDplex <sup>TM</sup> Customized Mouse Anti-Virus Response Panel (13-plex) with V-bottom Plate	BioLegend	N/A
LEGENDplex <sup>TM</sup> Mouse Anti-Virus Response Panel (13-plex) with V-bottom Plate	BioLegend	Cat#740622
Mouse Granzyme B ELISA Ready-SET-Go	Thermo Fisher Scientific	Cat# 88-8022-88, RRID:AB_2575171
Mouse IFN gamma ELISA Ready-SET-Go	Thermo Fisher Scientific	Cat# 88-7314-88,RRID:AB_2575070
QIAamp DNA mini kit	Qiagen	Cat# 513004
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
Baby hamster kidney (BHK)-21 cells	ATCC	ATCC Cat# CCL-10, RRID:CVCL_1915
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
Mouse : C57BL/6J (JAX <sup>TM</sup> )	Charles River	Cat# JAX:000664, RRID:IMSR_JAX:000664)
Mouse: B6 Albino	Charles River	Cat#CRL:493,RRID:IMSR_CRL:493
Mouse : BALB/cAnNCrl	Charles River	Cat# CRL:028, RRID:IMSR_CRL:028
Mouse : C57BL/6 CD45.1 <sup>+</sup>	Charles River	Cat# CRL:494, RRID:IMSR_CRL:494
Mouse : C57BL/6 CD45.1 <sup>+</sup> .2 <sup>+</sup>	GIGA	N/A
Mouse : C57BL/6 CCR2 <sup>-/-</sup>	The Jackson Laboratory	Cat# JAX :004999, RRID:IMSR_JAX:004999
Mouse : C57BL/6 IL10 <sup>-/-</sup>	The Jackson Laboratory	Cat# JAX :002251,RRID:IMSR_JAX:002251
Mouse : C57BL/6 IL10 <sup>lox-lox</sup>	GIGA	N/A
Mouse : C57BL/6 CD4 Cre	GIGA	N/A

Mouse: C57BL/6 CD274tm1Pfal (PD-L1 fl/fl)	Prof P .Fallon	Schwartz et al., 2018
Mouse : IL-10- $\beta$ -lactamase reporter C57BL/6	GIGA	Bouabe et al., 2011
Mouse: Ccr2-creER <sup>T2</sup> mKate2	Prof B. Becher (Zurich University)	Croxford et al., 2015
<b>Oligonucleotides</b>		
MuHV-4 ORF25 fwd : 5'-atggtatagccgcctttgtg-3'	Eurogentec	N/A
MuHV-4 ORF25 reverse : 5'-acaagtggatgaagggttgc-3	Eurogentec	N/A
<b>Software and algorithms</b>		
FlowJo software v10	Three Star	<a href="https://www.flowjo.com">https://www.flowjo.com</a>
GraphPad Prism 7	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>
Fiji software	ImageJ	<a href="https://imagej.net/software/fiji/">https://imagej.net/software/fiji/</a>
R (v.4.1.0), R package Seurat (v.4.0.3)	The R Foundation	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
Living image software v4.1	PerkinElmer	<a href="https://www.perkinelmer.com/">https://www.perkinelmer.com/</a>
OlyVIA Software 3.2	Olympus	<a href="https://olyvia.software.informer.com/">https://olyvia.software.informer.com/</a>
<b>Other</b>		

**Table S2. Clinical evaluation grid**

Parameters	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Activity	Active	Isolated	Inactive, depressed	Moribund
Posture	Normal	Slightly hunched	Hunched	Hunched and trembling
Gait	Normal	Awkward	Reluctance to move, incoordination, tiptoe walking	Very slow movement or paralysis or decubitus
Coat	Well groomed	Not well groomed	Rough hair coat	Very rough hair coat, self-mutilating
Breathing	Normal	Rapid and shallow breathing,	Rapid and abdominal breathing	Dyspnea, Tachypnea, irregular rhythm
Alertness	Normal	Mildly agitated	Nonresponsive when coaxed	Violent reaction to stimuli or unconsciousness
Weight	Normal, body score condition (BCS) 3,4	Weight loss < 10 %	Weight loss >10% BCS 2	Weight loss > 20%, BCS 1
Dehydration	Hydration	Decreased elasticity of the skin	Increased skin fold	Severe, eyes sunken, persistent skin fold



---

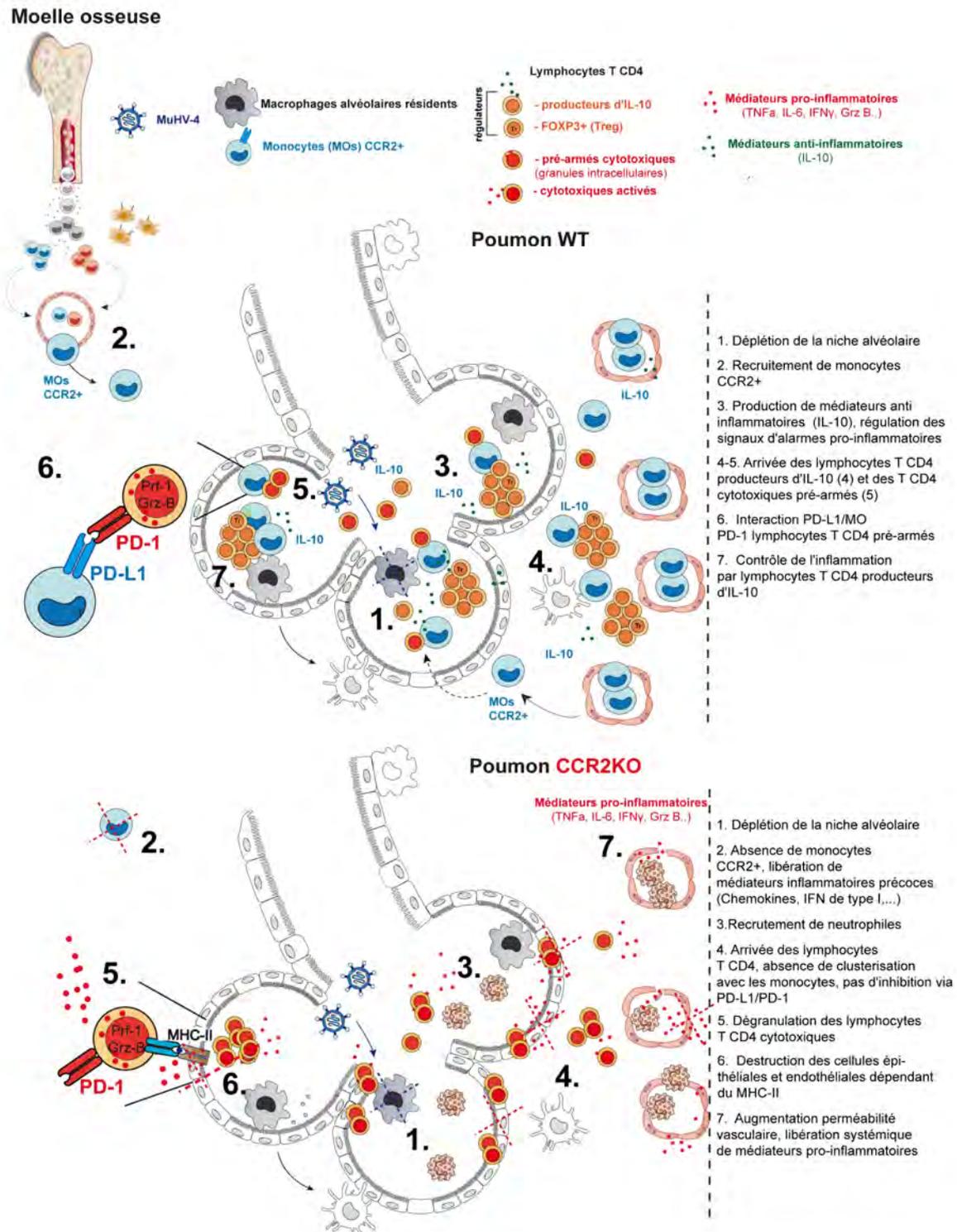
# Discussion - Perspectives

---



Au travers de cette étude, nous avons découvert un rôle crucial joué par les monocytes, éduqués suite à l'infection par le  $\gamma$ HV murin MuHV-4, pour recruter et réguler les lymphocytes T CD4 dans les voies aériennes. L'absence de monocytes est associée à une maladie sévère indépendamment de la mise en place de la réponse immune adaptative antivirale. Les monocytes préviennent le développement d'une immunopathologie de type *cytokine storm* en agissant par le biais de plusieurs voies de signalisation et d'intermédiaires immuns. Premièrement, les monocytes promeuvent le recrutement de lymphocytes T CD4 parmi lesquels, des lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-10. En parallèle, l'expression de PD-L1 par les monocytes empêche le développement d'une immunopathologie médiée par les lymphocytes T CD4 cytotoxiques. En effet, l'absence de monocytes et plus spécifiquement l'absence d'expression de PD-L1 par les monocytes CCR2<sup>+</sup> sont associées à un profil cytotoxique exacerbé des lymphocytes T CD4, libérant des molécules cytotoxiques dans le milieu extracellulaire à l'origine de dommages tissulaires sévères. Alors que la réponse immune adaptative mise en place suite à l'infection par les  $\gamma$ HVs a été largement étudiée, cette étude met en lumière un évènement clé de l'immunité innée, l'importance du recrutement de monocytes lors de l'infection primaire par les  $\gamma$ HVs, pour réguler l'inflammation primaire et notamment l'activation des lymphocytes T CD4. Le schéma suivant représente les éléments-clés de l'étude.

**Schéma 1 : Etude de l'impact des monocytes recrutés par le MuHV-4 sur l'environnement pulmonaire.**



Lors de cette discussion, nous aborderons différents aspects et questions qui ont émergés au fil de cette étude. Nous nous intéresserons tout d'abord à la fonctionnalité des monocytes dans ce contexte d'infection aiguë par le MuHV-4 et l'expression du ligand PD-L1 par ceux-ci. Nous nous intéresserons ensuite plus en détails aux lymphocytes T CD4 cytotoxiques, leur développement et leurs mécanismes d'action.

Concernant les monocytes, nous aborderons différentes questions relatives à

- 1) **Les définitions d'*imprinting* et de *trained immunity***
- 2) **Le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'éducation des monocytes**
- 3) **Fonctionnalité de l'expression du MHCII**
- 4) **Fonctionnalité de l'expression de PD-L1**
- 5) **Rôle de l'IL-10 dans la pathogénie**

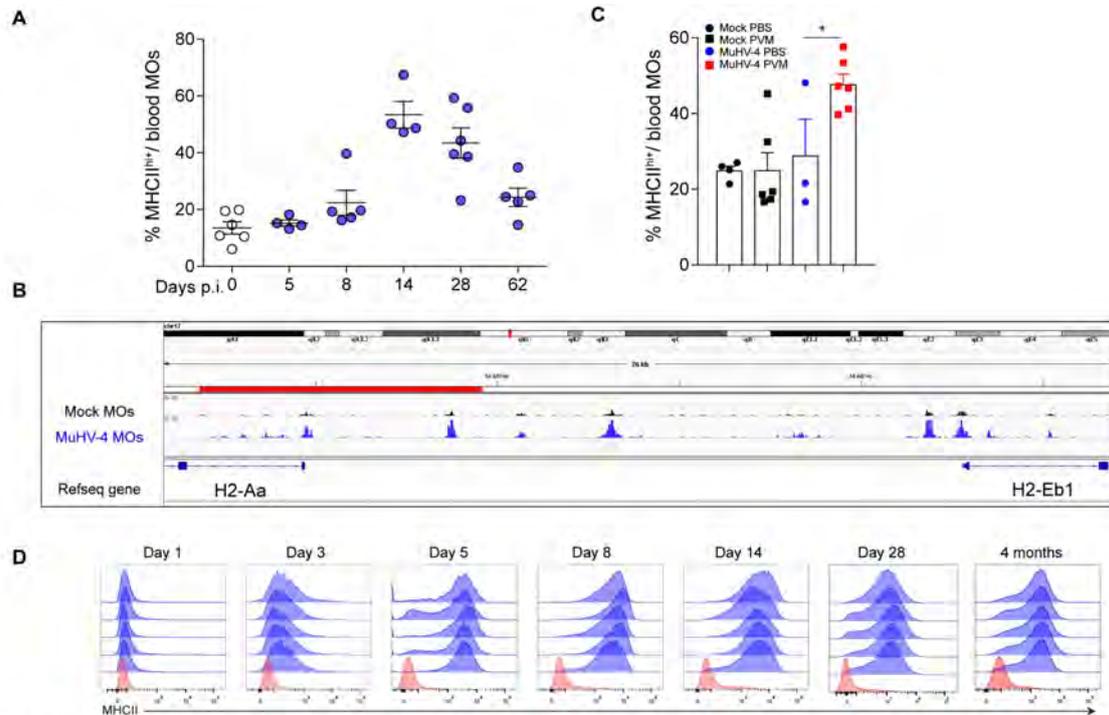
### ***Imprinting et trained immunity***

L'infection par le MuHV-4 induit une « éducation » précoce des monocytes, qui présentent des modifications phénotypiques avant même leur sortie de la moelle osseuse. Comme expliqué précédemment, le phénomène de *Trained immunity* s'appliquerait dans le contexte des infections par les  $\gamma$ HVs au niveau des monocytes et des macrophages dérivés des monocytes (Machiels et al., 2017). Pour rappel, la notion de *Trained immunity* se définit classiquement comme la capacité de cellules immunitaires innées à monter une mémoire immunitaire, non-spécifique, suite à l'exposition à un stimulus donné et à réagir différemment à un challenge secondaire ultérieur, même si le stimulus initial a disparu. Des modifications épigénétiques et métaboliques sont les principaux mécanismes à l'origine de la *Trained Immunity* et se traduisent par des modifications transcriptomiques, phénotypiques et fonctionnelles persistantes, permettant de répondre de façon différente à un deuxième stimulus, de façon non-spécifique. Nous avons décrit au fil de l'étude les monocytes comme des cellules éduquées ou « imprimées » suite à l'infection par le MuHV-4. Pour définir un peu plus la notion d'éducation, la **figure discussion 1** présente des données permettant de supporter ces hypothèses d'*imprinting* et de *Trained immunity* telles que nous les avons évoquées dans cette étude.

1. Les altérations phénotypiques observées après l'infection telles que l'overexpression du MHCII sur les monocytes circulants diminuent un mois post-infection (**Figure discussion 1A**).
2. Les changements phénotypiques sont liés à des modifications épigénétiques, révélées par une plus grande accessibilité de la chromatine, notamment sur la région promotrice du MHCII au niveau des monocytes sanguins (**Figure discussion 1B**).
3. Si les souris sont exposées à un challenge hétérologue (asthme allergique induit par des extraits d'acariens, infection virale hétérologue), les monocytes nouvellement recrutés exhibent les

mêmes changements phénotypiques tels qu'observés durant l'infection primaire (**Figure discussion 1C**).

- Des changements au niveau de la transcriptomique sont présents sur les macrophages dérivés des monocytes au jour 30 p.i. (Machiels et al., 2017) (**Figure discussion 1D**).

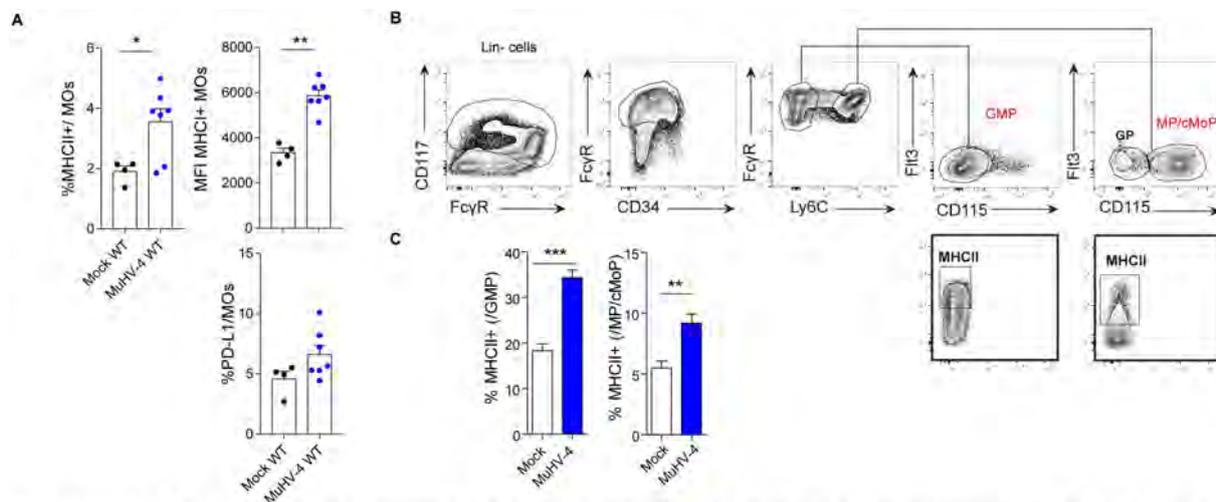


**Figure discussion 1.** (A) Percentages of MHCII-expressing MOs in blood at the following times post MuHV-4 infection. (B) Epigenetic profiling of open chromatin by ATAC seq analysis on nuclei from blood MOs FACS-sorted from mock or MuHV-4-infected mice for one month. Representation of ATAC-seq peaks found at the H2 loci. (C) Percentages of MHCII-expressing MOs in blood 8 days after PVM inoculation, one month post MuHV-4 infection. (D) Representative FACS histograms of MHCII expression level on AMs isolated from BALF of mock or MuHV-4 infected mice with  $10^4$  PFU of MuHV4 and euthanized at the indicated times p.i...

La notion d'*imprinting/Trained immunity* implique la persistance de marques épigénétiques à l'origine d'altérations fonctionnelles **après que le stimulus initial ait disparu**. A ce titre, l'utilisation d'un virus sauvage établissant une latence à vie chez son hôte, ne permet pas de discriminer une apposition lors de l'infection aiguë de modifications épigénétiques persistantes, d'une persistance du stimulus à l'origine du maintien à long terme de ces marques. Afin d'éclaircir cette question et de préciser la définition « d'imprinting » des monocytes dans le cadre de l'infection MuHV-4, nous utiliserons un virus rendu incapable d'établir une infection latente (par la délétion de l'ORF73 (Fowler et al., 2003)), pour comparer les signatures phénotypiques, transcriptomiques et épigénétiques des monocytes à long terme. De manière intéressante, une première expérience a mis en évidence que certaines modifications phénotypiques telles que l'overexpression de PD-L1 sont comparables entre les souches virales WT et Del73 un mois p.i. Ces résultats doivent être confirmés et répétés à plus long terme pour éclaircir la nature et la définition d'imprinting des monocytes dans le contexte d'infections par les  $\gamma$ HVs.

## Le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'éducation des monocytes

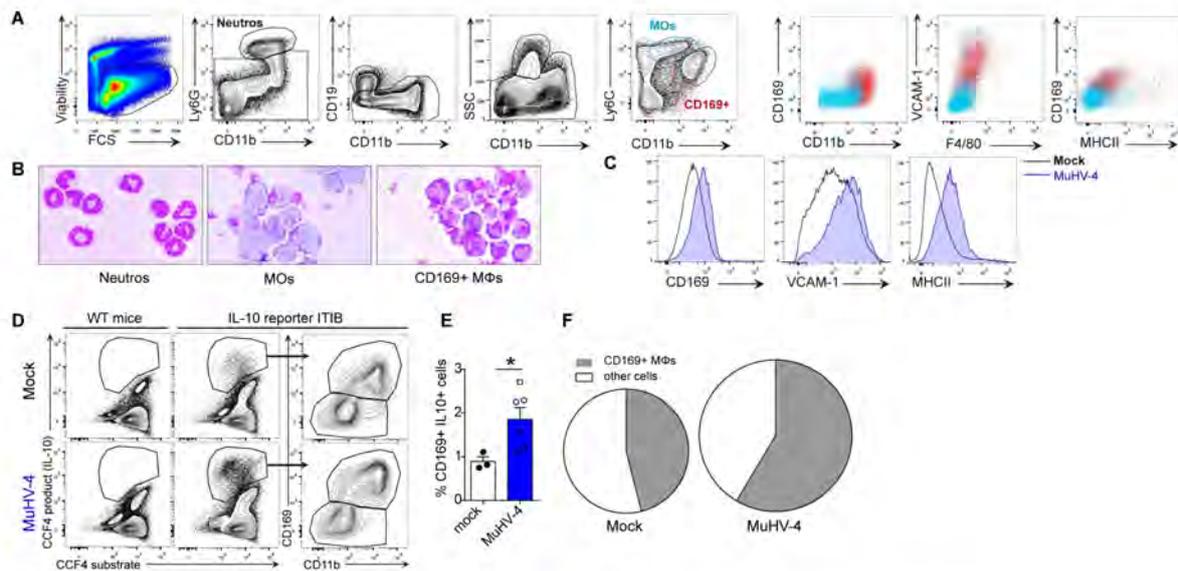
Outre les différences observées au niveau des monocytes infiltrant le poumon aux temps précoces p.i. ainsi qu'au niveau des AMs dérivés des monocytes, les monocytes de la moelle osseuse présentent également des altérations phénotypiques évaluées par l'expression des marqueurs MHCII, MHCI et PD-L1 dès le jour 7 p.i.. De façon plus intéressante encore, les progéniteurs des monocytes au sein de la moelle osseuse montrent également des différences phénotypiques persistantes et ce, un mois après l'infection. La **figure discussion 2** présente les altérations phénotypiques des monocytes au sein de la moelle osseuse (**Figure discussion 2A**), la stratégie de *gating* des différentes populations de progéniteurs précurseurs de monocytes (**Figure discussion 2B**), ainsi que les niveaux d'expression du marqueur MHCII associé à un profil régulateur (Askenase et al., 2015) sur ces populations GMP/MPcMoP un mois après l'infection (**Figure discussion 2C**).



