

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire Inflammation, tissus épithéliaux et cytokines - LITEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges)
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :
Céline Chessa

Activités antivirales et immunomodulatrices des peptides antimicrobiens au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile

Directeur(s) de Thèse :
Nicolas Lévêque, Magali Garcia

Soutenue le 21 juin 2022 devant le jury

Jury :

Président	Marie-Édith Lafon	Professeure et praticien hospitalier, Université de Bordeaux
Rapporteur	Marie-Édith Lafon	Professeure et praticien hospitalier, Université de Bordeaux
Rapporteur	Sébastien Hantz	Professeur et praticien hospitalier, Université de Limoges
Membre	Nicolas Lévêque	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers POITIERS
Membre	Magali Garcia	Maître de conférence et praticien hospitalier, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :

Céline Chessa. *Activités antivirales et immunomodulatrices des peptides antimicrobiens au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2022. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Céline CHESSA

Activités antivirales et immunomodulatrices des peptides antimicrobiens au cours de l'infection de kératinocytes primaires humains par le virus West Nile

Directeur de Thèse : Pr Nicolas Lévêque
Co-directeur de thèse : Dr Magali Garcia

Soutenue le 21 juin 2022

devant la Commission d'Examen

JURY

Marie Edith LAFON	PU-PH	Université Bordeaux II	Rapporteur
Sébastien HANTZ	PU-PH	Université de Limoges	Rapporteur
Magali GARCIA	MCU-PH	Université de Poitiers	Co-directeur de thèse
Nicolas LEVEQUE	PU-PH	Université de Poitiers	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au **Professeur Marie-Edith Lafon** et au **Professeur Sébastien Hantz**, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteurs et de me faire l'honneur d'évaluer ce travail.

**Au Co-directeur de thèse,
le Docteur Magali Garcia,**

Je te remercie pour toute l'aide, le soutien et les conseils que tu as pu m'apporter.

**Au Directeur de thèse,
le Professeur Nicolas Lévêque,**

Je vous remercie de m'avoir accompagnée au cours de cette étape et pour votre soutien. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et pour la confiance que vous m'avez accordée.

Au Professeur Franck Morel

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre équipe.

A Alexia,

Merci pour tout !

A Vincent, Lucie et Clément

Merci pour votre aide très précieuse.

A mes collègues

Merci de m'avoir libéré du temps pour pouvoir finaliser ce travail.

A tous ceux qui m'ont soutenu au cours ce travail

Merci

ABREVIATIONS UTILISEES

ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
CCL :	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CHIKV :	<i>CHIKungunya Virus</i>
CLR :	Récepteur aux lectines de type C
COVID-19 :	<i>COronaVirus Induced Disease 2019</i>
CRAMP :	<i>Cathelicidin-Related AntiMicrobial Peptide</i>
CXCL :	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand</i>
DAMP :	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DC-SIGN :	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin</i>
DENV :	<i>DENVue Virus</i>
DICT :	Dose Infectieuse en Culture de Tissu
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FAK :	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GAPDH :	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
hBD :	Bêta-Défensine humaine
HEK :	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPV :	<i>Human PapillomaVirus</i>
IFIT :	<i>InterFeron Induced proteins with Tetratricopeptide repeats</i>
IFN :	InterFéroN
IFNAR :	<i>Interferon α/β receptor</i>
ISGs :	<i>Interferon Stimulated Genes</i>
IL :	Interleukine
JEV :	<i>Japanese Encephalitis Virus</i>
kb :	kilobase
LB :	Lymphocyte B
LPS :	LipoPolySaccharide
LT :	Lymphocyte T
MDA5 :	<i>Melanoma-Differentiation-Associated gene 5</i>
mL :	Millilitre
MOI :	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MX1 :	<i>MyXoma resistance protein 1</i>
Nb :	Nombre

NK :	<i>Natural Killer</i>
ng :	Nanogramme
nm :	Nanomètre
NLR :	<i>NOD like receptor</i>
NOD :	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like</i>
NS :	<i>Non Structural</i>
NSB :	Niveau de Sécurité Biologique
PAM :	Peptide AntiMicrobien
PAMP :	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS :	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFU :	<i>Plaque Forming Unit</i>
pH :	Potentiel Hydrogène
Poly (I:C) :	Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR :	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
qPCR :	quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i>
(RT)-PCR :	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
RBD :	<i>Receptor Binding Domain</i>
RE :	Réticulum Endoplasmique
RIG-I :	<i>Retinoic acid-Inducible Gene I</i>
RLH :	<i>RIG-I like Helicase</i>
RLR :	<i>RIG-I like Receptor</i>
RNase :	RiboNucléase
RSAD2 :	<i>Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2</i> , vipérine
SARS-CoV-2 :	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2</i>
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TAM :	<i>TYRO3, AXL and the MER</i>
TBEV :	<i>Tick Borne Encephalitis Virus</i>
TIM :	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin domain</i>
TLR :	<i>Toll Like Receptor</i>
TSLP :	<i>Thymic Stromal LymphoPoietin</i>
TNF :	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UTR :	<i>UnTranslated Region</i> , Région terminale non codante
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VRS :	Virus Respiratoire Syncytial
VSV :	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

WNV :	<i>West Nile Virus</i>
YFV :	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV :	<i>ZIKa Virus</i>
µg :	Microgramme
µL :	Microlitre
µM :	Micromolaire

TABLE DES MATIERES

But de la thèse	1
Généralités.....	2
I. Les arbovirus.....	2
a. Définition	2
b. Introduction	3
c. Conditions de l'émergence et de la ré-émergence des arbovirus.....	6
d. Modes de transmission des arboviroses	10
e. Physiopathologie	11
f. Manifestations cliniques	12
II. Virus West Nile.....	14
a. Classification et structure.....	15
b. Epidémiologie	17
c. Vecteurs et réservoirs.....	18
d. Réplication du WNV.....	20
III. La peau	22
a. Architecture globale.....	22
b. Cellules de la peau permissives à l'infection par le WNV et les arbovirus	23
c. Réponse antivirale du kératinocyte	24
IV. Les peptides antimicrobiens du kératinocyte	28
a. Introduction	28
b. Propriétés antivirales et immunomodulatrices	30
c. Actualisation des données de la littérature relatives aux propriétés des PAMs synthétisés par le kératinocyte.....	46
Objectifs de la thèse	48
Etude des propriétés antivirales et immunomodulatrices de la cathélicidine humaine et de la bêta-défensine de type 3.....	49
Etude des propriétés antivirales et immunomodulatrices des peptides S100.....	68

I.	Introduction	68
II.	Matériels et méthodes	68
III.	Résultats	71
a.	Cytotoxicité des peptides S100 vis-à-vis des cellules HaCaT	71
b.	Réplication du WNV dans des cellules HaCaT traitées par les peptides S100.....	72
c.	Réplication du WNV dans des cellules HEK surexprimant les peptides S100	74
d.	Effet antiviral direct des peptides S100	76
e.	Evaluation de l'action immunomodulatrice des peptides S100 sur la réponse inflammatoire du kératinocyte induite par le WNV	77
IV.	Discussion	78
	Discussion générale, conclusion et perspectives	81
	Références	85

BUT DE LA THESE

Les arbovirus sont des pathogènes émergents principalement transmis à l'Homme lors du repas sanguin d'un arthropode hématophage. A la suite de l'inoculation, simultanément à la salive anti-coagulante et anti-inflammatoire du vecteur, l'infection débute par la réplication du virus dans les cellules cutanées avant dissémination par voie lymphatique puis virémique à travers l'organisme jusqu'aux organes cibles. Les cellules résidentes de l'épiderme, constitué à 90% de kératinocytes ainsi que celles du derme, ont été montrées permissives à l'infection par de multiples espèces d'arbovirus. En réponse à la réplication virale, elles produisent un large éventail de molécules à activité antivirale dont des peptides antimicrobiens (PAMs). Les PAMs sont des petits peptides, généralement de moins de 50 acides aminés, dotés de propriétés antimicrobiennes à large spectre. Si les propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques et anti-parasitaires des PAMs sont désormais bien connues, leurs activités antivirales restent encore peu étudiées.

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'activité antivirale de PAMs produits par le kératinocyte primaire humain vis-à-vis d'un arbovirus émergent, le virus West Nile (WNV). Le mémoire, qui en découle, comporte une première partie de généralités consacrées aux arbovirus et, plus particulièrement, au WNV, à la peau avec la description de sa structure et de la réponse immunitaire locale, et, enfin, à la réalisation d'un état des connaissances portant sur les propriétés antivirales des PAMs du kératinocyte, ayant servi de base à la rédaction d'une revue de la littérature publiée dans le journal *Viruses* en 2020. La seconde partie est constituée d'un article original décrivant les activités antivirales et immunomodulatrices de deux d'entre eux, la cathélicidine humaine (LL-37) et la bêta-défensine humaine de type 3 (hBD-3). Enfin, d'autres résultats originaux à propos des peptides S100 constituent la troisième partie de ce manuscrit avant un quatrième et dernier chapitre de discussion générale, conclusion et perspectives.

GENERALITES

I. Les arbovirus

a. Définition

La première transmission d'un agent infectieux responsable d'une pathologie humaine par un insecte vecteur a été démontrée en 1878 par Sir Patrick Manson. Il s'agissait de la filaire du genre *Wuchereria bancrofti* dont la larve est inoculée à l'Homme par un moustique du genre *Culex*. En 1881, l'hypothèse de la transmission du pathogène responsable de la fièvre jaune par un moustique a été, à son tour, évoquée par Carlos Finlay, pour n'être finalement démontrée qu'en 1906. A cette date, le Dr James Carroll, appartenant à la commission « Fièvre jaune » de l'US Army, s'était porté volontaire pour subir le repas sanguin d'une femelle *Ae. aegypti* qui s'était nourrie 12 jours plus tôt sur des patients atteints de formes sévères de fièvre jaune. Suite à cette piqûre, le Dr Carroll avait développé une forme sévère non mortelle de fièvre jaune. Le major Walter Reed, chef de cette commission, avait ensuite autorisé le même type de tests sur des personnes volontaires afin de confirmer la transmission du virus par piqûre de moustique. [1, 2] Le concept d'« arbovirus » est né en 1942. Ses inventeurs, Hammon et Reeves, ont émis l'hypothèse que les virus de l'encéphalite de Saint Louis et de l'encéphalite équine de l'Ouest se transmettaient *via* un moustique du genre *Culex*. [1, 3]

Le terme « d'arbovirus » est l'acronyme d'*arthropod-borne virus*. Les arbovirus regroupent des virus appartenant à des familles virales diverses mais ayant un mode de transmission commun constitué par la piqûre, ou la morsure, d'un arthropode hématophage. Les principaux vecteurs des arbovirus sont constitués de différentes espèces de moustiques (*Aedes*, *Culex*), de tiques (*Ixodes*) ou de phlébotomes. [4, 5] Environ 500 espèces d'arbovirus ont été décrites mais un peu plus d'une centaine sont pathogènes pour l'Homme. [4, 5]

b. Introduction

Les arbovirus ont pour caractéristiques structurales communes d'être enveloppés et d'avoir majoritairement pour génome une molécule d'ARN (Acide RiboNucléique). Il s'agit néanmoins d'un groupe hétérogène de virus appartenant à des familles différentes. La famille des *Flaviviridae* constitue un contingent important des arbovirus impliqués en pathologie humaine avec le genre *Flavivirus* dont le virus prototype est le virus de la fièvre jaune (YFV) et qui regroupe également les virus de la dengue (DENV), Zika (ZIKV), West Nile et de l'encéphalite à tique (TBEV pour *tick-borne encephalitis virus*). On retrouve également le genre *Alphavirus* de la famille des *Togaviridae* avec les virus du Chikungunya (CHIKV), de la forêt de Semliki et Mayaro. Enfin, les virus de la fièvre de la vallée du Rift, de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo et Toscana appartiennent à l'ordre des Bunyavirales. D'autres familles sont également représentées parmi les arbovirus dont les *Reoviridae* (Tableau 1). [5]

Tableau 1 : Liste des arbovirus d'importance médicale. Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, 2019

Famille	Genre	Virus	Vecteur principal	Continents/Pays	Symptomatologie
Flaviviridae	<i>Flavivirus</i>	Fièvre jaune	Moustique (<i>Aedes</i>)	Afrique, Amérique du Sud	Syndrome Hépaté Rénal - Fièvre hémorragique
		Dengue	Moustique (<i>Aedes</i>)	Afrique, Asie, Amérique du Sud, Amérique Centrale, Europe	Eruption et arthromyalgies fébriles
		West Nile	Moustique (<i>Culex</i>)	Afrique, Amérique du Nord, Europe, Moyen-Orient	Infections neuro-invasives
		Zika	Moustique (<i>Aedes</i>)	Afrique, Asie, Amériques, Europe	Eruption et arthromyalgies fébriles ; infections neuro-invasives ; syndrome malformatif fœtal
		Encéphalite japonaise	Moustique (<i>Aedes</i>)	Asie	Infections neuro-invasives
		Encéphalite à tiques	Tique (<i>Ixodes</i>)	Europe, Asie	Infections neuro-invasives
		Encéphalite de St Louis	Moustique (<i>Culex</i>)	Amérique du Nord	Infections neuro-invasives
Togaviridae	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya	Moustique (<i>Aedes</i>)	Afrique, Amériques Centrale et du Sud, Asie, Europe	Eruption et arthralgies fébriles
		O'nyong'nyong	Moustique (<i>Anophèles</i>)	Afrique	Eruption et arthralgies fébriles
		Forêt de Semliki	Moustique (<i>Culex, Aedes</i>)	Afrique	Infections neuro-invasives
		Sindbis	Moustique (<i>Culex</i>)	Afrique, Europe, Moyen-Orient, Asie, Australie	Eruption et arthralgies fébriles
		Ross River	Moustique (<i>Culex, Aedes</i>)	Océanie	Eruption et arthralgies fébriles
		Forêt de Barmah	Moustique (<i>Aedes</i>)	Australie	Eruption et arthralgies fébriles
		Mayaro	Moustique (<i>Aedes</i>)	Amérique du Sud	Eruption et arthralgies fébriles
		Virus des encéphalites équine	Moustique (<i>Culex, Aedes</i>)	Amériques	Infections neuro-invasives

Tableau 1 : Liste des arbovirus d'importance médicale. Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, 2019

Famille	Genre	Virus	Vecteur principal	Continents/Pays	Symptomatologie
Peribunyaviridae	<i>Orthobunyavirus</i>	Tahyna	Moustique (<i>Ochlerotatus</i> , <i>Aedes</i>)	Europe	Infections neuro-invasives
		Oropouche	Moustique (<i>Culex</i>)	Amérique du Sud	Infections neuro-invasives
		La Crosse	Moustique (<i>Aedes</i>)	Amérique du Nord	Infections neuro-invasives
Phenuiviridae	<i>Phlebovirus</i>	Fièvre de la vallée du Rift	Moustique (<i>Culex</i> , <i>Aedes</i>)	Afrique, Moyen-Orient	Eruption et arthralgies fébriles
		Fièvre à phlébotomes de Naples	Phlébotome	Afrique du Nord, bassin méditerranéen, Moyen Orient, Asie du Sud Est	Infections neuro-invasives
		Toscana	Phlébotome	Europe	Infections neuro-invasives
		Fièvre sévère avec thrombocytopénie	Tique (<i>Haemaphysalis</i> , <i>Rhipicephalus</i>)	Asie	Fièvre hémorragique
		Heart- land virus	Tique (<i>Amblyomma</i>)	Amérique du Nord	Diarrhée fébrile, thrombocytopénie
Nairoviridae	<i>Orthonairovirus</i>	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo	Tique (<i>Ixodes</i>)	Afrique, Europe, Asie	Fièvre hémorragique
Reoviridae	<i>Coltivirus</i>	Eyach	Tique (<i>Ixodes</i>)	Europe	Eruption et arthralgies fébriles
Rhabdoviridae	<i>Vesiculovirus</i>	Chandipura	Phlébotome	Inde	Infections neuro-invasives
	<i>Vesiculovirus</i>	Isfahan	Phlébotome	Iran	?
	<i>Non assigné</i>	Mossuril	Moustique (<i>Culex</i>)	Mozambique	?

c. Conditions de l'émergence et de la ré-émergence des arbovirus

Certains arbovirus tels que le YFV sont connus pour être impliqués en pathologie humaine depuis plusieurs siècles. Cependant, nous assistons depuis quelques années à une émergence, ou une ré-émergence, de ces virus ce qui pose de sérieux problèmes de santé publique. [5]

La répartition des arboviroses est désormais mondiale (Figure 1). L'augmentation du nombre de cas d'arboviroses au cours des dernières années est liée à la conquête de nouveaux territoires par les différents vecteurs facilitée, notamment, par le réchauffement climatique, la progression de l'urbanisation, l'augmentation des échanges commerciaux internationaux et du tourisme, à l'interruption des programmes de lutte contre les vecteurs liée à une instabilité géopolitique ou économique croissante dans certains pays, ou encore à la variabilité génétique intrinsèque propre aux virus à ARN. [1, 4, 5]

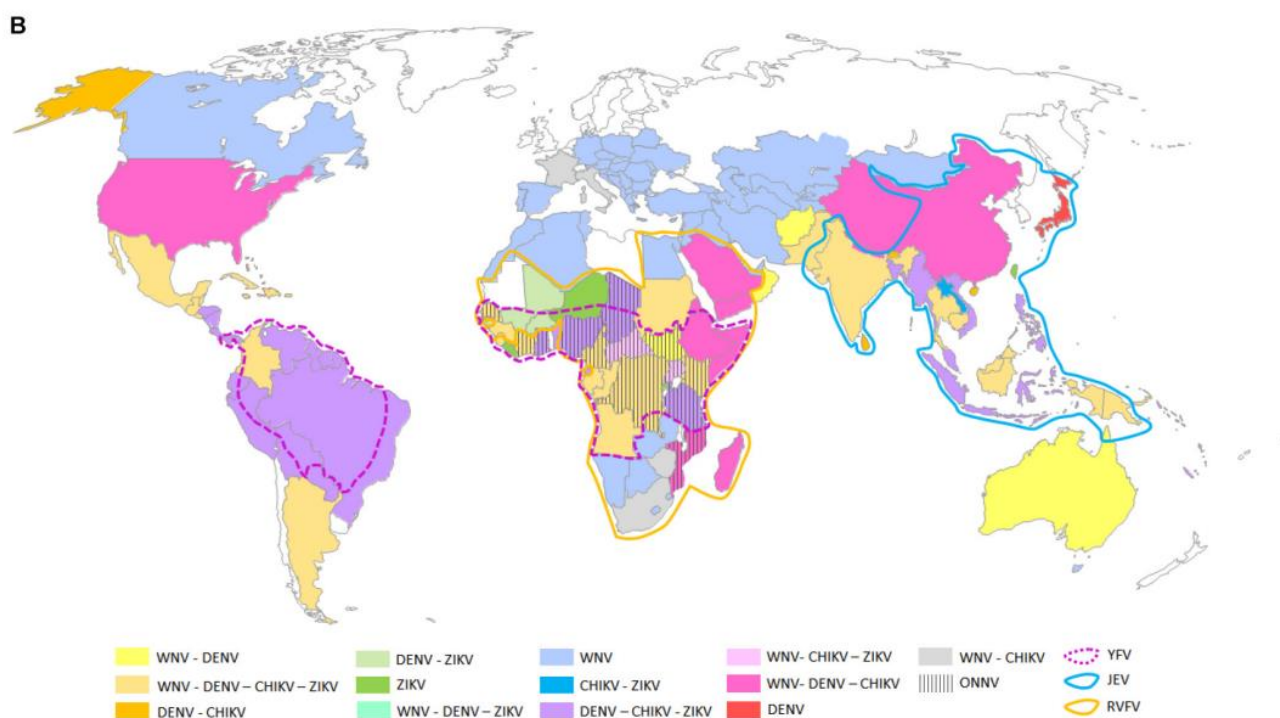


Figure 1 : Répartition mondiale de différents arbovirus d'importance médicale. (Viglietta *et al*, 2021)

La répartition géographique des cas d'arboviroses dépend de celle du vecteur. La conquête du continent sud-américain par le YFV aurait ainsi eu lieu entre le XV^e et le XVII^e siècle, le moustique *Ae. aegypti* ayant migré d'Afrique vers le continent américain au moment

de la traite des Noirs. [2] Le climat est un élément déterminant dans l'adaptation des vecteurs à de nouveaux territoires et a, de fait, un impact sur la prévalence des cas d'arboviroses. Dans les zones au climat tropical, le cycle de reproduction du moustique est raccourci favorisant la propagation des arbovirus. *A contrario*, pour chaque vecteur, il existe une température limite en-deçà de laquelle il lui est impossible de se multiplier. [1] Nous pouvons prendre pour exemple la fièvre hémorragique Crimée Congo transmise par la morsure de la tique *Hyalomma marginatum*. Une température supérieure à 15°C et une humidité suffisante sont nécessaires au développement des nymphes. On constate ainsi une augmentation du nombre de cas en Turquie, Iran et Bulgarie, pendant les saisons où les conditions climatiques sont favorables à la reproduction des tiques. [6] De même, les cas de TBE sont en augmentation en Suède où l'association d'hivers plus doux et de printemps plus précoces favoriserait la reproduction de la tique vecteur du genre *Ixodes*. [6] Enfin, le risque d'épidémie d'encéphalites provoquées par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) est plus élevé dès que la température se situe au-delà de 25°C alors que le nombre de cas diminue fortement en deçà de 20°C. On peut donc affirmer que les conditions de température sont intimement corrélées à la densité des moustiques vecteurs. [6]

Le changement climatique a aussi un impact sur l'épidémiologie des arbovirus. Il a permis à certains vecteurs, tels qu'*Ae. albopictus* ou moustique tigre, de conquérir de nouveaux territoires dans des régions tempérées. En effet, ce moustique originaire des zones tropicales et inter-tropicales d'Asie du Sud-Est s'est propagé à la surface du globe au cours des dernières décennies. Il a été détecté pour la première fois en Europe, en Albanie, en 1979 puis s'est installé progressivement dans d'autres pays européens comme l'Italie en 1991 et la France en l'an 2000 (Figures 2 et 3). [7, 8] Le moustique tigre est alors capable d'assurer la transmission locale de certains arbovirus comme le DENV, le ZIKV ou le CHIKV au sein de ces nouvelles aires géographiques. Ce phénomène est entre autre lié à la capacité pour les œufs de ce moustique de rentrer dans un état de diapause de la saison automnale à la saison printanière, résistants ainsi à nos températures hivernales et reprenant un développement dès le retour de températures plus clémentes. Cette conquête de nouveaux territoires par le vecteur, conjuguée à l'intensification du tourisme international, a favorisé l'apparition de cas autochtones d'arboviroses habituellement limitées aux régions tropicales. Le retour en zone tempérée, en période de circulation d'*Ae. albopictus*, d'une personne infectée en zone d'endémie par l'un de ces virus a été à l'origine de cas de Chikungunya à Montpellier et de dengue en région Provence-Alpes-Côte d'Azur. [4]

L'influence de la conquête de nouveaux territoires par l'Homme et de la déforestation sur le nombre de cas d'infections par le JEV a également été démontrée. En effet, en Asie, la déforestation au profit du développement de rizières permet au vecteur de se multiplier et de se disséminer plus facilement en raison de l'augmentation du nombre de gîtes larvaires. [6]

Le développement du commerce international a également un impact sur l'émergence des cas d'arboviroses. Par exemple, le transport de pneus usagés, qui constituent des gîtes larvaires lorsqu'ils sont remplis d'eau, a permis l'arrivée de nouveaux vecteurs sur des territoires non colonisés jusqu'à présent. [5]

La situation géopolitique d'une région peut également avoir un impact sur la transmission des arbovirus. En effet, en cas de crise économique ou politique, les services publics fonctionnent de façon dégradée et les moyens pour la lutte anti-vectorielle ne sont pas forcément maintenus. Ainsi, ces contextes peuvent favoriser la multiplication des moustiques et donc l'émergence des arboviroses. [5]

Enfin, la plasticité génétique des virus à ARN favorise également l'émergence ou la ré-émergence des arbovirus. Ainsi, le CHIKV était historiquement endémique en Afrique et en Asie du Sud-Ouest avec comme vecteur *Ae. aegypti*. En 2005, une épidémie inattendue de CHIKV s'est produite sur l'île de la Réunion. Une substitution sur le gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E1 (A226V) a été mise en évidence sur la souche responsable de cette épidémie. Cette mutation a permis au virus d'infecter un nouveau vecteur, *Ae. albopictus*, lui permettant ainsi de conquérir des contrées inconnues jusque-là. [1]

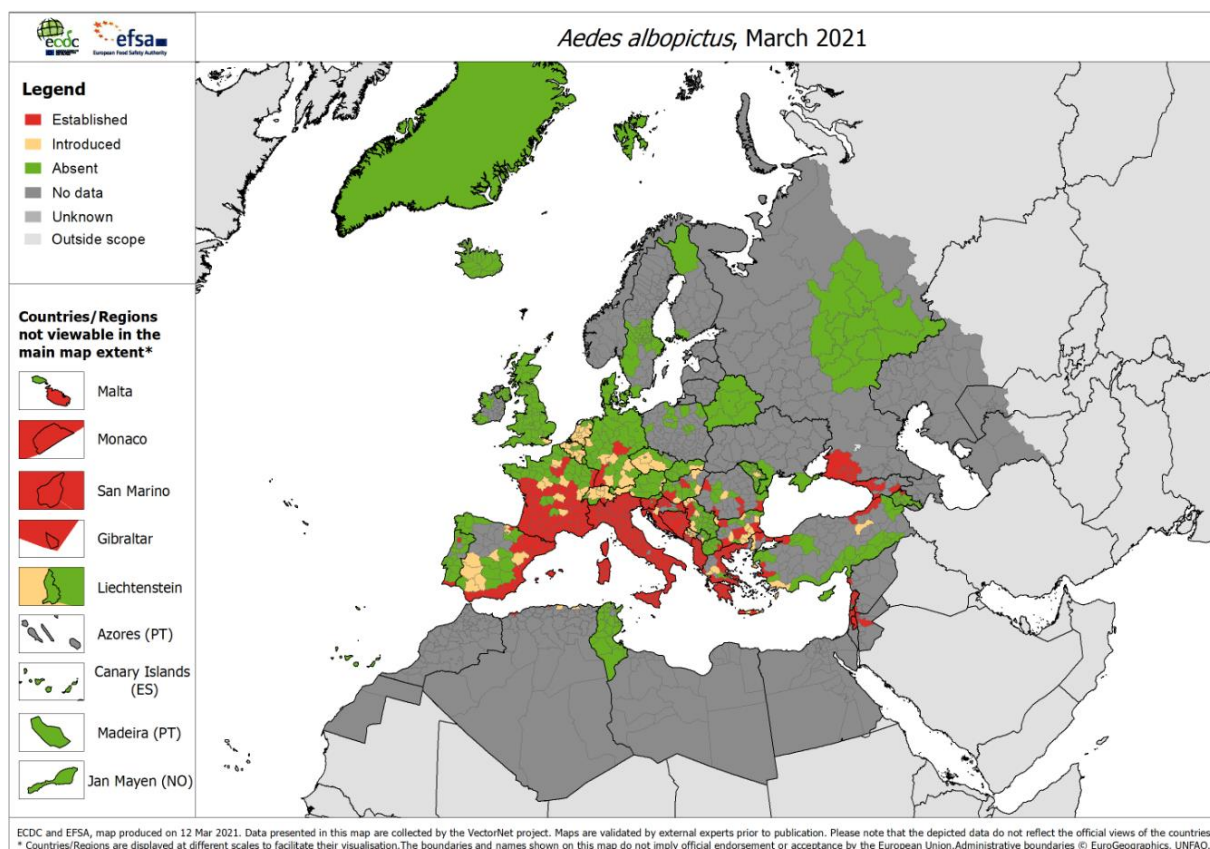


Figure 2 : Répartition d'*Ae. albopictus* en Europe au 31 mars 2021. (Données de l'ECDC)