**Figure discussion 2.** (A) Percentages of MHCII-expressing MOs, MFI of MHCII-expressing MOs, percentages of PD-L1-expressing MOs at day 7 p.i. in Mock and MuHV-4 infected mice. (B) Gating strategy for BM progenitors (MP/cMoP/GMP) (C) Percentages (day 30) of BM MP-cMoP expressing MHCII molecules after Mock or MuHV-4 infection. For comparisons between two groups, Student t-test was used. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

Une autre question directement liée à ces observations est actuellement adressée en parallèle de cette étude principale. Le projet s'intéresse à la nature de cet *imprinting* afin de savoir où, comment et par quels intermédiaires, les monocytes sont éduqués **au niveau central**, dans la moelle osseuse. Dans ce projet, nous investiguons particulièrement le rôle des macrophages CD169+ de la moelle dans l'éducation précoce des monocytes. Nous émettons l'hypothèse que les macrophages CD169+ de la moelle osseuse contribuent de façon majeure au développement et au priming des monocytes. Il est connu que ces cellules interagissent étroitement avec les HSCs en formant des niches au sein de la moelle osseuse (Chow et al., 2011; Jacobsen et al., 2014). En périphérie, ces macrophages CD169+ sont des macrophages résidents tissulaires situés au niveau des voies d'entrées des ganglions lymphatiques et au niveau de la zone marginale de la rate. Ils capturent et traitent les antigènes issus de cellules mortes et agissent comme des voies d'entrée pour les virus, les bactéries, initiant par la suite des réponses immunitaires (Kastenmüller, Torabi-Parizi, Subramanian, Lämmermann, & Germain, 2012; Miyake et al., 2007; Perez et al., 2017). Dans le cadre de l'infection par le MuHV-4, ces cellules présentent des

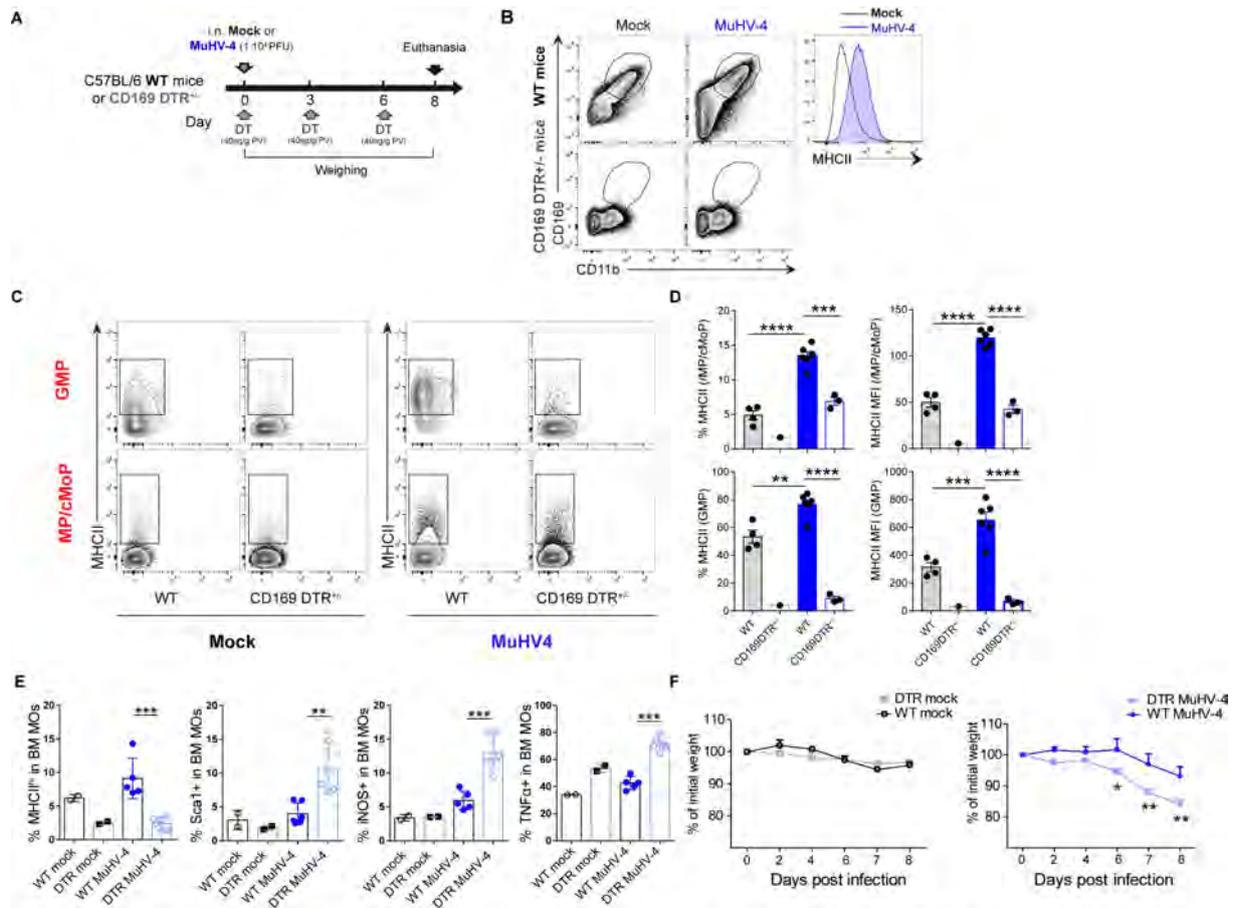
changements phénotypiques majeurs dans la moelle. La **figure discussion 3** présente les principales différences observées suite à l'infection : une overexpression du marqueur CD169, VCAM-1 et MHCII. Ces cellules représentent également les principales cellules hématopoïétiques productrices d'IL-10 au sein de la moelle osseuse.



**Figure discussion 3**

(A) WT or CD169 DTR<sup>-/-</sup> C57BL/6 were infected (1.10<sup>6</sup> PFU of MuHV-4) or not and euthanized 1 month p.i. Gating strategy of neutrophils (Live, Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>), MOs (Live, Ly6G<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, out eosinophils, Ly6C<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) and CD169<sup>+</sup> MΦs (Live, CD19<sup>-</sup>, out eosinophils, out neutrophils, out MOs, CD169<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) and representative DOT plots showing the expression of CD169, VCAM-1 and MHCII markers by MOs (blue) and CD169<sup>+</sup> MΦs (red) isolated from BM at day 28 p.i. (B) Control of the gating strategy with photographs of FACS-sorted populations gated in (A) stained with May-Grünwald Giemsa staining. (C) Surface phenotype of CD169, VCAM-1 and MHCII markers of the CD169<sup>+</sup> MΦs from Mock (black) or MuHV-4 (blue) infected mice. (D) Representative plots of all live BM IL-10<sup>+</sup> cells (assessed by detection of 450 nm fluorescence in CCF4-substrate-loaded cells) and within this IL10<sup>+</sup> population, plots of CD169<sup>+</sup> macrophages isolated from IL-10 β lactamase reporter ITIB or WT naive mice infected or not with MuHV-4 for 8 days. (E) Percentages of IL10<sup>+</sup> CD169<sup>+</sup> macrophages gated as in D. (F) Pie chart depicting the average absolute number (surface area) of the indicated cell populations isolated from the BM of Mock or MuHV-4 IL-10 β lactamase reporter ITIB mice. (\*p<0,05, one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test)

Nous avons observé que la déplétion des macrophages CD169<sup>+</sup> de la moelle (**Figure discussion 4A-B**) était associée à une perte de l'imprinting des monocytes et des progéniteurs de monocytes (**Figure discussion 4C-D**). De plus, l'absence des macrophages CD169<sup>+</sup> entraîne une perte des capacités régulatrices des monocytes et une expression de marqueurs inflammatoires comme l'expression de iNOS et TNFα (**Figure discussion 4E-F**) suggérant l'importance des macrophages CD169<sup>+</sup> pour réguler le phénotype régulateur des monocytes. De manière très intéressante, cette perte d'imprinting due à l'absence des macrophages CD169<sup>+</sup> de la moelle osseuse est corrélée à une aggravation sévère de la pathologie (**Figure discussion 4G**) comme observée en absence de monocytes ou en absence d'expression de PD-L1 par les monocytes. Les mécanismes précis de cette éducation doivent maintenant être investigués.



**Figure discussion 4** (A) WT or CD169 DTR<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice were intratracheally (i.t.) mock or virus-infected (1.10<sup>4</sup> PFU of MuHV-4) and were weighed at the indicated times until euthanasia. CD169<sup>+</sup> cells were systemically depleted by using the diptheria toxin (DT). Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with DT (40ng/g weight) at the indicated times. (B) Control of CD169<sup>+</sup> macrophages depletion in BM. (C) Representative FACS plots of BM GMP and MP/cMoP expressing MHCII at day 8 p.i. (D) Percentage (day 8 p.i.) of BM MP/cMoP and GMP expressing MHCII molecules. (E) Percentages of BM MOs expressing MHCII, Sca1<sup>+</sup>, iNOS, TNF $\alpha$  in BM at day 8 p.i. (F) Weight-curves represented as % of initial weight, comparison of weight of DTR and WT mock or MuHV-4. For comparisons between multiple groups, one-way was used. (\*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001). Error bars represent SEM.

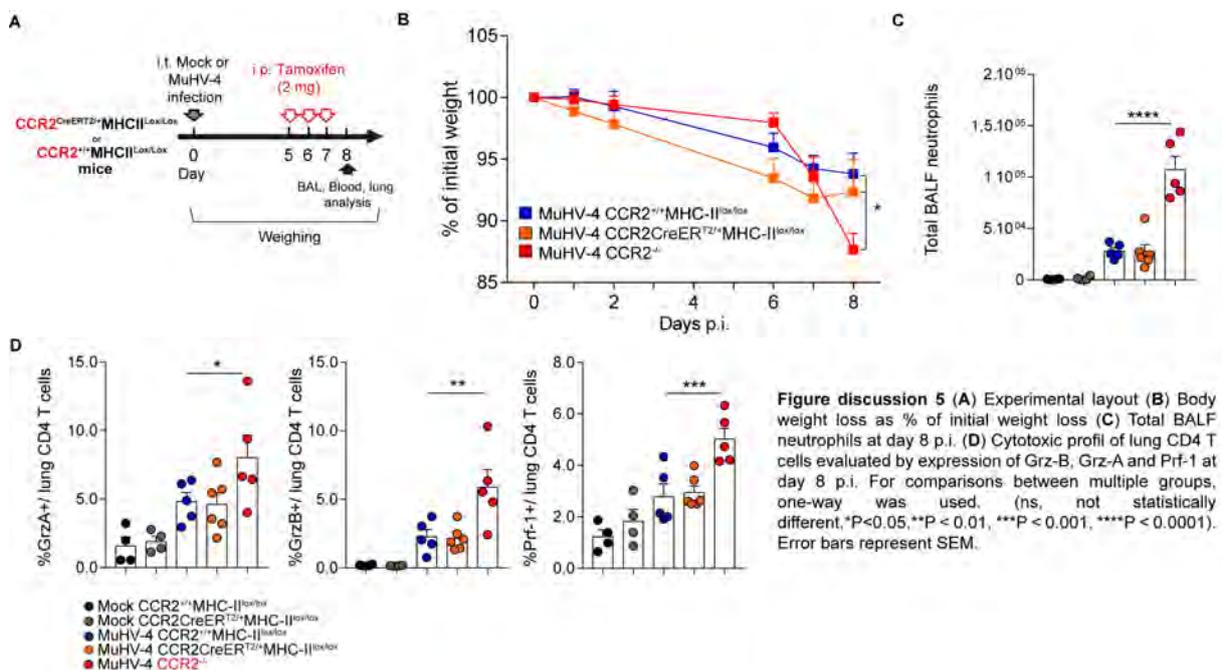
Les macrophages CD169<sup>+</sup> agissent comme premiers senseurs de l'infection. Les mécanismes de sensing des signaux initiaux de l'infection respiratoire et leur intégration par ces macrophages nichés au sein de la moelle osseuse n'ont pas encore été investigués. Il a notamment été montré que les macrophages CD169<sup>+</sup> de la moelle permettaient l'éducation et la production subséquente d'IFN de type I par les *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) via un sensing dépendant du TLR7 au niveau intrinsèque ainsi qu'une activation de la voie cGAS-STING de façon extrinsèque lors d'une infection létale à *Plasmodium yoelii* (Spaulding et al., 2016). Ces pDCs motiles en conditions normales s'arrêtent dans la moelle osseuse lors de l'infection ce qui permet leur éducation par les macrophages CD169<sup>+</sup>. Le signaling et l'activation de la voie STING au sein des macrophages CD169<sup>+</sup> contrôlent la production d'IFN de type I par les pDCs et leur sortie de la moelle osseuse. Un article en préprint (Fried, Mahinder, Jing, Fooksman, & Lauvau, 2022) dans la continuité des recherches sur *Plasmodium yoelii* a montré que la voie STING au sein des macrophages CD169<sup>+</sup> induisait l'initiation et le priming de pDCs leur permettant de produire de l'IFN de type I. Les IFN de type I modulent l'activation de centaines de gènes (Barrat, Crow, & Ivashkiv, 2019; Ivashkiv & Donlin, 2014; Stetson & Medzhitov, 2006) et nous pensons

que ces IFNs jouent également un rôle crucial dans les étapes précoces de l'infection par MuHV-4. De la même façon, il serait intéressant de tester dans le cadre de l'infection par MuHV-4 si les macrophages CD169<sup>+</sup> intègrent de la même façon les signaux initiaux de l'infection par l'activation de voies antivirales comme la voie cGAS-STING et que ces cellules relaient l'information par le biais de médiateurs immuns au sein de la moelle. Nous voulons investiguer les médiateurs (cytokines, chemokines) libérés dans le sérum et présents également dans le fluide extra-médullaire (Arts et al., 2018) aux temps précoces d'infection. L'IFN $\gamma$  et les IFNs de type I sont libérés suite à l'infection par le MuHV-4 (Sarawar et al., 1997; Tan, Lawler, May, Belz, & Stevenson, 2016) et de récentes observations suggèrent leur participation à l'imprinting des monocytes au sein de la moelle osseuse. La production d'IFNs de type I joue un rôle double dans le cadre d'infections virales persistantes. Durant la phase aiguë d'infection, les IFNs de type I possèdent une activité antivirale alors que lors de l'établissement et la persistance des infections virales, les IFNs de type I montrent des capacités immunosuppressives (Divangahi, King, & Pernet, 2015; Papatriantafyllou, 2013; Teijaro et al., 2013; Wilson et al., 2013). Les AMs sont les principales cellules productrices d'IFNs de type I suite à une infection virale pulmonaire (Kumagai et al., 2007). Ces IFNs de type I sécrétés peuvent agir de façon autocrine ou paracrine mais induisent également le recrutement de cellules myéloïdes jusqu'au site d'infection (Divangahi et al., 2015). Après une infection par *influenza*, le signalling de l'IFN de type I dans les HSCs est requis pour la génération et le recrutement de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> (S. U. Seo et al., 2011). Nous voulons donc tester si les macrophages CD169<sup>+</sup> intègrent les signaux IFNs de type I pour participer à l'éducation des progéniteurs des monocytes dans la moelle osseuse.

Nous pensons qu'il existe une interaction fonctionnelle entre les macrophages CD169<sup>+</sup> et les monocytes éduqués au sein de celle-ci lors de l'infection par le MuHV-4. Après le sensing de l'infection par des molécules provenant du poumon, nous postulons que les macrophages CD169<sup>+</sup> de la moelle osseuse libèrent à leur tour, des molécules à l'origine de l'expansion et du priming des monocytes. Parmi les candidats, nous avons identifié l'IFN $\gamma$ . Dans d'autres contextes, le sensing de l'IFN $\gamma$  par les progéniteurs des monocytes de la moelle osseuse permet l'acquisition de fonctions régulatrices (Askenase et al., 2015) et joue un rôle clé dans l'induction de la myélopoïèse (Kaufmann et al., 2018). Suite à l'infection par *Toxoplasma gondii*, les cellules NK de la moelle produisent de l'IFN $\gamma$  en réponse à la production d'IL-12 par des DCs dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Le sensing précoce de l'IFN $\gamma$  par les progéniteurs des monocytes dans la moelle osseuse éduque la fonction régulatrice subséquente des monocytes Ly6C<sup>hi</sup> (Askenase et al., 2015). Des expériences préliminaires ont été réalisées concernant l'IFN $\gamma$  montrant son caractère essentiel dans l'imprinting des monocytes et des progéniteurs de la moelle. Lors de l'utilisation d'un anticorps anti-IFN $\gamma$ , nous observons une perte totale de l'imprinting au niveau des monocytes et des progéniteurs des monocytes au sein de la moelle. Des chimères mixtes sont en réalisation pour comparer le phénotype et l'expansion des monocytes entre le compartiment WT et le compartiment défectueux pour le récepteur de l'IFN $\gamma$  (Ifngr1<sup>-/-</sup>).

## Fonctionnalité de l'expression du MHCII

Pour évaluer l'éducation et le profil régulateur des monocytes induits par l'infection, nous nous basons principalement sur l'expression du marqueur PD-L1 ainsi que sur celle du marqueur MHCII en surface des monocytes. Pour rappel, cette expression est également corrélée à la production d'IL-10 par ces monocytes (**Figure S1 de l'article**). L'expression du MHCII a en effet été associée à un profil régulateur dans un contexte d'infection par *Toxoplasma gondii* (Askenase et al., 2015). Dans notre contexte, le rôle fonctionnel de l'expression du MHCII par les monocytes n'est pas encore clairement défini. Pour investiguer cela, nous avons généré des souris  $CCR2^{CreERT2/+}MHCII^{lox/lox}$  pour évaluer si l'absence spécifique d'expression du MHCII par les cellules  $CCR2^+$  induisait le même phénotype tel qu'observé au sein des souris  $CCR2^{-/-}$ . La **figure discussion 5** présente les principales observations suite à l'infection des souris  $CCR2^{CreERT2/+}MHCII^{lox/lox}$ . Cette mutation conditionnelle (**Figure discussion 5A**) sur le gène MHCII exprimé par les monocytes n'induit pas une perte de poids telle qu'observée chez les souris  $CCR2^{-/-}$  (**Figure discussion 5B**) ainsi qu'un profil cytotoxique des lymphocytes T CD4 (**Figure discussion 5D**). Les mécanismes régulateurs s'opèreraient via un mécanisme indépendant d'une présentation antigénique par les monocytes sur les lymphocytes T CD4.



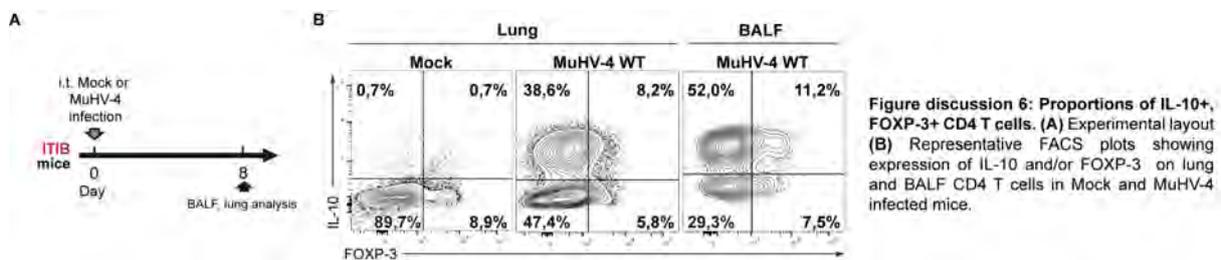
## Fonctionnalité de l'expression de PD-L1

En générant les souris  $CCR2^{CreERT2/+}PD-L1^{lox/lox}$ , nous avons observé que l'expression de PD-L1 par les monocytes était le principal mécanisme permettant la régulation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD4 (**Figure 7 de l'article**). Alors que cet axe est connu principalement dans le contexte des mécanismes d'immunoévasions des cellules tumorales, l'axe PD-L1/PD-1 régule les réponses

immunes antivirales et peut être modulé par un nombre important de virus (Schönrich & Raftery, 2019). De façon similaire à ce qui est observé lors d'une infection par le MuHV-4, le KSHV induit une augmentation de l'expression de PD-L1 sur les monocytes humains et il est suggéré que l'augmentation de PD-L1 par le KSHV pourrait représenter un nouveau mécanisme d'immunomodulation par les  $\gamma$ HVs encore non-investigé jusqu'à présent (Host et al., 2017). Il est reporté que les cancers gastriques induits par l'EBV, un type de cancer gastrique bien particulier, sont associés à une uprégulation de l'axe PD-L1/PD-1. Ces cancers gastriques EBV+ comptent pour 10% des cancers gastriques et sont le résultat d'accumulation de modifications génétiques et épigénétiques (Shinozaki-Ushiku, Kunita, & Fukayama, 2015). Dans ce type de cancer, l'overexpression de PD-L1 au sein de la tumeur est induite par l'expression de l'IFN $\gamma$  via les voies de signalisations JAK2, PI3K et mTOR (Sasaki et al., 2019). Il est important de préciser que dans le cas des infections par EBV et KSHV, les cellules qui uprégulent PD-L1 sont elles-mêmes infectées par le virus, au contraire du MuHV-4 où les monocytes ne sont pas infectés par le virus. Les mécanismes d'induction de PD-L1 pourraient donc être différents en fonction des cas. L'activation de PD-L1 n'est pas limitée à l'infection par les  $\gamma$ HVs car celle-ci est également observée dans des contextes d'infections avec des virus persistants, comme le HIV et les virus des hépatites B et C (Schönrich & Raftery, 2019). Il est également reporté qu'une insuffisance d'activation de cette voie promeut les immunopathologies lors d'infections aiguës associées à une hyperactivation des lymphocytes T. C'est le cas lors des infections par *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) où une sévère immunopathologie se développe lors d'une déficience de l'axe PD-L1/PD-1 (Barber et al., 2006; Mueller et al., 2010; Shaabani et al., 2016; Zinselmeyer et al., 2013). Dans cette immunopathologie, les lymphocytes T CD8 agissent comme cellules super-tueuses de l'endothélium vasculaire, infecté par LCMV, résultant en une fuite vasculaire associée à de l'œdème pulmonaire et une hypotension sévère (Frebel et al., 2012). Dans un modèle d'hépatite virale aiguë, l'absence de PD-1 est associée à une clairance virale plus rapide accompagnée du développement d'une hépatite sévère (Iwai, Terawaki, Ikegawa, Okazaki, & Honjo, 2003). Ces résultats indiquent que la stimulation de l'axe PD-L1/PD-1 pendant la phase aiguë de l'infection virale aide à ajuster la force et la qualité de l'attaque des lymphocytes T cytotoxiques de manière à équilibrer les réponses visant à l'élimination du virus et les dommages tissulaires excessifs liés à l'inflammation. A l'opposé, dans le cadre d'infections persistantes, les hauts taux de PD-1 et PD-L1 permettant la tolérance du virus pourraient avoir des conséquences immunologiques défavorables pour l'hôte à long terme, menant à une exhaustion des lymphocytes T et une immunosuppression face à d'autres contextes d'infection ou de tumeurs. Les mécanismes moléculaires par lesquels les  $\gamma$ HVs manipulent cette voie PD-L1/PD-1 à leur profit nécessiteraient d'être investigués pour compléter l'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la relation symbiotique entre l'hôte et le pathogène.

## Rôle de l'IL-10 dans la pathogénie

Comme dit précédemment, de nombreux herpèsvirus manipulent la voie de l'IL-10 pour faciliter l'infection de l'hôte, l'établissement de la latence et la dissémination virale (Moore et al., 1990; Peacock & Bost, 2001; Siegel, Herskowitz, & Speck, 2008). Nous avons identifié la population de cellules T CD4 comme étant la principale source d'IL-10 dans les voies respiratoires pendant les premiers stades de l'infection par le MuHV-4 (**Figure 3 de l'article**). Nous avons également mis en évidence que l'axe de régulation mettant en jeu l'IL-10, régule l'inflammation de façon distincte à l'axe PD-L1/PD-1, régulant la cytotoxicité des lymphocytes T CD4, suggérant que les axes IL-10 et PD-L1/PD-1 sont des voies régulatrices indépendantes qui contribuent toutes deux de façon complémentaire au phénotype protecteur de la maladie. Un autre point important à adresser est la distinction de populations CD4 productrices d'IL-10 des cellules T classiques régulatrices Foxp-3+ classiquement décrites (*Regulatory T cell*-T Reg). Il est en effet important de souligner que l'expression de Foxp-3 ne corrèle pas systématiquement avec une production massive d'IL-10 et inversement, une production d'IL-10 ne corrèle pas avec une expression du facteur Foxp-3. En effet, en plus des cellules T Reg CD4 classiques Foxp3+, nous avons remarqué un enrichissement significatif des cellules T CD4 effectrices Foxp3- IL-10+. La **figure discussion 6** présente les quatre types de populations CD4 sur base de l'expression des marqueurs IL-10 et Foxp-3.



De plus, en infectant des souris IL-10<sup>-/-</sup> ou CD4<sup>cre</sup>IL10<sup>lox/lox</sup> avec le MuHV-4, nous avons observé que l'absence d'IL-10 dérivée des cellules T pendant l'infection aiguë perturbe l'interaction symbiotique hôte-virus et déclenche une infiltration massive de neutrophiles et une libération incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  (**Figure 3 de l'article**). Ainsi, en plus d'amortir l'inflammation globale, l'IL-10 produite par les cellules T CD4 peut faire partie d'une boucle de rétroaction autocrine, régulant directement leurs propriétés effectrices, et notamment leur production d'IFN $\gamma$ , comme décrit pour d'autres infections (J. Sun et al., 2011). Une autre question à adresser est le rôle des lymphocytes T CD8 producteurs d'IL-10 qui sont présents également de façon massive suite à l'infection (**Figure 3 de l'article**). Alors qu'il est décrit que l'IL-10 inhibe la fonction des lymphocytes T CD8 et modifie la capacité de transduction du signal TCR suite à une infection par LCMV (L. K. Smith et al., 2018), il serait intéressant d'investiguer le rôle de l'IL-10 produit par les lymphocytes T CD8 eux-mêmes via un mode de régulation autocrine, empêchant leur activation et leur fonction effectrice. Ceux-ci sont décrits également chez l'homme, ayant fait l'objet de premières investigations

dans les années 2000 (Billerbeck & Thimme, 2008; Noble, Giorgini, & Leggat, 2006) mais leur caractérisation et leur importance dans diverses pathologies restent encore largement sous-estimées de nos jours. Les populations lymphocytes T CD8 productrices d'IL-10 sont observées dans différents types d'infections comme le HIV (Elrefaei, Barugahare, Ssali, Mugenyi, & Cao, 2006; Elrefaei et al., 2007), HCV (Abel et al., 2006), *influenza* (Zou et al., 2014), EBV (Popescu et al., 2007) et MuHV-4 (Hu, Zhang, & Usherwood, 2013) mais leurs capacités effectrices ont été évaluées principalement après restimulation *in vitro*. La manipulation de la voie de l'IL-10 au niveau des lymphocytes T CD8 pourrait représenter une nouvelle voie d'immunomodulation développée par le virus pour contourner la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8 en les biaisant vers un profil régulateur.

Le laboratoire hôte a montré que l'infection par le MuHV-4 éduquait les lymphocytes T CD8 pour protéger l'hôte dans un contexte d'une infection hétérologue par le PVM (Dourcy et al., 2020). Plus précisément, l'infection par MuHV-4 protège à la fois contre l'immunopathologie de type Th2 induite par le vaccin contre le PVM et contre la surinfection par ce même virus. Les cellules T CD8 jouent un rôle essentiel à cette protection. Il est essentiel de comprendre comment les herpesvirus modifient les réponses immunitaires face aux infections virales secondaires pour comprendre l'évolution de la maladie, en particulier pour des virus tels que le RSV, qui peut avoir des manifestations cliniques extrêmes chez l'homme allant d'une infection asymptomatique à une infection pulmonaire potentiellement mortelle (Gurczynski, Stephen J., 2020). Cette étude met en évidence que les infections à  $\gamma$ HVs induisent une activation non-spécifique des cellules T, ici CD8, qui est bénéfique dans certaines conditions mais qui pourrait également être préjudiciable dans d'autres comme nous le voyons dans cette étude par l'activation excessive des lymphocytes T CD4 causant des dommages tissulaires en absence de monocytes.

En effet, nous avons vu que les monocytes régulaient l'activation des lymphocytes T CD4 cytotoxiques via un mécanisme dépendant de PD-L1/PD-1 suite à l'infection par le MuHV-4. Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont d'un intérêt grandissant, que ce soit lors d'infections virales ou le développement de tumeurs. En effet, leur présence dans différents contextes comme les infections virales (D. M. Brown, Lampe, & Workman, 2016; Verma et al., 2016; Weiskopf et al., 2015), et notamment l'infection primaire par l'EBV (Meckiff et al., 2019), la réponse anti-tumorale (Cachot et al., 2021) ou les phénomènes d'auto-immunité (Peeters et al., 2017), a été associée à des effets différents, d'aggravation de la maladie ou au contraire de l'induction d'une immunité protectrice (Juno et al., 2017). La présence de lymphocytes T CD4 cytotoxiques pourrait notamment être une adaptation et un mécanisme de compensation dans le cas d'infection persistante ou chronique comme c'est le cas avec les  $\gamma$ HVs où les mécanismes cytotoxiques induits par les lymphocytes T CD8 sont modulés par le virus (Stuller & Flaño, 2009). Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont également observés dans une classe de la population des « super-centenaires », leur conférant une réponse immune efficace face aux

infections et aux processus tumoraux et une longévité subséquente remarquable. *A contrario*, les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont également décrits comme des acteurs majeurs lors du COVID-19, où leur infiltration dans le tissu est corrélée à la sévérité de la maladie (Meckiff et al., 2020) et aux dommages tissulaires (Maehara et al., 2020). Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques contribuent également aux dommages vasculaires lors d'une infection CMV (Pachnio et al., 2016).

La contribution ambivalente des lymphocytes T CD4 cytotoxiques à des réponses immunes bénéfiques ou délétères n'étant pas toujours claire, comprendre par quels mécanismes la régulation ou l'activation de ces cellules s'opère est une question d'importance cruciale. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes sous-jacents relatifs aux lymphocytes T CD4 cytotoxiques, nous aborderons les différents points de discussion suivants:

### **1) Rôle antiviral protecteur**

### **2) Développement et plasticité des lymphocytes T CD4 cytotoxiques**

### **3) Mécanismes effecteurs de cytotoxicité**

### **4) Régulation des mécanismes effecteurs et immunopathologies**

### **5) Immunothérapies et cancers**

### **6) Virome dans la santé et la maladie**

#### **Rôle antiviral protecteur**

Dans différents contextes d'infections virales, les lymphocytes T CD4 cytotoxiques peuvent jouer un rôle protecteur. Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont notamment étudiés lors d'infections par le virus simien d'immunodéficience (SIV) chez les macaques rhésus. Le contrôle viral de l'infection n'est pas impacté lors d'une déficience en lymphocytes T CD8 spécifiques du SIV et est associé à une expansion de lymphocytes T CD4 spécifiques circulants exprimant GrzB (von Gegerfelt et al., 2010). Leur aptitude à contrôler l'infection virale a notamment été démontrée via leur capacité de reconnaissance et d'élimination des macrophages infectés par le SIV (Sacha et al., 2009). Plus récemment, une autre étude a également démontré l'activité cytolytique des lymphocytes T CD4 spécifiques du SIV pour contrôler la réplication virale (Ayala et al., 2016). Les lymphocytes T CD4 possédant un profil cytotoxique sont également présents chez les patients infectés par le HIV. Ces cellules sont présentes en grande quantité et expriment notamment la Prf-1 et GrzA (Appay et al., 2002). Fonctionnellement, ces cellules possèdent des propriétés cytolytiques similaires aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques du HIV (S. Johnson et al., 2022). Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques

sont également majoritairement décrits dans les infections aiguës à *influenza*. Elles ont été décrites pour la première fois en 1985 (Lukacher, Morrison, Braciale, Malissen, & Braciale, 1985) et leur fonction protectrice par action cytotoxique a également été décrite (Graham, Braciale, & Braciale, 1994). Les mécanismes par lesquels ces cellules induisent une protection contre *influenza* ont été investigués dans des souris transgéniques avec une infection par une souche influenza murine (PR8). Ces cellules, transférées adoptivement à des receveuses naïves ont fourni une protection de manière indépendante de l'IFN $\gamma$ , en favorisant la maturation des cellules B et en induisant une activité cytolytique médiée par la Prf-1 (D. Brown, Lee, Garcia-Hernandez, & Swain, 2012; D. M. Brown, Dilzer, Meents, & Swain, 2006; McKinstry et al., 2012). Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont protecteurs également dans l'infection par le CMV. Lors de l'infection primaire par le HCMV, l'expansion de lymphocytes T CD4 spécifiques, produisant de l'IFN $\gamma$ , et du GrzB a été associée à un meilleur résultat clinique (Gamadia et al., 2003). Dans le modèle murin MCMV, les souris déplétées en lymphocytes T CD4 avaient une incapacité à réguler la réplication virale au niveau des glandes salivaires, principal site de latence (Jonjić, Mutter, Weiland, Reddehase, & Koszinowski, 1989). En utilisant des tétramères MHCII spécifiques, Verma *et al.* ont montré que les lymphocytes T CD4 spécifiques à MCMV exprimaient des hauts taux de GrzB et que cette activité était restreinte au foie, suggérant que les lymphocytes T CD4 spécifiques peuvent tuer des cellules cibles dans un mécanisme dépendant de l'antigène et de l'organe touché (Verma et al., 2015). Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont également retrouvés en grand nombre chez des patients touchés par un hantavirus où l'expression de GrzB, Prf-1 et CD107a par les cellules CD4 est plus importante et associée à un meilleur résultat clinique que chez les patients atteints d'une maladie sévère (Y. Ma et al., 2015). L'identification de lymphocytes T CD4 cytotoxiques spécifiques a également été réalisée chez des patients infectés par l'EBV (Steimle, Siegrist, Mottet, Lisowska-Grospierre, & Mach, 1994) ainsi que dans l'infection par le MuHV-4 où les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont capables de lyser des cellules infectées *in vivo* (Hu, Blackman, Kaye, & Usherwood, 2015; Stuller & Flaño, 2009). En regard du rôle antiviral protecteur joué par ces cellules dans divers contextes d'infections virales, disséquer le rôle de ces cellules cytotoxiques et leurs effets dans les immunopathologies en les dissociant de leur rôle dans le contrôle de la réplication viral est un challenge difficile. Notre étude n'a en effet pas pu démontrer à ce jour de façon directe, le rôle spécifique des lymphocytes T CD4 cytotoxiques dans l'aggravation de la maladie et l'immunopathologie. En effet, en déplétant les lymphocytes T CD4 de façon générale, la réponse immune envers le MuHV-4 serait complètement débalancée menant à une infection lytique plus importante (Sparks-Thissen et al., 2005) et d'autres facteurs confondants viendraient s'ajouter dans le phénotype de la maladie et la pathologie aiguë en déplétant notamment les T Reg. Une récente étude a également mis en évidence le rôle crucial des lymphocytes T CD4 dans le contrôle de l'infection primaire du MuHV-4 en établissant une régulation avec les cellules NK (Lawler & Stevenson, 2020). Le modèle propose que les cellules épithéliales supportent la réplication lytique du MuHV-4. Les débris viraux sont récupérés par les cellules dendritiques migrantes pour présenter les antigènes viraux au niveau du ganglion lymphatique

drainant, permettant d'initier une réponse CD4 spécifique. Ces lymphocytes T CD4 primés migrent ensuite au niveau du site inflammatoire à savoir les poumons infectés et activent là des cellules présentatrices d'antigènes LysM<sup>+</sup> par la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Ces cellules présentatrices d'antigènes, locales, recrutent et activent à leur tour les cellules NK avec l'aide des lymphocytes T CD4 en produisant diverses cytokines. A leur tour, les cellules NK activées tuent les cellules infectées et limitent la réplication virale par des mécanismes dépendants de la production d'IFN $\gamma$  et de Prf-1. Pour notre part, nous avons mis en évidence un rôle cytotoxique des lymphocytes T CD4 localisés à proximité des cellules épithéliales et endothéliales exprimant le MHCII chez les souris CCR2<sup>-/-</sup> et pouvant potentiellement par ce biais présenter des antigènes viraux aux lymphocytes T CD4. Le mécanisme que nous proposons se veut complémentaire à ce modèle et la voie proposée par Lawler *et al.*, nécessiterait également d'être investiguée lors d'infection chez des souris CCR2<sup>-/-</sup>. En effet, les cellules LysM<sup>+</sup> présentatrices d'antigènes tissulaires qualifiées par Lawler *et al.* nécessiteraient d'être plus caractérisées et pourraient être notamment les monocytes.

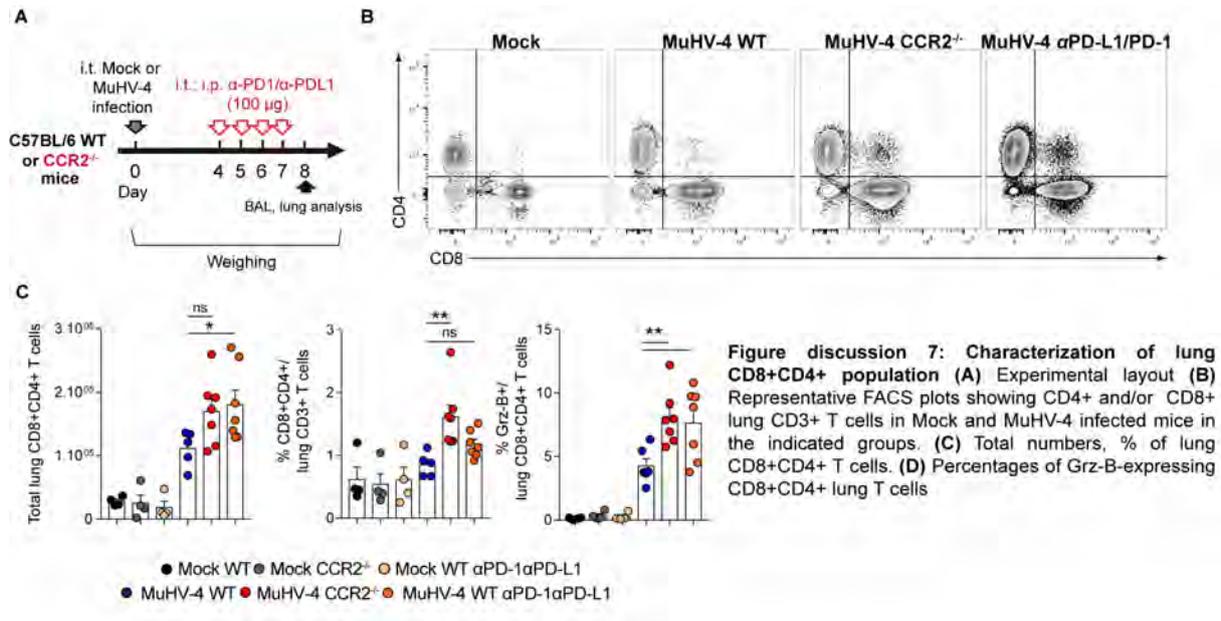
Une limitation de l'étude actuelle est également le manque d'un outil spécifique pour la génération de souris déficientes en lymphocytes T CD4 cytotoxiques afin d'évaluer leur rôle direct dans la pathologie. Le facteur de transcription Runx3 avait été proposé mais celui-ci intervient dans d'autres processus de différenciation généraux des lymphocytes T comme expliqué plus loin dans le chapitre *développement des lymphocytes T CD4*. De plus, comme pour la déplétion globale des lymphocytes T CD4, les lymphocytes T CD4 cytotoxiques jouent un rôle dans le contexte d'infection par les  $\gamma$ HVs (Heller, Gurer, & Münz, 2006) et évaluer leur fonction par une approche de déplétion serait faussée par un contrôle viral dérégulé. Une question qui reste ouverte concerne également la spécificité des lymphocytes T CD4. Alors que les études précédemment citées investiguent le rôle des lymphocytes T CD4 cytotoxiques spécifiques de l'infection, nous manquons d'un modèle MHCII tétramère spécifique permettant d'attester de la spécificité de ces cellules dans le cadre de l'infection par le MuHV-4. L'investigation de leur spécificité permettrait d'ajouter une compréhension mécanistique de leur développement et hyperactivation d'une part 1) en investiguant le rôle joué par les monocytes interagissant de manière non-spécifique via l'axe PD-L1/PD-1 mais également 2) en investiguant l'activation primaire de ces cellules dépendamment de la voie du TCR par d'autres cellules présentatrices d'antigènes, le rôle des monocytes dans la présentation d'antigènes et la génération des lymphocytes T CD4 cytotoxiques ayant été exclu par l'utilisation des souris CCR2<sup>CreERT2/+</sup>MHCII<sup>lox/lox</sup>.

### **Développement et plasticité des lymphocytes T CD4 cytotoxiques**

Une question que l'on peut se poser également est le développement de cette population particulière de lymphocytes T CD4 aux propriétés cytotoxiques alors que les lymphocytes T CD4 sont connus à la base comme lymphocytes T *Helper*. L'origine des lymphocytes T CD4 cytotoxiques est toujours controversée, ces lymphocytes pouvant émerger d'une nouvelle voie centrale de

différenciation-lignée cellulaire CD4 ou d'une spécialisation périphérique d'un groupe de T *Helper* classique acquérant des fonctions cytotoxiques. Historiquement, les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 *Helper* sont centrées sur la production de cytokines alors que l'activité cytotoxique contre des cellules cibles est réservée à la population des lymphocytes T CD8. Des études détaillées ont établi le rôle d'une série de facteurs de transcription spécifiques propres à chaque famille de CD4 *Helper* (Hirahara & Nakayama, 2016), menant à la question de l'existence de facteurs de transcription spécifiques pour les lymphocytes T CD4 cytotoxiques. Au niveau du thymus, la différenciation en lymphocytes T CD4 *Helper* ou lymphocytes T CD8 résulte d'une activation-répression opposée de facteurs de transcription ThPOK et Runx3 réprimant l'expression des gènes associés à la famille CD8 et CD4 respectivement. Après la différenciation et la sortie du thymus, les lymphocytes T CD8 et CD4 naïfs maintiennent l'expression de Runx3 ou ThPOK respectivement suggérant que le rôle de ces facteurs de transcription est aussi actif en périphérie (Vacchio et al., 2014). Dans le cas de l'infection par MuHV-4, il est intéressant de rappeler en lien avec ces dernières notions, que les lymphocytes T CD4 au sein du poumon chez les souris CCR2<sup>-/-</sup> overexpriment Runx3 comme vu lors de l'analyse par *single cell* soulignant le rôle crucial de ce facteur de transcription dans notre contexte d'étude. Cependant, la répression du programme cytotoxique dans les lymphocytes T CD4 périphériques n'est pas absolue comme ces cellules peuvent acquérir des activités cytotoxiques associées entre autre à l'expression de Prf-1 (Appay et al., 2002; Cheroutre & Husain, 2013; P. J. van de Berg, van Leeuwen, ten Berge, & van Lier, 2008). Deux facteurs de transcription participent au développement des lymphocytes T CD4 cytotoxiques : Eomesodermin (Eomes) et T-bet (Intlekofer et al., 2008; Pearce et al., 2003). Le rôle de ces molécules a été confirmé dans le développement des lymphocytes T CD4 cytotoxiques. T-bet peut notamment se lier à la région promotrice des gènes GrzB et Prf-1 (Glimcher, Townsend, Sullivan, & Lord, 2004; Laiqing et al., 2013) et Eomes est également nécessaire à l'expression de GrzB par les lymphocytes T CD4 (Qui et al., 2011). En amont de ces facteurs de transcription, Takeuchi *et al.* ont identifié la molécule *Class I-restricted T cell-associated molecule* (CRTAM) comme déterminant principal du lineage cytotoxique CD4 chez l'homme et la souris (Takeuchi et al., 2016). La molécule CRTAM a initialement été décrite comme un marqueur de surface d'activation précoce des cellules NK et des lymphocytes T CD8. C'est une protéine membranaire de surface qui lie la molécule 1 d'adhésion cellulaire et est également exprimée sur une portion des lymphocytes T CD4 après activation. Les lymphocytes T CD4 exprimant CRTAM sont capables de produire de l'IFN $\gamma$ , expriment des quantités importantes d'Eomes et de GrzB et peuvent se différencier en lymphocytes T CD4 cytotoxiques *in vitro*. La signalisation intracellulaire par le domaine cytoplasmique de CRTAM est nécessaire à l'expression d'Eomes, d'IFN $\gamma$  et de GzmB/Prf-1 dans les cellules CRTAM<sup>+</sup>, plaçant CRTAM en amont d'Eomes dans une voie de signalisation qui régule le développement des lymphocytes T CD4 cytotoxiques (Takeuchi et al., 2016). Il est intéressant de noter que les cellules CD4 CRTAM<sup>+</sup> se trouvent notamment dans les poumons et les intestins, les mêmes tissus dans lesquels les lymphocytes T CD4 cytotoxiques sont efficacement générés lors d'infections

virales à *influenza* ou dans des modèles d'induction de colite intestinale indiquant que les cellules CRTAM<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sont impliquées dans la réponse spécifique cytotoxique antivirale à *influenza* mais également dans l'induction d'inflammation au niveau de l'intestin (Takeuchi et al., 2016). Deux études ont également rapporté l'existence d'une population de cellules T qui expriment le CD4 et le CD8 $\alpha$  dans l'intestin. Ces lymphocytes intraépithéliaux (*Intraepithelial lymphocytes*-IELs) ressemblent phénotypiquement à des CD8 cytotoxiques avec l'expression de GrzB, CD107a et ont des capacités de cytotoxicité *in vitro*. Cette population aux propriétés cytotoxiques peut être générée à partir de lymphocytes T périphériques CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> suite à un traitement au TGF $\beta$  et l'acide rétinoïque, induisant une uprégulation de Runx3 et une downrégulation de l'expression de ThPOK (Mucida et al., 2013; Reis, Rogoz, Costa-Pinto, Taniuchi, & Mucida, 2013). Cette population est également présente dans un modèle d'induction de colite inflammatoire (Takeuchi et al., 2016). Cette population exprime CRTAM<sup>+</sup> mais les CRTAM<sup>+</sup> CD4 ne sont pas nécessairement CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Les auteurs confirment que ces IELs CD4 ont perdu l'expression de ThPOK dans un mécanisme en aval de la sélection et de la différenciation thymique montrant que les lymphocytes T CD4 peuvent exhiber une certaine plasticité et provenir de lymphocytes T CD4 *Helper* ayant subi un remaniement de fonction effectrice par le biais de régulation de facteurs de transcription au niveau de régions promotrices ou silenciers de gènes (Takeuchi et al., 2016). Il est intéressant d'observer que dans le cas d'une infection par le MuHV-4, en plus des lymphocytes T CD4 cytotoxiques, nous observons également une population CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> telle que décrite (Mucida et al., 2013). Cette population, minoritaire en terme de pourcentages globaux sur les cellules CD3<sup>+</sup> présente néanmoins des caractéristiques cytotoxiques marquées et est présente en plus grand nombre chez les souris CCR2<sup>-/-</sup> et les souris traitées avec des inhibiteurs de l'axe PD-L1/PD-1. La **figure discussion 7** montre l'existence de cette population dans le poumon et le BALF après 8 jours d'infection par le MuHV-4. On retrouve également une expression de CD8 $\alpha$  plus marquée au niveau de l'analyse par *single cell* sur les lymphocytes T CD4 chez les souris infectées CCR2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris WT. Les mécanismes de répression des gènes T *Helper* et d'activation de gènes cytotoxiques spécifiques et notamment l'expression de CRTAM méritent d'être investigués.