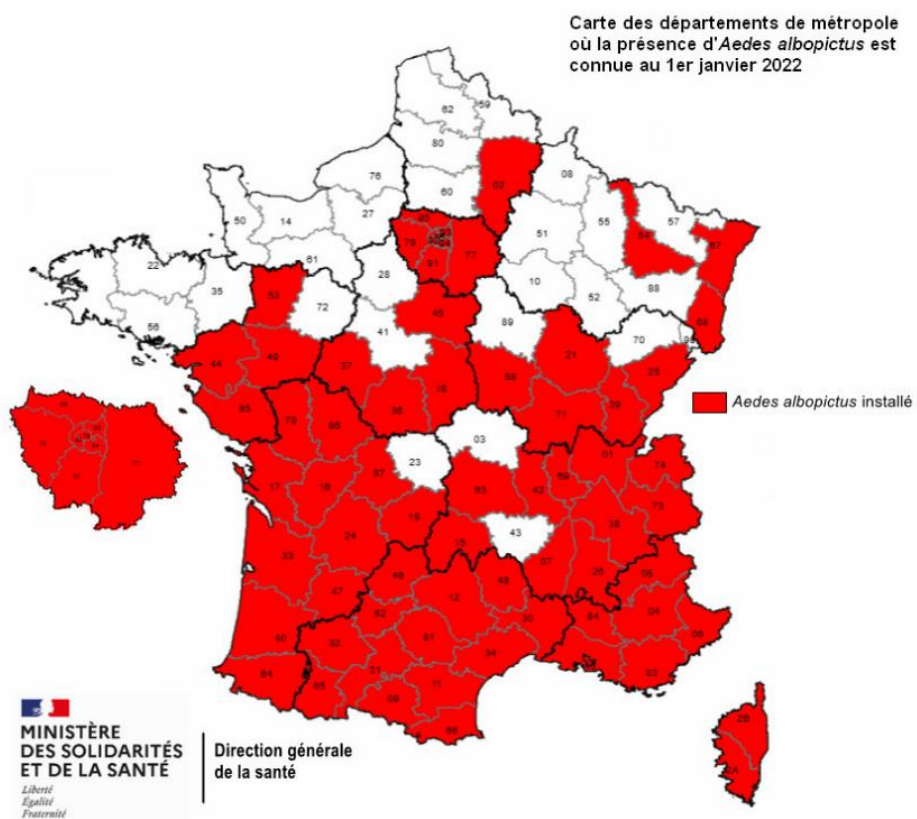


Figure 3 : Répartition d'*Ae. albopictus* dans les départements métropolitains français. Carte du Ministère des solidarités et de la santé établie le 1^{er} janvier 2022.

d. Modes de transmission des arboviroses

1. Infection de l'arthropode hématophage

La contamination de l'arthropode peut se produire de deux façons. Le principal mode d'infection du vecteur se fait lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Le virus va alors se répliquer dans le tube digestif de l'insecte avant de gagner les glandes salivaires où il est présent à des titres infectieux très élevés après 7 à 14 jours. [9-12] Le virus peut aussi se transmettre de façon verticale, passant de la femelle arthropode infectée à ses œufs. Des larves et des moustiques mâles peuvent ainsi être infectés par des arbovirus. Ceci permet le maintien du virus au sein des populations d'arthropodes, d'une saison estivale à une autre du fait du phénomène de diapause, malgré l'interruption de développement liée à la période hivernale. [4]

2. Transmission à l'Homme

Les arboviroses sont principalement des zoonoses, c'est-à-dire à réservoir animal. Le cycle naturel de transmission du virus se déroule entre son hôte animal et son vecteur arthropode (Figure 4). Il s'agit du cycle enzootique, ou sylatique. L'Homme est alors un hôte accidentel contaminé par sa proximité avec le réservoir animal, qu'il soit sauvage (oiseaux, primates non humains...) ou domestique (porc principalement). Deux cas de figure apparaissent alors. Pour certains virus, il arrive que la virémie soit assez élevée chez l'Homme pour qu'un nouveau vecteur venant prendre son repas sanguin puisse se contaminer. La transmission à un autre être humain par le vecteur peut ensuite se faire sans nouvelle intervention du réservoir animal, déclenchant un cycle dit « urbain ». En revanche, si la virémie chez l'Homme est trop faible pour infecter un nouveau vecteur, le cycle de transmission n'est pas entretenu et l'Homme représente un cul de sac épidémiologique pour le virus (Figure 4). [1, 5] Ceci est le cas du virus WNV qui sera abordé un peu plus loin dans ce manuscrit. Enfin, le cycle de transmission de certains arbovirus, tels que le DENV, peut se faire sans l'intervention d'un réservoir animal autre que l'Homme. Les individus virémiques entretiennent, en milieu urbain, la circulation du virus en contaminant des moustiques

anthropophiles lors du repas sanguin, qui se chargeront ensuite de la transmission à d'autres individus.

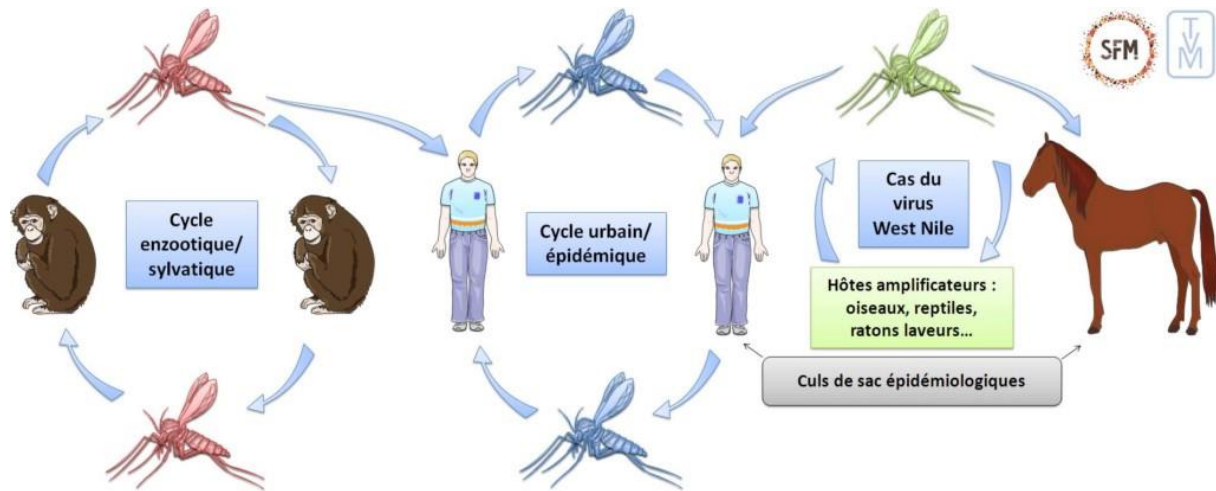


Figure 4 : Cycle de transmission des arbovirus. Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, 2019

Si la transmission des arbovirus est principalement vectorielle, d'autres modes de transmission existent comme la transmission par transfusion de produits sanguins labiles ou le don d'organe, la transmission materno-fœtale (sang, sécrétion génitales, lait maternel) ou la transmission alimentaire décrite pour le TBEV *via* le lait non pasteurisé. Il a également été démontré une transmission sexuelle pour le ZIKV avec une excrétion dans le sperme pouvant persister plusieurs mois après l'infection aiguë. [5]

e. Physiopathologie

L'arthropode vecteur est un acteur crucial dans la transmission des arbovirus à l'Homme. Il permet au virus de se répliquer et assure, de ce fait, un rôle d'amplificateur de la charge virale avant inoculation à l'Homme. En effet, le virus, ingéré lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté (Homme ou animal) décrivant une virémie suffisante, va se répliquer au niveau du tube digestif du vecteur puis se disséminer vers des sites de multiplication secondaires, dont les glandes salivaires. A l'occasion d'un nouveau repas sanguin, le virus est injecté par le vecteur simultanément à sa salive anticoagulante majoritairement dans le compartiment extravasculaire de l'épiderme et du derme d'un nouvel hôte. [4] La dose de virus inoculée par un moustique au cours de l'infection naturelle n'est pas précisément connue

mais est vraisemblablement comprise entre 10^3 et 10^5 PFU (*Plaque-Forming Units*) en fonction du virus et du vecteur. [13, 14]

A la suite de la piqûre/morsure du vecteur, une réplication virale active peut être détectée au site d'inoculation dès le premier jour de l'infection. [15] Les cellules résidentes de la peau, kératinocytes de l'épiderme, fibroblastes et cellules dendritiques du derme, constituent les premières cellules infectées par le virus. [16, 17] Il est à noter que les protéines contenues dans la salive du moustique jouent un rôle important dans l'invasion virale en perturbant la réponse immunitaire innée et notamment les niveaux de production en cytokines pro-inflammatoires provoquant une immunosuppression locale facilitant la réplication et la dissémination du virus. [18, 19] Le virus va ensuite gagner les ganglions lymphatiques adjacents, soit sous la forme de particules virales libres, soit transporté par les cellules de Langerhans de l'épiderme ou les cellules dendritiques migratrices du derme. [13, 19-21] A ce niveau, les macrophages du plancher du sinus sous-cortical et de la médullaire capturent très efficacement les particules virales, servant de site d'amplification de la charge virale. [20] Les macrophages permettent également d'activer efficacement l'immunité innée et adaptative. Les virus produits sont ensuite véhiculés par la lymphe et évacués par le canal lymphatique efférent vers les vaisseaux sanguins provoquant une première phase virémique permettant au virus d'infecter les monocytes circulants, boucle d'amplification à l'origine d'une seconde virémie facilitant l'atteinte de différents organes cibles tels que le système nerveux central ou le tissu hépatique. Il est à noter que la virémie secondaire induite par la réplication virale au sein des monocytes est plus importante que la virémie primaire. Au total, le temps de détection du virus dans le sang est assez court, allant classiquement jusqu'à 5 à 7 jours après le début des signes cliniques. [5, 22]

f. Manifestations cliniques

Lors d'une infection par un arbovirus, l'incubation est généralement courte, de 1 à 12 jours. La plupart des infections sont asymptomatiques, notamment la dengue qui l'est dans 90% des cas. En revanche, plus rarement, certaines sont plus fréquemment symptomatiques qu'asymptomatiques telles que la fièvre jaune ou le chikungunya. Les manifestations cliniques liées aux arbovirus sont très hétérogènes et les arboviroses sont classiquement regroupées en 3 grands syndromes : celles responsables d'éruptions cutanées, associées ou non à des algies fébriles (myalgies, arthralgies), celles à l'origine d'infections neuro-invasives (méningites, méningo-encéphalites) ou enfin celles provoquant des fièvres hémorragiques. [5]

Les arboviroses représentent, dans le monde, un quart des décès liés à des causes infectieuses, la dengue représentant à elle seule la deuxième maladie tropicale dans le monde. [4]

1. Les arbovirus responsables de syndromes cutanés algiques

Le premier exemple est celui du virus de la dengue. Après une incubation de 3 à 14 jours, la personne infectée peut présenter des nausées, des céphalées, de la fièvre, un rash cutané et des douleurs musculaires ou articulaires. Le second virus responsable d'éruptions cutanées est le CHIKV. Après une phase d'incubation courte de 3 à 10 jours, le tableau clinique regroupe une fièvre supérieure à 39°C accompagnée de céphalées, d'un érythème maculo-papuleux, d'une asthénie, parfois de douleurs abdominales, de diarrhées, d'arthralgie ou d'arthrites, et de douleurs musculaires. Les polyarthralgies au niveau des petites articulations sont quasiment constantes. Les arthrites sont un signe extrêmement fréquent au moment de la phase aiguë et disparaissent en quelques jours dans la plupart des cas. L'infection est généralement spontanément résolutive avec une phase de convalescence qui peut durer 3 semaines. Cependant, une atteinte chronique post-infection par le virus du Chikungunya a été décrite dans certains cas. Elle est caractérisée par des troubles polymorphes et, notamment, des polyarthralgies au-delà du 90^e jour de la maladie. [5]

2. Les arbovirus responsables de syndromes neuro-méningés

Les arbovirus à tropisme neurologique appartiennent principalement aux familles des *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae* et *Phenuiviridae*. [23]

La majorité des infections par des arbovirus neurotropes demeurent asymptomatiques. Cependant, environ la moitié des patients symptomatiques développe un syndrome pseudo-grippal qui va se compliquer d'une atteinte neuro-invasive. De plus, 50 à 70% des personnes ayant eu une atteinte neurologique en garderont des séquelles susceptibles de s'aggraver dans le temps. [23]

WNV et ZIKV sont principalement responsables d'un syndrome pseudo-grippal. Les atteintes neurologiques n'apparaissent que dans 0,6% des cas et peuvent se manifester sous la forme de méningite, encéphalite, paralysie et troubles de la mémoire. De plus, l'infection par

ces virus peut présenter des complications neurologiques post-infectieuses immédiates, comme un syndrome de Guillain-Barré (ZIKV), ou tardives telles que des séquelles neurologiques qui s'aggravent dans le temps. [23]

Le CHIKV, classiquement associé à un syndrome fébrile avec rash cutané et arthralgies, peut occasionnellement provoquer une atteinte neurologique. Les complications neurologiques sont représentées par des convulsions, un syndrome de Guillain-Barré, des atteintes des nerfs des paires crâniennes, des myélites, des cas d'encéphalopathies ou de méningo-encéphalites. [23]

3. Les arbovirus responsables de fièvres hémorragiques

Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo appartient à l'ordre des *Bunyavirales* et au genre *Orthonairovirus*. L'infection provoque une fièvre importante accompagnée de douleurs et de troubles digestifs (nausées, vomissements) qui apparaissent dans les quatre jours suivant le début des symptômes. La maladie peut ensuite évoluer sous la forme d'hémorragies cutanéomuqueuses et digestives qui conduisent au décès du patient dans 10 à 40% des cas.

La dengue, dans ses formes sévères, est également à l'origine d'une fièvre hémorragique. [5] Après 3 à 7 jours, le tableau clinique initial de dengue bénigne, tel que décrit précédemment, peut évoluer vers une dengue sévère, qui va se manifester par des douleurs abdominales importantes, des vomissements persistants, des hémorragies sous-cutanées et des muqueuses, ou des difficultés respiratoires. Sans traitement symptomatique, l'évolution de la dengue hémorragique peut être fatale du fait d'un choc hypovolémique résultant de la fuite plasmatique. [5, 24]

II. Virus West Nile

Le WNV a été utilisé comme modèle viral tout au long des expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail. La présence en Camargue de cet agent pathogène, identifié depuis le début des années 1960, son caractère émergent en France, en Europe et sur tout le pourtour du bassin méditerranéen, ses propriétés neuro-invasives à l'origine de cas d'encéphalites, et le peu de connaissances des étapes initiales de l'infection, constituées par les interactions entre les cellules résidentes de la peau et le virus, ont constitué les raisons de ce choix.

a. Classification et structure

Le WNV appartient à la famille des *Flaviviridae* qui comprend quatre genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* et *Pegivirus*. [25] Le genre *Flavivirus*, auquel appartient le WNV, rassemble environ 70 espèces. [26] Ces espèces étaient initialement regroupées en 8 sérogroupes : encéphalite à tique, Rio Bravo, JEV, Tyulenyi, Uganda S, Ntaya, DENV et Modoc. [27] Le WNV fait partie du séro groupe du JEV. [26] En fonction de la séquence génétique codant les protéines d'enveloppe, l'espèce WNV est elle-même subdivisée en quatre lignages dont les principaux impliqués en pathologie humaine sont les lignages 1 et 2. [28, 29] Les souches appartenant au lignage 1 sont isolées en Afrique Centrale et du Nord, en Amérique Centrale et du Nord, en Australie (virus de Kunjin : souche de WNV avec une virulence naturellement atténuée, qui n'engendrait pas de cas d'encéphalite équine jusqu'à une épidémie en 2011 [30]), en Europe, en Inde, en Israël, en Colombie et en Argentine. Les espèces du lignage 2 sont enzootiques à Madagascar et, en Afrique Australe et Centrale. [31] Mais depuis les années 2000, nous assistons à une émergence de ce lignage en Europe. [32]

Les particules virales sont de petite taille, environ 50 nm de diamètre, enveloppées, avec une capsid de symétrie icosaédrique. [33] Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 kb. Cet ARN est composé d'un seul cadre ouvert de lecture codant trois protéines structurales, constitutives de la capsid (protéine C) et de l'enveloppe (prM/M et E) virales, et sept protéines non structurales nécessaires aux étapes de traduction et de réplication du génome viral. NS1, dans sa forme intracellulaire, est indispensable à la réplication du virus. Dans sa forme extracellulaire, elle participe à l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B forment le complexe de réplication. La protéine NS3 assure les fonctions de protéase et d'hélicase. Enfin, NS5 est une ARN polymérase-ARN dépendante ainsi qu'une méthyltransférase. [33-35] Les régions non codantes (UTR pour *UnTranslated Region*) en positions 5' et 3' ont une importance majeure dans le cycle de réplication du virus. En effet, ces régions présentent des structures secondaires (tiges-boucles) très conservées qui permettent des interactions ARN-ARN, entraînant ainsi la circularisation de l'ARN viral et la réplication du génome. L'ARN génomique présente une coiffe dans la région 5' UTR, à l'instar des ARNm cellulaires, qui le protège de l'action des 5' exoribonucléases de la cellule hôte, permet l'initiation de la traduction et l'échappement à la réponse immunitaire innée

médiée par le récepteur cytosolique MDA5 (*Melanoma-Differentiation-Associated gene 5*) dont nous reparlerons un peu plus loin. [36] (Figure 5 et 6).

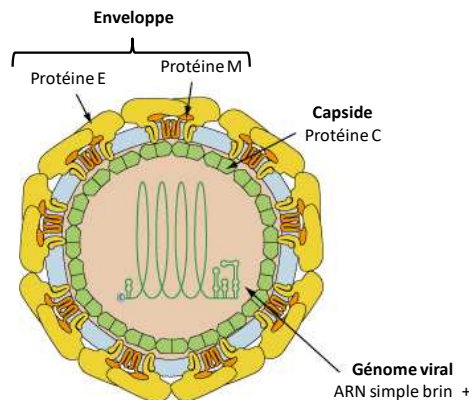


Figure 5 : Structure d'un virion du genre *Flavivirus* (adapté de ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://viralzone.expasy.org>) Le virus West Nile est un virus enveloppé comportant deux glycoprotéines d'enveloppe E et M intervenant dans l'attachement à la cellule cible. A l'intérieur de la particule virale, se trouve la protéine C constituant la capsid qui renferme le génome viral formé par un brin d'ARN de polarité positive.

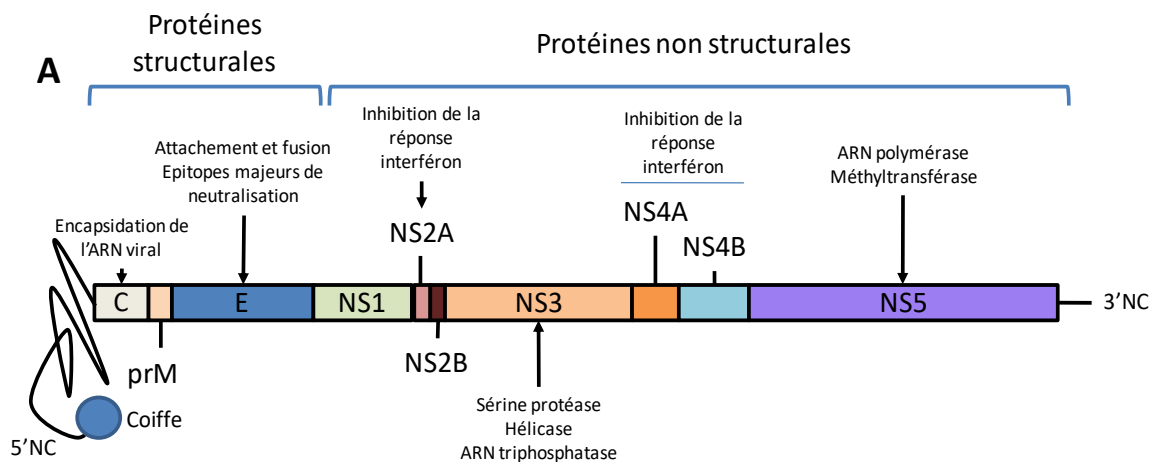


Figure 6 : Schéma du génome du virus West Nile. Le virus West Nile est un virus à ARN simple brin de polarité positive. L'ARN comprend un seul cadre ouvert de lecture codant, en 5', les trois protéines structurales (protéine de capsid (C), protéines d'enveloppe (prM/M et E)), puis les sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Le génome viral comporte une coiffe à l'extrémité de la région 5' et également des structures secondaires très conservées en 5' et 3' UTR permettant des interactions ARN-ARN.

b. Epidémiologie

Le virus du Nil Occidental, ou virus West Nile, a été isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda, dans le district West Nile, chez une femme présentant une fièvre inexplicable. [37] Il a été ensuite retrouvé dans différentes régions d'Afrique (Egypte), du Moyen-Orient (Israël), d'Asie et d'Australie où il est désormais considéré comme endémique. [38]

A partir des années 1990, l'épidémiologie de l'infection par le WNV change du fait l'émergence du virus en Europe de l'Est, émergence associée à une augmentation des complications neurologiques constatées lors de l'infection. En 1999, le WNV est introduit sur le continent nord-américain, à New-York d'abord, puis, en moins de dix ans, dans 48 états des Etats-Unis et dans certaines régions du Canada, du Mexique, des Caraïbes, jusqu'en Amérique du Sud. [38]

Les premiers cas confirmés d'infection à WNV en France remontent à 1962. Depuis, quelques épizooties ont eu lieu sur le territoire français métropolitain pouvant parfois être à l'origine de cas humains. L'année 2018 a été particulièrement marquée par les cas d'infection à WNV en France, avec 25 cas rapportés, ainsi qu'en Europe, avec 2 083 infections décrites, soit davantage que l'ensemble des cas déclarés au cours des 7 années précédentes (1 832 cas de 2011 à 2017). [39] En 2019, 2 cas autochtones ont été rapportés dans le département du Var, dont une forme neuro-invasive. Il n'y a plus eu de cas humain décrit depuis cette date. [40-43]

En 2020, selon les dernières données épidémiologiques connues, il y a eu 336 cas d'infections par le WNV rapportés par 8 pays européens. 94 % étaient autochtones ; 38% ont conduit au décès du patient. La majorité de ces cas a été rapportée par la Grèce et l'Espagne, respectivement 43% et 23%. [42] Depuis les années 2000, nous assistons à l'émergence du lignage 2 en Europe qui est maintenant majoritaire dans cette région du monde. [32, 44]

Les cas humains apparaissent généralement dans les pays tempérés entre le milieu et la fin de l'été, concomitamment à la circulation des moustiques vecteurs. [45]

Les infections à WNV sont majoritairement asymptomatiques (80%) ou se manifestent sous la forme d'un syndrome pseudo-grippal, la fièvre du Nil Occidental (20%). Après 2 à 14 jours d'incubation, l'infection est caractérisée par l'apparition d'une fièvre accompagnée de myalgies, d'arthralgies, de céphalées, de troubles digestifs, d'une asthénie, d'une éruption cutanée et d'adénopathies. Cependant, il existe des formes graves de l'infection caractérisées par un tableau d'encéphalite, de méningite ou de paralysie flasque aiguë (0,6%). Les

personnes de plus de 50 ans et les immunodéprimés sont les plus susceptibles de développer une forme grave. [22, 38]

Depuis 1999, l'introduction du virus dans les populations humaines et animales naïves du continent américain a entraîné une augmentation du nombre de cas et de la sévérité de l'infection. Entre 1999 et 2013, 17 000 cas de complications neurologiques (méningites ou encéphalites) ont été rapportés aux Etats-Unis, ainsi que 1600 décès. [35, 38] Le WNV constitue désormais la première cause d'encéphalite épidémique aux Etats-Unis. [46]

c. Vecteurs et réservoirs

Le WNV est transmis par les moustiques du genre *Culex*, notamment *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* et *C. tarsalis*. Dans la nature, le cycle se fait entre l'hôte aviaire, les oiseaux migrateurs constituant le réservoir du WNV, et le moustique vecteur. La femelle moustique hématophage se contamine en prélevant le sang d'un oiseau infecté pour se nourrir. Le virus se multiplie ensuite dans le tube digestif du moustique et migre jusqu'aux glandes salivaires de l'insecte. Lors des repas sanguins suivants, le moustique pourra ainsi transmettre le virus à un oiseau sain, *via* la salive contaminée (Figure 7). [35]

La plupart des espèces aviaires peuvent être infectées par le virus mais toutes ne vont pas développer l'atteinte neurologique qui conduira ensuite à la mort de l'animal. Lors de l'émergence du virus sur le continent nord-américain, le WNV a entraîné des épizooties chez des oiseaux domestiques et des oiseaux sauvages en captivité (Canada, USA). En Europe, des cas d'atteinte neurologique chez des oiseaux sauvages ont également été rapportés. [31]