### Mécanismes effecteurs de cytotoxicité

Les lymphocytes T CD4 cytotoxiques utilisent des mécanismes effecteurs partagés par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK. Deux principaux mécanismes sont connus à ce jour :

- la voie médiée par l'interaction entre Fas/Fas ligand. Cette liaison induit l'activation d'un signal complexe induisant la mort cellulaire par apoptose via la caspase-3. Cette voie n'a pas été investiguée dans le cadre de cette étude mais nécessiterait également d'être évaluée notamment par l'expression de FasL sur les lymphocytes T CD4 cytotoxiques, d'autant plus que ce mode d'induction d'apoptose par les cellules cytotoxiques a été décrit lors de l'infection par EBV (Nikiforow, Kim, George, & Christian, 2003). De plus, il a été montré que des lymphocytes T CD4 exprimant GrzB et Prf-1 peuvent tuer les T Reg par un mécanisme dépendant de l'interaction entre NKG2D-NKG2DL et de l'interaction Fas-FasL (Yang et al., 2017). Cette observation est à mettre en lien avec la diminution sévère du nombre de T Reg observée chez les souris CCR2<sup>-/-</sup> infectées par le MuHV4 par rapport aux souris WT où ce mécanisme pourrait expliquer la diminution du nombre de T Reg en plus d'une diminution du nombre global de lymphocytes T CD4 suite au défaut de recrutement observé chez les souris CCR2<sup>-/-</sup> (**Figure S5 de l'article**).

- le second mécanisme majeur de cytotoxicité est l'exocytose de granules cytotoxiques au niveau des cellules cibles pour induire l'apoptose (Trapani & Smyth, 2002). Ces granules cytotoxiques sont contenus dans des vésicules et sont exocytés suite à l'activation du signal TCR notamment. L'engagement du TCR seul n'est pas suffisant pour induire la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques. En effet, la mobilisation des granules lytiques et la dégranulation subséquente des

lymphocytes T cytotoxiques requièrent l'activation de protéines kinases et un remodelage du cytosquelette (N. N. Berg, Puente, Dawicki, & Ostergaard, 1998; Puente, Mireau, Lysechko, & Ostergaard, 2005; A. Shen, Puente, & Ostergaard, 2005; Wei et al., 1998). Une étape de maturation terminale des granules cytotoxiques est en effet nécessaire à l'excrétion de leur contenu lytique. Suite à la liaison du TCR, les cellules cytotoxiques réorganisent leur cytosquelette et leur centre organisateur de microtubules vers la zone de contact avec la cellule cible en créant une synapse immunologique. Toute cette organisation menant à l'exocytose des granules est le résultat d'activation de protéines en cascade où notamment 2 protéines sont essentielles à la sécrétion du contenu des granules cytotoxiques : Rab27a et Munc13-4. Rab27a est une petite GTPase intervenant au niveau du transport terminal ou de l'arrimage des granules cytotoxiques à la membrane plasmique (Fukuda, 2006; Izumi, Gomi, Kasai, Mizutani, & Torii, 2003). Munc13-4 joue un rôle de facteur d'amorçage de la fusion membranaire des granules arrimés en les rendant compétents pour l'étape de fusion avec la membrane plasmique, au niveau de la synapse immunologique (Feldmann et al., 2003; Ménager et al., 2007; Ménasché, Feldmann, Fischer, & De Saint Basile, 2005). Ces protéines permettent de coordonner l'exocytose des granules cytotoxiques. Une fois l'arrivée des granules dans les vésicules d'exocytose au contact des membranes cellulaires, la Prf-1 est la protéine principale permettant la formation d'un pore et la libération des granules Grz au niveau de la cellule cible. La libération de ces granules au sein de la cellule induit une mort cellulaire par différents types de morts cellulaires suivant les voies activées, par apoptose (Trapani & Smyth, 2002) ou pyroptose (Zhiwei et al., 2020). Nous avons mis en évidence que les lymphocytes T CD4 contiennent des granules cytotoxiques aussi bien chez les souris infectées de souche WT ou CCR2<sup>-/-</sup>. Alors que la dégranulation ne s'opère qu'en absence de monocytes, il serait intéressant d'investiguer au niveau moléculaire comment la régulation via les monocytes et l'axe PD-L1/PD-1 influence l'exocytose de ces granules, et ses potentielles actions sur la voie de signalisation du TCR, les signaux en aval comme les MAP kinase et les protéines nécessaires à l'exocytose finale des granules comme Rab27a et Munc13-4.

Il est établi que les lymphocytes T CD4 cytotoxiques reconnaissent des antigènes viraux spécifiques dans un mécanisme dépendant d'une présentation par les molécules MHCII, de la même façon que les lymphocytes T CD4 *Helper* classiques (Jellison, Kim, & Welsh, 2005). Il existe des voies bien caractérisées pour que les peptides d'origine virale soient présentés par le MHCI à la surface des cellules infectées aux lymphocytes T CD8, mais la présentation par le MHCII sur les cellules infectées est moins bien caractérisée. La présentation du MHCII par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles implique généralement une endocytose spécialisée et le transfert des peptides aux molécules MHCII dans des vésicules de chargement. Une voie possible pour le chargement des peptides viraux sur les molécules MHCII dans les cellules infectées peut impliquer l'autophagie, et cette présentation peut être renforcée par l'IFN $\gamma$  (Münz, 2016). L'uprégulation du MHCII sur les cellules épithéliales pulmonaires et endothéliales a lieu dans différents contextes d'infection et est

principalement induite par l'IFN $\gamma$  (Steimle et al., 1994; Thelemann et al., 2014) via l'activation des voies cellulaires JAK1/JAK2. Alors que nous avons observé une uprégulation du marqueur MHCII en surface des cellules endothéliales et épithéliales (**Figure 5 de l'article**), associée à une colocalisation des lymphocytes T CD4 cytotoxiques, nous n'avons pas adressé la capacité de présentation antigénique par les cellules endothéliales et épithéliales ainsi que la spécificité des cellules CD4 cytotoxiques à leur proximité. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si les lymphocytes T CD4 cytotoxiques nécessitent la reconnaissance d'un antigène spécifique permettant leur activation et la destruction des cellules infectées exprimant le MHCII, présentant un antigène dans le contexte d'une infection par le MuHV-4. Il est en tout cas rapporté que les cellules endothéliales sont la cible des lymphocytes T CD4 cytotoxiques dans différents contextes d'infections virales, induisant notamment leur apoptose (Maehara et al., 2020; Pachnio et al., 2016) en lien avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire observée dans notre étude (**Figure 5 de l'article**). Dans notre contexte et en lien avec nos observations, la mort des structures endothéliales par apoptose notamment suite à l'action des lymphocytes T CD4 cytotoxiques peut accentuer aussi bien la libération des cytokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine (phénomène *out*) mais également favoriser l'entrée de médiateurs pro-inflammatoires comme les neutrophiles (phénomène *in*) dans le tissu pulmonaire. Les cellules endothéliales sont des cibles particulièrement visées lors des phénomènes d'immunopathologies liées aux infections virales. Récemment, une étude portant sur les immunopathologies à SARS-CoV-2 a démontré que l'activation de la voie cGAS-STING lors de l'infection au sein des cellules endothéliales donnait lieu à une production d'IFN de type I, à l'origine même de la mort de ces cellules. L'infection par le SARS-CoV-2 active la signalisation cGAS-STING dans les cellules endothéliales par la libération d'ADN mitochondrial. Suite aux dommages tissulaires primaires, l'activation de cette voie aboutit à une boucle d'amplification de mort cellulaire et de dommages tissulaires supplémentaires en résultant. Ces mécanismes d'autodestruction pourraient être induits de manière indirecte par les lymphocytes T CD4 cytotoxiques (Domizio et al., 2022).

### Régulation des mécanismes effecteurs et immunopathologies

Comme acteur clé de la régulation des mécanismes effecteurs des lymphocytes T CD4 cytotoxiques, nous avons identifié l'axe PD-L1/PD-1. Cet axe est crucial pour le maintien de l'homéostasie et le bon fonctionnement de l'organisme en évitant le développement d'immunopathologies induites par une activation excessive des lymphocytes T suite à une rupture d'équilibre entre les mécanismes pro-inflammatoires et les acteurs freinant cette activation (Burke, Grebinoski, Sharpe, & Vignali, 2020; Grebinoski, Gocher-Demske, & Vignali, 2022; Grebinoski & Vignali, 2020; Pauken, Dougan, Rose, Lichtman, & Sharpe, 2019). Les maladies auto-immunes, causées par une rupture de la tolérance immunitaire au soi, engendrant une destruction des tissus de l'hôte touchent 5 à 8 % de la population mondiale (Fugger, Jensen, & Rossjohn, 2020). La preuve la plus

directe de l'importance de cet axe dans le maintien d'une tolérance périphérique est mise en évidence par l'observation que 37% et 24% des patients traités avec des inhibiteurs de PD-1 ou PD-L1 respectivement développent des immunopathologies définies comme *immune-related adverse events* (irAEs) (Pauken et al., 2019; Sonpavde et al., 2021). Ces patients sont traités avec ces inhibiteurs dans le cadre de traitements anti-cancéreux. Les risques majeurs de ces traitements sont donc principalement le développement d'irAEs. L'inhibition de l'axe PD-L1/PD-1 donne de bons résultats pour lyser les cellules tumorales, permettant de briser la tolérance et l'environnement anti-inflammatoire induits par la tumeur sur les cellules environnantes. Il serait intéressant d'investiguer le rôle des lymphocytes T CD4 cytotoxiques chez ces patients traités avec des inhibiteurs de PD-1 ou PD-L1 qui développent des immunopathologies sévères. Le profil épidémiologique de ces patients nécessiterait également d'être investigué notamment le statut EBV et KSHV pour mettre en lien une possible triade entre le développement d'immunopathologies, l'infection par des  $\gamma$ HVs et l'induction subséquente de lymphocytes T CD4 cytoxiqes hyperactivés. En effet, bien que la base moléculaire des irAEs soit mal définie, une étude récente a désigné les cellules T CD4 cytotoxiques induites par l'EBV comme le principal responsable de l'encéphalite associée aux anti-PD-L1/PD-1 notamment, soutenant un lien entre les infections à  $\gamma$ HV et les irAEs (D. B. Johnson et al., 2019). La HLH décrite également dans l'introduction observée lors de l'infection par EBV est une maladie rare mais fatale caractérisée par une activation non régulée des macrophages et des lymphocytes cytotoxiques, entraînant une tempête de cytokines (Esteban, de Jong, & Teshner, 2017). Bien que la pathogenèse de la HLH soit largement inconnue, il serait intéressant de dresser le profil de la signature des monocytes et de déterminer toute altération potentielle des mécanismes régulateurs entre les monocytes recrutés et les cellules T CD4 cytotoxiques. Enfin, l'EBV est également le principal facteur de risque pour le développement de la sclérose en plaque, une maladie multifactorielle dans laquelle les cellules T CD4 sont connues pour jouer un rôle pathogène majeur (Chitnis, 2007). Là encore, si le lien de causalité est très difficile à établir puisque la majorité des personnes sont positives à l'EBV, il sera important à l'avenir de déterminer si une éventuelle défaillance dans le dialogue monocytes-lymphocytes T CD4 est impliquée dans le développement de telles manifestations immunopathologiques chez l'homme. Un autre acteur clé dans la régulation des immunopathologies qu'il serait également intéressant d'investiguer est une voie cellulaire impliquant CTLA4 et CD80/86 contrôlant également l'activation et la fonction des lymphocytes T. Nos données d'analyse par *single cell* (**Figure 4 de l'article**) montrent en effet une co-expression de PD-1 mais également de CTLA-4 par les lymphocytes T CD4 après l'infection par le MuHV-4. Concernant l'immunopathologie spécifique observée lors de l'infection par le MuHV-4 chez des souris *CCR2<sup>-/-</sup>*, nous avons investigué à court terme les conséquences de l'immunopathologie sur le tissu fonctionnel pulmonaire. Nous avons observé une réduction des capacités de ventilation et de compliance pulmonaire (**Figure 1 de l'article**). Il aurait également été intéressant d'évaluer les conséquences systémiques de la *cytokine storm* sur d'autres organes vitaux comme le rein, tributaire de la perfusion. Ces mêmes organes font l'objet de dommages lors des irAEs. Outre les conséquences à

court terme, il serait utile d'investiguer les effets à long terme de cette inflammation exacerbée et évaluer la potentielle fibrose s'installant dans les poumons des souris *CCR2<sup>-/-</sup>*.

### **Immunothérapies et cancers**

Outre leur rôle délétère comme acteurs d'immunopathologies, le rôle cytotoxique des lymphocytes T CD4 est également investigué dans l'immunité anti-tumorale et les options thérapeutiques associées (Takeuchi & Saito, 2017; Xie et al., 2010). Il est également rapporté qu'une induction de lymphocytes T CD4 effecteurs contre l'EBV permettrait une immunothérapie efficace contre le développement des tumeurs associées à l'EBV (Heller et al., 2006; Merlo et al., 2010). La compréhension des mécanismes épigénétiques permettant la reprogrammation des lymphocytes T CD4 *Helper* en cytotoxiques comme potentiel traitement anti-cancéreux fait également l'objet de nombreuses études (Renaude et al., 2021). De la même façon que l'imprinting a été décrit pour les monocytes, il serait utile de réaliser les mêmes investigations en parallèle concernant le profil des lymphocytes T CD4.

### **Virome dans la santé et la maladie**

Alors que le nombre de bactéries composant le microbiome bactérien installé au sein de l'hôte est 10 fois supérieur au nombre de cellules constituant l'organisme lui-même, l'ensemble des virus au sein de l'organisme est 10 fois plus important encore (Virgin, 2014). Le virome des mammifères se définit comme l'ensemble des virus infectant les cellules eucaryotes (virome eucaryotique), les bactéries (virome bactérien) et les archés (virome archéen) ainsi que tous éléments génétiques dérivés des virus dans les chromosomes de l'hôte qui peuvent modifier l'expression de ses gènes, aboutir à la production de protéines, voire générer un virus infectieux. Chez les mammifères, ce virome occupe toutes les surfaces muqueuses et persiste après l'infection primaire notamment lors d'infection par les HVs. En établissant des infections à long terme, ces virus persistants peuvent être considérés comme des participants-clés de l'homéostasie de l'hôte. Alors que le virome est vu avant tout comme une source d'agents pathogènes, il est aujourd'hui établi que celui-ci est bien plus qu'une source de menaces pour l'espèce humaine et dans un terme plus global, l'espèce animale. Les mammifères constituent en effet une niche d'accueil pour une multitude de virus et l'interaction entre ce virome et l'hôte n'implique pas toujours des effets délétères sur ce dernier. Ce concept a permis l'émergence du paradigme selon lequel le virome influence l'hôte de manière profonde, indépendamment de l'infection virale primaire. Le système immunitaire ne représente pas un modèle statique et évolue constamment au fil de la vie de l'individu comme il a été montré que la variation du système immunitaire augmente avec l'âge et est notamment due à l'exposition aux agents infectieux. Le virome propre à chaque individu contribue à sa variation interindividuelle face aux phénomènes permettant le maintien de la santé ou lors de maladies (Brodin et al., 2015; Cadwell, 2015). Les HVs sont des virus particulièrement importants dans la constitution de ce virome de part leur capacité à infecter l'hôte pour toute la durée de sa vie. Cette étude

met en lumière le rôle primordial joué par les agents viraux symbiotiques comme modulateurs de la réponse immunitaire de l'hôte. Ce travail de recherche fondamental a permis la compréhension de mécanismes d'immunomodulation induits suite à l'infection par le MuHV-4 et permet notamment de promouvoir ces voies immunomodulatrices sélectionnées par le virus et l'hôte en les ciblant thérapeutiquement notamment lors des tempêtes cytokiniques induites lors d'infections par des virus respiratoires hautement pathogènes. Alors que nous avons principalement axé nos recherches fondamentales dans un but translationnel en médecine humaine, il est également important de rappeler que toutes ces notions sont applicables également à la médecine vétérinaire, la recherche sur la constitution du virome pulmonaire faisant notamment l'objet d'attentions au vu de la fréquence des maladies respiratoires aiguës sévères et des syndromes inflammatoires rencontrés notamment en médecine bovine (M. Zhang et al., 2020).

En conclusion, notre travail constitue une base intéressante pour la compréhension des mécanismes menant à la régulation et au développement des lymphocytes T CD4 cytotoxiques par un dialogue établi entre les monocytes et les lymphocytes T CD4 recrutés au niveau des voies pulmonaires. L'étude a révélé l'importance cruciale des voies de signalisation IL-10 et PD-L1/PD-1 dans la mise sous silence de l'inflammation pathologique avant le développement de lésions respiratoires graves et de maladies systémiques dans un contexte d'infection virale. Alors que l'antagonisme de la voie PD-L1/PD-1 est largement exploité dans le traitement des cancers, cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives, au-delà du contexte de l'infection par les  $\gamma$ HVs, dans la manipulation de l'axe PD-L1/PD-1 afin de permettre la prise en charge thérapeutique de diverses immunopathologies virales et induites notamment lors de traitements anti-cancéreux.



---

# Bibliographie

---



- Abel, M., Sène, D., Pol, S., Bourlière, M., Poynard, T., Charlotte, F., ... Caillat-Zucman, S. (2006). Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, *44*(6), 1607–1616. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.21438>
- Ackermann, M. (2006). Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, *113*, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.008>
- Adkins, S. (2019). CAR T-Cell Therapy: Adverse Events and Management. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, *10*(4), 21–28. <https://doi.org/10.6004/jadpro.2019.10.4.11>
- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M., & Koszinowski, U. H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Journal of Virology*, *74*(15), 6964–6974. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6964-6974.2000>
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M., & Rossi, F. M. V. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature Neuroscience* *2011* *14*:9, *14*(9), 1142–1149. <https://doi.org/10.1038/nn.2887>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Aldridge, J. R., Moseley, C. E., Boltz, D. A., Negovetich, N. J., Reynolds, C., John, F., ... Thomas, P. G. (2009). TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(13), 5306–5311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900655106>
- Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., ... Kelleher, A. D. (2002). Characterization of CD4+ CTLs Ex Vivo. *The Journal of Immunology*, *168*(11), 5954 LP – 5958. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5954>
- Ariza, M.-E., Glaser, R., Kaumaya, P. T. P., Jones, C., & Williams, M. V. (2009). The EBV-Encoded dUTPase Activates NF-κB through the TLR2 and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, *182*(2), 851–859. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.851>
- Arnold, D. E., Chellapandian, D., & Leiding, J. W. (2021). The Use of Biologic Modifiers as a Bridge to Hematopoietic Cell Transplantation in Primary Immune Regulatory Disorders. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.692219>
- Arts, R. J. W., Moorlag, S. J. C. F. M., Novakovic, B., Li, Y., Wang, S.-Y., Oosting, M., ... Netea, M. G. (2018). BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host & Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.010>
- Asada, K., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., & Nakamura, H. (2004). Antiinflammatory Roles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  in Human Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *169*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-740OC>
- Ashhurst, T. M., Vreden, C. van, Munoz-Erazo, L., Niewold, P., Watabe, K., Terry, R. L., ... Cole King, N. J. (2013). Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *The Indian Journal of Medical Research*, *138*(5), 632–647. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24434318>
- Askenase, M. H., Han, S. J., Byrd, A. L., Morais da Fonseca, D., Bouladoux, N., Wilhelm, C., ...

- Belkaid, Y. (2015). Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity*, 42(6), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.011>
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., ... Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>
- Ayala-Nunez, N. V., Follain, G., Delalande, F., Hirschler, A., Partiot, E., Hale, G. L., ... Gaudin, R. (2019). Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nature Communications*, 10(1), 4430. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12408-x>
- Ayala, V. I., Trivett, M. T., Coren, L. V., Jain, S., Bohn, P. S., Wiseman, R. W., ... Ott, D. E. (2016). A novel SIV gag-specific CD4+T-cell clone suppresses SIVmac239 replication in CD4+T cells revealing the interplay between antiviral effector cells and their infected targets. *Virology*, 493, 100–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.013>
- Backovic, M., Leser, G. P., Lamb, R. A., Longnecker, R., & Jardetzky, T. S. (2007). Characterization of EBV gB indicates properties of both class I and class II viral fusion proteins. *Virology*, 368(1), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.031>
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., ... Barrell, B. G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207–211. <https://doi.org/10.1038/310207a0>
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014). The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cellular Immunology*, 291(1), 41–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.012>
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., ... Mowat, A. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C hi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, 6(3), 498–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.89>
- Balfour, H. H., Sifakis, F., Sliman, J. A., Knight, J. A., Schmeling, D. O., & Thomas, W. (2013). Age-Specific Prevalence of Epstein—Barr Virus Infection Among Individuals Aged 6–19 Years in the United States and Factors Affecting Its Acquisition. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(8), 1286–1293. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit321>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., ... Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077), 682–687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Barrat, F. J., Crow, M. K., & Ivashkiv, L. B. (2019). Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease. *Nature Immunology*, 20(12), 1574–1583. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0466-2>
- Barry, S. M., Johnson, M. A., & Janossy, G. (2000). Cytopathology or immunopathology? The puzzle of cytomegalovirus pneumonitis revisited. *Bone Marrow Transplantation*, 26(6), 591–597. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702562>
- Barth, M. W., Hendrzak, J. A., Melnicoff, M. J., & Morahan, P. S. (1995). Review of the macrophage disappearance reaction. *Journal of Leukocyte Biology*, 57(3), 361–367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlb.57.3.361>

- Barton, E. S., Lutzke, M. L., Rochford, R., & Virgin, H. W. (2005). Alpha/Beta Interferons Regulate Murine Gammaherpesvirus Latent Gene Expression and Reactivation from Latency. *Journal of Virology*, 79(22), 14149–14160. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14149-14160.2005>
- Barton, E. S., Mandal, P., & Speck, S. H. (2011). Pathogenesis and Host Control of Gammaherpesviruses: Lessons from the Mouse. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), 351–397. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-072710-081639>
- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., ... Virgin, H. W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, 447(7142), 326–329. <https://doi.org/10.1038/nature05762>
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Calvo, F. Q., Henry, E., ... Bureau, F. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(12), 3723–3738. <https://doi.org/10.1172/JCI39717>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 46(4), 562–576. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.04.008>
- Belkaid, Y., & Tamoutounour, S. (2016). The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 353–366. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.48>
- Bennett, N. J., May, J. S., & Stevenson, P. G. (2005). Gamma-herpesvirus latency requires T cell evasion during episome maintenance. *PLoS Biology*, 3(4), 0638–0649. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030120>
- Bentz, G. L., Liu, R., Hahn, A. M., Shackelford, J., & Pagano, J. S. (2010). Epstein–Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon- $\beta$ . *Virology*, 402(1), 121–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.014>
- Berg, N. N., Puente, L. G., Dawicki, W., & Ostergaard, H. L. (1998). Sustained TCR Signaling Is Required for Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Degranulation by Cytotoxic T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 161(6), 2919 LP – 2924. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/161/6/2919.abstract>
- Bhaskar, S., Sinha, A., Banach, M., Mittoo, S., Weissert, R., Kass, J. S., ... Kutty, S. (2020). Cytokine Storm in COVID-19—Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Frontiers in Immunology*, 11(July). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01648>
- Bigalke, J. M., & Heldwein, E. E. (2017). Chapter Three - Have NEC Coat, Will Travel: Structural Basis of Membrane Budding During Nuclear Egress in Herpesviruses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 97, pp. 107–141). Academic Press. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352716300392>
- Billerbeck, E., & Thimme, R. (2008). CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. *Human Immunology*, 69(11), 771–775. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.07.016>
- Bisno, A. L., Brito, M. O., & Collins, C. M. (2003). Molecular basis of group A streptococcal virulence. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(4), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00576-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00576-0)
- Bistoni, F., Vecchiarelli, A., Cenci, E., Puccetti, P., Marconi, P., & Cassone, A. (1986). Evidence for

- macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infection and Immunity*, *51*(2), 668–674. <https://doi.org/10.1128/iai.51.2.668-674.1986>
- Blackbourn, D. J., Lennette, E. T., Ambroziak, J., Mourich, D. V., & Levy, J. A. (1998). Human Herpesvirus 8 Detection in Nasal Secretions and Saliva. *The Journal of Infectious Diseases*, *177*(1), 213–216. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30107674>
- Blake, N. (2010). Immune evasion by gammaherpesvirus genome maintenance proteins. *Journal of General Virology*, *91*(4), 829–846. <https://doi.org/10.1099/vir.0.018242-0>
- Blaskovic, D., Stanceková, M., Svobodová, J., & Mistríková, J. (1980). Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virologica*, *24*(6), 468.
- Blériot, C., Chakarov, S., & Ginhoux, F. (2020). Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity*, *52*(6), 957–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.014>
- Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., & Lecuit, M. (2015). Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity*, *42*(1), 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.020>
- Bohannon, K., Yonggun, J., Gross, S. P., & Allan, S. G. (2013). Differential protein partitioning within the herpesvirus tegument and envelope underlies a complex and variable virion architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), E1613–E1620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221896110>
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C. L., Martens, L., ... Guilliams, M. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity*, *51*(4), 638–654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.017>
- Bosschaerts, T., Guilliams, M., Stijlemans, B., Morias, Y., Engel, D., Tacke, F., ... Beschin, A. (2010). Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN- $\gamma$  and MyD88 signaling. *PLoS Pathogens*, *6*(8), 35–36. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001045>
- Braaten, D. C., McClellan, J. S., Messaoudi, I., Tibbetts, S. A., McClellan, K. B., Nikolich-Zugich, J., & Virgin IV, H. W. (2006). Effective Control of Chronic  $\gamma$ -Herpesvirus Infection by Unconventional MHC Class Ia-Independent CD8 T Cells. *PLOS Pathogens*, *2*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020037>
- Brodin, P., Jovic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C. J. L., Furman, D., ... Davis, M. M. (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*, *160*(1–2), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.020>
- Brown, D., Lee, S., Garcia-Hernandez, M. d. l. L., & Swain, S. (2012). Multifunctional CD4 Cells Expressing Gamma Interferon and Perforin Mediate Protection against Lethal Influenza Virus Infection. *Journal of Virology*, *86*(12), 6792–6803. <https://doi.org/10.1128/JVI.07172-11>
- Brown, D. M., Dilzer, A. M., Meents, D. L., & Swain, S. L. (2006). CD4 T Cell-Mediated Protection from Lethal Influenza: Perforin and Antibody-Mediated Mechanisms Give a One-Two Punch. *The Journal of Immunology*, *177*(5), 2888 LP – 2898. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2888>

- Brown, D. M., Lampe, A. T., & Workman, A. M. (2016). The Differentiation and Protective Function of Cytolytic CD4 T Cells in Influenza Infection. *Frontiers in Immunology*, 0(MAR), 93. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00093>
- Burke, K. P., Grebinoski, S., Sharpe, A. H., & Vignali, D. A. A. (2020). Understanding adverse events of immunotherapy: A mechanistic perspective. *Journal of Experimental Medicine*, 218(1), e20192179. <https://doi.org/10.1084/jem.20192179>
- Busse, W. W., Lemanske, R. F., & Gern, J. E. (2010). Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *The Lancet*, 376(9743), 826–834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61380-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61380-3)
- Cachot, A., Bilous, M., Liu, Y. C., Li, X., Saillard, M., Cenerenti, M., ... Jandus, C. (2021). Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Science Advances*, 7(9). [https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABE3348/SUPPL\\_FILE/ABE3348\\_TABLE\\_S2.XLSX](https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABE3348/SUPPL_FILE/ABE3348_TABLE_S2.XLSX)
- Cadwell, K. (2015). The Virome in Host Health and Disease. *Immunity*, 42(5), 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.003>
- Cai, Q., Banerjee, S., Cervini, A., Lu, J., Hislop, A. D., Dzens, R., & Robertson, E. S. (2013). IRF-4-Mediated CIITA Transcription Is Blocked by KSHV Encoded LANA to Inhibit MHC II Presentation. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003751. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003751>
- Cardin, R. D., Brooks, J. W., Sarawar, S. R., & Doherty, P. C. (1996). Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 863–871. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.863>
- Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., ... Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153(2), 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.010>
- Caro-Vegas, C., Sellers, S., Host, K. M., Seltzer, J., Landis, J., Fischer, W. A., ... Dittmer, D. P. (2020). Runaway Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus replication correlates with systemic IL-10 levels. *Virology*, 539, 18–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.10.002>
- Casper, C., Krantz, E., Selke, S., Kuntz, S. R., Wang, J., Huang, M.-L., ... Wald, A. (2007). Frequent and asymptomatic oropharyngeal shedding of human herpesvirus 8 among immunocompetent men. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(1), 30–36. <https://doi.org/10.1086/509621>
- Cassol, E., Alfano, M., Biswas, P., & Poli, G. (2006). Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(5), 1018–1030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.0306150>
- Cecchini, M. G., Dominguez, M. G., Mocci, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., ... Stanley, E. R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development*, 120(6), 1357–1372. <https://doi.org/10.1242/dev.120.6.1357>
- Cesarman, E. (2014). Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 349–372. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104656>

- Chakarov, S., Lim Hwee, Y., Leonard, T., Yng, L. S., Peter, S., Josephine, L., ... Florent, G. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science*, 363(6432), eaau0964. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., & Moore, P. S. (1994). Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science*, 266(5192), 1865–1869. <https://doi.org/10.1126/science.7997879>
- Chatterjee, M., Osborne, J., Bestetti, G., Chang, Y., & Moore, P. (2002). Viral IL-6-Induced Cell Proliferation and Immune Evasion of Interferon Activity. *Science*, 298(5597), 1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.1074883>
- Chen, H., Barteel, M. Y., Yaron, J. R., Liu, L., Zhang, L., Zheng, D., ... Lucas, A. R. (2018). Mouse Gamma Herpesvirus MHV-68 Induces Severe Gastrointestinal (GI) Dilatation in Interferon Gamma Receptor-Deficient Mice (IFN $\gamma$ R $^{-/-}$ ) That Is Blocked by Interleukin-10. *Viruses*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/v10100518>
- Chen, W., Hilton, I. B., Staudt, M. R., Burd, C. E., & Dittmer, D. P. (2010). Distinct p53, p53:LANA, and LANA complexes in Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Lymphomas. *Journal of Virology*, 84(8), 3898–3908. <https://doi.org/10.1128/JVI.01321-09>
- Cheroutre, H., & Husain, M. M. (2013). CD4 CTL: Living up to the challenge. *Seminars in Immunology*, 25(4), 273–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.022>
- Chitnis, T. (2007). The Role of CD4 T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. In *The Neurobiology of Multiple Sclerosis* (Vol. 79, pp. 43–72). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)79003-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)79003-7)
- Chong, S. Z., Evrard, M., Devi, S., Chen, J., Lim, J. Y., See, P., ... Ng, L. G. (2016). CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses, 2293–2314.
- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., ... Frenette, P. S. (2011). Bone marrow CD169 $^{+}$  macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 261–271. <https://doi.org/10.1084/jem.20101688>
- Christensen, J. P., Cardin, R. D., Branum, K. C., & Doherty, P. C. (1999). CD4(+) T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in B cell-deficient mice is mediated by IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5135>
- Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(5), 369–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2548>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*,

164(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>

Covarrubias, S., Richner, J., Karen, C., Lee, Y., & Glaunsinger, B. (2009). Host Shutoff Is a Conserved Phenotype of Gammaherpesvirus Infection and Is Orchestrated Exclusively from the Cytoplasm. *Journal of Virology*, 83(18), 9554–9566. <https://doi.org/10.1128/JVI.01051-09>

Crane, M. J., Hokeness-Antonelli, K. L., & Salazar-Mather, T. P. (2009). Regulation of inflammatory monocyte/macrophage recruitment from the bone marrow during murine cytomegalovirus infection: role for type I interferons in localized induction of CCR2 ligands. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(4), 2810–2817. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900205>

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y. Y., Senechal, B., ... Geissmann, F. (2010). Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*, 33(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>

Croxford, A. L., Lanzinger, M., Hartmann, F. J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., ... Becher, B. (2015). The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*, 43(3), 502–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.010>

Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D. J., Thomson, M., ... Davison, A. J. (2010). Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 3), 605–615. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015891-0>

Dai, W., Jia, Q., Bortz, E., Shah, S., Liu, J., Atanasov, I., ... Zhou, Z. H. (2008). Unique structures in a tumor herpesvirus revealed by cryo-electron tomography and microscopy. *Journal of Structural Biology*, 161(3), 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.10.010>

Dai, X.-M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., ... Stanley, E. R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 99(1), 111–120. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.111>

Daley-Bauer, L. P., Wynn, G. M., & Mocarski, E. S. (2012). Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*, 37(1), 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.014>

Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 86(1), 69–88. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00492-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00492-8)

Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, 143(1), 52–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>

Davison, A. J. (2014). Herpesviruses: General Features. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 430–436). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04812-1>

Davison, A. J., Cunningham, C., Sauerbier, W., & McKinnell, R. G. (2006). Genome sequences of two frog herpesviruses. *Journal of General Virology*, 87(12), 3509–3514. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.82291-0>

Davison, A. J., & Scott, J. E. (1986). The Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus. *Journal of General Virology*, 67(9), 1759–1816. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-9-1759>

- Davison, A. J., Subramaniam, K., Kerr, K., Jacob, J. M., Landrau-Giovannetti, N., Walsh, M. T., ... Waltzek, T. B. (2017). Genome Sequence of a Gammaherpesvirus from a Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Genome Announcements*, 5(31), e00777-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00777-17>
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., ... Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86(1), 41–53. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>
- de Graaff, P. M. A., de Jong, E. C., van Capel, T. M., van Dijk, M. E. A., Roholl, P. J. M., Boes, J., ... van Bleek, G. M. (2005). Respiratory Syncytial Virus Infection of Monocyte-Derived Dendritic Cells Decreases Their Capacity to Activate CD4 T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(9), 5904 LP – 5911. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5904>
- De Laval, B., & Sieweke, M. H. (2017). Trained macrophages support hygiene hypothesis. *Nature Immunology*, 18(12), 1279–1280. <https://doi.org/10.1038/ni.3874>
- Divangahi, M., King, I. L., & Pernet, E. (2015). Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends in Immunology*, 36(5), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.03.005>
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A. I., Bogen, B., Biberfeld, P., & Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 1025–1032. <https://doi.org/10.1084/jem.190.7.1025>
- Domínguez-Andrés, J., Feo-Lucas, L., Minguito de la Escalera, M., González, L., López-Bravo, M., & Ardavin, C. (2017). Inflammatory Ly6Chigh Monocytes Protect against Candidiasis through IL-15-Driven NK Cell/Neutrophil Activation. *Immunity*, 46(6), 1059-1072.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.009>
- Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2019). Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Current Opinion in Immunology*, 56, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.001>
- Domizio, J. Di, Gulen, M. F., Saidoune, F., Thacker, V. V., Yatim, A., Sharma, K., ... Ablasser, A. (2022). The cGAS–STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19. *Nature*, 603(7899), 145–151. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04421-w>
- Dourcy, M., Maquet, C., Dams, L., Gilliaux, G., Javaux, J., Desmecht, D., ... Gillet, L. (2020). A gammaherpesvirus licenses CD8 T cells to protect the host from pneumovirus-induced immunopathologies. *Mucosal Immunology*, 13(5), 799–813. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0293-7>
- Dunay, I. R., DaMatta, R. A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., & Sibley, L. D. (2008). Gr1+Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 29(2), 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.019>
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., ... Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14223–14228. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334032100>
- Dupin, N., Fisher, C., Kellam, P., Ariad, S., Tulliez, M., Franck, N., ... Boshoff, C. (1999). Distribution

of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4546–4551. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4546>

Dutta, K., Mishra, M. K., Nazmi, A., Kumawat, K. L., & Basu, A. (2010). Minocycline differentially modulates macrophage mediated peripheral immune response following Japanese encephalitis virus infection. *Immunobiology*, 215(11), 884–893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.12.003>

Ehrlich, P. (1880). Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Z Klin Med*, 1, 553–560. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0001577481&partnerID=40&md5=8c5c877607c0ba0ee9dd1bd433f10460>

Ehtisham, S., Sunil-Chandra, N. P., Nash, A. A., & Stewart, J. P. (1993). Pathogenesis of murine gammaherpesvirus infection in mice deficient in CD4 and CD8 T cells. *Journal of Virology*, 67(9), 5247–5252. <https://doi.org/10.1128/jvi.02085-09>

Elrefaei, M., Barugahare, B., Ssali, F., Mugenyi, P., & Cao, H. (2006). HIV-Specific IL-10-Positive CD8+ T Cells Are Increased in Advanced Disease and Are Associated with Decreased HIV-Specific Cytolysis. *The Journal of Immunology*, 176(2), 1274–1280. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.1274>

Elrefaei, M., Ventura, F. L., Baker, C. A. R., Clark, R., Bangsberg, D. R., & Cao, H. (2007). HIV-Specific IL-10-Positive CD8<sup>+</sup> T Cells Suppress Cytolysis and IL-2 Production by CD8<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*, 178(5), 3265 LP – 3271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.3265>

Ensan, S., Li, A., Besla, R., Degousee, N., Cosme, J., Roufaiel, M., ... Robbins, C. S. (2016). Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1<sup>+</sup> precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nature Immunology*, 17(2), 159–168. <https://doi.org/10.1038/ni.3343>

Ensser, A., Pflanz, R., & Fleckenstein, B. (1997). Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *Journal of Virology*, 71(9), 6517–6525. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6517-6525.1997>

Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., ... Mann, D. L. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, 40(1), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.019>

Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *The Lancet*, 283(7335), 702–703. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-7)

Esteban, Y., de Jong, J., & Teshler, M. (2017). An overview of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Annals*, 46(8), e309–e313. <https://doi.org/10.3928/19382359-20170717-01>

Evans, A. G., Moser, J. M., Krug, L. T., Pozharskaya, V., Mora, A. L., & Speck, S. H. (2008). A gammaherpesvirus-secreted activator of Vβ4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells regulates chronic infection and immunopathology. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 669–684. <https://doi.org/10.1084/jem.20071135>

- Faiyaz, N., Sasan, Z., Naoya, T., Stephanie, D., I., G. O., Gavin, W., ... E., D. J. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*, *351*(6269), aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>
- Farquhar, J. W., & Claireaux, A. E. (1952). Familial haemophagocytic reticulosis. *Archives of Disease in Childhood*, *27*(136), 519–525. <https://doi.org/10.1136/adc.27.136.519>
- Farrell, P. J. (2019). Epstein–Barr Virus and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*(1), 29–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>
- Feinberg, M. W., Wara, A. K., Cao, Z., Lebedeva, M. A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., ... Jain, M. K. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO Journal*, *26*(18), 4138–4148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601824>
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., ... de Saint Basile, G. (2003). Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, *115*(4), 461–473. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00855-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00855-9)
- Ferrara, J. L., Abhyankar, S., & Gilliland, D. G. (1993). Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplantation Proceedings*, *25*(1 Pt 2), 1216–1217. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/8442093>
- Fife, B. T., Huffnagle, G. B., Kuziel, W. A., & Karpus, W. J. (2000). Cc Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(6), 899–906. <https://doi.org/10.1084/jem.192.6.899>
- Fourcade, G., Germe, R., Guerber, F., Lupo, J., Baccard, M., Seigneurin, A., ... Epaulard, O. (2017). Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000–2016. *PLOS ONE*, *12*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175574>
- Fowler, P., Marques, S., Simas, J. P., & Efstathiou, S. (2003). ORF73 of murine herpesvirus-68 is critical for the establishment and maintenance of latency. *Journal of General Virology*, *84*(12), 3405–3416. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19594-0>
- François, S., Vidick, S., Sarlet, M., Desmecht, D., Drion, P., Stevenson, P. G., ... Gillet, L. (2013). Illumination of Murine Gammaherpesvirus-68 Cycle Reveals a Sexual Transmission Route from Females to Males in Laboratory Mice. *PLoS Pathogens*, *9*(4), e1003292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003292>
- Fraunberger, P., Wang, Y., Holler, E., Parhofer, K. G., Nagel, D., Walli, A. K., & Seidel, D. (2006). Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive proteins levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock*, *26*(1).
- Frebel, H., Nindl, V., Schuepbach, R. A., Braunschweiler, T., Richter, K., Vogel, J., ... Oxenius, A. (2012). Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(13), 2485–2499. <https://doi.org/10.1084/jem.20121015>
- Freeman, M. L., Burkum, C. E., Cookenham, T., Roberts, A. D., Lanzer, K. G., Huston, G. E., ... Blackman, M. A. (2014). CD4 T Cells Specific for a Latency-Associated  $\gamma$ -Herpesvirus Epitope Are Polyfunctional and Cytotoxic. *The Journal of Immunology*, *193*(12), 5827 LP – 5834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302060>

- Fried, J., Mahinder, P., Jing, Z., Fooksman, D., & Lauvau, G. (2022). CD169+ macrophages orchestrate plasmacytoid dendritic cell arrest and retention for optimal priming in the bone marrow of malaria-infected mice. *BioRxiv Preprint*.
- Friedman, A. D. (2007). Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, *26*(47), 6816–6828. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210764>
- Fry, D. E. (2012). Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *The American Surgeon*, *78*(1), 1–8.
- Fugger, L., Jensen, L. T., & Rossjohn, J. (2020). Challenges, Progress, and Prospects of Developing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Cell*, *181*(1), 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.007>
- Fukuda, M. (2006). Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27·effector complex. *Biochemical Society Transactions*, *34*(5), 691–695. <https://doi.org/10.1042/BST0340691>
- Gallo, R. C. (1998). The Enigmas of Kaposi's Sarcoma. *Science*, *282*(5395), 1837–1839. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2897003>
- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B. M., Weel, J. F., Bemelman, F., van Lier, R. A. W., & Ten Berge, I. J. M. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- $\gamma$ -producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood*, *101*(7), 2686–2692. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2502>
- Gangappa, S., van Dyk, L. F., Jewett, T. J., Speck, S. H., & Virgin 4th, H. W. (2002). Identification of the in vivo role of a viral bcl-2. *The Journal of Experimental Medicine*, *195*(7), 931–940. <https://doi.org/10.1084/jem.20011825>
- Gaspar, M., May, J. S., Sukla, S., Frederico, B., Gill, M. B., Smith, C. M., ... Stevenson, P. G. (2011). Murid Herpesvirus-4 Exploits Dendritic Cells to Infect B Cells. *PLOS Pathogens*, *7*(11), e1002346. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002346>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, *19*(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Ghigo, C., Mondor, I., Jorquera, A., Nowak, J., Wienert, S., Zahner, S. P., ... Bajénoff, M. (2013). Multicolor fate mapping of Langerhans cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(9), 1657–1664. <https://doi.org/10.1084/jem.20130403>
- Giannoni, F., Shea, A., Inglis, C., Lee, L. N., & Sarawar, S. R. (2008). CD40 Engagement on Dendritic Cells, but Not on B or T Cells, Is Required for Long-Term Control of Murine Gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology*, *82*(22), 11016–11022. <https://doi.org/10.1128/JVI.00919-08>
- Gibbings, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., ... Jakubzick, C. V. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *57*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>
- Giladi, A., Wagner, L. K., Li, H., Dörr, D., Medaglia, C., Paul, F., ... Mildner, A. (2020). Cxcl10 +

monocytes define a pathogenic subset in the central nervous system during autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, 21(5), 525–534. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0661-1>

Gill, M. B., Gillet, L., Colaco, S., May, J. S., de Lima, B. D., & Stevenson, P. G. (2006). Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein H–glycoprotein L complex is a major target for neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 87(6), 1465–1475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.81760-0>

Gillet, L., Frederico, B., & Stevenson, P. G. (2015). Host entry by gamma-herpesviruses - lessons from animal viruses? *Current Opinion in Virology*, 15(Im), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.007>

Gillet, L., Gill, M. B., Colaco, S., Smith, C. M., & Stevenson, P. G. (2006). Murine gammaherpesvirus-68 glycoprotein B presents a difficult neutralization target to monoclonal antibodies derived from infected mice. *Journal of General Virology*, 87(12), 3515–3527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.82313-0>

Gillet, L., May, J. S., Colaco, S., & Stevenson, P. G. (2007). The Murine Gammaherpesvirus-68 gp150 Acts as an Immunogenic Decoy to Limit Virion Neutralization. *PLOS ONE*, 2(8), e705.