Le maintien du virus dans la population de moustiques se fait aussi de façon verticale, par transmission de la femelle aux œufs (Figure 7). [35]

Un moustique infecté peut également transmettre le virus à un hôte humain ou à un autre mammifère. Il s'agit alors d'hôtes accidentels représentant un cul-de-sac pour le virus. En effet, la virémie induite lors de l'infection chez les mammifères n'est pas suffisante pour réinfecter un moustique lors d'un repas sanguin ultérieur et renouveler le cycle (Figure 7). [35]

Un des hôtes mammifères le plus sensible à l'infection par le virus est le cheval. L'incubation chez l'hôte équin est comprise entre 3 et 15 jours. La plupart des équidés infectés sont asymptomatiques mais ceux qui développent la maladie présentent une ataxie plus ou moins sévère, accompagnée de fièvre, de douleurs musculaires et d'une atteinte des

nerfs crâniens. L'infection est fatale dans un cas sur trois. [31] En France, les chevaux servent de sentinelles pour la mise en évidence de la circulation du virus. En effet, une surveillance saisonnière et régionale des équidés a été mise en place dans le sud de la France suite à l'épizootie de 2000. Elle est basée sur la déclaration obligatoire des encéphalites équine et sur la recherche du WNV chez les chevaux infectés. [47]

Le virus peut également se transmettre d'Homme à Homme par contact direct avec des fluides ou des tissus contaminés. Un nombre réduit d'infections humaines se sont produites après transfusion sanguine, transplantation d'organe ou allaitement maternel (Figure 7). [38]

Des cas d'infections acquises au laboratoire, lors de la manipulation du virus, ont également été décrits. En effet, le WNV est un agent biologique pathogène du groupe 3, c'est-à-dire pouvant provoquer une maladie grave chez l'Homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs. Jusqu'en 2020, le WNV nécessitait une manipulation en laboratoire sécurisé de type NSB3 (Niveau de Sécurité Biologique 3). Ceci a été revu et il est maintenant possible de le manipuler en laboratoire sécurisé de type NSB2. [31, 38, 48, 49]

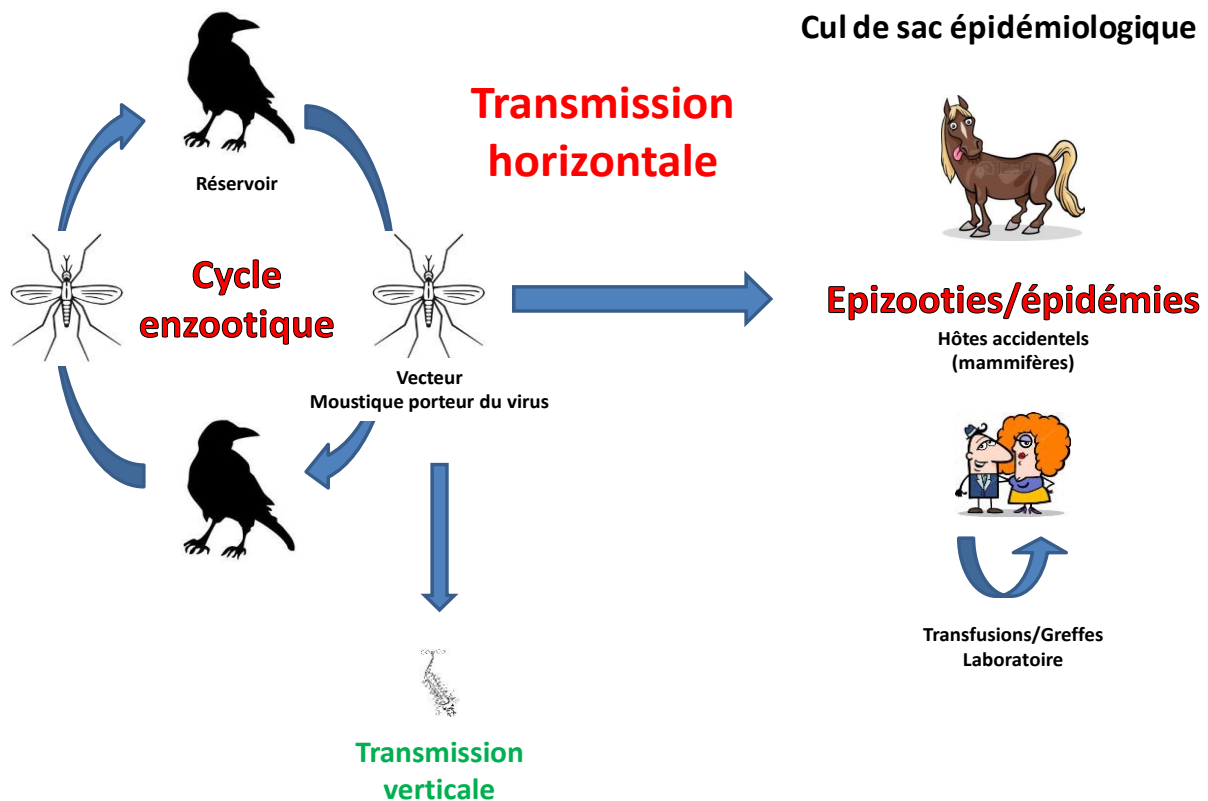


Figure 7 : Cycle de transmission du virus West Nile.

d. Réplication du WNV

Le cycle de réplication du WNV débute par la liaison du virus à son récepteur à la surface de la cellule cible grâce aux glycoprotéines de l'enveloppe. Le récepteur du WNV n'est pas précisément connu mais plusieurs candidats cellulaires tels que le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin) et les protéines TIM (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain) et TAM (TYRO3, AXL and the MER) ont été décrits comme impliqués dans l'attachement du virus à la surface cellulaire. [50, 51] Après internalisation du virus par endocytose médiée par le récepteur, vraisemblablement dépendante des puits tapissés de clathrine, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane de l'endosome à pH acide libérant la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire. La décapsidation intervient alors, permettant la traduction et la réplication de l'ARN viral au niveau d'usines de réplication constituées par un réarrangement des membranes cellulaires, et plus particulièrement des membranes péri-nucléaires et du réticulum endoplasmique (RE). [33] La réplication du génome viral débute par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative, formant avec l'ARN génomique une forme répllicative double-brin. [36] Le brin d'ARN de polarité négative ainsi synthétisé sert à son tour de matrice à la synthèse simultanée de multiples brins d'ARN génomique de polarité positive, constituant des intermédiaires de réplication partiellement bicaténaires. Formes répliquatives et intermédiaires de réplication constituent les principaux motifs moléculaires viraux, ou PAMPs pour *Pathogen associated Molecular Patterns*, reconnus par les senseurs cellulaires puis à l'origine de la réponse immunitaire innée qui seront décrits un peu plus loin dans ce manuscrit. Assemblage et bourgeonnement des virions néosynthétisés se produisent ensuite au niveau du RE avant libération dans le milieu extracellulaire par exocytose (Figure 8). [52]

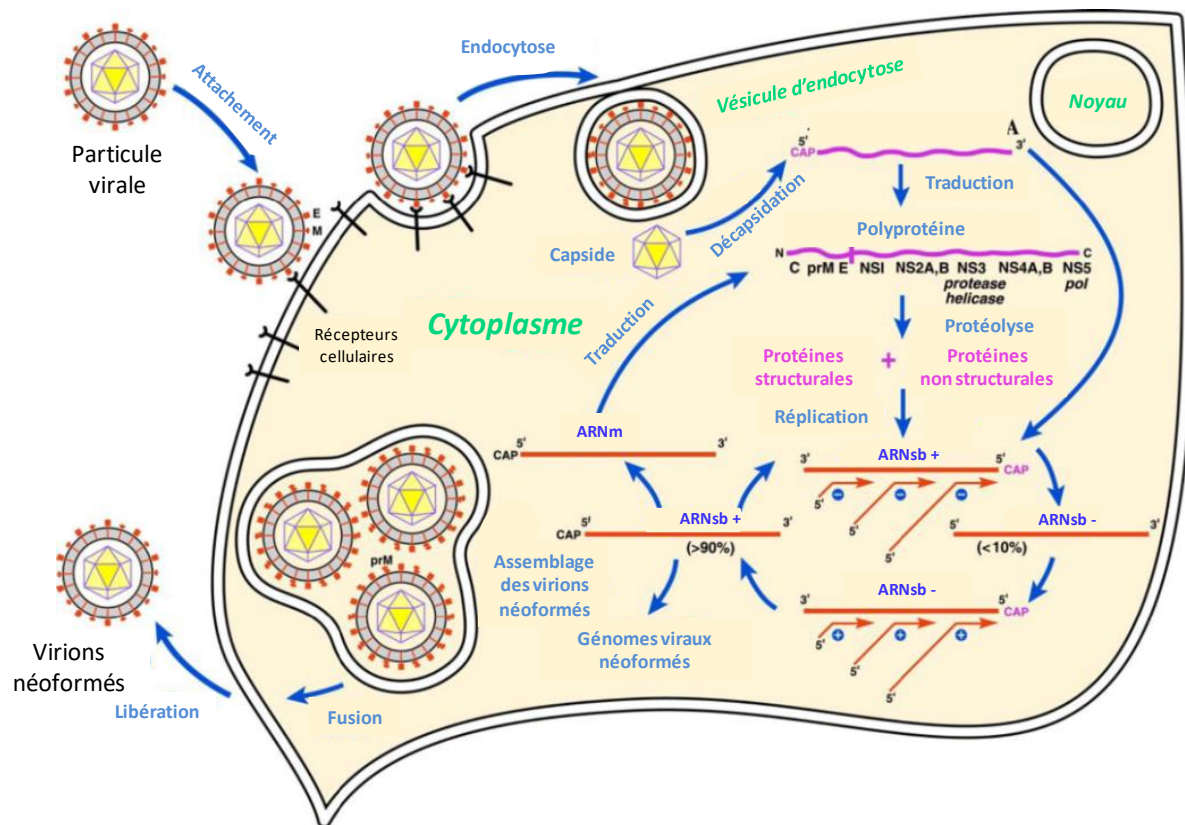


Figure 8 : Cycle de réplication du virus West Nile (adapté de Samuel, 2002). Le cycle de réplication du WNV débute par son attachement au récepteur cellulaire *via* ses glycoprotéines d'enveloppe. La particule virale pénètre alors dans la cellule par endocytose. La réplication virale est ensuite intra-cytoplasmique. L'ARN viral est soit directement traduit en protéines, soit sert de matrice à la fabrication des génomes des futurs virions. Lors de cette étape, il y a formation d'ARN double brin qui sont les éléments reconnus par les récepteurs intracellulaires qui permettent l'activation de la réponse immunitaire innée. Enfin, l'assemblage des particules virales se déroule au niveau du reticulum endoplasmique et les virions néoformés sont libérés par exocytose.

Lors de l'infection, le WNV est inoculé dans le derme et l'épiderme de l'hôte par le moustique vecteur. La peau constitue donc le premier tissu infecté par le virus chez l'Homme. Cette peau joue alors un rôle ambivalent, à la fois porte d'entrée du virus et site initial de réplication, et premier rempart de défense de l'organisme contre l'infection.

III. La peau

a. Architecture globale

La peau est l'organe le plus important du corps humain, elle constitue environ 15 % du poids total du corps et a une surface d'environ 1,8 m². Elle possède une fonction « barrière » sur le plan physique, chimique, microbiologique et immunologique essentielle pour l'organisme humain. [53-55] Son rôle de barrière immunologique lui confère un rôle en première ligne dans la défense de l'organisme face aux agressions externes. Elle assure également d'autres fonctions telles qu'une protection contre les forces mécaniques, l'irradiation solaire, la pénétration de substances chimiques ou de pathogènes. [54] Elle permet la régulation de la température du corps humain. [56] Enfin, la peau participe au métabolisme global de l'organisme car elle est capable de synthétiser des hormones, des neurotransmetteurs, de la sérotonine, de l'histamine ou encore des vitamines. [57, 58]

Il s'agit d'un organe complexe composé de trois couches qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 9). L'hypoderme est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé, constitué majoritairement par les adipocytes. Le derme est un tissu conjonctif composé de fibres de collagène, de fibronectine et de fibres élastiques. Ce compartiment hétérogène regroupe une grande diversité de cellules immunitaires, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4⁺ helper, des lymphocytes $\gamma\delta$, des lymphocytes *Natural Killer* (NK), des macrophages et des mastocytes, ainsi que des fibroblastes. Dans ce compartiment, se trouvent également les vaisseaux sanguins et lymphatiques de la peau et l'innervation cutanée. [59] Des structures annexes sont également présentes telles que les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les follicules pileux (Figure 9). [53, 60]

L'épiderme est un épithélium pluristratifié, pavimenteux, kératinisé, composé à plus de 90% par les kératinocytes. Il héberge également les mélanocytes, des cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans, quelques lymphocytes T) et les cellules de Merkel. [59, 60]

Il est non vascularisé mais innervé. Il se divise en quatre couches : la plus profonde est la couche basale où se trouvent les kératinocytes indifférenciés. Au fur et à mesure de leur maturation et de leur différenciation, les kératinocytes remontent à la surface jusqu'à se

transformer en cornéocytes, formant ainsi le *stratum corneum*. L'épiderme est renouvelé continuellement. Les kératinocytes assurent la cohésion de l'épiderme, ont une fonction de barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, et protègent contre les radiations lumineuses. [59] De très nombreux micro-organismes, essentiels à son fonctionnement, colonisent la couche la plus superficielle de l'épiderme constituant le microbiote cutané. [61, 62]

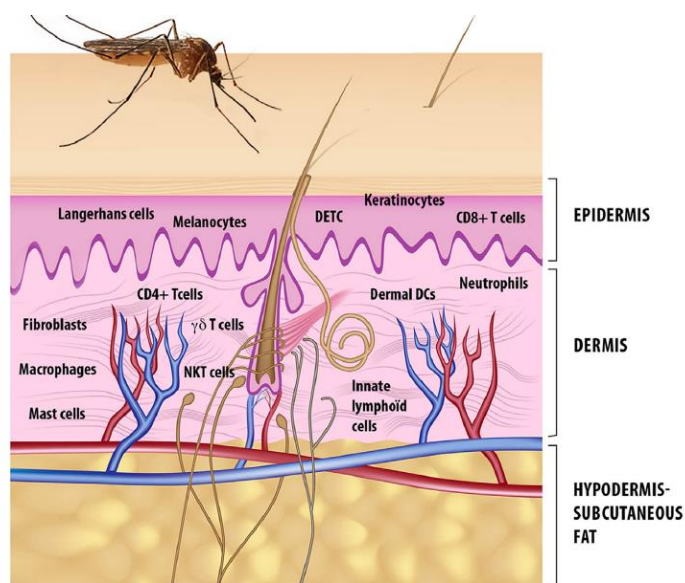


Figure 9 : Structure de la peau (Briant *et al*, 2014) : Schéma du tissu cutané où sont représentées les trois couches : l'hypoderme constitué majoritairement par les adipocytes, le derme où se trouvent les terminaisons vasculaires et nerveuses, et de nombreuses cellules intervenant dans la réponse immune, et à la surface, l'épiderme composé majoritairement de kératinocytes, de quelques mélanocytes et de rares cellules dendritiques résidentes, les cellules de Langerhans et lymphocytes.

b. Cellules de la peau permissives à l'infection par le WNV et les arbovirus

Du fait de leur place stratégique dans la physiopathologie de l'infection, la permissivité des cellules résidentes de la peau à l'infection par des arbovirus a déjà fait l'objet d'investigations. Ainsi les kératinocytes de l'épiderme, les fibroblastes, les cellules endothéliales du derme, les cellules dendritiques et les mastocytes se sont révélés permissifs à l'infection par plusieurs espèces d'arbovirus. [50, 63-65]

Les kératinocytes ont été identifiés à la fois *in vitro*, en culture primaire, et *in vivo*, sur des coupes histologiques réalisées chez l'Homme et la souris, comme permissifs à l'infection par le WNV. [16, 66] De même, la réplication du DENV a été mise en évidence *in vitro* sur culture de kératinocytes primaires. Les antigènes du virus ont été également détectés dans des

kératinocytes de la couche basale de l'épiderme au cours de l'infection d'explants cutanés. [67, 68] Cependant, les kératinocytes ne permettent pas la réplication de tous les arbovirus. En effet, il a été démontré que les kératinocytes primaires n'étaient pas permissifs à l'infection par le CHIKV, quel que soit le stade de différenciation de la cellule. [69] Des analyses histologiques de tissus cutanés de singe et de souris ont permis de mettre en évidence la présence d'antigènes du CHIKV au sein du derme, et non de l'épiderme. Ceci suggère l'implication des fibroblastes et des cellules endothéliales des capillaires du derme, plutôt que celle des kératinocytes, dans la réplication du CHIKV au niveau cutané. [16, 59, 66-68, 70] De même, il a été montré que les cibles principales du ZIKV au sein du tissu cutané étaient les fibroblastes du derme et les kératinocytes de l'épiderme. [59]

L'ensemble de ces études a permis de confirmer que la peau était le site initial de la réplication des arbovirus, point initial et critique avant dissémination au sein de l'organisme de l'hôte. [50] En ce qui concerne le WNV, les kératinocytes font partie des premières cellules exposées au WNV. Ils peuvent supporter un haut niveau de réplication virale et sont considérés comme un réservoir précoce du virus lors de l'infection. [35]

c. Réponse antivirale du kératinocyte

Le rôle du kératinocyte comme cellule de première ligne de défense de l'organisme au niveau cutané, capable d'initier la réponse immunitaire innée, est désormais acquis. [50, 67, 69] Les kératinocytes possèdent en ce sens tout un arsenal pour détecter et combattre l'infection quel qu'en soit l'agent infectieux à l'origine.

Les kératinocytes disposent de récepteurs impliqués dans la détection des pathogènes, les *PRRs* (*Pattern Recognition Receptors*), tels que les récepteurs de type RLH (*RIG-I-like Helicases*), *RIG-I* (*Retinoic acid Inducible Gene-I*) et *MDA-5* (*Melanoma Differentiation Associated gene 5*), les *NOD-like récepteurs* (*NLRs*), *NOD1* et *NOD2* (*Nucleotide-binding Olegomerization Domain-like*), les récepteurs aux lectines de type C (*CLRs*) et de nombreux récepteurs *Toll-like* (*TLR*) (*TLR* -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9 et -10), constituant des senseurs intracellulaires, intracytoplasmiques ou endosomaux, et extracellulaires (Figure 10).

Ces *PRRs* permettent à la cellule de reconnaître les signaux de danger tels que les *Pathogene Associated Molecular Patterns* (*PAMPs*), et aux dommages cellulaires, ou *Damage Associated Molecular Patterns* (*DAMPs*). Les *PAMPs* sont très nombreux, de natures variables (lipides, protéines, polysaccharides, acides nucléiques) et diffèrent selon le type de micro-organisme. Les *DAMPs*, aussi appelés alarmines, sont des molécules

endogènes, par exemple les peptides de la famille S100 ou HMGB1 pour high-mobility group box 1 (Figure 10) [71-73] .

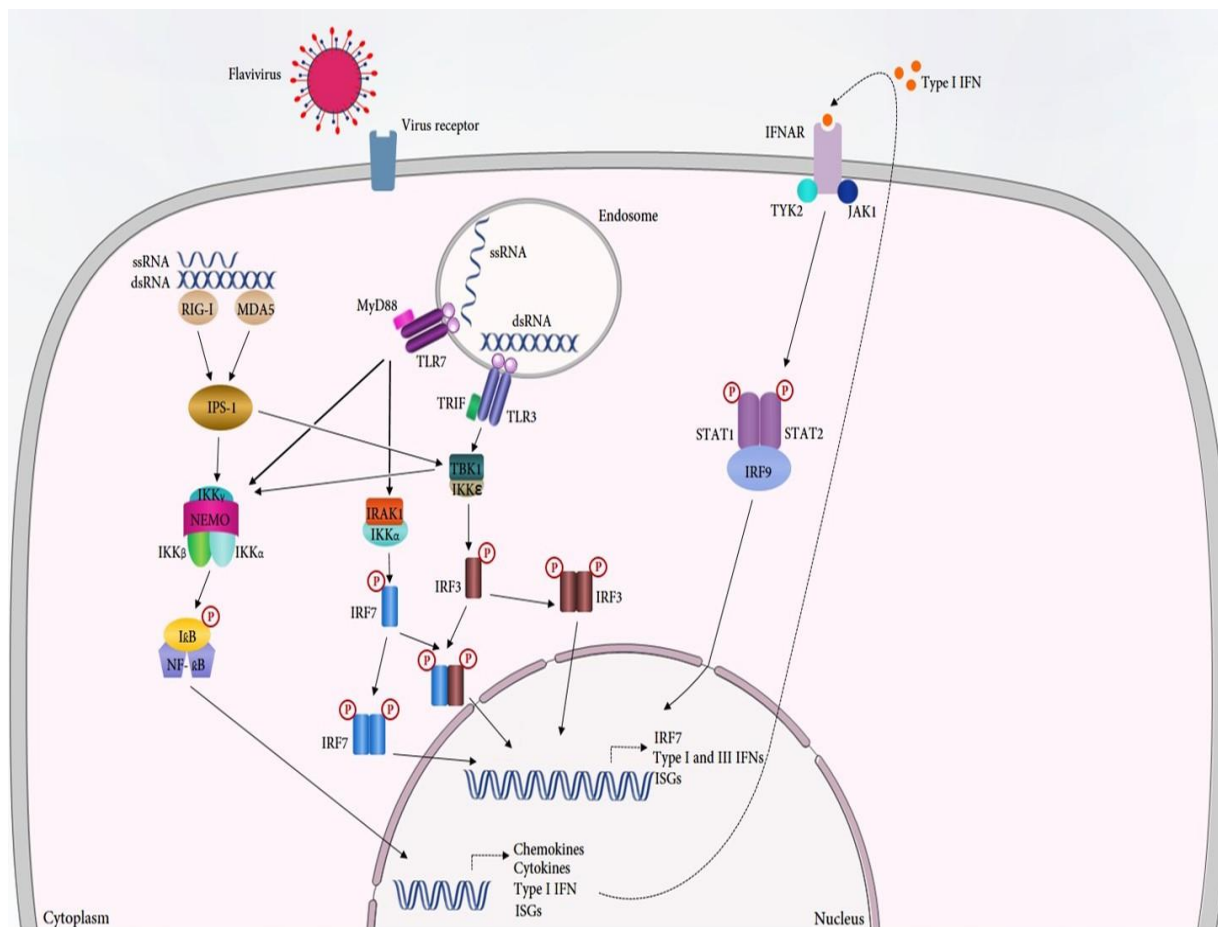


Figure 10 : Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans la détection des flavivirus lors de l'infection des kératinocytes (Garcia *et al*, 2017). Reconnaissance des ARN viraux simple- et/ou double-brins par les récepteurs cytosoliques (MDA5 et RIG-I) et endosomaux (TLR-3 et -7), entraînant la synthèse de médiateurs inflammatoires impliqués dans la lutte contre l'infection virale.

RIG-I et MDA-5, agissent comme protéines détectrices des ARN double-brins et/ou simple brins présents dans le cytoplasme. Les TLR-1, -2, -4 et -6 sont spécialisés dans la reconnaissance des motifs lipidiques comme le lipopolysaccharide (LPS) ou l'acide lipotéichoïque bactérien alors que les TLR-3, -7, -8 et -9 détectent les acides nucléiques viraux. [72, 74] Plus spécifiquement, TLR-3 et -7 reconnaissent les ARN exogènes bi- et monocaténaux présents au sein des endosomes. NOD1 et NOD2 se focalisent sur les fragments du peptidoglycane bactérien et peuvent agir en synergie avec les TLRs pour activer la production de cytokines pro-inflammatoires. [75, 76] Enfin, les polysaccharides des virus, bactéries et champignons sont identifiés par les CLR (Figure 10). [74, 77]

L'implication des RLH et TLR dans la réponse antivirale au cours de l'infection par les arbovirus des tissus extra-cutanés chez l'Homme et du tissu cutané chez la souris est décrite. [75, 76] Il faut souligner ici le rôle joué par les protéines contenues dans la salive de moustique qui peuvent perturber la mise en place de la réponse immunitaire innée en diminuant la synthèse en médiateurs pro-inflammatoires ou en interférant avec leur fonctionnement. Ceci peut conduire à une immunosuppression ou un dérèglement de l'immunité locale ne restreignant pas la réplication du virus puis sa dissémination. [78-80]

En réponse à la détection du virus, les kératinocytes produisent alors un large éventail de chimiokines et cytokines.