Gillet, L., & Stevenson, P. G. (2007). Antibody evasion by the N terminus of murid herpesvirus-4 glycoprotein B. *The EMBO Journal*, 26(24), 5131–5142. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601925>

Ginhoux, F., Bleriot, C., & Lecuit, M. (2017). Dying for a Cause: Regulated Necrosis of Tissue-Resident Macrophages upon Infection. *Trends in Immunology*, 38(10), 693–695. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.009>

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>

Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>

Glauser, D. L., Milho, R., Lawler, C., & Stevenson, P. G. (2019). Antibody arrests  $\gamma$ -herpesvirus olfactory super-infection independently of neutralization. *Journal of General Virology*, 100(2), 246–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jgv.0.001183>

Glimcher, L. H., Townsend, M. J., Sullivan, B. M., & Lord, G. M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 900–911. <https://doi.org/10.1038/nri1490>

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., ... Rodewald, H.-R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>

Graham, M. B., Braciale, V. L., & Braciale, T. J. (1994). Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 180(4), 1273–1282. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1273>

- Gray, K. S., Forrest, J. C., & Speck, S. H. (2010). The *De Novo* Methyltransferases DNMT3a and DNMT3b Target the Murine Gammaherpesvirus Immediate-Early Gene 50 Promoter during Establishment of Latency. *Journal of Virology*, *84*(10), 4946–4959. <https://doi.org/10.1128/JVI.00060-10>
- Grebinoski, S., Gocher-Demske, A. M., & Vignali, D. A. A. (2022). Catch and release: freeing up PD-L1 ameliorates autoimmunity. *Nature Immunology*, *23*(3), 344–346. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01140-2>
- Grebinoski, S., & Vignali, D. A. (2020). Inhibitory receptor agonists: the future of autoimmune disease therapeutics? *Current Opinion in Immunology*, *67*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.06.001>
- Gredmark-Russ, S., Cheung, E. J., Isaacson, M. K., Ploegh, H. L., & Grotenbreg, G. M. (2008). The CD8 T-Cell Response against Murine Gammaherpesvirus 68 Is Directed toward a Broad Repertoire of Epitopes from both Early and Late Antigens. *Journal of Virology*, *82*(24), 12205–12212. <https://doi.org/10.1128/JVI.01463-08>
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., ... Stürzl, M. (2005). EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood*, *105*(8), 3263–3269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2752>
- Gruffat, H., Marchione, R., & Manet, E. (2016). Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 869. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00869>
- Gschwend, J., Sherman, S. P. M., Ridder, F., Feng, X., Liang, H. E., Locksley, R. M., ... Schneider, C. (2021). Alveolar macrophages rely on GM-CSF from alveolar epithelial type 2 cells before and after birth. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(10). <https://doi.org/10.1084/JEM.20210745/212602>
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Förster, I., ... Tschopp, J. (2011). Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity*, *34*(2), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.006>
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., ... Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., ... Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, *14*(8), 571–578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, *49*(4), 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M. K., Herin, M., ... Beschin, A. (2009). IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection. *The Journal of Immunology*, *182*(2), 1107–1118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1107>
- Guilliams, M., & Scott, C. L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature Reviews Immunology*, *17*(7), 451–460. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.42>

- Guilliams, M., & Svedberg, F. R. (2021). Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nature Immunology*, 22(February), 434–451. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00849-2>
- Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J., & Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity*, 52(3), 434–451. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.015>
- Gurczynski, Stephen J., B. B. M. (2020). Master manipulators: how herpesviruses alter immune responses to RSV. *Mucosal Immunology*, 93.
- Gurczynski, S. J., & Moore, B. B. (2020). Master manipulators: how herpesviruses alter immune responses to RSV. *Mucosal Immunology*, 13(5), 715–716. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0313-7>
- Hahn, A. M., Huye, L. E., Ning, S., Webster-Cyriaque, J., & Pagano, J. S. (2005). Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *Journal of Virology*, 79(15), 10040–10052. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.10040-10052.2005>
- Haist, K. C., Burrack, K. S., Davenport, B. J., & Morrison, T. E. (2017). Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLoS Pathogens*, 13(12), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006748>
- Hanson, L., Dishon, A., & Kotler, M. (2011). Herpesviruses that Infect Fish. *Viruses*, 3(11), 2160–2191. <https://doi.org/10.3390/v3112160>
- Hart, J., Ackermann, M., Jayawardane, G., Russell, G., Haig, D. M., Reid, H., & Stewart, J. P. (2007). Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. *Journal of General Virology*, 88(1), 28–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.82284-0>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., ... Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Heidarieh, H., Hernáez, B., & Alcamí, A. (2015). Immune modulation by virus-encoded secreted chemokine binding proteins. *Virus Research*, 209, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.028>
- Heller, K. N., Gurer, C., & Münz, C. (2006). Virus-specific CD4+ T cells: Ready for direct attack. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 805–808. <https://doi.org/10.1084/jem.20060215>
- Henson, B., Perkins, E., Cothran, J., & Prashant, D. (2009). Self-Assembly of Epstein-Barr Virus Capsids. *Journal of Virology*, 83(8), 3877–3890. <https://doi.org/10.1128/JVI.01733-08>
- Herold, S., von Wulffen, W., Steinmueller, M., Pleschka, S., Kuziel, W. A., Mack, M., ... Lohmeyer, J. (2006). Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1817–1824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1817>
- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8), 821–830. <https://doi.org/10.1038/ni.2638>
- Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4 + T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T h 1/T h 2 paradigm . *International Immunology*, 28(4), 163–171. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>

- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., ... Ginhoux, F. (2015). C-Myb<sup>+</sup> Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 42(4), 665–678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>
- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., ... Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1167–1181. <https://doi.org/10.1084/jem.20120340>
- Host, K. M., Jacobs, S., West, J., Zhigang, Z., Costantini, L., Stopford Charles, ... Blossom, D. (2017). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Increases PD-L1 and Proinflammatory Cytokine Expression in Human Monocytes. *MBio*, 8(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00917-17>
- Hu, Z., Blackman, M. A., Kaye, K. M., & Usherwood, E. J. (2015). Functional heterogeneity in the CD4<sup>+</sup> T cell response to murine  $\gamma$ -herpesvirus 68. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(6), 2746–2756. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401928>
- Hu, Z., Zhang, W., & Usherwood, E. J. (2013). Regulatory CD8<sup>+</sup> T Cells Associated with Erosion of Immune Surveillance in Persistent Virus Infection Suppress In Vitro and Have a Reversible Proliferative Defect. *The Journal of Immunology*, 191(1), 312–322. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201773>
- Hughes, D. J., Kipar, A., Leeming, G. H., Bennett, E., Howarth, D., Cummerson, J. A., ... Stewart, J. P. (2011). Chemokine Binding Protein M3 of Murine Gammaherpesvirus 68 Modulates the Host Response to Infection in a Natural Host. *PLOS Pathogens*, 7(3), e1001321. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001321>
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
- Hutchins, A. P., Diez, D., & Miranda-Saavedra, D. (2013). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in Functional Genomics*, 12(6), 489–498. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt028>
- Iijima, N., Mattei, L. M., & Iwasaki, A. (2011). Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 284–289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005201108>
- Imashuku, S. (2002). Clinical features and treatment strategies of Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 44(3), 259–272. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(02\)00117-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1040-8428(02)00117-8)
- Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., ... Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 115(3), e10–e19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235028>
- Intlekofer, A., Arnob, B., Naofumi, T., M., G. S., S., D. C., Haina, S., ... L., R. S. (2008). Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8<sup>+</sup> T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science*, 321(5887), 408–411. <https://doi.org/10.1126/science.1159806>

- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, *14*(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., & Honjo, T. (2003). PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(1), 39–50. <https://doi.org/10.1084/jem.20022235>
- Izikson, L., Klein, R. S., Charo, I. F., Weiner, H. L., & Luster, A. D. (2000). Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Lacking the Cc Chemokine Receptor (Ccr2). *Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1075–1080. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1075>
- Izumi, T., Gomi, H., Kasai, K., Mizutani, S., & Torii, S. (2003). The Roles of Rab27 and Its Effectors in the Regulated Secretory Pathways. *Cell Structure and Function*, *28*(5), 465–474. <https://doi.org/10.1247/csf.28.465>
- Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Raggatt, L. J., Nowlan, B., Barbier, V., Kaur, S., ... Levesque, J.-P. (2014). Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullar erythropoiesis by depleting F4/80<sup>+</sup>VCAM1<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>ER-HR3<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> erythroid island macrophages in the mouse. *Experimental Hematology*, *42*(7), 547–561.e4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.03.009>
- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbins, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., ... Randolph, G. J. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, *39*(3), 599–610. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.007>
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, *17*(6), 349–362. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>
- James, S., Donato, D., de Thoisy, B., Lavergne, A., & Lacoste, V. (2020). Novel herpesviruses in neotropical bats and their relationship with other members of the Herpesviridae family. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *84*, 104367. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104367>
- Jayasooriya, S., de Silva, T. I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., ... Flanagan, K. L. (2015). Early Virological and Immunological Events in Asymptomatic Epstein-Barr Virus Infection in African Children. *PLOS Pathogens*, *11*(3), e1004746. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004746>
- Jellison, E. R., Kim, S.-K., & Welsh, R. M. (2005). Cutting Edge: MHC Class II-Restricted Killing In Vivo during Viral Infection. *The Journal of Immunology*, *174*(2), 614–618. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.614>
- Johnson, D. B., McDonnell, W. J., Gonzalez-Ericsson, P. I., Al-Rohil, R. N., Mobley, B. C., Salem, J. E., ... Balko, J. M. (2019). A case report of clonal EBV-like memory CD4<sup>+</sup> T cell activation in fatal checkpoint inhibitor-induced encephalitis. *Nature Medicine*, *25*(8), 1243–1250. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0523-2>
- Johnson, S., Eller, M., Teigler, J. E., Malveste, S. M., Schultz, B. T., Soghoian, D. Z., ... Silvestri, G. (2022). Cooperativity of HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cells and CD8 T Cells in Control of HIV Viremia. *Journal of Virology*, *89*(15), 7494–7505. <https://doi.org/10.1128/JVI.00438-15>
- Jonjić, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M. J., & Koszinowski, U. H. (1989). Site-restricted

persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 169(4), 1199–1212. <https://doi.org/10.1084/jem.169.4.1199>

Joshi, N., Walter, J. M., & Misharin, A. V. (2018). Alveolar Macrophages. *Cellular Immunology*, 330, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.005>

Jung, H., Mithal, D. S., Park, J. E., & Miller, R. J. (2015). Localized CCR2 Activation in the Bone Marrow Niche Mobilizes Monocytes by Desensitizing CXCR4. *PloS One*, 10(6), e0128387–e0128387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128387>

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX<sub>3</sub>CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106–4114. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000>

Juno, J. A., Bockel, D. Van, Kent, S. J., Kelleher, A. D., Zaunders, J. J., & Munier, C. M. L. (2017). Cytotoxic CD4 T cells—friend or foe during viral infection? *Frontiers in Immunology*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00019>

Kanegane, H., Wakiguchi, H., Kanegane, C., Kurashige, T., & Tosato, G. (1997). Viral Interleukin-10 in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(1), 254–275. <https://doi.org/10.1086/517260>

Kang, H.-R., Cheong, W.-C., Park, J.-E., Ryu, S., Cho, H.-J., Youn, H., ... Frueh, K. (2014). Murine Gammaherpesvirus 68 Encoding Open Reading Frame 11 Targets TANK Binding Kinase 1 To Negatively Regulate the Host Type I Interferon Response. *Journal of Virology*, 88(12), 6832–6846. <https://doi.org/10.1128/JVI.03460-13>

Kapadia, S. B., Levine, B., Speck, S. H., & Virgin IV, H. W. (2002). Critical Role of Complement and Viral Evasion of Complement in Acute, Persistent, and Latent Herpesvirus Infection. *Immunity*, 17(2), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00369-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00369-2)

Karass, M., Grossniklaus, E., Seoud, T., Jain, S., & Goldstein, D. A. (2017). Kaposi Sarcoma Inflammatory Cytokine Syndrome (KICS): A Rare but Potentially Treatable Condition. *The Oncologist*, 22(5), 623–625. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0237>

Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., & Germain, R. N. (2012). A Spatially-Organized Multicellular Innate Immune Response in Lymph Nodes Limits Systemic Pathogen Spread. *Cell*, 150(6), 1235–1248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.021>

Kaufmann, E., Sanz, J., Dunn, J. L., Khan, N., Mendonça, L. E., Pacis, A., ... Divangahi, M. (2018). BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.031>

Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., & Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International Immunology*, 28(10), 489–501. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw012>

Kim, T. H., Kim, C. W., Oh, D. S., Jung, H. E., & Lee, H. K. (2021). Monocytes contribute to IFN- $\beta$  production via the myd88-dependent pathway and cytotoxic t-cell responses against mucosal respiratory syncytial virus infection. *Immune Network*, 21(4), 1–12. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e27>

- Kimball, A. K., Oko, L. M., Kaspar, R. E., van Dyk, L. F., & Clambey, E. T. (2019). High-Dimensional Characterization of IL-10 Production and IL-10-Dependent Regulation during Primary Gammaherpesvirus Infection. *ImmunoHorizons*, 3(3), 94–109. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800088>
- Kjetil, B., Marianna, C., C., H. B., Jens, K., J., M. M., Yumei, L., ... Alberto, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Klinkhammer, J., Schnepf, D., Ye, L., Schwaderlapp, M., Gad, H. H., Hartmann, R., ... Staeheli, P. (2018). IFN- $\lambda$  prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *ELife*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.33354>
- Krug, L. T., Collins, C. M., Gargano, L. M., & Speck, S. H. (2009). NF $\kappa$ B p50 Plays Distinct Roles in the Establishment and Control of Murine Gammaherpesvirus 68 Latency. *Journal of Virology*, 83(10), 4732–4748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00111-09>
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., ... Akira, S. (2007). Alveolar Macrophages Are the Primary Interferon-1; Producer in Pulmonary Infection with RNA Viruses. *Immunity*, 27(2), 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.013>
- Kuri, A., Jacobs, B. M., Vickaryous, N., Pakpoor, J., Middeldorp, J., Giovannoni, G., & Dobson, R. (2020). Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*, 20(1), 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
- Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., ... Tamura, T. (2013). Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood*, 121(10), 1839–1849. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437863>
- Lagos, D., Vart, R. J., Gratrix, F., Westrop, S. J., Emuss, V., Wong, P.-P., ... Boshoff, C. (2008). Toll-like Receptor 4 Mediates Innate Immunity to Kaposi Sarcoma Herpesvirus. *Cell Host & Microbe*, 4(5), 470–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.012>
- Laiqing, H., Shuyu, Y., Duy, P., Li, J., Jeffrey, W., Deepali, S., ... Jie, S. (2013). Cytokine-Dependent Induction of CD4<sup>+</sup> T cells with Cytotoxic Potential during Influenza Virus Infection. *Journal of Virology*, 87(21), 11884–11893. <https://doi.org/10.1128/JVI.01461-13>
- Lauvau, G., Chorro, L., Spaulding, E., & Soudja, S. (2015). Inflammatory Monocyte Effector Mechanisms. *Cell Immunology*, 291(0), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.07.007>. Inflammatory
- Lauvau, G., Loke, P., & Hohl, T. M. (2015). Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Seminars in Immunology*, 27(6), 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.014>
- Lawler, C., Milho, R., May, J. S., & Stevenson, P. G. (2015). Rhadinovirus host entry by co-operative infection. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004761>
- Lawler, C., & Stevenson, P. G. (2020). A CD4<sup>+</sup> T Cell-NK Cell Axis of Gammaherpesvirus Control. *Journal of Virology*, 94(3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01545-19>
- Lee, H.-R., Brulois, K., Wong, L., & Jung, J. U. (2012). Modulation of Immune System by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Lessons from Viral Evasion Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 3,

44. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00044>

Lee, H., Kim, M. H., Lee, J.-S., Liang, C., & Jung, J. U. (2009). Viral interferon regulatory factors. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(9), 621–627. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0067>

Lee, K. S., Cool, C. D., & van Dyk, L. F. (2009). Murine gammaherpesvirus 68 infection of gamma interferon-deficient mice on a BALB/c background results in acute lethal pneumonia that is dependent on specific viral genes. *Journal of Virology*, 83(21), 11397–11401. <https://doi.org/10.1128/JVI.00989-09>

Lee, K. S., Groshong, S. D., Cool, C. D., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., & van Dyk, L. F. (2009). Murine gammaherpesvirus 68 infection of IFN $\gamma$  unresponsive mice: a small animal model for gammaherpesvirus-associated B-cell lymphoproliferative disease. *Cancer Research*, 69(13), 5481–5489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0291>

Lee, K., Suarez, A. L., Claypool, D. J., Armstrong, T. K., Buckingham, E. M., & van Dyk, L. F. (2012). Viral Cyclins Mediate Separate Phases of Infection by Integrating Functions of Distinct Mammalian Cyclins. *PLOS Pathogens*, 8(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002496>

Leight, E. R., & Sugden, B. (2000). EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein–Barr virus. *Reviews in Medical Virology*, 10(2), 83–100. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(200003/04\)10:2<83::AID-RMV262>3.0.CO;2-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(200003/04)10:2<83::AID-RMV262>3.0.CO;2-T)

Liang, X., Collins, C. M., Mendel, J. B., Iwakoshi, N. N., & Speck, S. H. (2009). Gammaherpesvirus-Driven Plasma Cell Differentiation Regulates Virus Reactivation from Latently Infected B Lymphocytes. *PLOS Pathogens*, 5(11), e1000677. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000677>

Lieberman, P. M. (2013). Keeping it quiet: chromatin control of gammaherpesvirus latency. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 863–875. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3135>

Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C. J., Marichal, T., & Bureau, F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cellular Immunology*, 330, 91–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.001>

Lin, S.-J., Lo, M., Kuo, R.-L., Shih, S.-R., Ojcius, D. M., Lu, J., ... Tsai, C.-H. (2014). The pathological effects of CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes are amplified by an IFNAR1-triggered chemokine feedback loop in highly pathogenic influenza infection. *Journal of Biomedical Science*, 21(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0099-6>

Liu, L., Eby, M. T., Rathore, N., Sinha, S. K., Kumar, A., & Chaudhary, P. M. (2002). The Human Herpes Virus 8-encoded Viral FLICE Inhibitory Protein Physically Associates with and Persistently Activates the I $\kappa$ B Kinase Complex \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13745–13751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110480200>

Liu, Q., Zhou, Y. H., & Yang, Z. Q. (2016). The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.74>

Liu, Z., Gu, Y., Chakarov, S., Bleriot, C., Kwok, I., Chen, X., ... Ginhoux, F. (2019). Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell*, 178(6), 1509–1525.e19.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.009>

Lloyd, C. M., & Marsland, B. J. (2017). Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity*, *46*(4), 549–561. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.04.005>

Loh, J., Thomas, D. A., Revell, P. A., Ley, T. J., & Virgin, H. W. (2004). Granzymes and Caspase 3 Play Important Roles in Control of Gammaherpesvirus Latency. *Journal of Virology*, *78*(22), 12519–12528. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12519-12528.2004>

Loos, P., Baiwir, J., Maquet, C., Javaux, J., Sandor, R., Lallemand, F., ... Gillet, L. (2022). A persistent gammaherpesvirus infection reprograms the alveolar macrophage niche for the long-term by dampening type 2 properties of group 2 innate lymphoid cells (In revision). *Science Immunology*.

Lopušná, K., Benkóczka, T., Lupták, J., Matúšková, R., Lukáčiková, E., Ovečková, I., & Režuchová, I. (2016). Murine gammaherpesvirus targets type I IFN receptor but not type III IFN receptor early in infection. *Cytokine*, *83*, 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.04.013>

Lukac, D. M., Renne, R., Kirshner, J. R., & Ganem, D. (1998). Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection from Latency by Expression of the ORF 50 Transactivator, a Homolog of the EBV R Protein. *Virology*, *252*(2), 304–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/viro.1998.9486>

Lukacher, A. E., Morrison, L. A., Braciale, V. L., Malissen, B., & Braciale, T. J. (1985). Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *Journal of Experimental Medicine*, *162*(1), 171–187. <https://doi.org/10.1084/jem.162.1.171>

Ma, Y., Yuan, B., Zhuang, R., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, C., ... Jin, B. (2015). Hantaan Virus Infection Induces Both Th1 and ThGranzyme B+ Cell Immune Responses That Associated with Viral Control and Clinical Outcome in Humans. *PLOS Pathogens*, *11*(4), e1004788. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004788>

Ma, Z., Jacobs, S. R., West, J. A., Stopford, C., Zhang, Z., Davis, Z., ... Damania, B. (2015). Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(31), E4306–E4315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503831112>

Machiels, B., Doucey, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., ... Gillet, L. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nature Immunology*, *18*(12), 1310–1320. <https://doi.org/10.1038/ni.3857>

Machiels, B., Lété, C., Guillaume, A., Mast, J., Stevenson, P. G., Vanderplasschen, A., & Gillet, L. (2011). Antibody Evasion by a Gammaherpesvirus O-Glycan Shield. *PLoS Pathogens*, *7*(11), e1002387. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002387>

Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A. E. I., Plachý, J., ... Schlöndorff, D. (2001). Expression and Characterization of the Chemokine Receptors CCR2 and CCR5 in Mice. *The Journal of Immunology*, *166*(7), 4697–4704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4697>

Maehara, T., Kaneko, N., Perugino, C. A., Mattoo, H., Kers, J., Allard-Chamard, H., ... Pillai, S. (2020). Cytotoxic CD4+ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2451–2464. <https://doi.org/10.1172/JCI131700>

- Major, J., Crotta, S., Llorian, M., M., M. T., Henrik, G. H., L., P. S., ... Wack, A. (2020). Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science*, 369(6504), 712–717. <https://doi.org/10.1126/science.abc2061>
- Mărginean, M. O., Molnar, E., & Chinceșan, M. I. (2020). Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in a small child: A case report. *Medicine (United States)*, 99(3), 3–7. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018759>
- Marsh, R. A. (2018). Epstein–Barr Virus and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01902>
- McClellan, K. B., Gangappa, S., Speck, S. H., & Virgin IV, H. W. (2006). Antibody-Independent Control of  $\gamma$ -Herpesvirus Latency via B Cell Induction of Anti-Viral T Cell Responses. *PLOS Pathogens*, 2(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020058>
- McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Dolan, A., McNab, D., Perry, L. J., Taylor, P., & Challberg, M. D. (1988). Structures of herpes simplex virus type 1 genes required for replication of virus DNA. *Journal of Virology*, 62(2), 444–453. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.2.444-453.1988>
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 117(1), 90–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
- McKinstry, K. K., Strutt, T. M., Kuang, Y., Brown, D. M., Sell, S., Dutton, R. W., & Swain, S. L. (2012). Memory CD4<sup>+</sup> T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2847–2856. <https://doi.org/10.1172/JCI63689>
- McVoy, M., Nixon, D., Hur, H., & Adler, S. (2000). The Ends on Herpesvirus DNA Replicative Concatemers Contain pac2 cis Cleavage/Packaging Elements and Their Formation Is Controlled by Terminal cis Sequences. *Journal of Virology*, 74(3), 1587–1592. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1587-1592.2000>
- Meckiff, B. J., Ladell, K., McLaren, J. E., Ryan, G. B., Leese, A. M., James, E. A., ... Long, H. M. (2019). Primary EBV Infection Induces an Acute Wave of Activated Antigen-Specific Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*, 203(5), 1276–1287. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900377>
- Meckiff, B. J., Ramírez-Suástegui, C., Fajardo, V., Chee, S. J., Kusnadi, A., Simon, H., ... Vijayanand, P. (2020). Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4<sup>+</sup> T Cells in COVID-19. *Cell*, 183(5), 1340-1353.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.001>
- Ménager, M. M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougel, P., Ho, C.-H., Garfa, M., ... de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nature Immunology*, 8(3), 257–267. <https://doi.org/10.1038/ni1431>
- Ménasché, G., Feldmann, J., Fischer, A., & De Saint Basile, G. (2005). Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunological Reviews*, 203(1), 165–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00224.x>
- Merlo, A., Turrini, R., Bobisse, S., Zamarchi, R., Alaggio, R., Dolcetti, R., ... Rosato, A. (2010). Virus-Specific Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T Cells for the Treatment of EBV-Related Tumors. *The Journal of Immunology*, 184(10), 5895 LP – 5902. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902850>
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus Assembly and Egress. *Journal of Virology*, 76(4), 1537–1547.