Les chimiokines sont impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires au site de l'infection et dans la coordination des réponses immunitaires innée et adaptative. Les kératinocytes produisent les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL17, CCL20, CCL22 ou encore CCL27. CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 et CXCL8 sont chimioattractantes vis-à-vis des neutrophiles. CXCL9, CXCL10 et CXCL11 vont plutôt attirer les cellules Th1 tandis que les cellules Th2 seront plus sensibles à CCL2, CCL17 et CCL22. CCL20 attire les lymphocytes T (LT) mémoires et les cellules de Langerhans. Enfin, CCL27, chimiokine que l'on retrouve uniquement dans les kératinocytes, attire les LT. [54, 81, 82] Des récepteurs à certaines chimiokines comme CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 et CXCR5 sont également retrouvés au niveau des kératinocytes. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des cytokines sécrétées par d'autres cellules de la peau ou par des leucocytes. Leur activation peut conduire à une amplification de la réponse inflammatoire pouvant être responsable de pathologies cutanées. Par exemple, l'activation des récepteurs à l'IL-17 et à l'IL-22 peut conduire au développement du psoriasis. [74, 83]

En complément, les kératinocytes sont capables de synthétiser de nombreuses cytokines comme l'IL-1, -6, -7, -10, -12, -15, -18, -23, -25, -33, le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) et les interférons (IFN) α , β , κ et λ , dont ils expriment parfois également les récepteurs. [74, 84-87] Ces cytokines ont de nombreuses fonctions dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Après activation des PRRs, l'IL-1 est l'une des premières cytokines produites et entraîne la synthèse d'IL-6, -8 et du TNF- α qui ont un rôle pro-inflammatoire majeur. L'IL-1 est capable d'entraîner l'activation des cellules dendritiques, des LT et la maturation des lymphocytes B (LB) tandis que l'IL-6 favorise la prolifération des kératinocytes. [74, 86, 88] A l'inverse, d'autres cytokines comme l'IL-10 ou l'IL-12 ont une action immunomodulatrice voire anti-

inflammatoire. [86] Certaines cytokines influencent la production d'autres cytokines, par exemple l'IL-4 et l'IL-13. Ces deux cytokines favorisent la production d'IL-6 mais inhibent l'expression des PAMs. [54, 86] Enfin, les kératinocytes produisent plusieurs types d'interférons. Les IFNs, notamment de type I, sont impliqués dans la défense antivirale et antibactérienne. Lors d'une infection virale, les IFNs sont sécrétés par la cellule infectée et vont se fixer sur les IFNAR (*Interferon α/β receptor*) présents sur la cellule elle-même (effet autocrine) mais aussi et surtout les cellules voisines (effet paracrine) afin de les stimuler et d'induire un environnement antiviral au niveau du site de l'infection. Les IFNs induisent la maturation des cellules présentatrices d'antigène et l'activation des LT, LB et des cellules NK ainsi que la production de nombreuses molécules antivirales : les *Interferon Stimulated Genes* (ISGs). [89, 90]

Les ISGs sont les acteurs importants de la réponse antivirale. Elles inhibent, de façon complémentaire et parfois redondante, les étapes intracellulaires du cycle viral. Les protéines IFIT (*Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats*) constituent, par exemple, une des principales familles d'ISGs et sont largement impliquées dans la réponse immunitaire innée anti-arbovirus. IFIT-1 interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3 empêchant ainsi la traduction des ARNm des alphavirus comme le CHIKV tandis qu'IFIT-M inhibe les étapes précoces de l'infection par le DENV et le WNV, empêchant l'entrée du virus dans la cellule. Enfin deux autres ISGs jouent un rôle notable anti-arbovirus, la Ribonucléase L (RNase) qui clive l'ARN viral grâce à son activité endonucléasique et la vipérine, ou RSAD2 (*Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2*) qui bloque l'activité de la protéase NS3 du DENV empêchant la maturation de la polyprotéine virale. [91-95]

Enfin, les kératinocytes produisent des peptides antimicrobiens doués de propriétés anti-infectieuses et immunomodulatrices. [88]

IV. Les peptides antimicrobiens du kératinocyte

a. Introduction

Les peptides antimicrobiens sont des petits peptides de 12 à 50 acides aminés classés selon de multiples critères intégrant leur origine, leur structure tridimensionnelle, l'existence de liaisons covalentes intramoléculaires, leurs propriétés physico-chimiques, leurs fonctions ou leurs cibles biologiques. [96, 97] Plus de 1300 PAMs ont été décrits chez un grand nombre d'espèces qu'elles soient animales, vertébrées ou invertébrées, ou végétales. Leur diversité structurale est grande, à l'origine de trois grandes familles de PAMs constituées des peptides linéaires formant des hélices- α , des peptides riches en cystéine décrivant des feuillets- β plissés, avec un ou plusieurs ponts disulfures, et des peptides non structurés contenant un pourcentage élevé d'un type spécifique d'acide aminé. [97] Les PAMs ont de multiples fonctions, tour à tour anti-tumorales, anti-oxydantes, insecticides, spermicides, cicatrisantes et d'inhibition enzymatique (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Ils ont, aussi et surtout, la capacité commune de directement tuer ou inhiber la croissance des micro-organismes. Leur nature majoritairement cationique et amphiphile leur confère en effet la capacité de perforer/perméabiliser la membrane/enveloppe d'un large spectre de micro-organismes, incluant les bactéries à coloration de Gram positive et négative, les champignons ainsi que les virus nus et enveloppés. Les activités antivirales des PAMs sont encore peu décrites même s'il s'agit d'un champ d'étude en plein développement. Vis-à-vis des virus, les PAMs sont capables de combiner une action extracellulaire, avec un effet antiviral direct en portant atteinte à l'intégrité de l'enveloppe virale, ou indirect, par saturation ou modulation de l'expression des récepteurs cellulaires, à une action intracellulaire, en agissant au niveau de la traduction, de la synthèse des ARN viraux ou de l'assemblage des particules virales (Figure 11). L'activité virucide par altération de la particule virale a été démontrée pour plusieurs virus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus respiratoire syncytial (VRS), le virus de la varicelle et du zona et le virus de la grippe A. [98-109] Concernant les étapes intracellulaires du cycle viral, la cathélicidine humaine LL-37 peut inhiber la réplication du VIH-1 par des interactions protéine-protéine avec la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase du virus. [106] De plus, plusieurs ribonucléases (RNases) de la famille de la RNase 7, autre peptide du kératinocyte, ont montré des activités antivirales, contre le VRS pour les RNases 2 et 3, ou le VIH-1 pour l'onconase, un peptide issu de la grenouille,

par lyse du génome viral encapsidé sans dégradation des ARN ribosomiaux et messagers cellulaires. [102, 107, 109, 110] Enfin, en complément de leur activité antivirale directe, les PAMs ont également des propriétés immunomodulatrices qui participent à renforcer les défenses de l'hôte. Ils sont capables d'attirer au site de l'infection les cellules immunitaires par leurs propriétés chimiotactiques, d'induire leur prolifération et leur différenciation, et de stimuler la production de cytokines et chimiokines par les cellules infectées. [111-116]

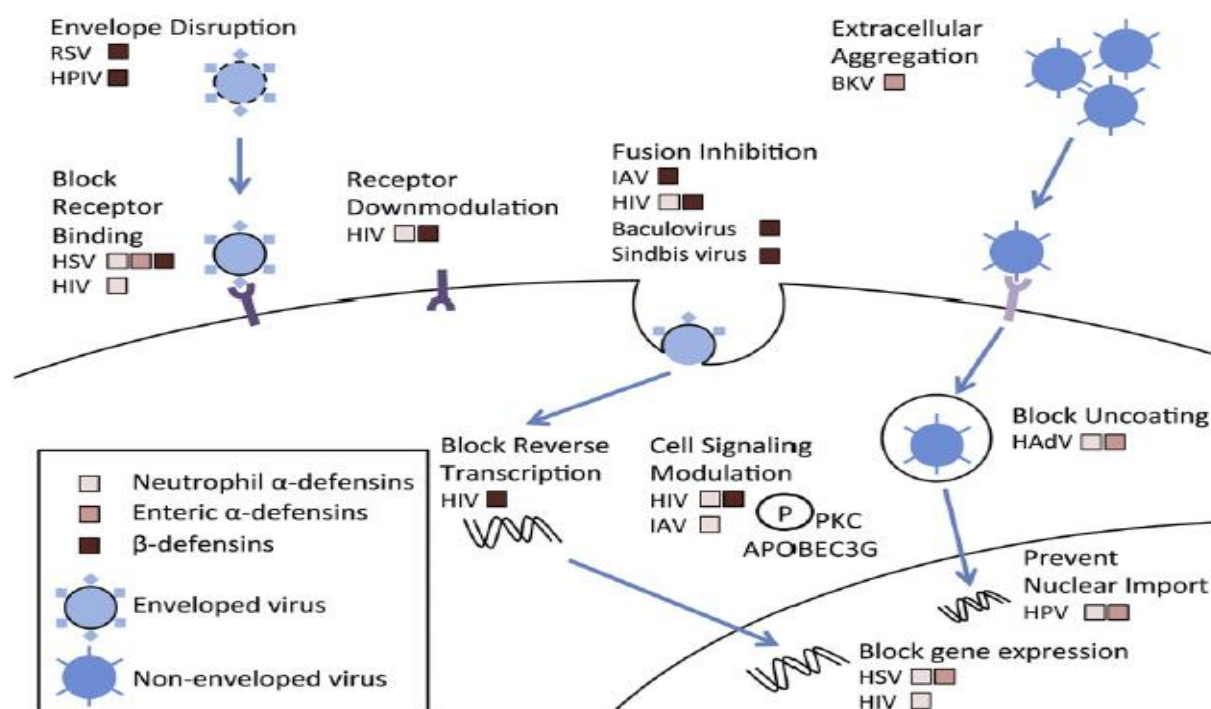


Figure 11 : Modes d'action de différentes défensines sur les virus (Wilson *et al.*, 2013)

Une vingtaine de PAMs ont été identifiés dans la peau humaine parmi lesquels les principaux sont la cathélicidine LL-37, les défensines (β -défensines 1, 2, 3), la dermcidine, la RNase 7 et les protéines S100 (S100A-7, -8/9, -15). Certains PAMs sont synthétisés de façon constitutive au sein du tissu cutané (dermcidine, RNase7, S100A7), d'autres ont une expression induite par différents stimuli (LL-37, β -défensines) tels que l'inflammation, la cicatrisation ou l'exposition aux UV. Différents types cellulaires cutanés : kératinocytes, sébocytes, monocytes-macrophages, lymphocytes T, mastocytes et cellules circulantes (polynucléaires neutrophiles, ...) peuvent être à l'origine de la synthèse de PAMs bien que les kératinocytes en soient les principaux. [111, 117]

Ils ont en effet la capacité de synthétiser neuf PAMs : cathélicidine humaine LL-37, les β -défensines humaines de type 1 à 4, la psoriasine S100A7, la calprotectine S100A8/9, la koebnerisine S100A15 et la RNase 7. [116] La revue présentée dans le chapitre suivant résume les connaissances actuelles sur les propriétés antivirales et immunomodulatrices des peptides antimicrobiens des kératinocytes humains.

b. Propriétés antivirales et immunomodulatrices

Voir la revue intitulée « *Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes* »



Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes

Céline Chessa^{1,2}, Charles Bodet², Clément Jousselin^{1,2}, Michel Wehbe²,
Nicolas Lévêque^{1,2*} and Magali Garcia^{1,2}

¹ Laboratoire de Virologie et Mycobactériologie, CHU de Poitiers, Poitiers, France, ² Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, LITEC EA 4331, Université de Poitiers, Poitiers, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jayachandran N. Kizhakkedathu,
The University of British Columbia,
Canada

Reviewed by:

Nayeli Alva-Murillo,
University of Guanajuato, Mexico
Elio Pizzo,
University of Naples Federico II, Italy

*Correspondence:

Nicolas Lévêque
nicolas.leveque@chu-poitiers.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 September 2019

Accepted: 06 May 2020

Published: 03 June 2020

Citation:

Chessa C, Bodet C, Jousselin C,
Wehbe M, Lévêque N and Garcia M
(2020) Antiviral
and Immunomodulatory Properties
of Antimicrobial Peptides Produced
by Human Keratinocytes.
Front. Microbiol. 11:1155.
doi: 10.3389/fmicb.2020.01155

Keratinocytes, the main cells of the epidermis, are the first site of replication as well as the first line of defense against many viruses such as arboviruses, enteroviruses, herpes viruses, human papillomaviruses, or vaccinia virus. During viral replication, these cells can sense virus associated molecular patterns leading to the initiation of an innate immune response composed of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and antimicrobial peptides. Human keratinocytes produce and secrete at least nine antimicrobial peptides: human cathelicidin LL-37, types 1–4 human β -defensins, S100 peptides such as psoriasin (S100A7), calprotectin (S100A8/9) and koebnerisin (S100A15), and RNase 7. These peptides can exert direct antiviral effects on the viral particle or its replication cycle, and indirect antiviral activity, by modulating the host immune response. The purpose of this review is to summarize current knowledge of antiviral and immunomodulatory properties of human keratinocyte antimicrobial peptides.

Keywords: keratinocyte, antimicrobial peptide, innate immunity, antiviral, immunomodulation

INTRODUCTION

As the largest organ of human body, skin is not only a physical barrier but represents also the first line of defense against environmental pathogens including viruses (Robert and Kupper, 1999; Ganz, 2002). Skin is organized in three layers, which differ structurally and functionally: epidermis, the most superficial, dermis and hypodermis, the deepest. The epidermis is mainly composed of keratinocytes at different levels of differentiation, from the stratum basale made of the youngest keratinocytes, still dividing, at the dermis interface to the keratin containing desquamating corneocytes on the surface of the skin. Langerhans cells (LCs), a skin-specialized type of dendritic cells (DCs) constantly probing for antigens, represent the main immune resident cell in the epidermis (Kubo et al., 2009). T cells, mainly CD8+, can also be found in the deepest strata, stratum basale, and stratum spinosum, of the epidermis (Nestle et al., 2009). Finally, melanocytes, responsible for the pigmentation of the skin, constitute the last cell type of the epidermis (Nestle et al., 2009). Then, the dermis is a more complex conjunctive tissue composed of several specialized cells, such as DCs, CD4 + T helper (Th)1, Th2, and Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells, macrophages, mast cells, and fibroblasts, which all together play a role in the immune skin barrier. Contrary to the epidermis, the dermis is an innervated tissue where blood and lymphatic vessels contribute to cell trafficking (Nestle et al., 2009). Finally, hypodermis is an adipose-tissue mainly composed of fat cells.

Keratinocytes allow, *in vivo* and *in vitro*, replication of many viruses such as alphaherpesviruses [types 1 and 2 herpes simplex viruses (HSV), varicella-zoster virus (VZV)], arboviruses such as Dengue (DENV), Zika (ZIKV), and West Nile viruses (WNV), enteroviruses, human papillomaviruses (HPVs) and vaccinia virus (VACV), amplifying the viral load and facilitating viral spread to the liver, the fetus or the central nervous system (Lim et al., 2011; Crack et al., 2012; Puiprom et al., 2013; Sayers and Elliott, 2016; Gourru-Lesimple et al., 2017; Phyu et al., 2017; Duangkhae et al., 2018). Keratinocytes also act as immune cells that can initiate an innate immune response to fight viral infection (Nestle et al., 2009). Indeed, they express a wide range of Pattern-Recognition Receptors (PRRs) including cell-surface (-1, -2, -4, -5, -6) or endosomal (-3, -7, -8, -9) transmembranal Toll-Like Receptors (TLRs). They also possess cytosolic sensors like Retinoic acid Inducible Gene I (RIG-I)-Like Receptors (RLRs): Melanoderma Differentiation-Associated gene 5 (MDA5), Retinoic acid-Inducible gene (RIG-I) and Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2), or cytosolic DNA receptor cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS) (Almine et al., 2017; Nestle et al., 2009). All these PRRs sense Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) that are, in case of viruses, nucleic acid and structural or non-structural protein motifs conserved among pathogens (Yong and Luo, 2018). For RNA viruses, such as arboviruses and enteroviruses, the main PRRs involved in the detection of the viral infection are TLRs 3 and 7, and RLRs RIG-I and MDA5, detecting single-stranded viral genomes or double-stranded replication intermediates in endosomes and cytoplasm, respectively. Activation of these PRRs triggers signaling pathways leading to production of interferons (IFNs), proinflammatory chemokines, cytokines and antimicrobial peptides (AMPs) that are key players of the innate immune response (Kalali et al., 2008; Nestle et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2009; Welte et al., 2009; Aguirre et al., 2012; Dalpke and Helm, 2012; Garcia et al., 2017). Then, secreted pro-inflammatory mediators participate to the recruitment of monocytes, macrophages, polymorphonuclear neutrophils (PMNs), and DCs to the site of viral infection (Schmid and Harris, 2014; Pinggen et al., 2016; Sharif et al., 2016). These cells are innate immune sentinels playing a crucial role in activation of innate and adaptive antiviral immunities. For example, once activated by a viral antigen, LCs and DCs start migrating to the draining lymph node in order to prime T-cells and induce an immune memory (Johnston et al., 1996, 2000; Kubo et al., 2009). Other skin cells can also contribute to the initiation of the innate immune response. It has been suggested that melanocytes were contributing to the phagocytosis of viral pathogens, presenting antigens to competent immune cells or producing cytokines and chemokines (Gasque and Jaffar-Bandjee, 2015). Overall, these data highlight the crosstalk between the different kinds of skin cells in order to create an antiviral environment. Thus, in the same way as respiratory, genital or digestive epithelia, the cutaneous epithelium is an interface between the organism and the outside environment exposed to many microorganisms, functioning as a physical but also as an immunological barrier (Grice and Segre, 2011). Antimicrobial defense is therefore essential in order to preserve the "aseptic" of deep skin tissue. For this purpose, AMPs,

which are small peptides synthesized and secreted by skin cells and glands, display antifungal, antibacterial and both direct and indirect antiviral activities (Zasloff, 2002). Indeed, they can directly inactivate viral particles or inhibit virus replication (Wilson et al., 2013). AMPs can also exert an indirect antiviral activity by modulating the host immune response. They can induce the production of cytokines and chemokines, demonstrating both proper pro-inflammatory activities and potentiating the inflammatory response caused by the infection. AMPs may also exert a chemo-attractant activity on immune cells at the site of infection contributing to viral clearance (De et al., 2000; Koczulla and Bals, 2003; Tjabringa et al., 2006; Lai and Gallo, 2009; Mookherjee et al., 2009).

The purpose of this review is to summarize current knowledge about direct antiviral and immunomodulatory properties of human keratinocyte antimicrobial peptides.

MAIN CHARACTERISTICS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES PRODUCED BY HUMAN KERATINOCYTES AND EXPRESSION IN THE CONTEXT OF VIRAL INFECTION

Antimicrobial peptides are small peptides, classically less than 100 amino-acids, with a large structural diversity (Lehrer and Ganz, 1999; Lei et al., 2019). They can form α -helices, cysteine-rich pleated β -sheets with one or more disulfide bridges, or be relatively non-structured peptides containing a high percentage of one specific type of amino-acid (Lehrer and Ganz, 1999). Human keratinocytes are known to produce and secrete at least nine AMPs: human cathelicidin LL-37, types 1–4 human β -defensins, psoriasin (S100A7), calprotectin (S100A8/9), koebnerisin (S100A15), and RNase 7 (Braff et al., 2005; Lai and Gallo, 2009). Their expression can be constitutive or inducible, displaying an increased expression in case of stimuli such as infection or inflammation. In addition, incubation of primary human keratinocytes with pro-inflammatory cytokines can stimulate AMP synthesis (Guilloteau et al., 2010; Firat et al., 2014).

Human Cathelicidin LL-37

LL-37 is the only known human cathelicidin, although peptides of this large family have been isolated from numerous non-human species. This amphipathic α -helical peptide is produced by human keratinocytes during inflammatory disorders like psoriasis, lupus erythematosus and contact dermatitis where its concentration can reach 20 $\mu\text{g/mL}$ (Frohm et al., 1997; Braff et al., 2005; Currie et al., 2013). Its up-regulation has also been described during HSV-2 and DENV infections of human keratinocytes (Ogawa et al., 2013; López-González et al., 2018). Moreover, LL-37 expression in combination with hBD-3 was also increased in epidermal and dermal lesions of patients suffering from Kaposi's sarcoma caused by human herpes virus 8 (HHV-8) in comparison to normal skin of healthy controls (Fathy et al., 2012). Finally, the secretion of LL-37 was observed during the

infection of the respiratory epithelium by human rhinovirus (HRV) C, influenza virus A (IAV)/H1N1 and respiratory syncytial virus (RSV) (Hansdottir et al., 2008; Boda et al., 2018). In cell culture supernatant of infected nasal epithelium, LL-37 secretion ranged from 10 to 25 ng/mL. Interestingly, its secretion was not detected following HRV-B and coronavirus (HCoV-) OC43 infection potentially related to a different cell tropism of these two viral species (Boda et al., 2018).

β -defensins

Defensins are small molecules between 24 and 42 amino-acids characterized by a β -sheet structure with 3 disulfide bounds. In human, defensins are divided into α -defensins, referred to as human neutrophil peptides (hNPs), and β -defensins (hBDs) expressed in myeloid and epithelial cells. There are about 37 hBDs (Wilson et al., 1999; Holly et al., 2017). Four (hBD-1 to -4) are detected in the epidermis. Many viruses were shown to stimulate hBD expression and/or secretion in epithelial cells, even though the antiviral activity of these peptides was not always demonstrated (Frohm et al., 1997). In human keratinocytes, VACV, DENV and HSV-2 infections were shown to induce hBD-1, hBD-2, and -3, and hBD-4 expression, respectively (reviewed in Surasombatpattana et al., 2011; Wilson et al., 2013). HPV infection also increased hBD-1 to -3 expression in oral epithelial lesions from patients with recurrent respiratory papillomatosis (Chong et al., 2006). hBD production was then demonstrated in vulvovaginal biopsy samples of condylomata acuminata as well as in human amniotic epithelial cells infected with HPV (Erhart et al., 2011; Szukiewicz et al., 2016). Interestingly, expression of hBD-2 was paradoxically diminished in HPV-induced carcinomas potentially defining a mechanism of virus escape to the host immune response occurring during carcinogenesis (Hubert et al., 2007). Type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) infection also induced expression of hBD-2 and -3, but not that of hBD-1, in human oral epithelial cells (Quiñones-Mateu et al., 2003). In respiratory epithelial cells infected *in vitro*, hBD-2 and hBD-3 production is stimulated by the replication of several HRV serotypes from HRV-B and -C species. *In vivo*, a doubling of the concentration of hBD2, from 150 ng/mL to more than 300, was assessed at 48 h post-infection in nasal swabs of patients infected with HRV-A16 (Proud et al., 2004). Similarly, IAV/H1N1 as well as RSV infections induced a huge increase in hBD-2 secretion whereas HCoV-OC43 did not (Kota et al., 2008; Boda et al., 2018). In intestinal epithelial cells, enterovirus (EV) infection enhanced the secretion of hBD-3 but not that of α - and other β -defensins (Chen et al., 2018). In fresh peripheral blood mononuclear cells, the other major source of hBD production in human, only hBD-1 coding mRNAs were detected in non-stimulated cells among the four known hBDs (Oppenheim et al., 2003). Its expression could be then induced as early as 3 h post-infection with IAV, Sendai virus or, in a much lesser extent, HSV-1 (Ryan et al., 2011). Finally, hBD concentrations have been demonstrated to be elevated after exposure to Hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses as well as to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) (Bai et al., 2015; Aksoy et al., 2016; Mattar et al., 2016a). Concentrations of hBDs were shown

to be significantly higher in HCV-infected patient sera, ranging from 900 to 21,120 ng/mL, compared to controls where they were less than 60 ng/mL (Mattar et al., 2016a). In the same way, serum hBD2 levels were significantly increased in patients infected with CCHFV compared to healthy controls and were three-times higher in patients with non-fatal evolution of the disease than in patients with fatal disease (89,480 vs. 30,580 ng/mL) suggesting a protective role of the peptide during the infection (Aksoy et al., 2016).

Peptides of the S100 Family

S100 family peptides are characterized by two calcium-binding sites that can also chelate zinc and manganese. This family regroups 25 molecules among those psoriasin S100A7, calprotectin S100A8/9 and koebnerisin S100A15 are produced by keratinocytes (Celis et al., 1990; Zhu et al., 2013). Constitutive expression of psoriasin S100A7 is low in normal adult skin ranging from 5 to 46 ng/cm² regarding to the region of the human body (Gläser et al., 2005). Its expression can be enhanced in stimulated keratinocytes as seen in psoriasis (Gläser et al., 2005). Conversely, high expression levels have been detected in the fetal skin, suggesting a potentially protective role in the innate immune system of the newborn (Yoshio et al., 2003). Besides its antimicrobial activity, S100A7 is associated with wound healing, neutrophil migration, Reactive Oxygen Species (ROS) generation, antimicrobial peptide release and cytokine/chemokine production (Niyonsaba et al., 2008; Kozlyuk et al., 2019). S100A7 has further been reported to be overexpressed in breast and bladder tumors, suggesting that it may play a role in the regulation of cell growth, survival and differentiation (Watson et al., 1998; Ostergaard et al., 1999). Regarding viral infections, psoriasin expression is induced in vulvovaginal and cervical HPV-associated lesions (Erhart et al., 2011; Alvendal et al., 2019). Calprotectin S100A8/9 is a heterodimer composed of calgranuline A (S100A8 or myeloid-related protein 8) and calgranuline B [S100A9 or migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14)]. In normal epidermis, S100A8 and S100A9 are both expressed at low levels but, in inflammatory skin diseases such as psoriasis, lichen planus and lupus erythematosus, or during wound healing, their expression is highly induced (Gabrielsen et al., 1986; Kunz et al., 1992; Thorey et al., 2001). Moreover, S100A8/9 expression has been identified as a general danger signature of activated keratinocytes, as its expression can be induced in response to a wide variety of skin stresses including tape stripping, exposure to detergent, UV or cytokine stimulation (IL-1 α , IL-22) (Boniface et al., 2005; Ehrchen et al., 2009). This overexpression prevents keratinocyte proliferation but triggers cell differentiation (Ryckman et al., 2003; Voss et al., 2011). Calprotectin expression has been also shown to be increased in epithelial cells during viral infections by coronavirus and HPV with antiviral properties against HPV type 16 (Reghunathan et al., 2005; Tugizov et al., 2005). Finally, koebnerisin S100A15, which has a sequence almost identical to that of psoriasin, is overexpressed in psoriatic skin lesions and known for its proinflammatory and chemotaxis properties (Wolf et al., 2011). Infection with *Escherichia coli* also modulates its expression in

keratinocytes through recognition of the pathogen by TLR4 (Büchau et al., 2007). To our knowledge, S100A15 expression in the context of viral infection has so far never been studied.

RNase 7

While RNase 7 is usually considered as an AMP, it is actually a larger protein of 14.5 kDa, composed of 128 amino acids and belonging to the RNase A superfamily. RNase 7 exhibits potent ribonuclease activity and its expression in the skin is both constitutive and inducible in inflammatory and infectious contexts (Harder and Schroder, 2002; Simanski et al., 2013; Firat et al., 2014). In normal skin, RNase 7 concentration varies according to the area of the body, from 0.17 ng/cm², in the palms of the hands, to 1.28 ng/cm², in skin of the legs (Rademacher et al., 2016). RNase 7 concentrations are increased in patients with psoriatic, atopic dermatitis and dermatophyte skin lesions (Becknell and Spencer, 2016). *In vitro* studies have demonstrated that the treatment of primary keratinocytes with proinflammatory cytokines such as IL-17A, TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ or their infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* or the dermatophyte *Trichophyton rubrum* induced RNase 7 expression (reviewed in Becknell and Spencer, 2016; Rademacher et al., 2019). Keratinocyte infection with DENV was also shown to induce RNase 7 gene expression (Surasombattana et al., 2011).

The main characteristics of keratinocyte AMPs are summarized in **Table 1**.

ANTIVIRAL ACTIVITIES OF KERATINOCYTE AMPs

The antiviral activity of LL-37 has been reported against many viruses, both naked and enveloped as reviewed previously (Barlow et al., 2014; Ahmed et al., 2019a; Brice and Diamond, 2019). In particular, LL-37 was shown to inhibit viruses that replicate in the skin such as HSV-1 and -2, VZV, HHV-8, DENV, ZIKV, HPV16, or VACV (Howell et al., 2004; Buck et al., 2006; Hazrati et al., 2006; Crack et al., 2012; Alagarasu et al., 2017; Brice et al., 2018; He et al., 2018). Further antiviral activities were identified against viruses responsible for enteric infections such as Aichi virus A, respiratory diseases such as IAV, RSV and HRVs, and ocular epithelium infections such as adenoviruses (Gordon et al., 2005; Barlow et al., 2011; Uchio et al., 2013; Harcourt et al., 2016; Schögl et al., 2016; Findlay et al., 2017; Sousa et al., 2017; Vilas Boas et al., 2017). *In vitro* inhibition of HCV in hepatocyte-derived carcinoma HuH-7 cells and HIV in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) including CD4 + T cells was also described (Bergman et al., 2007; Matsumura et al., 2016). *In vivo*, the murine analog of LL-37, mCRAMP, reduced disease severity and IAV replication in the lung of infected mice to a similar extent as neuraminidase inhibitors (Barlow et al., 2011).

In the context of skin infections, antiviral properties of hBDs have been demonstrated against HSV, VZV, and VACV, similarly to LL-37, but also against EV-71 and Coxsackievirus

(CV) A16, the main etiological agents of hand, foot and mouth disease (Hazrati et al., 2006; Howell et al., 2004; Crack et al., 2012; Chen et al., 2018). hBD-3, and in a lesser extent hBD-1, exerted anti-HSV-2 activities whereas hBD-2 did not but diminished VZV replication in HaCat cells, a keratinocyte cell line (Hazrati et al., 2006; Scudiero et al., 2010). Moreover, hBD-3, but not hBD-2, significantly reduced the expression of the VACV DNA-dependent RNA polymerase and the number of viral plaques in African green monkey kidney cell line BS-C-1 in a concentration-dependent manner from 5 μ M (Howell et al., 2007). Finally, addition of recombinant hBD-3 to colon adenocarcinoma HT-29 cells inhibited EV-71, CV-A16, CV-B5, and poliovirus 1 infection. However, enterovirus replication was not impaired in genetically modified HT-29 cells overexpressing hBD-3 intracellularly, suggesting extracellular antiviral activity of the peptide (Chen et al., 2018). Regarding other viral species, hBD-1 and, more markedly, hBD-2 neutralized infectivity of the Phil82 strain of IAV (Doss et al., 2009). Antiviral activity of hBD-2 was also shown against RSV and type 3 human parainfluenza virus (HPIV-3) (Kota et al., 2008). Treatment of human lung epithelial A549 cells with 4 μ g/mL hBD-2 reduced RSV and HPIV-3 viral titers by more than 100-fold whereas hBD-1 treatment had no effect against these two respiratory viruses (Kota et al., 2008). In addition, hBD-1 to -3 have been shown to render less infectious HIV-1 virion particles. Interestingly, this effect was higher when combining hBD-2 and hBD-3 than that of the peptides added separately (Quiñones-Mateu et al., 2003; Sun et al., 2005). Finally, hBD-1 to -4, used at 10, 20, and 50 μ g/mL, diminished HCV gene expression and cytotoxicity associated with infection in PBMCs and HuH7.5 liver cell line (Mattar et al., 2016b). Conversely, other studies aimed at describing hBD antiviral properties found little or no activity. For example, hBD-1 and hBD-2 peptides had no effect on HPV16 infection of the cervical cancer cell line HeLa (Buck et al., 2006). However, polymorphisms in the gene DEFB1, encoding hBD-1, has been associated with higher susceptibility to HPV infection suggesting nevertheless a role for this peptide in the antiviral response. In the same way, BK and JC viruses were not or modestly inhibited by hBD-1 and hBD-2 while hBD-2 was found to be ineffective against HRVs (Dugan et al., 2008). Overall, the antiviral properties of hBDs are sometimes restricted to a given viral species suggesting a specific mechanism of action depending on the structure of the viral particle or its replication cycle. Finally, their ability to inhibit viral infection generally appears to be lower than that of LL-37 or other defensins.

To our knowledge, antiviral activity of psoriasin S100A7, calprotectin S100A8/9, and koebnerisin S100A15 has so far never been studied despite induction of their expression during many viral infections as described above. Similarly, RNase 7, despite its abundance in the skin, induction of its expression in an inflammatory or infectious context, and its high antimicrobial activity demonstrated *in vitro* against a broad spectrum of microorganisms such as Gram-positive and Gram-negative bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium vaccae*, the yeast *Candida albicans* and *Pichia pastoris*, and the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, has so far poorly been tested against viruses (Pulido

TABLE 1 | Main characteristics of the antimicrobial peptides synthesized by the keratinocyte.

AMP	Producing cells	Structure	Properties	References
LL-37	Keratinocytes, monocytes, mast cell granules, PMNs, natural killer (NK) cells, sweat glands	N-terminus signal peptide, cathelin domain, and C-terminus peptide	Antimicrobial, chemotaxis, cytokine/chemokine production, cell migration/proliferation	Frohm et al., 1997; Sørensen et al., 2001; Murakami et al., 2002; Di Nardo et al., 2003; Braff et al., 2005)
hBD1	Keratinocytes, monocytes, macrophages, DCs, sebaceous glands, canals of the sudoriparous glands	3 antiparallel beta sheets structure, and 3 disulfide bonds	Antimicrobial, chemotaxis, cytokine/chemokine production, wound healing, proinflammatory mediators/suppressors	Fulton et al., 1997; Ali et al., 2001; Semple and Dorin, 2012; Pace et al., 2017
hBD2	Keratinocytes, monocytes, macrophages, DCs			
hBD3	Keratinocytes			
hBD4	Keratinocytes			
S100A7	Keratinocytes	1 monomer consists of 5 helices each and carries only 1 calcium-binding EF-hand	Antimicrobial, chemotaxis, cytokine/chemokine production, wound healing, neutrophil migration, epithelial tumor progression marker	Gläser et al., 2005; Wolf et al., 2011
S100A8/9	Keratinocytes, macrophages, PMNs		Antimicrobial, chemotaxis, cytokine/chemokine production, antitumoral, antinociceptive	Ryckman et al., 2003
S100A15	Basal keratinocytes, melanocytes, DCs, LCs, sebocytes, smooth muscles and endothelial cells of the dermis		Antimicrobial, chemotaxis, cytokine/chemokine production, wound healing, neutrophil migration, epithelial tumor progression marker	Wolf et al., 2011; Hattinger et al., 2013
RNase 7	Keratinocytes	Hydrophobic signal peptide, mature peptide (12–16 kDa) with 3–4 disulfide bounds	Antimicrobial, immunomodulation	Becknell and Spencer, 2016; Rademacher et al., 2016

AMP, Antimicrobial peptide; PMNs, polymorphonuclear neutrophils; DCs, dendritic cells; LCs, Langerhans cells.

et al., 2013; Rademacher et al., 2016). Recently, it was reported that RNase 7 failed to reduce HSV-1 infection in keratinocytes (Kopfnagel et al., 2020).

DIRECT ANTIVIRAL EFFECTS OF KERATINOCYTE AMPS

AMPs can inhibit viral infection by targeting the steps preceding the entry of the virus into the cell but also intracellular stages of viral replication (Ahmed et al., 2019a). Before virus entry, they can directly alter viral particles by creating pores within the viral envelope thanks to their cationic and amphiphilic nature (Hsieh and Hartshorn, 2016). Electron microscopy observation of VACV and RSV, respectively exposed to LL-37 and hBD-2, thus showed a disruption of the viral envelope (Watson et al., 1998; Howell et al., 2004; Niyonsaba et al., 2005; Kota et al., 2008). LL-37-related inhibition of HHV-8 internalization in oral epithelial cells (OECs) relied on the same mechanism. The authors showed that LL-37 did not alter OECs, but, instead, the virions by disrupting the viral envelope then preventing viral entry into epithelial cells. This was observed from concentration

of 10 µg/mL compatible with concentrations measured during inflammation in epithelial tissue reaching up to 20 µg/mL (Currie et al., 2013; Brice et al., 2018). Pre-incubation of ZIKV, IAV, VACV, and HCV with LL-37, or one of its analog, resulted in a significant decrease in the number of active virions suggesting, here again, an alteration of the viral particle (Ehrchen et al., 2009; Dean et al., 2010; Tripathi et al., 2013; Becknell and Spencer, 2016; Matsumura et al., 2016; Ulaeto et al., 2016; He et al., 2018). Similarly, hBDs, namely hBD-2, incubated with HIV, HPIV, and RSV also decreased virion infectivity, likely because of permeabilization of the viral envelope lipid bilayer since electron microscopy showed direct binding of hBDs to viral particles (Quiñones-Mateu et al., 2003; Kota et al., 2008). This detergent-like role is reported as the main AMP antiviral mechanism of action. However, direct interaction with AMPs can also cause viral particles extracellular aggregation blocking virus entry and leading to an increase of virus uptake by phagocytes. Treatment with LL-37 caused clumping of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), thereby preventing cell infection (Ahmed et al., 2019b; Lai et al., 2011). Finally, the pre-fusion antiviral activity of AMPs can be linked to an inhibition of virus attachment to its receptor at the cell surface. LL-37 bound DENV-2 envelope

protein acting as an entry inhibitor (Voss et al., 2011; Alagarasu et al., 2017). LL-37 also prevented HSV-1 infection in corneal epithelial cells by blocking viral-cell attachment (Sunahori et al., 2006; Lee et al., 2014). hBD-3 interacted with either the HSV receptor at the target cell surface or the HSV glycoprotein on the viral envelope, thereby eliciting a stronger inhibition of viral entry (Hazrati et al., 2006; Niyonsaba et al., 2008).

In addition to these antiviral properties based on the inhibition of the virus entry into the target cell, AMPs can interfere with intracellular steps of viral replication (Hazrati et al., 2006; Niyonsaba et al., 2008; Wilson et al., 2013). Indeed, several studies reported that AMPs added after the virus entry could lead to virus gene expression or genome replication inhibition (Howell et al., 2006; Crack et al., 2012; Currie et al., 2013; Sousa et al., 2017). Moreover, the hypothesis of intracellular antiviral activity of AMPs is supported by the fact that recombinant peptides added to the cell culture medium can be internalized by the epithelial cells (Lau et al., 2005). Unfortunately, most of the time, the exact mechanism of the post-fusion antiviral activity of AMPs is not clearly defined. An elegant study nonetheless described the anti-HIV-1 intracellular activity of LL-37 that occurs through direct protein-protein interactions with reverse transcriptase and, in a lesser extent, protease (Wong et al., 2011). In contrast, the LL-37 did not have the ability to prevent the translocation of HIV-1 integrase from the cytoplasm into the nucleus, which is its site of action. Furthermore, inhibition of early HIV-1 transcription by hBD-2 has also been reported (Klotman and Chang, 2006; Yong and Luo, 2018). Overall, the direct mechanisms by which AMPs inhibit virus infection remain little known, particularly regarding the intracellular steps of replication. The immunomodulatory functions of AMPs were, however, better studied, although much progress remains to be made in the context of viral infection.

INDIRECT ANTIVIRAL ACTIVITIES THROUGH MODULATION OF THE HOST CELL IMMUNE RESPONSE

Induction of Cytokine and Chemokine Expression by Keratinocyte AMPs

The expression of antimicrobial peptides synthesized by the keratinocyte is increased or induced in context of inflammation and/or infection. In turn, these peptides can stimulate the expression of cytokines and chemokines because of their own pro-inflammatory properties or by their capacity to potentiate an already in progress inflammatory response.

Intrinsic Pro-inflammatory Properties of AMPs

AMPs are known to have intrinsic pro-inflammatory properties through induction of various inflammatory mediator production by resident skin cells, such as keratinocytes, and cutaneous immune cells such as PBMCs and PMNs. AMPs act by binding cellular receptors leading to signaling pathway activation and up-regulation of cytokine or chemokine expression.

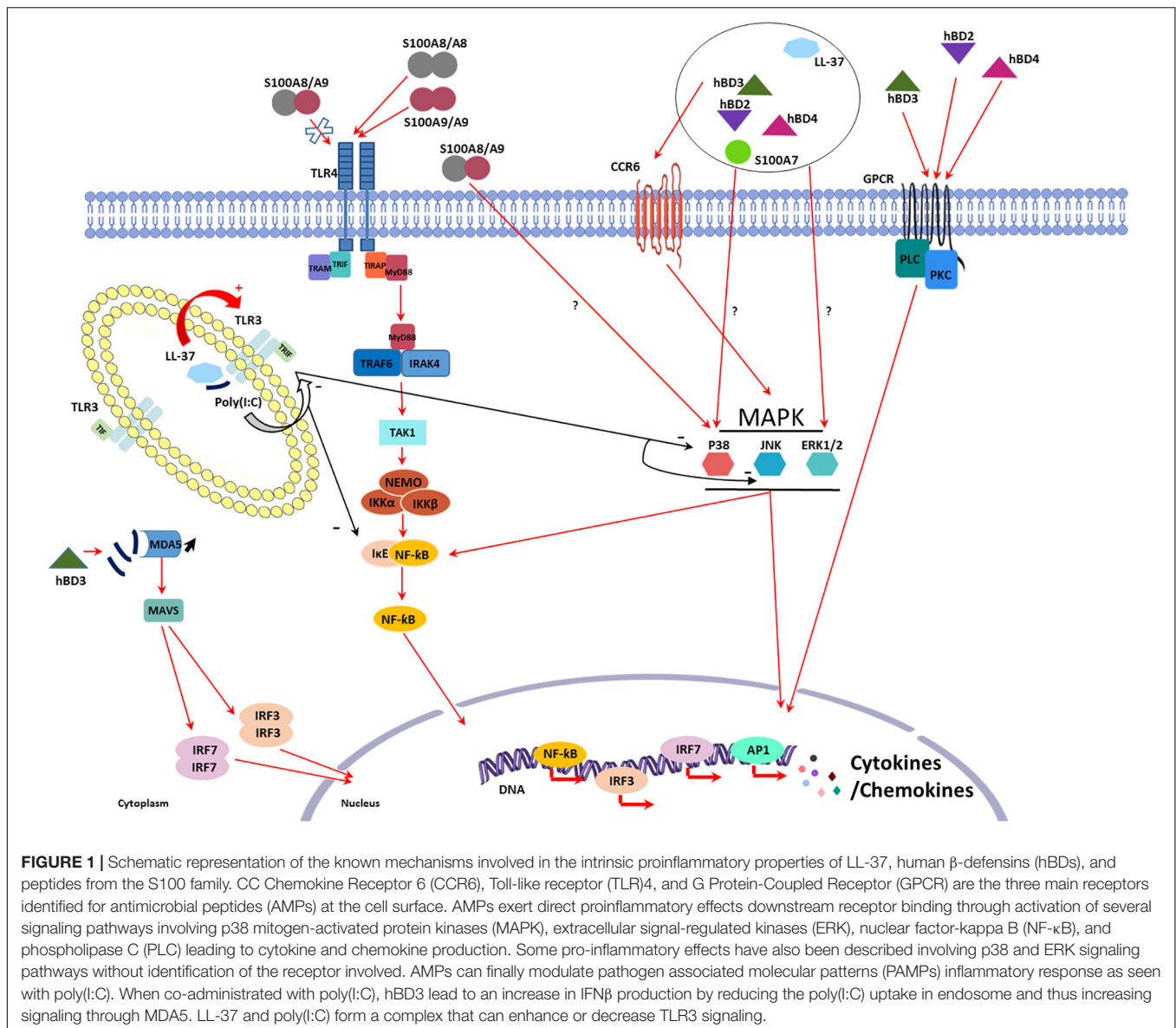
CC Chemokine Receptor 6 (CCR6), TLR4, and G Protein-Coupled Receptor (GPCR) are the three receptors identified so far with which AMPs interact to induce the cellular inflammatory response.

CCR6 is a seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptor with only one known chemokine ligand, CCL-20, which was involved in DC, memory T cell and selected B cell subtype chemotaxis (Lee and Körner, 2017). hBD-3 binding to CCR6 upregulated IL-37 expression and release by human keratinocytes through caspase-1 and -4, mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3), mitogen activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway activation (Smithrithee et al., 2015).

TLR4 normally senses bacterial peptidoglycan and lipopeptides as well as viral envelop glycoproteins. Its interaction with S100A8 and S100A9 homodimers induced IL-1 β , IL-6, INF- γ , and TNF- α secretion in human PBMCs. Interestingly, S100A8/S100A9 heterodimer binding to TLR4 failed to induce this secretion (Chen et al., 2015). Furthermore, treatment with the recombinant S100A8-GST peptide stimulated macrophages, again through TLR4 activation, increasing TNF- α , CCL-2, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-22, IL-23, and IL-24 mRNA expression and contributing to their migration (Figure 1; Inoue et al., 2018).

G protein-coupled receptor (GPCR) and phospholipase C (PLC) signaling pathway are involved in hBD-2, -3, and -4-mediated induction of IL-6, IL-10, INF- γ , CXCL-10, CCL-2, and CCL-5 expression and secretion in human primary keratinocytes playing a role in their migration and proliferation (Figure 1; Niyonsaba et al., 2007).

Other signaling pathways have been described activated by the PAMPs expressed by keratinocytes even if the receptor involved has not always been identified. Niyonsaba et al. (2005) demonstrated that IL-18 mRNA expression and IL-18 secretion were induced by stimulation of keratinocytes with hBD-2, -3, -4, but not -1, and LL-37 through the phosphorylation of p38 and ERK1/2. Moreover, the involvement of p38 and ERK1/2 was also described in IL-6, CXCL-8, CCL-3, CCL-20, TNF- α , and ROS production a dose- and time-dependent manner after human PMN treatment with S100A7 (Zheng et al., 2008). Similar results were obtained by addition of S100A7 to keratinocytes that increased production of CXCL-8, CXCL-10, and CCL20 (Niyonsaba et al., 2008). hBD-2 and, in a lesser extent, hBD-1 and hBD-3 were shown to induce expression and secretion of IL-6, IL-10, and CXCL-8 in PBMCs in a dose-dependent manner (Boniotto et al., 2006). hBD-3 can also stimulate the expression of IL-1 α , IL-6, CXCL-8, and CCL-18 in differentiated macrophages as well as CXCL-1, CCL-2, CCL-22, MIP-1 α , IL-1 β , and VEGF in monocytes (Jin et al., 2010; Petrov et al., 2013). hBD-2 also causes pro-inflammatory cytokine secretion by lymphocytes through activation of JNK, MERK/ERK and PI3K/Akt pathways (Kanda et al., 2011). Concerning RNase 7, its ability to induce INF- α and IFN-stimulated gene expression in human plasmacytoid DCs and PBMCs has been reported (Kopfnagel et al., 2018). Finally, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and CXCL-8 production observed in S100A8/A9-stimulated monocytes involved both p38 MAPK and NF- κ B signaling pathway activation in an independent manner (Figure 1; Sunahori et al., 2006).



Modulation of Inflammatory Response by AMPs

Besides leading to cytokine and chemokine expression and secretion, AMPs can also contribute to enhance or inhibit inflammatory response induced by PAMPs.

Polyinosinic:polycytidylic acid [poly (I:C)] is a synthetic analog of double stranded RNA, mimicking a molecular pattern associated with viral replication known to activate TLR3, RIG-I, and MDA5. LL-37 was shown to increase IFN β -1 mRNA expression induced by poly (I:C) stimulation in human epidermal keratinocytes leading to an enhanced antiviral activity against HSV-1 (Takiguchi et al., 2014; Sato et al., 2018). Lai et al. (2011) demonstrated that this LL-37-dependent enhancement of the inflammatory response required TLR3. Indeed, LL-37 forms, with poly (I:C), a complex that enhances TLR3 signaling pathway (Singh et al., 2013). In contrast, the innate immune response induced by poly (I:C) in macrophages was

inhibited by high concentrations of LL-37 (5 μ M) resulting in a decreased TNF- α and nitrite production as well as IL-1 β and IL-6 mRNA expression (Hasan et al., 2011). This apparently paradoxical effect could be due to the capacity of LL-37 to inhibit phosphorylation of I κ B, MAPKs p38, and JNK induced by poly (I:C) in macrophages (Hasan et al., 2011). Thus, the LL-37-poly (I:C) complex could either prevent TLR3 activation or potentiate TLR3-dependant signaling (Singh et al., 2013).

Modulation of the innate immune response to TLR agonists was also demonstrated with hBD-3. Semple et al. (2015) observed an increased production of IFN- β , TNF- α , CXCL-8, and IL-6 in monocytes and PBMCs stimulated with poly (I:C) in presence of hBD-3. Higher levels of IFN- β and TNF- α were also observed in transgenic mice expressing hBD-3 and stimulated with poly (I:C) as compared to control mice (Semple et al., 2015). In contrast to LL-37, hBD-3 doesn't form a complex with poly (I:C) to modulate

its effects since the two molecules do not co-localize. However, hBD-3 altered poly (I:C) localization within the cell cytoplasm since, in the presence of HBD-3, less poly (I:C) localized to the early endosome. The authors demonstrated that hBD-3 suppressed the poly (I:C)-induced TLR3 response mediated by TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), while exacerbating the cytoplasmic response through MDA5 and MAVS (Vazquez and Horner, 2015).

In other hand, TLR9-mediated DNA sensing was strongly enhanced in presence of RNase 7 leading to secretion of antiviral level of IFN- α by human plasmacytoid DCs (Kopfnagel et al., 2018). Among the known immunomodulatory activities of RNase 7 (reviewed in Rademacher et al., 2019), it was shown that RNase 7 can contribute to antiviral immune response of human keratinocytes through promotion of self-DNA sensing (Kopfnagel et al., 2020). Indeed, pretreatment with both RNase 7 and DNA reduced HSV-1 replication in keratinocyte, a phenomenon mediated by induction of IFN- β production (Kopfnagel et al., 2020).

AMPs are also able to modulate inflammatory response induced by viral infection. The addition of LL-37 to HRV-infected human bronchial epithelial cells enhanced IL-6 and CCL-2 production (Lai et al., 2011). It also increased the expression of type I IFN during VEEV infection (Lai et al., 2011; Ahmed et al., 2019b). However, paradoxical pro- and anti-inflammatory properties of LL-37 were also observed in the context of viral infection (Tripathi et al., 2014). In one hand, CXCL-8 production induced by PMN infection with IAV was reduced in cell supernatant in presence of LL-37, while on the other, LL-37 enhanced PMN extracellular traps (NETs) formation and stimulated respiratory oxidative bursts in IAV-infected PMN (Tripathi et al., 2014). It is interesting to note that the anti-IAV mechanism of LL-37 through PMN activation was different from that reported for hNPs and hBD-2, which promoted virus aggregation and then phagocyte uptake by PMNs (Tecle et al., 2007). hBD-2 had also the ability to stimulate antiviral immunity both *in vitro* and *in vivo* (Kim et al., 2018). When conjugated with the receptor-binding domain of Middle East respiratory syndrome-coronavirus spike protein (S-RBD), it significantly increased the expression levels of IFNs, IFN-stimulated genes and chemokines capable of recruiting leukocytes including macrophages, T cells, and DCs at the site of infection. *In vivo*, immunization of mice with hBD-2-conjugated S-RBD enhanced the immunogenicity of the S-RBD and elicited a higher S-RBD-specific neutralizing antibody response than S-RBD alone. Finally, hBD-4 may also enhance antiviral host protection. Administration of recombinant murine hBD-4 into animals immediately prior to IAV infection resulted in a significant increase of IFN- γ concentration in bronchoalveolar lavage (LeMessurier et al., 2016).

Chemotaxis and Immune Cell Activation

In addition to cytokine and chemokine production modulation, keratinocyte AMPs can also modify the innate immune cell profile at the site of infection and inflammatory response. They can modulate the cellular composition of the inflammatory

infiltrate but also the state of maturation and activation of the infiltrating cells.

Chemotactic Properties of Keratinocyte AMPs

AMPs can attract immune cells at the site of infection promoting an inflammatory context favorable to pathogen eradication. LL-37, hBD-2, -3, and -4 chemotactic activity has been observed on PMNs, T cells and monocytes (Figure 2; De et al., 2000; García et al., 2001; Röhl et al., 2010). For hBDs, the mechanism was mediated through binding to the chemokine receptor CCR2 attracting CCR2-expressing inflammatory cells such as monocytes/macrophages, DCs, and PMNs to the sites of infection while LL-37 chemotactic activity was mediated by the G protein-coupled formyl peptide receptor-like 1 (FRPL-1) (De et al., 2000; Jia et al., 2008; Lin et al., 2008; Röhl et al., 2010). *In vivo*, injection of hBD-2 in mice peritoneal cavity induced macrophage migration, a mechanism shown to be independent of the CCR6 receptor (Soruri et al., 2007). Other studies demonstrated an AMP-related chemotaxis on mast cells (Niyonsaba et al., 2002; Soruri et al., 2007). While hBD-2, and LL-37 were shown to act as a specific mast cell chemotaxin through activation of G-protein-PLC-sensitive signaling pathway (Figure 2; Chen et al., 2007; Soruri et al., 2007), hBD3 and -4 were involved in mast-cell chemotaxis through MAPK pathway activation (ERK, JNK, and p38 phosphorylation) (Soruri et al., 2007). Finally, hBD-2-induced chemoattraction was also observed with immature DCs and memory T cells through CCR6 binding, while hBD-3, after CCR7 binding, promoted migration and lymph node localization of treated LC-DCs (Figure 2; Yang et al., 1999). Otherwise, S100 peptides may also display chemotactic activity. S100A7 was shown as a potent and selective chemotactic protein for CD4 + T lymphocytes and PMNs but had no effect on monocytes (Jinquan et al., 1996). Chemotactic effect of the S100A8/A9 heterodimer was observed with macrophages and PMNs (Figure 2; Ryckman et al., 2003; Hiratsuka et al., 2008; Chen et al., 2015). Taken together, these data suggest that AMPs can favor the migration of immune cells crucial for mounting successful immune responses against viruses.