<https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1537-1547.2002>

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., & Granzow, H. (2006). Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), 423–429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.013>

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., & Granzow, H. (2009). Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research*, 143(2), 222–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.018>

Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., ... Jung, S. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C<sup>+</sup> Cells. *Immunity*, 46(5), 849–862.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.018>

Milho, R., Smith, C. M., Marques, S., Alenquer, M., May, J. S., Gillet, L., ... Stevenson, P. G. (2009). In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *Journal of General Virology*, 90(1), 21–32. <https://doi.org/10.1099/vir.0.006569-0>

Mishra, M. K., & Wee Yong, V. (2016). Myeloid cells — targets of medication in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 2016 12:9, 12(9), 539–551. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.110>

Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., & Tanaka, M. (2007). Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2268–2278. <https://doi.org/10.1172/JCI31990>

Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P. S., & Goldsmith, M. A. (1997). A Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded Cytokine Homolog (vIL-6) Activates Signaling through the Shared gp130 Receptor Subunit \*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19625–19631. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19625>

Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A., & Mosmann, T. R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248, 1230–1234. <https://doi.org/10.1126/science.2161559>

Moorlag, S. J. C. F. M., Khan, N., Novakovic, B., Kaufmann, E., Jansen, T., van Crevel, R., ... Netea, M. G. (2020). B-Glucan Induces Protective Trained Immunity against Mycobacterium tuberculosis Infection: A Key Role for IL-1. *Cell Reports*, 31(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107634>

Mora, A. L., Torres-González, E., Rojas, M., Xu, J., Ritzenthaler, J., Speck, S. H., ... Stecenko, A. (2007). Control of virus reactivation arrests pulmonary herpesvirus-induced fibrosis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(11), 1139–1150. <https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1426OC>

Morales-Nebreda, L., Misharin, A. V., Perlman, H., & Budinger, G. R. S. (2015). The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *European Respiratory Review*, 24(137), 505–509. <https://doi.org/10.1183/16000617.0031-2015>

Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P. K., Espinosa, L., Stanley, E. R., Nutt, S. L., ... Sieweke, M. H. (2013). M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature*, 497(7448), 239–243. <https://doi.org/10.1038/nature12026>

Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., ... Cheroutre, H. (2013).

- Transcriptional reprogramming of mature CD4<sup>+</sup> helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nature Immunology*, 14(3), 281–289. <https://doi.org/10.1038/ni.2523>
- Mueller, S. N., Vanguri, V. K., Ha, S.-J., West, E. E., Keir, M. E., Glickman, J. N., ... Ahmed, R. (2010). PD-L1 has distinct functions in hematopoietic and nonhematopoietic cells in regulating T cell responses during chronic infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2508–2515. <https://doi.org/10.1172/JCI40040>
- Münz, C. (2016). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends in Immunology*, 37(11), 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.017>
- Naik, S. H., Perié, L., Swart, E., Gerlach, C., van Rooij, N., de Boer, R. J., & Schumacher, T. N. (2013). Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature*, 496(7444), 229–232. <https://doi.org/10.1038/nature12013>
- Nakano, H., Lin, K. L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D. N., Kakiuchi, T., & Gunn, M. D. (2009). Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature Immunology*, 10(4), 394–402. <https://doi.org/10.1038/ni.1707>
- Nash, A. A., Dutia, B. M., Stewart, J. P., & Davison, A. J. (2001). Natural history of murine  $\gamma$ -herpesvirus infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1408), 569–579. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0779>
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., ... Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
- Netea, M. G., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Domínguez-Andrés, J., Curtis, N., van Crevel, R., van de Veerdonk, F. L., & Bonten, M. (2020). Trained Immunity: a Tool for Reducing Susceptibility to and the Severity of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*, 181(5), 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>
- Netea, M. G., Quintin, J., & Meer, J. W. M. Van Der. (2011). Perspective Trained Immunity : A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host and Microbe*, 9(5), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>
- Newson, J., Stables, M., Karra, E., Arce-Vargas, F., Quezada, S., Motwani, M., ... Gilroy, D. W. (2014). Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, 124(11), 1748–1764. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-562710>
- Nguyen, K., Fentress, S., Qiu, Y., Yun, K., Jeffery, C., & Chawla, A. (2013). Circadian Gene Bmal1 Regulates Diurnal Oscillations of Ly6Chi Inflammatory Monocytes. *Science*, 341(6153), 1483–1488. <https://doi.org/10.1126/science.1240636>
- Nikiforow, S., Kim, B., George, M., & Christian, M. (2003). Cytolytic CD4<sup>+</sup>-T-Cell Clones Reactive to EBNA1 Inhibit Epstein-Barr Virus-Induced B-Cell Proliferation. *Journal of Virology*, 77(22), 12088–12104. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.22.12088-12104.2003>
- Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E., & Kzhyshkowska, J. (2018). Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2821. <https://doi.org/10.3390/ijms19092821>

- Noble, A., Giorgini, A., & Leggat, J. A. (2006). Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood*, *107*(11), 4475–4483. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3994>
- Offermann, M. K. (2007). Kaposi Sarcoma Herpesvirus-Encoded Interferon Regulator Factors BT - Kaposi Sarcoma Herpesvirus: New Perspectives. In C. Boshoff & R. A. Weiss (Eds.) (pp. 185–209). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34344-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34344-8_7)
- Pachnio, A., Ciaurriz, M., Begum, J., Lal, N., Zuo, J., Beggs, A., & Moss, P. (2016). Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4+ T Cells Targeted to Vascular Endothelium. *PLoS Pathogens*, *12*(9), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005832>
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., & Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, *126*(22), 5073–5084. <https://doi.org/10.1242/dev.126.22.5073>
- Papatriantafyllou, M. (2013). The interferon paradox. *Nature Reviews Immunology*, *13*(6), 392–393. <https://doi.org/10.1038/nri3461>
- Pariante, M., Bartolomé, J., Lorente, S., & Crespo, M. (2007). Age distribution of serological profiles of Epstein-Barr virus infection: review of results from a diagnostic laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *25*, 108–110.
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1989). Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*, *74*(7), 2527–2534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V74.7.2527.2527>
- Patel, A. A., Ginhoux, F., & Yona, S. (2021). Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology*, *163*(3), 250–261. <https://doi.org/10.1111/imm.13320>
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., ... Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>
- Pauken, K. E., Dougan, M., Rose, N. R., Lichtman, A. H., & Sharpe, A. H. (2019). Adverse Events Following Cancer Immunotherapy: Obstacles and Opportunities. *Trends in Immunology*, *40*(6), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.002>
- Pawelek, K. A., Dor Jr, D., Salmeron, C., & Handel, A. (2016). Within-Host Models of High and Low Pathogenic Influenza Virus Infections: The Role of Macrophages. *PloS One*, *11*(2), e0150568–e0150568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150568>
- Peacock, J. W., & Bost, K. L. (2001). Murine gammaherpesvirus-68-induced interleukin-10 increases viral burden, but limits virus-induced splenomegaly and leukocytosis. *Immunology*, *104*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1046/J.0019-2805.2001.01286.X>
- Pearce, E., Mullen, C. A., Martins, G. A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V., ... Reiner, S. L. (2003). Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*, *302*(5647), 1041–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1090148>

- Peeters, L. M., Vanheusden, M., Somers, V., Wijmeersch, B. van, Stinissen, P., Broux, B., & Hellings, N. (2017). Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T Cells Drive Multiple Sclerosis Progression. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01160>
- Peiris, J., Hui, K. P. Y., & Yen, H. L. (2010). Host response to influenza virus: Protection versus immunopathology. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.003>
- Peiris, J. S. M., Cheung, C. Y., Leung, C. Y. H., & Nicholls, J. M. (2009). Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? *Trends in Immunology*, 30(12), 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.004>
- Peng, L., Ryazantsev, S., Sun, R., & Zhou, Z. H. (2010). Three-Dimensional Visualization of Gammaherpesvirus Life Cycle in Host Cells by Electron Tomography. *Structure*, 18(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.017>
- Percivalle, E., Sammartino, J. C., Cassaniti, I., Arbustini, E., Urtis, M., Smirnova, A., ... Baldanti, F. (2021). Macrophages and Monocytes: “Trojan Horses” in COVID-19. *Viruses*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/v13112178>
- Perez, O., Yeung, S., Vera-Licona, P., Romagnoli, P., Tasleem, S., Ural, B., ... Khanna, K. (2017). CD169<sup>+</sup> macrophages orchestrate innate immune responses by regulating bacterial localization in the spleen. *Science Immunology*, 2(16), eaah5520. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah5520>
- Perié, L., & Duffy, K. R. (2016). Retracing the in vivo haematopoietic tree using single-cell methods. *FEBS Letters*, 590(22), 4068–4083. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1873-3468.12299>
- Perkins, E., Daniel, A., Aaron, D., Vishwam, S., F., A. R., & Prashant, D. (2008). Small Capsid Protein pORF65 Is Essential for Assembly of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Capsids. *Journal of Virology*, 82(14), 7201–7211. <https://doi.org/10.1128/JVI.00423-08>
- Pertel, E. (2002). Human Herpesvirus 8 Glycoprotein B (gB), gH, and gL Can Mediate Cell Fusion. *Journal of Virology*, 76(9), 4390–4400. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4390-4400.2002>
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D., ... Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Platt, A. M., Bain, C. C., Bordon, Y., Sester, D. P., & Mowat, A. M. (2010). An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6843–6854. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903987>
- Polizzotto, M. N., Uldrick, T. S., Wyvill, K. M., Aleman, K., Marshall, V., Wang, V., ... Yarchoan, R. (2016). Clinical Features and Outcomes of Patients With Symptomatic Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV)-associated Inflammation: Prospective Characterization of KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome (KICS). *Clinical Infectious Diseases*, 62(6), 730–738. <https://doi.org/10.1093/cid/civ996>
- Popescu, I., Macedo, C., Abu-Elmagd, K., Shapiro, R., Hua, Y., Thomson, A. W., ... Metes, D. (2007). EBV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Reactivation in Transplant Patients Results in Expansion of CD8<sup>+</sup> Type-1 Regulatory T Cells. *American Journal of Transplantation*, 7(5), 1215–1223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01740.x>

- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages—From Origin to Disease Modulation. *Annual Review of Immunology*, *39*(1), 251–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159>
- Puente, L. G., Mireau, L. R., Lysechko, T. L., & Ostergaard, H. L. (2005). Phosphatidylinositol-3-kinase regulates PKC $\theta$  activity in cytotoxic T cells. *Molecular Immunology*, *42*(10), 1177–1184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.012>
- Qiulong, H., Petros, A., Virgin, H., Fesik, S., & Olejniczak, E. (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(6), 3428–3433. <https://doi.org/10.1073/pnas.062525799>
- Qui, H. Z., Hagymasi, A. T., Bandyopadhyay, S., St. Rose, M.-C., Ramanarasimhaiah, R., Ménoret, A., ... Adler, A. J. (2011). CD134 Plus CD137 Dual Costimulation Induces Eomesodermin in CD4 T Cells To Program Cytotoxic Th1 Differentiation. *The Journal of Immunology*, *187*(7), 3555 LP – 3564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101244>
- Ragab, D., Salah, H., Taeimah, M., Khattab, R., & Salem, R. (2020). The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology*, *11*(June), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., & Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*, *317*(5), 575–589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.005>
- Rangaswamy, U. S., & Speck, S. H. (2014). Murine Gammaherpesvirus M2 Protein Induction of IRF4 via the NFAT Pathway Leads to IL-10 Expression in B Cells. *PLOS Pathogens*, *10*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003858>
- Rappocciolo, G., Jenkins, F. J., Hensler, H. R., Piazza, P., Jais, M., Borowski, L., ... Rinaldo, C. R. (2006). DC-SIGN Is a Receptor for Human Herpesvirus 8 on Dendritic Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, *176*(3), 1741–1749. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1741>
- Reis, B. S., Rogoz, A., Costa-Pinto, F. A., Taniuchi, I., & Mucida, D. (2013). Mutual expression of the transcription factors Runx3 and ThPOK regulates intestinal CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *Nature Immunology*, *14*(3), 271–280. <https://doi.org/10.1038/ni.2518>
- Renaude, E., Kroemer, M., Borg, C., Peixoto, P., Hervouet, E., Loyon, R., & Adotévi, O. (2021). Epigenetic Reprogramming of CD4<sup>+</sup> Helper T Cells as a Strategy to Improve Anticancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *12*(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669992>
- Ressing, M. E., Horst, D., Griffin, B. D., Tellam, J., Zuo, J., Khanna, R., ... Wiertz, E. J. H. J. (2008). Epstein-Barr virus evasion of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(6), 397–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.10.008>
- Rojas, J. M., Avia, M., Martín, V., & Sevilla, N. (2017). IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections. *Journal of Immunology Research*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6104054>
- Rosa, G. T., Gillet, L., Smith, C. M., de Lima, B. D., & Stevenson, P. G. (2007). IgG Fc Receptors Provide an Alternative Infection Route for Murine Gamma-Herpesvirus-68. *PLOS ONE*, *2*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000560>

- Rosseau, S., Selhorst, J., Wiechmann, K., Leissner, K., Maus, U., Mayer, K., ... Lohmeyer, J. (2000). Monocyte Migration Through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines. *The Journal of Immunology*, 164(1), 427–435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.1.427>
- Rowe, M., Glaunsinger, B., van Leeuwen, D., Zuo, J., Sweetman, D., Ganem, D., ... Rensing, M. E. (2007). Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion. *Pnas*, 104(9), 3366–3371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611128104>
- Russell, G. C., Stewart, J. P., & Haig, D. M. (2009). Malignant catarrhal fever: A review. *The Veterinary Journal*, 179(3), 324–335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.11.007>
- Russo, J. J., Bohenzky, R. A., Chien, M. C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., ... Moore, P. S. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14862–14867. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14862>
- Sacha, J. B., Giraldo-Vela, J. P., Buechler, M. B., Martins, M. A., Maness, N. J., Chung, C., ... Watkins, D. I. (2009). Gag- and Nef-specific CD4+ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), 9791–9796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813106106>
- Sadler, A. J., & Williams, B. R. G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 559–568. <https://doi.org/10.1038/nri2314>
- Saghafian-Hedengren, S., Sverremark-Ekström, E., Linde, A., Lilja, G., & Nilsson, C. (2010). Early-life EBV infection protects against persistent IgE sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.033>
- Sakakibara, S., Yasui, T., Jinzai, H., O'Donnell, K., Tsai, C.-Y., Minamitani, T., ... Kikutani, H. (2020). Self-reactive and polyreactive B cells are generated and selected in the germinal center during  $\gamma$ -herpesvirus infection. *International Immunology*, 32(1), 27–38. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz057>
- Sangster, M. Y., Topham, D. J., D\textquoterightCosta, S., Cardin, R. D., Marion, T. N., Myers, L. K., & Doherty, P. C. (2000). Analysis of the Virus-Specific and Nonspecific B Cell Response to a Persistent B-Lymphotropic Gammaherpesvirus. *The Journal of Immunology*, 164(4), 1820–1828. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.1820>
- Santa Cruz, A., Mendes-Frias, A., Oliveira, A. I., Dias, L., Matos, A. R., Carvalho, A., ... Silvestre, R. (2021). Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613422>
- Sarawar, S. R., Cardin, R. D., Brooks, J. W., Mehrpooya, M., Hamilton-Easton, A. M., Mo, X. Y., & Doherty, P. C. (1997). Gamma interferon is not essential for recovery from acute infection with murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology*, 71(5), 3916–3921. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3916-3921.1997>
- Sasaki, S., Nishikawa, J., Sakai, K., Iizasa, H., Yoshiyama, H., Yanagihara, M., ... Sakaida, I. (2019). EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer*, 22(3), 486–496. <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0880-4>
- Savin, K. W., Cocks, B. G., Wong, F., Sawbridge, T., Cogan, N., Savage, D., & Warner, S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a

- herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology Journal*, 7(1), 308. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-308>
- Schmidt, K., Wies, E., & Neipel, F. (2011). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 3 inhibits gamma interferon and major histocompatibility complex class II expression. *Journal of Virology*, 85(9), 4530–4537. <https://doi.org/10.1128/JVI.02123-10>
- Schneider, C., Nobs, S. P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., & Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nature Immunology*, 15(11), 1026–1037. <https://doi.org/10.1038/ni.3005>
- Schönrich, G., & Raftery, M. J. (2019). The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 0(JUN), 207. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00207>
- Schwyzler, M., & Ackermann, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 53(1), 17–29. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01231-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01231-X)
- Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., ... Marichal, T. (2019). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>
- Schyns, J., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Lung interstitial macrophages: Past, present, and future. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5160794>
- Šebová, R., Bauerová-Hlinková, V., Beck, K., Nemčovičová, I., Bauer, J., & Kúdelová, M. (2019). Residue Mutations in Murine Herpesvirus 68 Immunomodulatory Protein M3 Reveal Specific Modulation of Chemokine Binding. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00210>
- Seo, S.-U., Kwon, H.-J. J., Ko, H.-J. J., Byun, Y.-H. H., Seong, B. L., Uematsu, S., ... Kweon, M.-N. N. (2011). Type I Interferon Signaling Regulates Ly6Chi Monocytes and Neutrophils during Acute Viral Pneumonia in Mice. *PLOS Pathogens*, 7(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001304>
- Seo, S. U., Kwon, H. J., Ko, H. J., Byun, Y. H., Seong, B. L., Uematsu, S., ... Kweon, M. N. (2011). Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathogens*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001304>
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol*, 26, 421–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.Monocyte-Mediated>
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 7(3), 311–318. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/ $\text{iNOS}$ -producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19(1), 59–70. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00171-7)
- Shaabani, N., Duhan, V., Khairnar, V., Gassa, A., Ferrer-Tur, R., Häussinger, D., ... Lang, K. S. (2016). CD169+ macrophages regulate PD-L1 expression via type I interferon and thereby prevent severe

immunopathology after LCMV infection. *Cell Death & Disease*, 7(11), e2446–e2446. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.350>

Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., ... Schwartz, M. (2009). Infiltrating Blood-Derived Macrophages Are Vital Cells Playing an Anti-inflammatory Role in Recovery from Spinal Cord Injury in Mice. *PLOS Medicine*, 6(7), e1000113. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000113>

Shen, A., Puente, L. G., & Ostergaard, H. L. (2005). Tyrosine kinase activity and remodelling of the actin cytoskeleton are co-temporally required for degranulation by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 116(2), 276–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02222.x>

Shen, Y., Wang, S., Sun, F., Zheng, G., Wu, T., Du, Y., ... Sun, R. (2018). Inhibition of murine herpesvirus-68 replication by IFN-gamma in macrophages is counteracted by the induction of SOCS1 expression, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007202>

Sheridan, V., Polychronopoulos, L., Dutia, B. M., & Ebrahimi, B. (2014). A shutoff and exonuclease mutant of murine gammaherpesvirus-68 yields infectious virus and causes RNA loss in type I interferon receptor knockout cells. *Journal of General Virology*, 95(5), 1135–1143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.059329-0>

Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T. M., Serbina, N. V., Lipuma, L., ... Pamer, E. G. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity*, 34(4), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>

Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2011 11:11, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>

Shinozaki-Ushiku, A., Kunita, A., & Fukayama, M. (2015). Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (Review). *Int J Oncol*, 46(4), 1421–1434. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2856>

Shukla, D., & Spear, P. G. (2001). Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 503–510. <https://doi.org/10.1172/JCI13799>

Si, H., & Robertson, E. S. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function. *Journal of Virology*, 80(2), 697–709. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.697-709.2006>

Siegel, A. M., Herskowitz, J. H., & Speck, S. H. (2008). The MHV68 M2 protein drives IL-10 dependent B cell proliferation and differentiation. *PLoS Pathogens*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000039>

Sieweke, M., & Allen, J. E. (2013). Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science*, 342(6161), 1242974. <https://doi.org/10.1126/science.1242974>

Smith, L. K., Boukhaled, G. M., Condotta, S. A., Shoukry, N. H., Krawczyk, C. M., Richer, M. J., ... Guthmiller, J. J. (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8 + T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity*, 48(2), 299–312.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.006>