Immune Cell Activation by Keratinocyte AMPs

In addition to chemotaxis, keratinocyte AMPs can cause maturation and activation of innate immune cells. LL-37 enhanced CD86, CD83, and CCR7 expression on the surface of murine LCs indicating cell maturation (Figure 2; Ogawa et al., 2013). Moreover, incubation with hBD-3 resulted in monocyte and myeloid DCs maturation revealed by CD80, CD86, and CD40 upregulation (Figure 2). This was not observed with plasmacytoid DCs or B lymphocytes. MyD88 was involved in this maturation suggesting a TLR4-mediated process (Funderburg et al., 2007). Another study confirmed induction of phenotypic LC-DCs maturation by hBD-3 (Ferris et al., 2013). In the presence of the peptide, an increase in HLA-DR, CD83, CD86, and CCR7 expression on human immature LCs and DCs was assessed (Figure 2). These data also demonstrated that hBD-3 exposure allowed potent antigen presentation capacity in LC-DCs and high levels of IFN- γ production by primed T-cells suggesting that the peptide skewed cell activation toward a

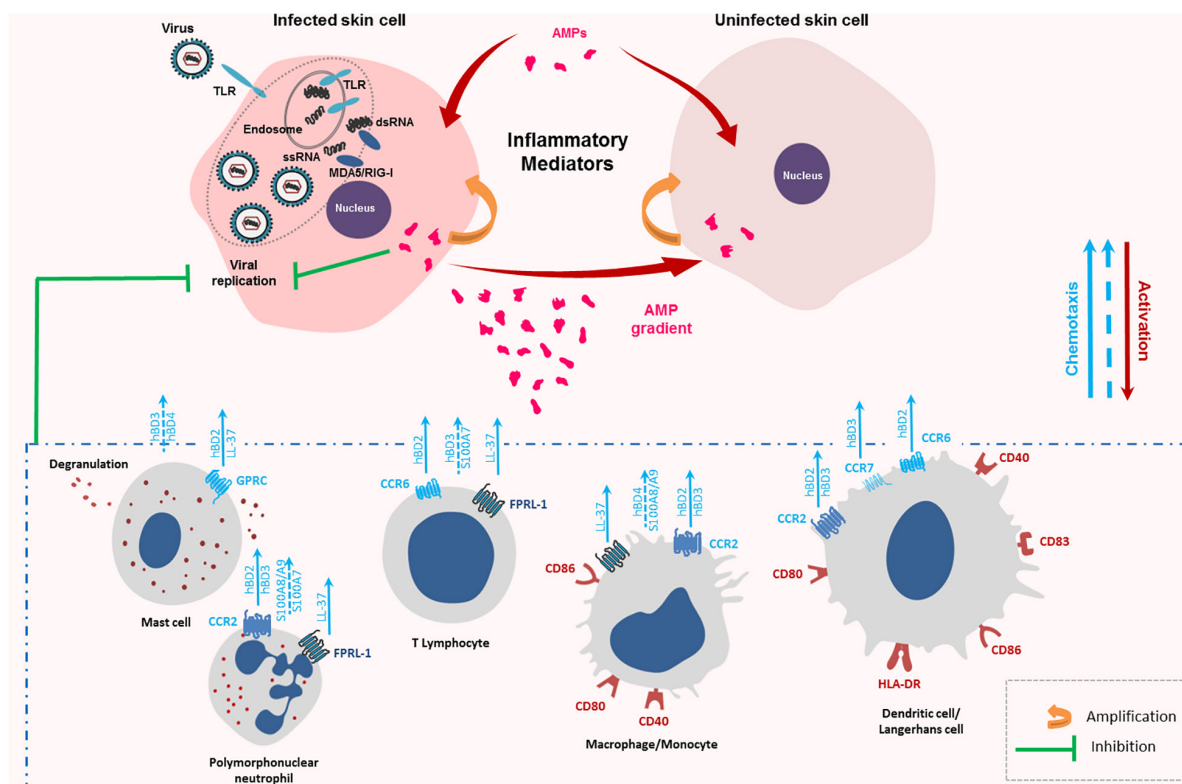


FIGURE 2 | Chemotactic and immune cell activation properties of keratinocyte antimicrobial peptides (AMPs). Keratinocytes infected with RNA viruses, such as arboviruses, sense viral single-stranded and double-stranded RNA generating an innate immune response made of cytokines, chemokines and AMPs. AMPs can then trigger the inflammatory response of the infected cells as well as non-infected cells. They also attract a wide range of immune cells at the site of the infection through several receptors as CC Chemokine Receptor (CCR)-2, CCR-6, CCR-7, and Formyl Peptide Receptor-Like (FPRL)-1 contributing to enhance the innate immune response and initiate the adaptive one. These receptor-dependent chemoattractant effects are represented with full blue arrows. Chemotactic effects described without identification of the AMP receptor are represented by a discontinuous blue arrow.

Th1-type immune response (Ferris et al., 2013). In addition to the binding to CCR6 and CCR2, hBD-3 was shown to interact with TLR1 and TLR2 on antigen-presenting cells, such as myeloid dendritic cells, leading to their activation (Funderburg et al., 2007). This peptide also induced the monocytes costimulatory molecules, CD80 and CD86, necessary for T cell activation (Figure 2; Petrov et al., 2013). Finally, Chen et al. (2007) demonstrated the abilities of hBD-3 and -4 to cause mast cell degranulation, prostaglandine D2 production and chemotaxis (Figure 2). Thus, AMPs, through their immune cell activation ability, can contribute to stimulate innate immunity and activate lymphocytes, key components of adaptive immunity against viruses.

OTHER CELL MODIFICATION CAUSED BY KERATINOCYTE AMPs IMPACTING VIRAL INFECTION

Induction of APOBEC Expression

Cell signaling pathways mediated by the chemokine receptor CCR6 also play a role in defensin-mediated HIV replication

inhibition. hBD-2 treatment was shown to up-regulate expression of host restriction factor apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) in PBMCs or CD4 + T cells. APOBEC3G is an HIV-1 restriction factor that inhibits the accumulation of early reverse transcription products during virus replication cycle (Wilson et al., 2013). This induction was mediated through the activation of CCR6 by hBD-2 (Lafferty et al., 2010).

Modulation of Chemokine Receptor Expression at the Surface of the Target Cell

Chemokine receptors CXCR4 and CCR5 are HIV-1 co-receptors in addition to CD4. The HIV-1 strains use either of these two co-receptors to infect CD4 + cells. hBD-2 and -3 reduced cell surface expression of CXCR4, but not CCR5, in PBMCs and a human T cell line (Quiñones-Mateu et al., 2003; Feng et al., 2006). Those peptides, by modulating host surface receptors expression, acted as antiviral compound restricting cell binding and entry of HIV-1 strain with CXCR4 tropism (Quiñones-Mateu et al., 2003; Feng et al., 2006).

Conversely, LL-37 enhanced HIV-1 infection of monocyte-derived Langerhans cells (mLCs) (Ogawa et al., 2013). LL-37 treatment increased CCR5 and CD4 expression on mLCs surface, which could explain the potentiating effect of LL-37 on HIV-1 infection. Effects of the peptide were also studied in DCs. Inhibition of HIV-1 infection was observed in LL-37 treated DCs, a phenomenon which may be due to down regulation of DC-SIGN and/or CCR5 expression (Ogawa et al., 2013). Finally, LL-37 facilitated HIV-1 transmission from mLCs to CD4 + T cells whereas opposite effect was observed using DCs (Ogawa et al., 2013).

CONCLUSION

The keratinocyte is the target cell of many viruses of major importance in human health. As an immune cell that can detect viral PAMPs, it has the ability to secrete a wide range of molecules in response to the infection including many antimicrobial peptides. These peptides may then act directly on the viral particle or its replication cycle as well as modulate the innate immune response of the host. The first objective of this immunomodulation is likely to create an antiviral state by potentiating the production of cytokines and chemokines, and attracting immune cells to the site of infection. However, its precise role in the pathophysiology of viral infection remains to

be defined. Furthermore, this dual mode of direct and indirect antiviral action suggests that AMPs may have a promising therapeutic role with direct virucidal activity and limited risk of engendering viral resistance. The deployment of such potentially impactful, innovative and reliable compounds awaits success in future research on how to effectively administer them and possibly stimulate them *in situ*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC and MG wrote the draft. CB, CJ, and NL contributed to the revision of the manuscript. MW designed the figures. All authors approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE35-0001-01).

ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank Steven Tracy (Department of Pathology and Microbiology, Nebraska Medical Center) for having carefully reviewed this article.

REFERENCES

- Aguirre, S., Maestre, A. M., Pagni, S., Patel, J. R., Savage, T., Gutman, D., et al. (2012). DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog.* 8:e1002934. doi: 10.1371/journal.ppat.1002934
- Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N., and Narayanan, A. (2019a). Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections. *Viruses* 11:704. doi: 10.3390/v11080704
- Ahmed, A., Siman-Tov, G., Keck, F., Kortchak, S., Bakovic, A., Risner, K., et al. (2019b). Human cathelicidin peptide LL-37 as a therapeutic antiviral targeting Venezuelan equine encephalitis virus infections. *Antiviral Res.* 164, 61–69. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.02.002
- Aksoy, O., Parlak, E., Parlak, M., and Aksoy, H. (2016). Serum β -Defensin-2 levels and their relationship with the clinical course and prognosis in patients with crimean-congo hemorrhagic fever. *Med. Princ. Pract.* 25, 163–168. doi: 10.1159/000442177
- Alagarasu, K., Patil, P. S., Shil, P., Seervi, M., Kakade, M. B., Tillu, H., et al. (2017). In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2. *Peptides* 92, 23–30. doi: 10.1016/j.peptides.2017.04.002
- Ali, R. S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C. E., Cerio, R., and Quinn, A. G. (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117, 106–111. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01401.x
- Almine, J. F., O'Hare, C. A., Dunphy, G., Haga, I. R., Naik, R. J., Atrih, A., et al. (2017). IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat. Commun.* 8:14392. doi: 10.1038/ncomms14392
- Alvandal, C., Kamolovit, W., Wagner, S., Brauner, A., and Bohm-Starke, N. (2019). Expression of psoriasis in human papillomavirus-induced cervical high-grade squamous intraepithelial lesions. *J. Low. Genit. Tract Dis.* 23, 33–38. doi: 10.1097/LGT.0000000000000438
- Bai, X., Tian, T., Wang, P., Yang, X., Wang, Z., and Dong, M. (2015). Potential roles of placental human beta-defensin-3 and apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3G in prevention of intrauterine transmission of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* 87, 375–379. doi: 10.1002/jmv.24072
- Barlow, P. G., Findlay, E. G., Currie, S. M., and Davidson, D. J. (2014). Antiviral potential of cathelicidins. *Future Microbiol.* 9, 55–73.
- Barlow, P. G., Svoboda, P., Mackellar, A., Nash, A. A., York, I. A., Pohl, J., et al. (2011). Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS One* 6:e25333. doi: 10.1371/journal.pone.0025333
- Becknell, B., and Spencer, J. D. (2016). A review of ribonuclease 7's structure, regulation, and contributions to host defense. *Int. J. Mol. Sci.* 17:423. doi: 10.3390/ijms17030423
- Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B., and Söderlund, J. (2007). The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr. HIV Res.* 5, 410–415. doi: 10.2174/157016207781023947
- Boda, B., Benaoudia, S., Huang, S., Bonfante, R., Wiszniewski, L., Tseligka, E. D., et al. (2018). Antiviral drug screening by assessing epithelial functions and innate immune responses in human 3D airway epithelium model. *Antiviral Res.* 156, 72–79. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.06.007
- Boniface, K., Bernard, F. X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J. C., and Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.* 174, 3695–3702. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3695
- Boniotto, M., Jordan, W. J., Eskdale, J., Tossi, A., Antcheva, N., Crovella, S., et al. (2006). Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1433–1441. doi: 10.1128/AAC.50.4.1433-1441.2006
- Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.* 125, 9–13. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x
- Brice, D. C., and Diamond, G. (2019). Antiviral activities of human host defense peptides. *Curr. Med. Chem.* 27, 1420–1443. doi: 10.2174/0929867326666190805151654

- Brice, D. C., Toth, Z., and Diamond, G. (2018). LL-37 disrupts the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus envelope and inhibits infection in oral epithelial cells. *Antiviral Res.* 158, 25–33. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.025
- Büchau, A. S., Hassan, M., Kukova, G., Lewerenz, V., Kellermann, S., Würthner, J. U., et al. (2007). S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by *E. coli* through Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2596–2604. doi: 10.1038/sj.jid.5700946
- Buck, C. B., Day, P. M., Thompson, C. D., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D. R., et al. (2006). Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1516–1521.
- Celis, J. E., Crüger, D., Kiil, J., Lauridsen, J. B., Ratz, G., Basse, B., et al. (1990). Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin. *FEBS Lett.* 262, 159–164. doi: 10.1016/0014-5793(90)80179-m
- Chen, B., Miller, A. L., Rebelatto, M., Brewah, Y., Rowe, D. C., Clarke, L., et al. (2015). S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. *PLoS One* 10:e0115828. doi: 10.1371/journal.pone.0115828
- Chen, W., Liu, Z., Zhang, Q., Yan, Q., and Jing, S. (2018). Induction and antiviral activity of human β -defensin 3 in intestinal cells with picornavirus infection. *Acta Virol.* 62, 287–293. doi: 10.4149/av_2018_222
- Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Hara, M., Yokoi, H., Matsumoto, K., et al. (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur. J. Immunol.* 37, 434–444. doi: 10.1002/eji.200636379
- Chong, K. T., Xiang, L., Wang, X., Jun, E. L., Xi, L. F., and Schweinfurth, J. M. (2006). High level expression of human epithelial beta-defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Virol J.* 3:75. doi: 10.1186/1743-422X-3-75
- Crack, L. R., Jones, L., Malavive, G. N., Patel, V., and Ogg, G. S. (2012). Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin. Exp. Dermatol.* 37, 534–543. doi: 10.1111/j.1365-2230.2012.04305.x
- Currie, S. M., Findlay, E. G., McHugh, B. J., Mackellar, A., Man, T., Macmillan, D., et al. (2013). The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One* 8:e73659. doi: 10.1371/journal.pone.0073659
- Dalpe, A., and Helm, M. (2012). RNA mediated Toll-like receptor stimulation in health and disease. *RNA Biol.* 9, 828–842. doi: 10.4161/rna.20206
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., et al. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192, 1069–1074. doi: 10.1084/jem.192.7.1069
- Dean, R. E., O'Brien, L. M., Thwaite, J. E., Fox, M. A., Atkins, H., and Ulaeto, D. O. (2010). A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes. *Peptides* 31, 1966–1972. doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.028
- Di Nardo, A., Vitiello, A., and Gallo, R. L. (2003). Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.* 170, 2274–2278. doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2274
- Doss, M., White, M. R., Tecle, T., Gantz, D., Crouch, E. C., Jung, G., et al. (2009). Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. *J. Immunol.* 182, 7878–7887. doi: 10.4049/jimmunol.0804049
- Duangkhae, P., Erdos, G., Ryman, K. D., Watkins, S. C., Falo, L. D., Marques, E. T. A., et al. (2018). Interplay between keratinocytes and myeloid cells drives dengue virus spread in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 138, 618–626. doi: 10.1016/j.jid.2017.10.018
- Dugan, A. S., Maginnis, M. S., Jordan, J. A., Gasparovic, M. L., Manley, K., Page, R., et al. (2008). Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. *J. Biol. Chem.* 283, 31125–31132. doi: 10.1074/jbc.M805902200
- Ehrchen, J. M., Sunderkötter, C., Foell, D., Vogl, T., and Roth, J. (2009). The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 86, 557–566. doi: 10.1189/jlb.1008647
- Erhart, W., Alkasi, Ö., Brunke, G., Wegener, F., Maass, N., Arnold, N., et al. (2011). Induction of human β -defensins and psoriasin in vulvovaginal human papillomavirus-associated lesions. *J. Infect. Dis.* 204, 391–399. doi: 10.1093/infdis/jir079
- Fathy, H., Amin, M. M., and El-Gilany, A. H. (2012). Upregulation of human β -defensin-3 and cathelicidin LL-37 in Kaposi's sarcoma. *F1000Res.* 1:38. doi: 10.12688/f1000research.1-38.v2
- Feng, Z., Dubyak, G. R., Lederman, M. M., and Weinberg, A. (2006). Cutting edge: human beta defensin 3—a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J. Immunol.* 177, 782–786. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.782
- Ferris, L. K., Mburu, Y. K., Mathers, A. R., Fluharty, E. R., Larregina, A. T., Ferris, R. L., et al. (2013). Human beta-defensin 3 induces maturation of human langerhans cell-like dendritic cells: an antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant. *J. Invest. Dermatol.* 133, 460–468. doi: 10.1038/jid.2012.319
- Findlay, F., Pohl, J., Svoboda, P., Shakamuri, P., McLean, K., Inglis, N. F., et al. (2017). Carbon nanoparticles inhibit the antimicrobial activities of the human cathelicidin LL-37 through structural alteration. *J. Immunol.* 199, 2483–2490. doi: 10.4049/jimmunol.1700706
- Firat, Y. H., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J., and Harder, J. (2014). Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One* 9:e93941. doi: 10.1371/journal.pone.0093941
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Ståhle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., et al. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 272, 15258–15263. doi: 10.1074/jbc.272.24.15258
- Fulton, C., Anderson, G. M., Zasloff, M., Bull, R., and Quinn, A. G. (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 350, 1750–1751. doi: 10.1016/S0140-6736(05)63574-X
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., et al. (2007). Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18631–18635. doi: 10.1073/pnas.0702130104
- Gabrielsen, T. O., Dale, I., Brandtzaeg, P., Hoel, P. S., Fagerhol, M. K., Larsen, T. E., et al. (1986). Epidermal and dermal distribution of a myelomonocytic antigen (L1) shared by epithelial cells in various inflammatory skin diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 15(2 Pt 1), 173–179. doi: 10.1016/s0190-9622(86)70152-7
- Ganz, T. (2002). Epithelia: not just physical barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3357–3358. doi: 10.1073/pnas.072073199
- García, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F. J., Klüber, E., Adermann, K., et al. (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 15, 1819–1821.
- Garcia, M., Wehbe, M., Lévêque, N., and Bodet, C. (2017). Skin innate immune response to flaviviral infection. *Eur. Cytokine Netw.* 28, 41–51. doi: 10.1684/ecn.2017.0394
- Gasque, P., and Jaffar-Bandjee, M. C. (2015). The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *J. Infect.* 71, 413–421. doi: 10.1016/j.jinf.2015.06.006
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J. M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6, 57–64. doi: 10.1038/ni1142
- Gordon, Y. J., Huang, L. C., Romanowski, E. G., Yates, K. A., Proske, R. J., and McDermott, A. M. (2005). Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr. Eye Res.* 30, 385–394. doi: 10.1080/02713680590934111
- Gourru-Lesimple, G., Mathieu, C., Thevenet, T., Guillaume-Vasselin, V., Jégou, J. F., Boer, C. G., et al. (2017). Measles virus infection of human keratinocytes: possible link between measles and atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 86, 97–105. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.01.015

- Grice, E. A., and Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244–253.
- Guilloteau, K., Paris, I., Pedretti, N., Boniface, K., Juchaux, F., Huguier, V., et al. (2010). Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1[alpha], and TNF-[alpha] recapitulates some features of psoriasis. *J. Immunol.* 184, 5263–5270. doi: 10.4049/jimmunol.0902464
- Hansdottir, S., Monick, M. M., Hinde, S. L., Lovan, N., Look, D. C., and Hunninghake, G. W. (2008). Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J. Immunol.* 181, 7090–7099. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7090
- Harcourt, J. L., McDonald, M., Svoboda, P., Pohl, J., Tatti, K., and Haynes, L. M. (2016). Human cathelicidin, LL-37, inhibits respiratory syncytial virus infection in polarized airway epithelial cells. *BMC Res. Notes* 9:11. doi: 10.1186/s13104-015-1836-y
- Harder, J., and Schroder, J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779–46784. doi: 10.1074/jbc.M207587200
- Hasan, M., Ruksznis, C., Wang, Y., and Leifer, C. A. (2011). Antimicrobial peptides inhibit polyinosinic-polycytidylic acid-induced immune responses. *J. Immunol.* 187, 5653–5659. doi: 10.4049/jimmunol.1102144
- Hattinger, E., Zwicker, S., Ruzicka, T., Yuspa, S. H., and Wolf, R. (2013). Opposing functions of psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in epithelial carcinogenesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 588–594. doi: 10.1016/j.coph.2013.04.007
- Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., et al. (2006). Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J. Immunol.* 177, 8658–8666. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8658
- He, M., Zhang, H., Li, Y., Wang, G., Tang, B., Zhao, J., et al. (2018). Cathelicidin-derived antimicrobial peptides inhibit Zika virus through direct inactivation and interferon pathway. *Front. Immunol.* 9:722. doi: 10.3389/fimmu.2018.00722
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., et al. (2008). The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol.* 10, 1349–1355. doi: 10.1038/ncb1794
- Holly, M. K., Diaz, K., and Smith, J. G. (2017). Defensins in viral infection and pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.* 4, 369–391. doi: 10.1146/annurev-virology-201416-041734
- Howell, M. D., Gallo, R. L., Boguniewicz, M., Jones, J. F., Wong, C., Streib, J. E., et al. (2006). Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 24, 341–348. doi: 10.1016/j.immuni.2006.02.006
- Howell, M. D., Jones, J. F., Kisich, K. O., Streib, J. E., Gallo, R. L., and Leung, D. Y. (2004). Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J. Immunol.* 172, 1763–1767. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1763
- Howell, M. D., Streib, J. E., and Leung, D. Y. (2007). Antiviral activity of human beta-defensin 3 against vaccinia virus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1022–1025. doi: 10.1016/j.jaci.2007.01.044
- Hsieh, I. N., and Hartshorn, K. L. (2016). The role of antimicrobial peptides in influenza virus infection and their potential as antiviral and immunomodulatory therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 9:53. doi: 10.3390/ph9030053
- Hubert, P., Herman, L., Maillard, C., Caberg, J. H., Nikkels, A., Pierard, G., et al. (2007). Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo. *FASEB J.* 21, 2765–2775. doi: 10.1096/fj.06-7646com
- Inoue, H., Shirakawa, J., Togashi, Y., Tajima, B., Okuyama, T., Kyohara, M., et al. (2018). Signaling between pancreatic β cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. *J. Biol. Chem.* 293, 5934–5946. doi: 10.1074/jbc.M117.809228
- Jia, T., Serbina, N. V., Brandl, K., Zhong, M. X., Leiner, I. M., Charo, I. F., et al. (2008). Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 180, 6846–6853. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.6846
- Jin, G., Kawsar, H. I., Hirsch, S. A., Zeng, C., Jia, X., Feng, Z., et al. (2010). An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. *PLoS One* 5:e10993. doi: 10.1371/journal.pone.0010993
- Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C. G., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Gesser, B., et al. (1996). Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest. Dermatol.* 107, 5–10.
- Johnston, L. J., Halliday, G. M., and King, N. J. (1996). Phenotypic changes in Langerhans' cells after infection with arboviruses: a role in the immune response to epidermally acquired viral infection? *J. Virol.* 70, 4761–4766.
- Johnston, L. J., Halliday, G. M., and King, N. J. (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J. Invest. Dermatol.* 114, 560–568. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x
- Kalali, B. N., Köllisch, G., Mages, J., Müller, T., Bauer, S., Wagner, H., et al. (2008). Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J. Immunol.* 181, 2694–2704. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2694
- Kanda, N., Kamata, M., Tada, Y., Ishikawa, T., Sato, S., and Watanabe, S. (2011). Human β -defensin-2 enhances IFN- γ and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J. Leukoc. Biol.* 89, 935–944. doi: 10.1189/jlb.0111004
- Kim, J., Yang, Y. L., Jang, S. H., and Jang, Y. S. (2018). Human β -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity. *Virol J.* 15:124. doi: 10.1186/s12985-018-1035-2
- Klotman, M. E., and Chang, T. L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 447–456.
- Koczulla, A. R., and Bals, R. (2003). Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 63, 389–406. doi: 10.2165/00003495-200363040-00005
- Kopfnagel, V., Dreyer, S., Baumert, K., Stark, M., Harder, J., Hofmann, K., et al. (2020). RNase 7 promotes sensing of Self-DNA by human keratinocytes and activates an antiviral immune response. *J. Invest. Dermatol.* S0022-202X(20)30039-7. doi: 10.1016/j.jid.2019.09.029
- Kopfnagel, V., Wagenknecht, S., Harder, J., Hofmann, K., Kleine, M., Buch, A., et al. (2018). RNase 7 strongly promotes TLR9-mediated DNA sensing by human plasmacytoid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 138, 872–881. doi: 10.1016/j.jid.2017.09.052
- Kota, S., Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Xiang, Y., Meng, X., et al. (2008). Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. *J. Biol. Chem.* 283, 22417–22429. doi: 10.1074/jbc.M710415200
- Kozlyuk, N., Monteith, A. J., Garcia, V., Damo, S. M., Skaar, E. P., and Chazin, W. J. (2019). S100 proteins in the innate immune response to pathogens. *Methods Mol. Biol.* 1929, 275–290. doi: 10.1007/978-1-4939-9030-6_18
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., and Amagai, M. (2009). External antigen uptake by langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 206, 2937–2946. doi: 10.1084/jem.20091527
- Kunz, M., Roth, J., Sorg, C., and Kolde, G. (1992). Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases. *Arch. Dermatol. Res.* 284, 386–390. doi: 10.1007/BF00372067
- Lafferty, M. K., Sun, L., DeMasi, L., Lu, W., and Garzino-Demo, A. (2010). CCR6 ligands inhibit HIV by inducing APOBEC3G. *Blood* 115, 1564–1571. doi: 10.1182/blood-2009-06-226423
- Lai, Y., Adhikarankunnathu, S., Bhardwaj, K., Ranjith-Kumar, C. T., Wen, Y., Jordan, J. R., et al. (2011). LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One* 6:e26632. doi: 10.1371/journal.pone.0026632
- Lai, Y., and Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131–141. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003
- Lau, Y. E., Rozek, A., Scott, M. G., Goosney, D. L., Davidson, D. J., and Hancock, R. E. (2005). Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect. Immun.* 73, 583–591. doi: 10.1128/IAI.73.1.583-591.2005
- Lee, A. Y., and Körner, H. (2017). CCR6/CCL20 chemokine axis in human immunodeficiency virus immunity and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 98, 338–344. doi: 10.1099/jgv.0.000691
- Lee, C. J., Buznyk, O., Kuffova, L., Rajendran, V., Forrester, J. V., Phopase, J., et al. (2014). Cathelicidin LL-37 and HSV-1 corneal infection: peptide versus gene therapy. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 3:4. doi: 10.1167/tvst.3.3.4

- Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 23–27. doi: 10.1016/s0952-7915(99)80005-3
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., et al. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* 11, 3919–3931.
- LeMessurier, K. S., Lin, Y., McCullers, J. A., and Samarasinghe, A. E. (2016). Antimicrobial peptides alter early immune response to influenza A virus infection in C57BL/6 mice. *Antiviral Res.* 133, 208–217. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.08.013
- Lim, P. Y., Behr, M. J., Chadwick, C. M., Shi, P. Y., and Bernard, K. A. (2011). Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J. Virol.* 85, 5197–5201. doi: 10.1128/JVI.02692-10
- Lin, K. L., Suzuki, Y., Nakano, H., Ramsburg, E., and Gunn, M. D. (2008). CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J. Immunol.* 180, 2562–2572. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2562
- López-González, M., Meza-Sánchez, D., García-Cordero, J., Bustos-Arriaga, J., Vélez-Del Valle, C., Marsch-Moreno, M., et al. (2018). Human keratinocyte cultures (HaCaT) can be infected by DENV, triggering innate immune responses that include IFN λ and LL37. *Immunobiology* 223, 608–617. doi: 10.1016/j.imbio.2018.07.006
- Matsumura, T., Sugiyama, N., Murayama, A., Yamada, N., Shiina, M., Asabe, S., et al. (2016). Antimicrobial peptide LL-37 attenuates infection of hepatitis C virus. *Hepatol. Res.* 46, 924–932. doi: 10.1111/hepr.12627
- Mattar, E. H., Almeshdar, H. A., Aljaddawi, A. A., Abu Zeid, I. E., and Redwan, E. M. (2016a). Elevated concentration of defensins in hepatitis C virus-infected patients. *J. Immunol. Res.* 2016:8373819. doi: 10.1155/2016/8373819
- Mattar, E. H., Almeshdar, H. A., Uversky, V. N., and Redwan, E. M. (2016b). Virucidal activity of human α - and β -defensins against hepatitis C virus genotype 4. *Mol. Biosyst.* 12, 2785–2797. doi: 10.1039/c6mb00283h
- Mookherjee, N., Hamill, P., Gardy, J., Blimkie, D., Falsafi, R., Chikatarla, A., et al. (2009). Systems biology evaluation of immune responses induced by human host defence peptide LL-37 in mononuclear cells. *Mol. Biosyst.* 5, 483–496. doi: 10.1039/b813787k
- Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., Schitteck, B., Garbe, C., and Gallo, R. L. (2002). Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1090–1095. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.19507.x
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., and Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679–691. doi: 10.1038/nri2622
- Niyonsaba, F., Hattori, F., Maeyama, K., Ogawa, H., and Okamoto, K. (2008). Induction of a microbicidal protein psoriasin (S100A7), and its stimulatory effects on normal human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 52, 216–219. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.07.003
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Someya, A., Hirata, M., Matsuda, H., Ogawa, H., et al. (2002). A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 106, 20–26. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01398.x
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2005). The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol.* 175, 1776–1784. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1776
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., et al. (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.* 127, 594–604. doi: 10.1038/sj.jid.5700599
- Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., et al. (2013). Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77–86. doi: 10.1016/j.chom.2012.12.002
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W., and Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 2), ii17–ii21. doi: 10.1136/ard.62.suppl_2.ii17
- Ostergaard, M., Wolf, H., Orntoft, T. F., and Celis, J. E. (1999). Psoriasin (S100A7): a putative urinary marker for the follow-up of patients with bladder squamous cell carcinomas. *Electrophoresis* 20, 349–354. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990201)20:2<349::AID-ELPS349>3.0.CO;2-B
- Pace, B. T., Lackner, A. A., Porter, E., and Pahar, B. (2017). The role of defensins in HIV pathogenesis. *Mediators Inflamm.* 2017:5186904.
- Petrov, V., Funderburg, N., Weinberg, A., and Sieg, S. (2013). Human β defensin-3 induces chemokines from monocytes and macrophages: diminished activity in cells from HIV-infected persons. *Immunology* 140, 413–420. doi: 10.1111/imm.12148
- Phyu, W. K., Ong, K. C., Kong, C. K., Alizan, A. K., Ramanujam, T. M., and Wong, K. T. (2017). Squamous epitheliotropism of Enterovirus A71 in human epidermis and oral mucosa. *Sci. Rep.* 7:45069. doi: 10.1038/srep45069
- Pingen, M., Bryden, S. R., Pondeville, E., Schnettler, E., Kohl, A., Merits, A., et al. (2016). Host inflammatory response to mosquito bites enhances the severity of arbovirus infection. *Immunity* 44, 1455–1469. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.002
- Proud, D., Sanders, S. P., and Wiehler, S. (2004). Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 172, 4637–4645. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4637
- Puiprom, O., Morales Vargas, R. E., Potiwat, R., Chaichana, P., Ikuta, K., Ramasoota, P., et al. (2013). Characterization of chikungunya virus infection of a human keratinocyte cell line: role of mosquito salivary gland protein in suppressing the host immune response. *Infect. Genet. Evol.* 17, 210–215. doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.005
- Pulido, D., Torrent, M., Andreu, D., Nogués, M. V., and Boix, E. (2013). Two human host defense ribonucleases against mycobacteria, the eosinophil cationic protein (RNase 3) and RNase 7. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3797–3805. doi: 10.1128/AAC.00428-13
- Quiñones-Mateu, M. E., Lederman, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H. R., et al. (2003). Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 17, F39–F48. doi: 10.1097/00002030-200311070-00001
- Rademacher, F., Dreyer, S., Kopfnagel, V., Gläser, R., Werfel, T., and Harder, J. (2019). The antimicrobial and immunomodulatory function of RNase 7 in skin. *Front. Immunol.* 10:2553. doi: 10.3389/fimmu.2019.02553
- Rademacher, F., Simanski, M., and Harder, J. (2016). RNase 7 in cutaneous defense. *Int. J. Mol. Sci.* 17:560.
- Reghunathan, R., Jayapal, M., Hsu, L. Y., Chng, H. H., Tai, D., Leung, B. P., et al. (2005). Expression profile of immune response genes in patients with severe acute respiratory syndrome. *BMC Immunol.* 6:2. doi: 10.1186/1471-2172-6-2
- Robert, C., and Kupper, T. S. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N. Engl. J. Med.* 341, 1817–1828. doi: 10.1056/NEJM199912093412407
- Röhrli, J., Yang, D., Oppenheim, J. J., and Hehlhans, T. (2010). Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J. Immunol.* 184, 6688–6694. doi: 10.4049/jimmunol.0903984
- Ryan, L. K., Dai, J., Yin, Z., Megjugorac, N., Uhlhorn, V., Yim, S., et al. (2011). Modulation of human beta-defensin-1 (hBD-1) in plasmacytoid dendritic cells (PDC), monocytes, and epithelial cells by influenza virus, Herpes simplex virus, and Sendai virus and its possible role in innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 90, 343–356. doi: 10.1189/jlb.0209079
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., and Tessier, P. A. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170, 3233–3242. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3233
- Sato, E., Hiromatsu, K., Murata, K., and Imafuku, S. (2018). Loss of ATP2A2 allows herpes simplex virus 1 infection of a human epidermis model by disrupting innate immunity and barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 138, 2540–2549. doi: 10.1016/j.jid.2018.05.019
- Sayers, C. L., and Elliott, G. (2016). Herpes simplex virus 1 enters human keratinocytes by a Nectin-1-dependent, rapid plasma membrane fusion pathway that functions at low temperature. *J. Virol.* 90, 10379–10389. doi: 10.1128/JVI.01582-16
- Schmid, M. A., and Harris, E. (2014). Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog.* 10:e1004541. doi: 10.1371/journal.ppat.1004541

- Schögler, A., Muster, R. J., Kieninger, E., Casaulta, C., Tapparel, C., Jung, A., et al. (2016). Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37. *Eur. Respir. J.* 47, 520–530. doi: 10.1183/13993003.00665-2015
- Scudiero, O., Galdiero, S., Cantisani, M., Di Noto, R., Vitiello, M., Galdiero, M., et al. (2010). Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2312–2322. doi: 10.1128/AAC.01550-09
- Semple, F., and Dorin, J. R. (2012). β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.* 4, 337–348. doi: 10.1159/000336619
- Semple, F., MacPherson, H., Webb, S., Kilanowski, F., Lettice, L., McGlasson, S. L., et al. (2015). Human β -D-3 exacerbates MDA5 but suppresses TLR3 responses to the viral molecular pattern mimic polyinosinic:polycytidylic acid. *PLoS Genet.* 11:e1005673. doi: 10.1371/journal.pgen.1005673
- Sharif, S., Nakatani, Y., Wise, L., Corbett, M., Real, N. C., Stuart, G. S., et al. (2016). A broad-spectrum chemokine-binding protein of bovine papular stomatitis virus inhibits neutrophil and monocyte infiltration in inflammatory and wound models of mouse skin. *PLoS One* 11:e0168007. doi: 10.1371/journal.pone.0168007
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H. M., Gläser, R., and Harder, J. (2013). IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes. *PLoS One* 8:e59531. doi: 10.1371/journal.pone.0059531
- Singh, D., Qi, R., Jordan, J. L., San Mateo, L., and Kao, C. C. (2013). The human antimicrobial peptide LL-37, but not the mouse ortholog, mCRAMP, can stimulate signaling by poly(I:C) through a FPRL1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 8258–8268. doi: 10.1074/jbc.M112.440883
- Smithrithie, R., Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Ushio, H., Ikeda, S., Okumura, K., et al. (2015). Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 77, 46–53. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.12.001
- Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., et al. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97, 3951–3959. doi: 10.1182/blood.v97.12.3951
- Soruri, A., Grigat, J., Forssmann, U., Riggert, J., and Zwierner, J. (2007). beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur. J. Immunol.* 37, 2474–2486. doi: 10.1002/eji.200737292
- Sousa, F. H., Casanova, V., Findlay, F., Stevens, C., Svoboda, P., Pohl, J., et al. (2017). Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus. *Peptides* 95, 76–83. doi: 10.1016/j.peptides.2017.07.013
- Sun, L., Finnegan, C. M., Kish-Catalone, T., Blumenthal, R., Garzino-Demo, P., La Terra Maggiore, G. M., et al. (2005). Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J. Virol.* 79, 14318–14329. doi: 10.1128/JVI.79.22.14318-14329.2005
- Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., et al. (2006). The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8:R69. doi: 10.1186/ar1939
- Surasombatpattana, P., Hamel, R., Patramool, S., Luplertlop, N., Thomas, F., Desprès, P., et al. (2011). Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1664–1673. doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.009
- Szukiewicz, D., Alkhalayla, H., Pyzlak, M., Watroba, M., Szewczyk, G., and Wejman, J. (2016). Human beta-defensin 1, 2 and 3 production by amniotic epithelial cells with respect to human papillomavirus (HPV) infection, HPV oncogenic potential and the mode of delivery. *Microb. Pathog.* 97, 154–165. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.010
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 227, 75–86.
- Takiguchi, T., Morizane, S., Yamamoto, T., Kajita, A., Ikeda, K., and Iwatsuki, K. (2014). Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 augments interferon- β expression and antiviral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 171, 492–498. doi: 10.1111/bjd.12942
- Teclé, T., White, M. R., Gantz, D., Crouch, E. C., and Hartshorn, K. L. (2007). Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. *J. Immunol.* 178, 8046–8052. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.8046
- Thorey, I. S., Roth, J., Regenbogen, J., Halle, J. P., Bittner, M., Vogl, T., et al. (2001). The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J. Biol. Chem.* 276, 35818–35825. doi: 10.1074/jbc.M104871200
- Tjabringa, G. S., Ninaber, D. K., Drijfhout, J. W., Rabe, K. F., and Hiemstra, P. S. (2006). Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140, 103–112. doi: 10.1159/000092305
- Tripathi, S., Teclé, T., Verma, A., Crouch, E., White, M., and Hartshorn, K. L. (2013). The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J. Gen. Virol.* 94(Pt 1), 40–49. doi: 10.1099/vir.0.045013-0
- Tripathi, S., Verma, A., Kim, E. J., White, M. R., and Hartshorn, K. L. (2014). LL-37 modulates. *J. Leukoc. Biol.* 96, 931–938.
- Tugizov, S., Berline, J., Herrera, R., Penaranda, M. E., Nakagawa, M., and Palefsky, J. (2005). Inhibition of human papillomavirus type 16 E7 phosphorylation by the S100 MRP-8/14 protein complex. *J. Virol.* 79, 1099–1112. doi: 10.1128/JVI.79.2.1099-1112.2005
- Uchio, E., Inoue, H., and Kadonosono, K. (2013). Anti-adenoviral effects of human cationic antimicrobial protein-18/LL-37, an antimicrobial peptide, by quantitative polymerase chain reaction. *Korean J. Ophthalmol.* 27, 199–203. doi: 10.3341/kjo.2013.27.3.199
- Ulaeto, D. O., Morris, C. J., Fox, M. A., Gumbleton, M., and Beck, K. (2016). Destabilization of α -Helical structure in solution improves bactericidal activity of antimicrobial peptides: opposite effects on bacterial and viral targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1984–1991. doi: 10.1128/AAC.02146-15
- Vazquez, C., and Horner, S. M. (2015). MAVS Coordination of antiviral innate immunity. *J. Virol.* 89, 6974–6977. doi: 10.1128/JVI.01918-14
- Vilas Boas, L. C., de Lima, L. M., Migliolo, L., Mendes, G. D., de Jesus, M. G., Franco, O. L., et al. (2017). Linear antimicrobial peptides with activity against herpes simplex virus 1 and Aichi virus. *Biopolymers* 108:e22871. doi: 10.1002/bip.22871
- Voss, A., Bode, G., Sopalla, C., Benedyk, M., Varga, G., Böhm, M., et al. (2011). Expression of S100A8/A9 in HaCaT keratinocytes alters the rate of cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 585, 440–446. doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.037
- Watson, P. H., Leygue, E. R., and Murphy, L. C. (1998). Psoriasin (S100A7). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 567–571.
- Welte, T., Reagan, K., Fang, H., Machain-Williams, C., Zheng, X., Mendell, N., et al. (2009). Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 11), 2660–2668. doi: 10.1099/vir.0.011783-0
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., López-Boado, Y. S., Stratman, J. L., et al. (1999). Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286, 113–117. doi: 10.1126/science.286.5437.113
- Wilson, S. S., Wiens, M. E., and Smith, J. G. (2013). Antiviral mechanisms of human defensins. *J. Mol. Biol.* 425, 4965–4980.
- Wolf, R., Ruzicka, T., and Yuspa, S. H. (2011). Novel S100A7 (psoriasin)/S100A15 (koebnerisin) subfamily: highly homologous but distinct in regulation and function. *Amino Acids* 41, 789–796. doi: 10.1007/s00726-010-0666-4
- Wong, J. H., Legowska, A., Rolka, K., Ng, T. B., Hui, M., Cho, C. H., et al. (2011). Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides* 32, 1117–1122. doi: 10.1016/j.peptides.2011.04.017
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., et al. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525–528. doi: 10.1126/science.286.5439.525
- Yong, H. Y., and Luo, D. (2018). RIG-I-Like receptors as novel targets for pan-antivirals and vaccine adjuvants against emerging and re-emerging viral infections. *Front. Immunol.* 9:1379. doi: 10.3389/fimmu.2018.01379
- Yoshio, H., Tollin, M., Gudmundsson, G. H., Lagercrantz, H., Jörnvall, H., Marchini, G., et al. (2003). Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr. Res.* 53, 211–216. doi: 10.1203/01.PDR.0000047471.47777.B0

- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_1
- Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Nagaoka, I., Okumura, K., et al. (2008). Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* 124, 357–367. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02782.x
- Zhu, L., Okano, S., Takahara, M., Chiba, T., Tu, Y., Oda, Y., et al. (2013). Expression of S100 protein family members in normal skin and sweat gland tumors. *J. Dermatol. Sci.* 70, 211–219. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.03.002

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Chessa, Bodet, Jousselin, Wehbe, Lévêque and Garcia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

c. Actualisation des données de la littérature relatives aux propriétés des PAMs synthétisés par le kératinocyte.

Yu *et al.* ont récemment montré que la cathélicidine humaine LL-37 et deux de ses dérivés synthétiques avaient un effet antiviral contre le virus Ebola. En effet, lors de l'infection de cellules Hela, ou de macrophages humains, par un virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) recombinant, exprimant à sa surface la glycoprotéine d'enveloppe du virus Ebola, une inhibition de 80% de la réplication virale a été observée en présence de ces peptides à une concentration de 5 μ M. L'infection de cellules Hela par le virus natif a confirmé les propriétés antivirales de la LL-37 vis-à-vis d'Ebola. Le mécanisme d'action identifié serait une inhibition dose-dépendante de l'entrée du virus dans la cellule cible plutôt qu'une altération de la réplication virale intracellulaire. [118] Un autre groupe a testé le potentiel antiviral de la LL-37 et de son homologue murin CRAMP (*Cathelicidin-Related AntiMicrobial Peptide*) contre l'Entérovirus A71. En effet, si les activités antivirales des peptides antimicrobiens vis-à-vis des virus enveloppés ont été largement décrites, leur capacité à agir contre les virus nus reste encore discutée. L'expression de la cathélicidine murine était significativement augmentée chez les souriceaux nouveau-nés infectés par l'Entérovirus A71 et la cinétique de cette augmentation était corrélée à la décroissance de la réplication virale. *In vitro*, les expérimentations ont montré que la LL-37 et CRAMP réduisaient considérablement l'effet cytopathique, le nombre de copies d'ARN viral intracellulaires, les niveaux d'expression de la protéine de capsid VP1 et la sécrétion de nouveaux virions. L'étude du mécanisme d'action a révélé que la LL-37 et CRAMP n'étaient pas virucides mais stimulaient la réponse immunitaire antivirale cellulaire. De plus, en complément de leurs propriétés immunomodulatrices, les deux peptides avaient la capacité de bloquer l'attachement du virus à la cellule cible. [119] De façon similaire, la LL-37 peut empêcher l'entrée du SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*) dans la cellule en se liant à la glycoprotéine de surface virale Spike et en empêchant la liaison entre la protéine S et son récepteur ACE2. [120, 121]

Les données récentes de la littérature concernant les bêta-défensines humaines de type 2 et de type 3 ont montré leur capacité à inhiber la réplication du VIH *in vitro*, dans des macrophages primaires humains, avec un effet dose-dépendant. L'effet des peptides a été évalué en quantifiant l'antigène P24 relargué dans le surnageant des cellules infectées. Il semblerait que les peptides aient un effet sur les étapes précoces du cycle viral une fois le

rétrovirus entré dans la cellule cible. [122] Par ailleurs, Zhang *et al.* ont démontré qu'hBD-2, à l'image de la LL-37, empêchait la fixation du domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine Spike du SARS-CoV-2 à ACE2. hBD-2 est ainsi capable d'inhiber l'entrée de pseudo-virions portant la protéine Spike dans des cellules HEK293T génétiquement modifiées pour exprimer ACE2. [123, 124] L'expression d'hBD-2 par l'organisme pourrait ainsi constituer un des mécanismes de défense de l'organisme contre la COVID-19 (*CORonavirus Induced Disease 2019*). [125]

Enfin, des études récentes ont mis en évidence une augmentation de la concentration en peptides S100, notamment S100A8, chez les patients présentant une forme sévère de COVID-19. Les concentrations sériques en peptides S100 pourraient donc être un marqueur prédictif de l'évolution clinique de la maladie. [126, 127]

L'ensemble de ces résultats confirment l'existence d'interactions majeures entre ces différents PAMs et l'histoire naturelle de l'infection par des espèces virales très variées.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, sont capables de synthétiser et de sécréter, *a minima*, 9 peptides antimicrobiens, de façon constitutive ou au cours de l'inflammation viro-induite. Ces peptides sont la cathélicidine humaine LL-37, les β -défensines humaines 1 à 4, trois peptides de la famille S100, calprotectine S100A8/A9, psoriasine S100A7 et koebnerisine S100A15, et la RNase 7. Certains d'entre eux ont déjà fait la preuve de leurs propriétés antivirales et immunomodulatrices. Cependant, malgré leur production *in situ*, leur rôle n'a jamais été étudié dans le contexte de l'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV. [110, 128, 129]

L'objectif de ce travail était donc d'étudier les propriétés antivirales directes et indirectes, immunomodulatrices, de quatre des neuf peptides antimicrobiens synthétisés par le kératinocyte humain vis-à-vis du virus West Nile, un arbovirus autochtone en France métropolitaine et susceptible d'émergence. Les activités antivirales et immunomodulatrices de la cathélicidine humaine LL-37 et de la β -défensine humaine de type 3 avaient déjà été décrites mais n'avaient jamais été étudiées dans le contexte de l'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV. En revanche, les potentialités antivirales de la psoriasine S100A7 et de la calprotectine S100A8/A9 n'avaient jusqu'ici jamais été explorées et le travail réalisé ici correspond à leur toute première évaluation.

De façon générale, les résultats obtenus participent à l'évaluation des capacités antivirales des molécules produites par les cellules résidentes de la peau en réponse à l'infection virale. L'identification d'acteurs cutanés disposant d'une activité anti-WNV est, en effet, susceptible de servir de base à de nouvelles stratégies thérapeutiques par la conception d'analogues contre l'infection, curatifs ou prophylactiques, ou *via* le recours à des agonistes capables de stimuler spécifiquement leur synthèse.

ETUDE DES PROPRIETES ANTIVIRALES ET IMMUNOMODULATRICES DE LA CATHÉLICIDINE HUMAINE ET DE LA BETA-DEFENSINE DE TYPE 3

Le Virus West Nile est un flavivirus émergent, transmis à l'Homme *via* la piqûre d'un moustique du genre *Culex* et dont l'infection peut se manifester par différents symptômes allant du syndrome pseudo-grippal à l'encéphalite. Lors du repas sanguin, le virus est inoculé au niveau de la peau où il infecte les kératinocytes de l'épiderme, provoquant une réponse inflammatoire viro-induite incluant la synthèse de peptides antimicrobiens. Parmi les peptides produits par le kératinocyte, la cathélicidine humaine (LL-37) et hBD-3 sont connues pour leur propriétés antivirales et immunomodulatrices. [130]

Au cours de ce travail, nous avons, pour la première fois, évalué leur rôle dans le contexte de l'infection de kératinocytes primaires humains par le WNV. Nos résultats montrent une activité antivirale directe de la LL-37 vis-à-vis du WNV. En effet, une diminution de la charge virale dans le surnageant de culture de kératinocytes infectés et du titre viral d'une suspension de WNV ont été observées en présence du peptide. A l'inverse, il n'a pas été montré d'effet antiviral d' hBD-3 aux concentrations testées. Par ailleurs, les deux peptides ont démontré des propriétés immunomodulatrices, que ce soit dans le cadre de la stimulation des kératinocytes par de l'acide polyinosinique-polycytidylique ou poly (I:C), un ARN double brin synthétique mimant les intermédiaires de réplication générés au cours de la réplication du génome viral, ou lors de l'infection par le WNV. Leur présence au cours de la stimulation ou de l'infection a ainsi significativement augmenté la réponse antivirale cellulaire aux niveaux transcriptomique et protéique par rapport aux cellules stimulées ou infectées en leur absence.

En conclusion, cette étude a mis en évidence une activité antivirale directe de la LL-37 vis-à-vis du WNV. Elle a également confirmé le rôle immunostimulateur majeur de ces PAMs, complémentaire de leur capacité à inactiver directement les pathogènes, dans un modèle kératinocyte primaire/WNV où il n'avait, jusqu'ici, pas été étudié. Elle souligne enfin les potentialités antivirales des molécules produites par les kératinocytes à la porte d'entrée et au site initial de réplication du WNV dans l'organisme.

2 *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary* 3 *keratinocyte infection with West Nile virus*

4 Céline Chessa^{1,2}, Charles Bodel², Clément Jousset^{1,2}, Andy Larivière^{1,2}, Alexia Damour^{1,2}, Julien Garnier³, Nicolas
5 Lévêque^{1,2}, Magali Garcia^{1,2,*}.