- Smith, L. M., McWhorter, A. R., Masters, L. L., Shellam, G. R., & Redwood, A. J. (2008). Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus. *Journal of Virology*, *82*(13), 6689–6696. <https://doi.org/10.1128/JVI.00160-08>
- Snelgrove, R. J., Goulding, J., Didierlaurent, A. M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., ... Hussell, T. (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nature Immunology*, *9*(9), 1074–1083. <https://doi.org/10.1038/ni.1637>
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *Journal of Cell Biology*, *136*(5), 1007–1021. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.1007>
- Sollid, L. (2022). Epstein-Barr virus as a driver of multiple sclerosis. *Science Immunology*, *7*(70), eabo7799. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abo7799>
- Sonpavde, G. P., Grivas, P., Lin, Y., Hennessy, D., & Hunt, J. D. (2021). Immune-related adverse events with PD-1 versus PD-L1 inhibitors: a meta-analysis of 8730 patients from clinical trials. *Future Oncology*, *17*(19), 2545–2558. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-1222>
- Soudja, S. M. H., Ruiz, A. L., Marie, J. C., & Lauvau, G. (2012). Inflammatory Monocytes Activate Memory CD8+T and Innate NK Lymphocytes Independent of Cognate Antigen during Microbial Pathogen Invasion. *Immunity*, *37*(3), 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.029>
- Sparks-Thissen, R. L., Braaten, D. C., Hildner, K., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Virgin, H. W. (2005). CD4 T cell control of acute and latent murine gammaherpesvirus infection requires IFN $\gamma$ . *Virology*, *338*(2), 201–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.011>
- Sparks-Thissen, R. L., Braaten, D. C., Kreher, S., Speck, S. H., & Virgin, H. W. (2004). An Optimized CD4 T-Cell Response Can Control Productive and Latent Gammaherpesvirus Infection. *Journal of Virology*, *78*(13), 6827–6835. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.6827-6835.2004>
- Spaulding, E., Fooksman, D., Moore, J. M., Saidi, A., Feintuch, C. M., Reizis, B., ... Lauvau, G. (2016). STING-Licensed Macrophages Prime Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in the Bone Marrow during Severe Plasmodium yoelii Malaria. *PLOS Pathogens*, *12*(10), e1005975. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005975>
- Speck, S. H., & Ganem, D. (2010). Viral Latency and Its Regulation: Lessons from the  $\beta$ -Herpesviruses. *Cell Host & Microbe*, *8*(1), 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.014>
- Spiller, O. B., Robinson, M., O'Donnell, E., Milligan, S., Morgan, B. P., Davison, A. J., & Blackbourn, D. J. (2003). Complement regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein. *Journal of Virology*, *77*(1), 592–599. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.592-599.2003>
- Steimle, V., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Grosj Pierre, B., & Mach, B. (1994). Regulation of MHC Class II Expression by Interferon- $\gamma$  Mediated by the Transactivator Gene CIITA. *Science*, *265*(5168), 106–109. <https://doi.org/10.1126/science.8016643>
- Stempel, M., Chan, B., & Brinkmann, M. M. (2019). Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway. *Medical Microbiology and Immunology*, *208*(3), 495–512. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00582-0>
- Stepp, S. E., Dufourcq-Lagelouse, R., Deist, F. Le, Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P. A., ... Kumar,

- V. (1999). Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Science*, 286(5446), 1957–1959. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1957>
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I Interferons in Host Defense. *Immunity*, 25(3), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>
- Stevenson, E., Collins-McMillen, D., Kim, J. H., Cieply, S. J., Bentz, G. L., & Yurochko, A. D. (2014). HCMV Reprogramming of Infected Monocyte Survival and Differentiation: A Goldilocks Phenomenon. *Viruses*, 6(2), 782–807. <https://doi.org/10.3390/v6020782>
- Stevenson, P. G. (2004). Immune evasion by gamma-herpesviruses. *Current Opinion in Immunology*, 16(4), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.002>
- Stevenson, P. G. (2020). Immune Control of  $\gamma$ -Herpesviruses. *Viral Immunology*, 33(3), 225–232. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0080>
- Stevenson, P. G., & Doherty, P. C. (1998). Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *Journal of Virology*, 72(2), 943–949. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.943-949.1998>
- Stevenson, P. G., Efstathiou, S., Doherty, P. C., & Lehner, P. J. (2000). Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8455–8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.150240097>
- Stevenson, P. G., May, J. S., Smith, X. G., Marques, S., Adler, H., Koszinowski, U. H., ... Efstathiou, S. (2002). K3-mediated evasion of CD8<sup>+</sup> T cells aids amplification of a latent  $\gamma$ -herpesvirus. *Nature Immunology*, 3(8), 733–740. <https://doi.org/10.1038/ni818>
- Stevenson, P. G., Simas, J. P., & Efstathiou, S. (2009). Immune control of mammalian gamma-herpesviruses: Lessons from murid herpesvirus-4. *Journal of General Virology*, 90(10), 2317–2330. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013300-0>
- Stuller, K. A., Cush, S. S., & Flaño, E. (2010). Persistent  $\gamma$ -Herpesvirus Infection Induces a CD4 T Cell Response Containing Functionally Distinct Effector Populations. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3850–3856. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902935>
- Stuller, K. A., & Flaño, E. (2009). CD4 T Cells Mediate Killing during Persistent Gammaherpesvirus 68 Infection. *Journal of Virology*, 83(9), 4700–4703. <https://doi.org/10.1128/jvi.02240-08>
- Sun, C., Schattgen, S. A., Pisitkun, P., Jorgensen, J. P., Hilterbrand, A. T., Wang, L. J., ... Paludan, S. R. (2015). Evasion of Innate Cytosolic DNA Sensing by a Gammaherpesvirus Facilitates Establishment of Latent Infection. *The Journal of Immunology*, 194(4), 1819–1831. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402495>
- Sun, J., Cardani, A., Sharma, A. K., Laubach, V. E., Jack, R. S., Müller, W., ... TJ, B. (2011). Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. *PLoS Pathogens*, 7(8).
- Sunil-Chandra, N. P., Efstathiou, S., Arno, J., & Nash, A. A. (1992). Virological and pathological features of mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Journal of General Virology*, 73(9), 2347–2356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-9-2347>

- Suzuki, T., Sakagami, T., Rubin, B. K., Noguee, L. M., Wood, R. E., Zimmerman, S. L., ... Trapnell, B. C. (2008). Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2703–2710. <https://doi.org/10.1084/jem.20080990>
- Swanson-Mungerson, M., Bultema, R., & Longnecker, R. (2010). Epstein–Barr virus LMP2A imposes sensitivity to apoptosis. *Journal of General Virology*, 91(9), 2197–2202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.021444-0>
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Peter, P., ... J., P. M. (2009). Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*, 325(5940), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>
- Tai, S. H. S., Niikura, M., Cheng, H. H., Kruger, J. M., Wise, A. G., & Maes, R. K. (2010). Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1). *Virology*, 401(2), 215–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.021>
- Takahashi, K., Yamamura, F., & Naito, M. (1989). Differentiation, Maturation, and Proliferation of Macrophages in the Mouse Yolk Sac: A Light-Microscopic, Enzyme-Cytochemical, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. *Journal of Leukocyte Biology*, 45(2), 87–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlb.45.2.87>
- Takashi, A., Ikuo, H., Ken, K., Hideo, F., Ronen, N., Avi, E., ... P., H. R. (2007). Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *Journal of Virology*, 81(10), 5058–5065. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-07>
- Takeuchi, A., Badr, M. E. S. G., Miyauchi, K., Ishihara, C., Onishi, R., Guo, Z., ... Saito, T. (2016). CRT AM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 123–138. <https://doi.org/10.1084/jem.20150519>
- Takeuchi, A., & Saito, T. (2017). CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. *Frontiers in Immunology*, 8(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00194>
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., ... Henri, S. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity*, 39(5), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Tan, C. S. E., Lawler, C., May, J. S., Belz, G. T., & Stevenson, P. G. (2016). Type I Interferons Direct Gammaherpesvirus Host Colonization. *PLoS Pathogens*, 12(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005654>
- Tan, C. S. E., Lawler, C., & Stevenson, P. G. (2017). CD8 + T cell evasion mandates CD4 + T cell control of chronic gamma-herpesvirus infection. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006311>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, 6(Kishimoto 1989), 1–16.
- Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., & Wen, C. (2020). Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Frontiers in Immunology*, 11, 1708. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01708>

- Teh, Y. C., Ding, J. L., Ng, L. G., & Chong, S. Z. (2019). Capturing the Fantastic Voyage of Monocytes Through Time and Space. *Frontiers in Immunology*, *10*(April), 834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00834>
- Teijaro, J. R., Ng, C., Lee Andrew, Sullivan, B., Sheehan, K. C., Welch, M., ... Oldstone, M. B. A. (2013). Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. *Science*, *340*(6129), 207–211. <https://doi.org/10.1126/science.1235214>
- Teijaro, J. R., Walsh, K. B., Cahalan, S., Fremgen, D. M., Roberts, E., Scott, F., ... Rosen, H. (2011). Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell*, *146*(6), 980–991. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.015>
- Telfer, S., Bennett, M., Carslake, D., Helyar, S., & Begon, M. (2007). The dynamics of Murid gammaherpesvirus 4 within wild, sympatric populations of bank voles and wood mice. *Journal of Wildlife Diseases*, *43*(1), 32–39. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.1.32>
- Telford, E. A. R., Watson, M. S., Aird, H. C., Perry, J., & Davison, A. J. (1995). The DNA Sequence of Equine Herpesvirus 2. *Journal of Molecular Biology*, *249*(3), 520–528. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0314>
- Terrell, S., & Speck, S. H. (2017). Murine gammaherpesvirus M2 antigen modulates splenic B cell activation and terminal differentiation in vivo. *PLOS Pathogens*, *13*(8), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006543>
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* *2016 535:7610*, *535*(7610), 65–74. <https://doi.org/10.1038/nature18847>
- Thelemann, C., Eren, R. O., Coutaz, M., Brasseit, J., Bouzourene, H., Rosa, M., ... Acha-Orbea, H. (2014). Interferon- $\gamma$  Induces Expression of MHC Class II on Intestinal Epithelial Cells and Protects Mice from Colitis. *PLOS ONE*, *9*(1), e86844. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086844>
- Thorley-Lawson, D. A. (2015). EBV Persistence—Introducing the Virus BT - Epstein Barr Virus Volume 1: One Herpes Virus: Many Diseases. In C. Münz (Ed.) (pp. 151–209). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8)
- Thorley-Lawson, D. A., & Allday, M. J. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(12), 913–924. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2015>
- Tibbetts, S. A., van Dyk, L. F., Speck, S. H., & Virgin, H. W. (2002). Immune Control of the Number and Reactivation Phenotype of Cells Latently Infected with a Gammaherpesvirus. *Journal of Virology*, *76*(14), 7125–7132. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7125-7132.2002>
- Ting-Ting, W., Usherwood, E. J., Stewart, J. P., Nash, A. A., & Ren, S. (2000). Rta of Murine Gammaherpesvirus 68 Reactivates the Complete Lytic Cycle from Latency. *Journal of Virology*, *74*(8), 3659–3667. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3659-3667.2000>
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., & Katze, M. G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(1), 16–32. <https://doi.org/10.1128/mubr.05015-11>

- Tobias, R., Lee, H., & George, M. (1998). The Epstein-Barr Virus Rta Protein Activates Lytic Cycle Genes and Can Disrupt Latency in B Lymphocytes. *Journal of Virology*, 72(10), 7978–7984. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.10.7978-7984.1998>
- Topham, D. J., Cardin, R. C., Christensen, J. P., Brooks, J. W., Belz, G. T., & Doherty, P. C. (2001). Perforin and Fas in murine gammaherpesvirus-specific CD8<sup>+</sup> T cell control and morbidity. *Journal of General Virology*, 82(8), 1971–1981. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1971>
- Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 735–747. <https://doi.org/10.1038/nri911>
- Tribouley, J., Tribouley-Duret, J., & Appriou, M. (1978). [Effect of Bacillus Callmette Guerin (BCG) on the receptivity of nude mice to Schistosoma mansoni]. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 172(5), 902–904. Retrieved from [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/157204/\[Effect\\_of\\_Bacillus\\_Callmette\\_Guerin\\_BCG\\_on\\_the\\_receptivity\\_of\\_nude\\_mice\\_to\\_Schistosoma\\_mansoni\]\\_](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/157204/[Effect_of_Bacillus_Callmette_Guerin_BCG_on_the_receptivity_of_nude_mice_to_Schistosoma_mansoni]_)
- Tse, E., & Kwong, Y.-L. (2019). NK/T-cell lymphomas. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 32(3), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.06.005>
- Tsou, C.-L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., ... Charo, I. F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 902–909. <https://doi.org/10.1172/JCI29919>
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D. L., & Kutish, G. F. (2000). The Genome of a Very Virulent Marek's Disease Virus. *Journal of Virology*, 74(17), 7980–7988. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.17.7980-7988.2000>
- Tuofu, Z., David, M., Sarah, H., David, N., Feng, F., Scott, B., ... Lawrence, C. (2002). Evidence for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication In Vivo in CD14<sup>+</sup> Monocytes and Its Potential Role as a Source of Virus in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 76(2), 707–716. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.707-716.2002>
- Uppal, T., Banerjee, S., Sun, Z., Verma, S. C., & Robertson, E. S. (2014). KSHV LANA--the master regulator of KSHV latency. *Viruses*, 6(12), 4961–4998. <https://doi.org/10.3390/v6124961>
- Vacchio, M. S., Wang, L., Bouladoux, N., Carpenter, A. C., Xiong, Y., Williams, L. C., ... Bosselut, R. (2014). A ThPOK-LRF transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunology*, 15(10), 947–956. <https://doi.org/10.1038/ni.2960>
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C. L., Van Isterdael, G., ... Guilliams, M. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 44(4), 755–768. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.017>
- Van't Wout, J., Poell, R., & Van furth, R. (1992). The Role of BCG/PPD-Activated Macrophages in Resistance against Systemic Candidiasis in Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 36(5), 713–720. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1992.tb03132.x>
- Van Beurden, S. J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M. H. A., Haenen, O. L. M., Peters, S., Abma-Henkens, M. H. C., ... Engelsma, M. Y. (2010). Complete genome sequence and taxonomic position of

- anguillid herpesvirus 1. *Journal of General Virology*, 91(4), 880–887. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016261-0>
- van de Berg, P. J., van Leeuwen, E. M., ten Berge, I. J., & van Lier, R. (2008). Cytotoxic human CD4+ T cells. *Current Opinion in Immunology*, 20(3), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.007>
- van Dyk, L. F., Virgin, H. W., & Speck, S. H. (2000). The murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin is a critical regulator of reactivation from latency. *Journal of Virology*, 74(16), 7451–7461. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.16.7451-7461.2000>
- van Gent, M., Braem, S. G. E., de Jong, A., Delagic, N., Peeters, J. G. C., Boer, I. G. J., ... Rensing, M. E. (2014). Epstein-Barr Virus Large Tegument Protein BPLF1 Contributes to Innate Immune Evasion through Interference with Toll-Like Receptor Signaling. *PLOS Pathogens*, 10(2), e1003960. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003960>
- Vanderbeke, L., Mol, P. Van, Herck, Y. Van, Smet, F. De, Van Mol, P., Herck, Y. Van, ... Wauters, J. (2021). Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. *Nature Communications*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24360-w>
- Vaz, P. K., Hartley, C. A., Lee, S.-Y., Sansom, F. M., Adams, T. E., Stalder, K., ... Jung, J. U. (2019). Koala and Wombat Gammaherpesviruses Encode the First Known Viral NTPDase Homologs and Are Phylogenetically Divergent from All Known Gammaherpesviruses. *Journal of Virology*, 93(6), e01404-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-18>
- Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B. P., ... Steinmetz, L. M. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature Cell Biology*, 19(4), 271–281. <https://doi.org/10.1038/ncb3493>
- Verma, S., Daniela, W., Ankan, G., Bryan, M., Bjoern, P., Alessandro, S., ... M., L. R. (2015). Cytomegalovirus-Specific CD4 T Cells Are Cytolytic and Mediate Vaccine Protection. *Journal of Virology*, 90(2), 650–658. <https://doi.org/10.1128/JVI.02123-15>
- Verma, S., Weiskopf, D., Gupta, A., McDonald, B., Peters, B., Sette, A., & Benedict, C. A. (2016). Cytomegalovirus-Specific CD4 T Cells Are Cytolytic and Mediate Vaccine Protection. *Journal of Virology*, 90(2), 650–658. <https://doi.org/10.1128/JVI.02123-15>
- Villarino, A. V, Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2017). Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. *Nature Immunology*, 18(4), 374–384. <https://doi.org/10.1038/ni.3691>
- Virgin, H. W. (2014). The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*, 157(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032>
- Virgin, H. W., Latreille, P., Wamsley, P., Hallsworth, K., Weck, K. E., J, D. C. A., & Speck, S. H. (1997). Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology*, 71(8), 5894–5904. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.8.5894-5904.1997>
- Virgin, H. W., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2009). Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, 138(1), 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>
- von Gegerfelt, A., Valentin, A., Alicea, C., Van Rompay, K. K. A., Marthas, M. L., Montefiori, D. C.,

- ... Felber, B. K. (2010). Emergence of Simian Immunodeficiency Virus-Specific Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T Cells and Increased Humoral Responses Correlate with Control of Rebounding Viremia in CD8-Depleted Macaques Infected with Rev-Independent Live-Attenuated Simian Im. *The Journal of Immunology*, 185(6), 3348 LP – 3358. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000572>
- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Alfaro, M. E., Kurobe, T., Davison, A. J., & Hedrick, R. P. (2009). Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(3), 179–194. <https://doi.org/10.3354/dao02023>
- Wan, T. G. H., Antonio, R.-C. J., Min, T. A. S., XiaoHui, S., Thu, L. G. T., Guan, T. T., ... Norman, P. (2018). Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science*, 362(6414), 589–595. <https://doi.org/10.1126/science.aat0537>
- Wang, Y., Tibbetts, S. A., & Krug, L. T. (2021). Conquering the Host: Determinants of Pathogenesis Learned from Murine Gammaherpesvirus 68. *Annual Review of Virology*, 8, 349–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011921-082615>
- Ward, P. L., & Roizman, B. (1994). Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends in Genetics*, 10(8), 267–274. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90009-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90009-U)
- Weck, K. E., Dal Canto, A. J., Gould, J. D., O'Guin, A. K., Roth, K. A., Saffitz, J. E., ... Virgin, H. W. (1997). Murine  $\gamma$ -herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon- $\gamma$  responsiveness: A new model for virus-induced vascular disease. *Nature Medicine*, 3(12), 1346–1353. <https://doi.org/10.1038/nm1297-1346>
- Weck, K. E., Kim, S. S., Virgin, H. W., & Speck, S. H. (1999). B Cells Regulate Murine Gammaherpesvirus 68 Latency. *Journal of Virology*, 73(6), 4651–4661. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.4651-4661.1999>
- Wei, S., Gamero, A. M., Liu, J. H., Daulton, A. A., Valkov, N. I., Trapani, J. A., ... Djeu, J. Y. (1998). Control of Lytic Function by Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Regulatory Kinase 2 (ERK2) in a Human Natural Killer Cell Line: Identification of Perforin and Granzyme B Mobilization by Functional ERK2. *Journal of Experimental Medicine*, 187(11), 1753–1765. <https://doi.org/10.1084/jem.187.11.1753>
- Weiskopf, D., Bangs, D. J., Sidney, J., Kolla, R. V., Silva, A. D. de, Silva, A. M. de, ... Sette, A. (2015). Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1<sup>+</sup> cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells associated with protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(31), E4256–E4263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505956112>
- Wen, K. W., & Damania, B. (2010). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): Molecular biology and oncogenesis. *Cancer Letters*, 289(2), 140–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.004>
- Wilson, E., Douglas, Y., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., ... G., B. D. (2013). Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science*, 340(6129), 202–207. <https://doi.org/10.1126/science.1235208>
- Wright, D. E., Colaco, S., Colaco, C., & Stevenson, P. G. (2009). Antibody limits in vivo murine herpesvirus-4 replication by IgG Fc receptor-dependent functions. *Journal of General Virology*, 90(11), 2592–2603. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014266-0>

- Wu, P., & Hartert, T. V. (2011). Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(9), 731–745. <https://doi.org/10.1586/eri.11.92>
- Wu, S., He, C., Tang, T.-Y., & Li, Y.-Q. (2019). A review on co-existent Epstein–Barr virus-induced complications in inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 31(9). Retrieved from [https://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2019/09000/A\\_review\\_on\\_co\\_existent\\_Epstein\\_Barr\\_virus\\_induced.2.aspx](https://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2019/09000/A_review_on_co_existent_Epstein_Barr_virus_induced.2.aspx)
- Xie, Y., Akpınarlı, A., Maris, C., Hipkiss, E. L., Lane, M., Kwon, E.-K. M., ... Antony, P. A. (2010). Naive tumor-specific CD4+ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 651–667. <https://doi.org/10.1084/jem.20091921>
- Yabal, M., Müller, N., Adler, H., Knies, N., Groß, C. J., Damgaard, R. B., ... Jost, P. J. (2014). XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Reports*, 7(6), 1796–1808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.008>
- Yáñez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., ... Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*, 47(5), 890-902.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.021>
- Yang, D., Tian, Z., Zhang, M., Yang, W., Tang, J., Wu, Y., & Ni, B. (2017). NKG2D+CD4+ T Cells Kill Regulatory T Cells in a NKG2D-NKG2D Ligand- Dependent Manner in Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports*, 7(1), 1288. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01379-y>
- Yao, Y., Jeyanathan, M., Haddadi, S., Robbins, C. S., Schertzer, J. D., Xing, Z., ... Xing, Z. (2018). Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.042>
- Yokota, S. (2003). [Influenza-associated encephalopathy--pathophysiology and disease mechanisms]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 61(11), 1953—1958. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/14619437>
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., ... Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004, October). Epstein-Barr virus: 40 Years on. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
- Zegeye, M. M., Lindkvist, M., Fälker, K., Kumawat, A. K., Paramel, G., Grenegård, M., ... Ljungberg, L. U. (2018). Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Communication and Signaling*, 16(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0268-4>
- Zhang, C., Wu, Z., Li, J.-W., Zhao, H., & Wang, G.-Q. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105954. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105954>

Zhang, M., Hill, J., Godson, D., Ngeleka, M., Fernando, C., & Huang, Y. (2020). The pulmonary virome, bacteriological and histopathological findings in bovine respiratory disease from western Canada, (October 2019), 924–934. <https://doi.org/10.1111/tbed.13419>

Zhao, J., Poelaert, K. C. K., Van Cleemput, J., & Nauwynck, H. J. (2017). CCL2 and CCL5 driven attraction of CD172a<sup>+</sup> monocytic cells during an equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in equine nasal mucosa and the impact of two migration inhibitors, rosiglitazone (RSG) and quinacrine (QC). *Veterinary Research*, 48(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0419-4>

Zhiwei, Z., Huabin, H., Kun, W., Xuyan, S., Yupeng, W., Ya, S., ... Feng, S. (2020). Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science*, 368(6494), eaz7548. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7548>

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), 584–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.0806510>

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., ... Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A. T., Friedlander, G., ... Jung, S. (2012). Ly6C<sup>hi</sup> Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity*, 37(6), 1076–1090. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>

Zimring, J. C., Goodbourn, S., & Offermann, M. K. (1998). Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. *Journal of Virology*, 72(1), 701–707. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.701-707.1998>

Zinselmeyer, B. H., Heydari, S., Sacristán, C., Nayak, D., Cammer, M., Herz, J., ... McGavern, D. B. (2013). PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *Journal of Experimental Medicine*, 210(4), 757–774. <https://doi.org/10.1084/jem.20121416>

Zou, Q., Wu, B., Xue, J., Fan, X., Feng, C., Geng, S., ... Wang, B. (2014). CD8<sup>+</sup> Treg cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell-responses by IL-10-dependent mechanism during H5N1 influenza virus infection. *European Journal of Immunology*, 44(1), 103–114. <https://doi.org/10.1002/eji.201343583>