- 6 1. Laboratoire de Virologie, CHU de Poitiers, 2, rue de la milétrie, CS 90577, 86000 Poitiers, France.
7 2. Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, LITEC, UR 15560, Université de Poitiers, Pôle
8 Biologie Santé, Bâtiment B36, 1, rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 POITIERS Cedex 9, France.
9 3. Qima Bioalternatives, 1 rue des plantes, 86160 Gençay, France.
10 * Correspondence: magali.garcia@chu-poitiers.fr
11

12 **Abstract:** West Nile virus (WNV) is an emerging flavivirus transmitted through
13 mosquito bite and responsible for a wide range of clinical manifestations. Following
14 their inoculation within the skin, flaviviruses replicate in keratinocytes of the epidermis,
15 inducing an innate immune response including the production of antimicrobial
16 peptides (AMPs). Among them, the cathelicidin LL-37 and the human beta-defensin
17 (hBD)-3 are known for their antimicrobial and immunomodulatory properties. We
18 assessed their role during WNV infection of human primary keratinocytes. LL-37
19 reduced the viral load in the supernatant of infected keratinocytes and of the titer of a
20 viral inoculum incubated in the presence of the peptide suggesting a direct antiviral
21 effect of this AMP. Conversely, WNV replication was not inhibited by hBD-3. The two
22 peptides then demonstrated immunomodulatory properties whether in the context of
23 keratinocyte stimulation by poly(I:C) or infection by WNV, but not alone. This study
24 demonstrates the immunostimulatory properties of these two skin AMPs at the initial
site of WNV replication and the ability of LL-37 to directly inactivate West Nile
infectious particles. The results provide new information on the multiple functions of
these two peptides and underline the potential of AMPs as new antiviral strategies in
the fight against flaviviral infections.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F. *Viruses* **2022**, *14*,
x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays
neutral with regard to jurisdictional
claims in published maps and
institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: antimicrobial peptides, LL-37, hBD-3, West Nile virus, flavivirus,
immunomodulation, antiviral, keratinocytes

1. Introduction

Arboviruses are emerging single-stranded positive-sense RNA viruses, pathogenic for
humans, transmitted by blood-sucking arthropods, predominantly mosquitoes. First
described in Uganda in 1937 [1], the flavivirus West Nile virus (WNV) is an arbovirus
affecting all continents and considered endemic in Europe, and the neighboring
countries of the Mediterranean basin, with reports of cases each year and epidemics in
some years [2–4]. The year 2018 was marked by a particularly large number of cases in

Europe with 2,083 infections reported, which represented more than all the cases declared over the previous 7 years (1,832 cases from 2011 to 2017) [5]. WNV can be responsible for a wide range of clinical manifestations from mild flu-like illness to encephalitis. There is to date no human vaccine or antiviral to combat WNV infections. In humans and other mammals, WNV infection starts with inoculation of the virus during the blood meal of the mosquito, mainly into the extravascular compartment of the epidermis and the dermis, simultaneously with its anti-hemostatic, anticoagulant, anti-inflammatory and vasodilatory saliva [6,7]. Keratinocytes are the main cells in the epidermis. They have been demonstrated to be permissive, both *in vivo* and *in vitro*, to WNV replication, amplifying the viral load before the virus spreads through the body [8,9]. Conversely, keratinocytes also act as immune cells that can initiate an innate immune response to fight viral infection [9]. Indeed, they harbor highly conserved pathogen recognition receptors (PRRs) such as transmembrane toll-like receptors (TLRs) or cytosolic RIG-I-like receptors (RLRs) that contribute to the initiation of innate immune response [10]. After sensing single-stranded RNA genomes or double-stranded RNAs synthesized during WNV replication cycle, PRRs are involved in activation of signaling pathways leading to the induction of expression of chemokines, cytokines such as types I and III interferons (IFNs), and antimicrobial peptides (AMPs), which constitute the first line of defense of the host [11,12]. AMPs are key players in innate immunity. AMPs are 12 to 50 amino-acid peptides, mostly amphiphilic and cationic, exerting broad spectrum antimicrobial activity. Antiviral properties of AMPs may combine intracellular activity, on translation, viral RNA synthesis or virus particle assembly, with extracellular inactivation, by envelope disruption or aggregation of viral particles, to fight viruses [13–19]. Moreover, in addition to their direct antiviral activities on virus replication cycle, AMPs display immunomodulatory properties that contribute to host defense, including chemotactic activity, proliferation and differentiation of immune cells, and regulation of cytokine/chemokine production [20,21]. In the skin, keratinocytes are the main cells involved in AMP production (reviewed in [22]). They produce and secrete at least nine AMPs including the human cathelicidin LL-37 and type 3 human β -defensin (hBD-3). LL-37 is a 37 amino acid-residue, amphipathic, α -helical peptide and the only known human cathelicidin, while peptides of this large family have been isolated from numerous non-human species [23,24]. Defensins are small molecules between 24 and 42 amino-acids characterized by a β -sheet structure with 3 disulfide bounds. In humans, defensins are divided into α -defensins, referred to as human neutrophil peptides (hNPs), and β -defensins (hBDs) expressed in myeloid and epithelial cells. There are about 37 hBDs [21,25]. Four (hBD-1 to -4) have been detected in the epidermis. Expression of LL-37 and hBD-3 by keratinocytes has been shown to be rapidly induced following infection with viruses such as type 2 herpes simplex virus, vaccinia virus and the arboviruses dengue virus (DENV) or WNV [21,26–30]. Furthermore, these two peptides display antiviral properties against many viruses that replicate in the skin, including DENV and Zika virus (ZIKV) [14,16,31–35]. Finally, LL-37 has been reported to exert indirect antiviral

activity through immunomodulatory properties, by interfering with TLR signaling and attracting immune cells at the site of infection, promoting an inflammatory context favorable to pathogen eradication (reviewed in [22]). All in all, by their production at the initial replication site of arboviruses and their direct and/or indirect antiviral activities, these two peptides represent credible candidates as molecules active against a virus for which we have no treatment or vaccine for humans. In this study, we assessed the antiviral properties of the skin AMPs LL-37 and hBD-3 against WNV. We investigated their ability to inhibit WNV replication and infectious particle production in human primary keratinocytes. Then, we unraveled the mechanism of their antiviral activity by successively studying their ability to modulate the host's immune response or to act by a direct, virucidal action on the viral particle. The results provide new information on the multiple functions of these two peptides and underline the potential of AMPs as new antiviral strategies in the fight against flaviviral infections.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and culture of normal human epidermal keratinocytes from human skin samples

The Ethics Committee of the Poitiers University Hospital approved the use of human skin samples for research studies. After the provision of fully informed consent, normal abdominal or breast skin was obtained from patients undergoing plastic surgery [36]. Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) were seeded in sterile 24-well culture plates at a density of 2×10^4 cells/well in Keratinocyte-Serum Free Medium (K-SFM; Gibco) supplemented with bovine pituitary extract (BPE; Gibco) 25 µg/ml and epidermal growth factor (EGF; Gibco) 0.25 ng/ml and cultured to 80 % confluence. Cells were then starved overnight in K-SFM without growth factors before stimulation.

2.2. The Peptides and their cytotoxicity

Recombinant human LL-37 and hBD-3 were purchased from Invivogen and PeproTech respectively. A 1 mg/mL stock solution of LL-37 and 500 µg/mL of hBD-3 was prepared by dissolving lyophilized synthetic peptides in sterile water, then aliquoted and frozen at -80°C until use. LL-37 and hBD-3 cytotoxicity on NHEK was determined following incubation for 48 h with concentrations ranging from 1 to 20 µg/mL using the cell proliferation kit II (XTT, Roche), as previously described [37]. For LDH assay, supernatants were collected after 24 h and mixed with 500 µL of PBS – 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Cells were lysed with 1 mL of PBS – 0.1% Triton X-100 and sonicated for 30 s. The LDH released was measured with the Cobas® (Roche) analyzer and viability was calculated, yielding the ratio between the LDH released in supernatants and the total LDH measured in both supernatants and cell lysates.

2.3. The virus strain and its production

The WNV strain used in this work belongs to lineage 1 and was isolated from a human brain during the epidemic that occurred in Tunisia in 1997 (kindly gifted by the French National Reference Center on Arboviruses, Marseille, France). The viral stock

was produced on the *Aedes albopictus* clone C6/36 cells (ATCC® CRL-1660™). Insect cells were cultivated in Leibovitz's L-15 medium (Gibco) supplemented with 2 % of tryptose-phosphate (Gibco) and 5 % of FBS in 75-cm² tissue culture flask at 28°C until 50% of confluency and then infected at a Multiplicity Of Infection (MOI) of 0.01 for 72 h. Cell supernatants were clarified by centrifugation for 15 min at 1,500 × g and frozen at -80°C in cryotubes containing 500 µL of Leibovitz's L-15 medium supplemented with 0.5 M sucrose and 50 mM HEPES. The final titer of the viral suspension was 10^{7.97} TCID₅₀ (median Tissue Culture Infection Dose) per mL as determined by plaque assays on Vero cell monolayers as described below.

2.4. Stimulation and infection protocols

Human primary keratinocyte cultures (60-80% of confluency) were stimulated for 3, 24 or 48 hours with poly(I:C), a synthetic analog of double-stranded (ds) RNA that mimics ds replicative intermediates generated during flavivirus genome replication at a final concentration of 0.1 µg/mL, or infected with WNV at a MOI of 0.1, in presence or absence of LL-37 or hBD-3 at final concentrations of 0.1, 1 and 10 µg/mL, before being incubated at 37°C in 5% CO₂ in K-SFM medium [12]. Cell culture supernatants and cell monolayers were collected at each point of the time course infection in order to perform, respectively, viral quantification by RT-qPCR and virus titration, and viral quantification by RT-qPCR and transcriptomic analysis of inflammatory marker expression as described below.

2.5. RNA isolation

Total RNA extraction from keratinocyte monolayers was performed using the Nucleospin RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). RNA was eluted in 30 µL of RNase-free H₂O before being quantified using the Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). In addition, RNA extraction was performed from 200 µL of keratinocyte supernatants on the NucliSENS easyMAG (Biomérieux) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Monitoring of the expression of inflammatory markers

Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using SuperScript II kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real time (RT)-PCR was performed in 96-well plates using LightCycler-FastStart DNA Master^{Plus}SYBR GREEN I kit (Roche, France) on LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Reaction mixtures consisted of 1X DNA Master Mix (Applied Biosystems), 1 µM forward and reverse primers designed using Primer 3 software and 12.5 ng of cDNA template in a total volume of 10 µL. PCR conditions were as follows: 5 min at 95 °C, 40 amplification cycles comprising 20 s at 95 °C, 15 s at 64 °C and 20 s at 72 °C. Samples were normalized with regard to two independent control housekeeping genes (Glyceraldehyde-Phospho-Dehydrogenase and 28S rRNA gene) and reported according to the $\Delta\Delta CT$ method as RNA fold increase:

$$2^{\Delta\Delta CT} = 2^{\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{reference}}}$$

2.7. Viral quantification by RT-qPCR

Viral quantification in cell supernatants and keratinocyte monolayers was performed using a one-step real time RT-PCR assay from 5 µL of total RNA in 96-well plates on Applied Biosystems 7500 thermocycler. Reaction mixtures consisted of 12.5 µL of Master Mix (Invitrogen), 0.5 µL (0.2 µM) of forward (5'-3' GTGCGGTCTACGATCAGTTT) and reverse primers (5'-3' CACTAAGGTCCACACCATTCTC), and 0.25 µL (0.1 µM) of 5'FAM and 3'Dark Quencher probe (5'-3' AATGTGGAAGCAGTGAAGGACGA), 0.5 µL of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) and DNA polymerase platinum Taq (Invitrogen), 0.5 µL of RNase out (Invitrogen) and 5.25 µL of water. The calibration range was performed with a transcript produced using a plasmid containing WNV genome deleted from genes coding structural proteins provided by Dr P.W. Mason (Microbiology and Immunology department, Texas University, Galveston, USA). The transcripts were diluted in order to obtain a calibration range allowing the quantification of viral load from 10^2 to 10^7 RNA copies/mL. Each standard of the calibration curve was added in duplicate to each analysis.

2.8. Viral quantification by end-point dilution assay

Vero cells were seeded, in 96-well plates, the day before titration at the rate of 4×10^3 cells/well in DMEM (Gibco) supplemented with 2% SVF. The suspension was successively diluted from 10^{-1} to 10^{-9} in DMEM medium supplemented with 2% SVF. Then, 100 µL of each dilution were deposited in 6 wells of a row. A reading was performed after 96 h of incubation at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. The wells, in which the cells had a cytopathic effect, were considered positive for viral infection. The titer of the viral suspension was then determined using Kärber's method for assessing the TCID₅₀.

2.9. Virucidal property assessment

The virucidal properties of LL-37 and hBD-3 were assessed by pre-incubating $1.10^{5.3}$ TCID₅₀/mL of the WNV stock solution with 10 µg/mL of the AMP in a final volume of 0.1 mL. After 1 h incubation at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂, the residual infectious titer of the viral suspension was then measured by viral titration using the end-point dilution assay on Vero cells as described above and compared to that of the untreated viral suspension.

2.10. Viperin (RSAD2) quantification by immunofluorescence

After 48 h of infection and/or stimulation, keratinocyte supernatant was removed, and the cell monolayer was washed with warm PBS (Thermofisher Scientific) before being fixed with 4% paraformaldehyde (Microm Microtech) during 20 minutes at room temperature and washed again with PBS. After removing the PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min and blocked with 1% BSA in

PBS for 1 h. Then keratinocytes were incubated for 1 h in presence of a 1/100 diluted viperin antibody (Sigma-Aldrich) and then washed three times. For immunostaining, cells were incubated with a fluorescent secondary goat anti-mouse IgG and cell nuclei were stained with Hoechst 33342. Fluorescent images were obtained using a IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, United Kingdom) with a 20 x objective.

2.11. Type III interferon quantification using HEK-Blue™ IFN-λ cells

After UV inactivation of WNV at 2 joules/cm² using a UV Crosslinker BIO-LINK BLX 254(Vilber Lourmat), levels of type III IFNs were determined in cell culture supernatants, in duplicates for each sample, using IFN-λ reporter human embryonic kidney (HEK)293 cells (Invivogen) in accordance with the manufacturers' specifications.

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the nonparametric Mann Whitney test (two-tailed; GraphPad Prism 5 software). *p* Values < 0.05 were considered as significant. All data were expressed as mean ± SEM from at least three independent experiments.

3. Results

3.1. LL-37 and hBD-3 impact on human primary keratinocyte viability

The cytotoxicity of LL-37 and hBD-3 was assessed on NHEK at concentrations ranging from 1 to 20 µg/mL using a colorimetric XTT cell viability assay and a LDH assay, which measures cellular metabolic activity and plasma membrane permeabilization, respectively. After 48 h of incubation, concentrations up to 10 µg/mL had no significant impact on keratinocyte viability, which remained greater than or equal to 90 %, by comparison to non-treated cells (Figure 1). Consequently, concentrations of 0.1, 1 and 10 µg/mL were chosen for the following experiments.

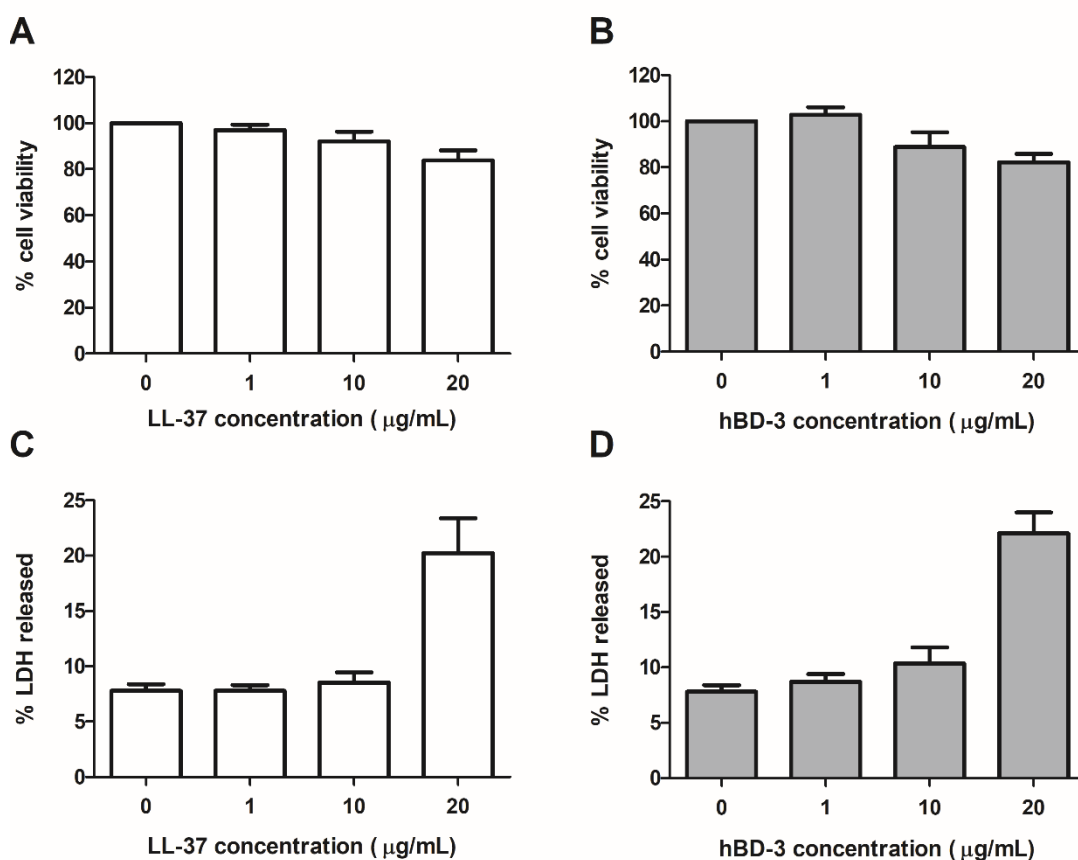


Figure 1. Cytotoxicity assays. The cytotoxicity of concentrations of LL-37 or hBD-3 ranging from 1 to 20 µg/mL was assessed on primary human keratinocytes after 48 h of incubation using XTT tests (A and B) or lactate dehydrogenase (LDH) release assay (C and D). Mean +/- SEM of at least 3 independent experiments are presented here.

3.2 WNV replication in human primary keratinocytes treated or not with LL-37 and hBD-3

Human primary keratinocytes were infected for 24 h with WNV at a MOI of 0.1 in the presence or absence of LL-37 and hBD-3 at 1 or 10 µg/mL. The AMPs were added 1 h before infection and left during the 24 h replication kinetics. The viral RNA concentration was subsequently measured in the cell monolayer as well as in the cell supernatant by RT-qPCR to assess the effect of the peptides on WNV replication (Figure 2). No significant difference in viral load was observed in the cell monolayers whether or not treated with the AMPs. However, a significant 5.5-fold decrease of viral RNA was noted in the cell supernatant in presence of 10 µg/mL of LL-37 compared with untreated cells. These results show that while LL-37 inhibits WNV replication in human primary keratinocytes, treatment with these concentrations of hBD-3 does not seem to have any effect.

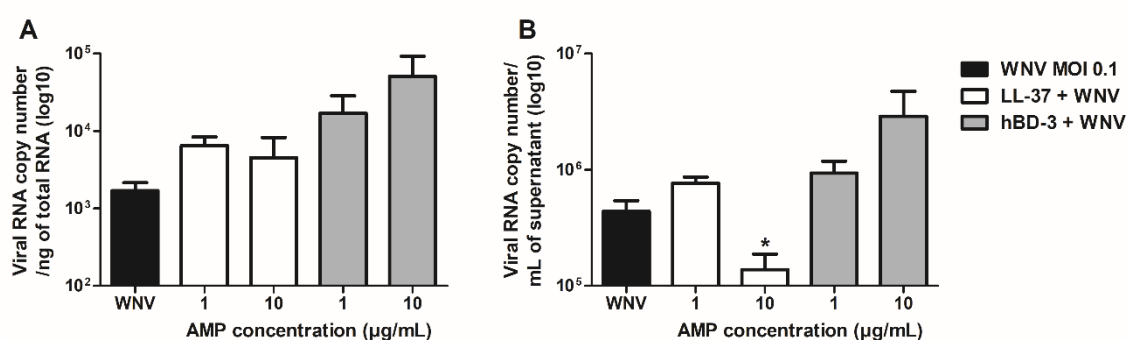


Figure 2. WNV RNA quantification in the cell monolayer (A) and supernatant (B) during NHEK infection by WNV at a MOI of 0.1 in presence or not of 1 or 10 µg/mL of LL-37 or hBD-3 for 24 h. Mean+/- SEM of 5 independent experiments are presented here.

3.3 Virucidal Properties of LL-37 and hBD-3

The virucidal properties of LL-37 and hBD-3 were then evaluated by pre-incubating for 2 h at 37 °C, a calibrated WNV inoculum of 10^{5.27} TCID₅₀/mL with 1 or 10 µg/mL of LL-37 or hBD-3 before measuring the residual infectious titer on Vero cells. A reduction in the viral titer by a factor of 14 and 95 at concentrations of 1 and 10 µg/mL, respectively, highlighted the dose-dependent direct antiviral properties of LL-37 against WNV (Figure 3A). By contrast, no significant direct antiviral effect of hBD-3 was observed at the concentrations tested (Figure 3B).

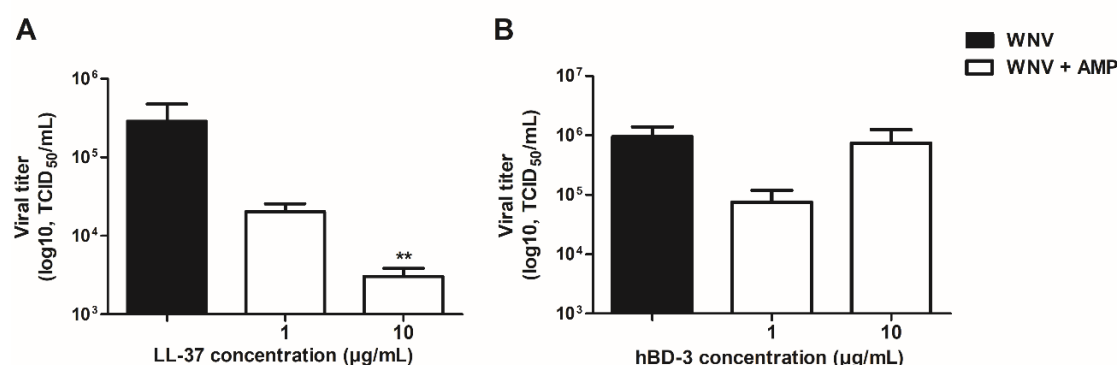


Figure 3. A WNV inoculum of 10^{5.27} TCID₅₀/mL was incubated 2 h at 37°C with 1 or 10 µg/mL of LL-37 (A) or hBD-3 (B). The residual infectious titer was then measured on Vero cells. Mean +/- SEM of respectively 5 and 4 independent experiments are presented here. ***p* < 0.01.

3.4 Immunomodulatory properties of LL-37 and hBD-3

The effect of LL-37 and hBD-3 treatment on the immune response of the human primary keratinocytes was then evaluated. Expression of cellular inflammatory and antiviral markers such as type I (IFNβ-1) and type III (IL-28A) IFNs, IFN-stimulated genes (ISGs) (IFIT-1, OAS1, RSAD2), and chemokines (CCL-5, CXCL-8, CXCL-10) was monitored following stimulation with poly(I:C) or WNV infection in presence of the peptides and compared with that observed

after stimulation or infection without peptides, or incubation with peptides alone (Figures 4-7).

Keratinocytes were first stimulated with 0.1 µg/mL of poly(I:C) and LL-37 or hBD-3 at final concentrations ranging from 0.1 to 10 µg/mL for 3 h (Figure 4). Results showed that mRNA expression of inflammatory markers was increased in the presence of LL-37 or hBD-3 during NHEK stimulation with poly(I:C) in comparison to cells treated with poly(I:C) alone. Indeed, treatment with 10 µg/mL of LL-37 resulted in significantly enhanced expression of IL-28A, CXCL-8, CCL-5, CXCL-10, IFIT-1 and RSAD2 mRNA with a fold-increase ranging from 3.5 to 10 as compared to poly(I:C)-stimulated keratinocytes. The same pattern was observed following NHEK treatment with 1 and 10 µg/mL of hBD-3

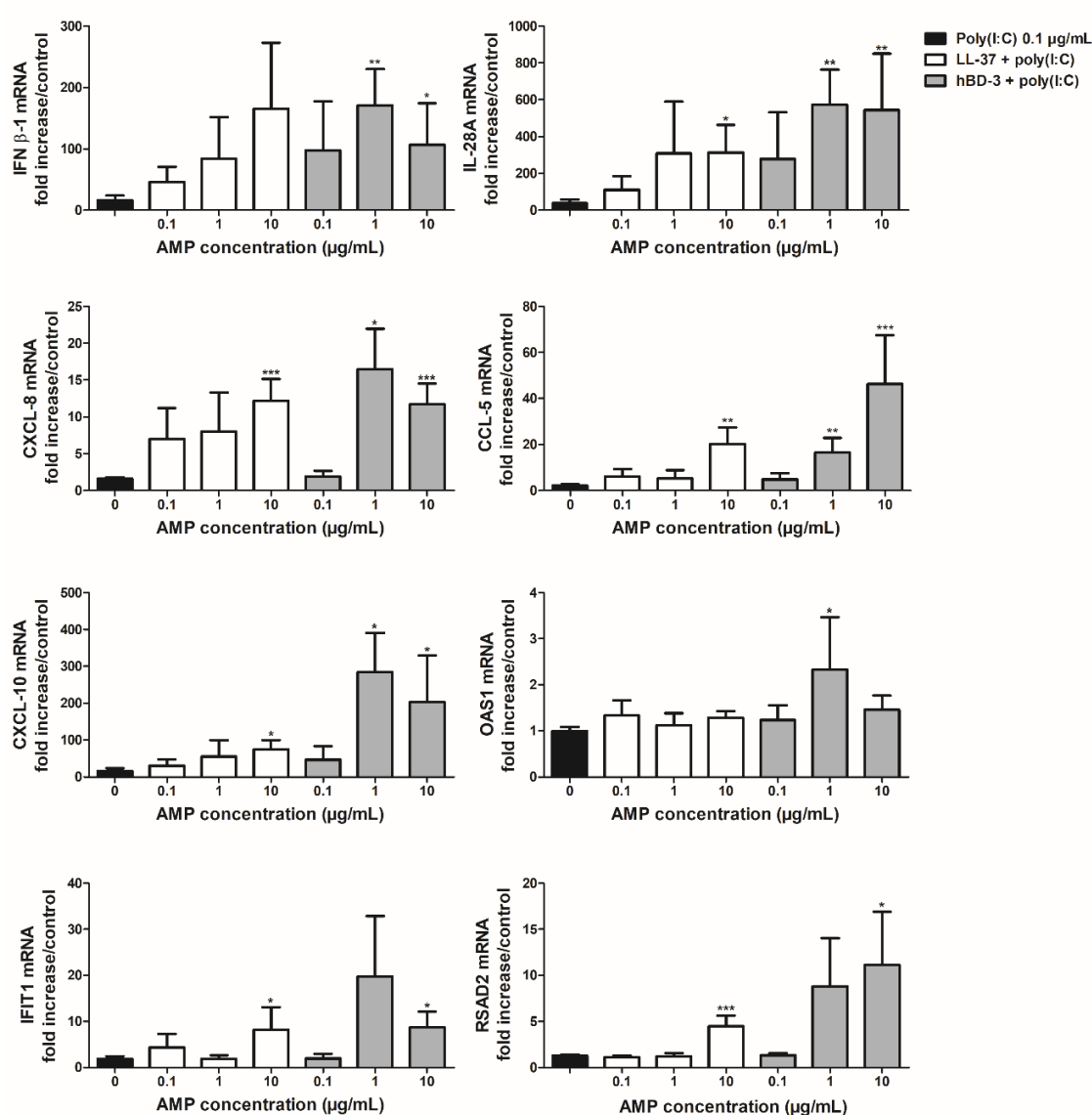


Figure 4. Inflammatory response of NHEK stimulated with 0.1 µg/mL of poly(I:C) alone or with increasing concentrations of LL-37 or hBD-3 for 3 h. Mean +/- SEM of 6 independent experiments are presented here. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

where IFN β -1, IL-28A, CXCL-8, CCL-5, CXCL-10, IFIT-1 and RSAD2 mRNA expression was induced from 9 to 572 times as compared to poly(I:C)-stimulated keratinocytes. Interestingly, if NHEK stimulation with poly(I:C) elicited an inflammatory response, LL-37 or hBD-3 alone exhibited no significant pro-inflammatory effects, with the notable exception of CXCL-8 mRNA expression after keratinocyte stimulation with 10 μ g/mL of hBD-3 (supplementary figure 1).

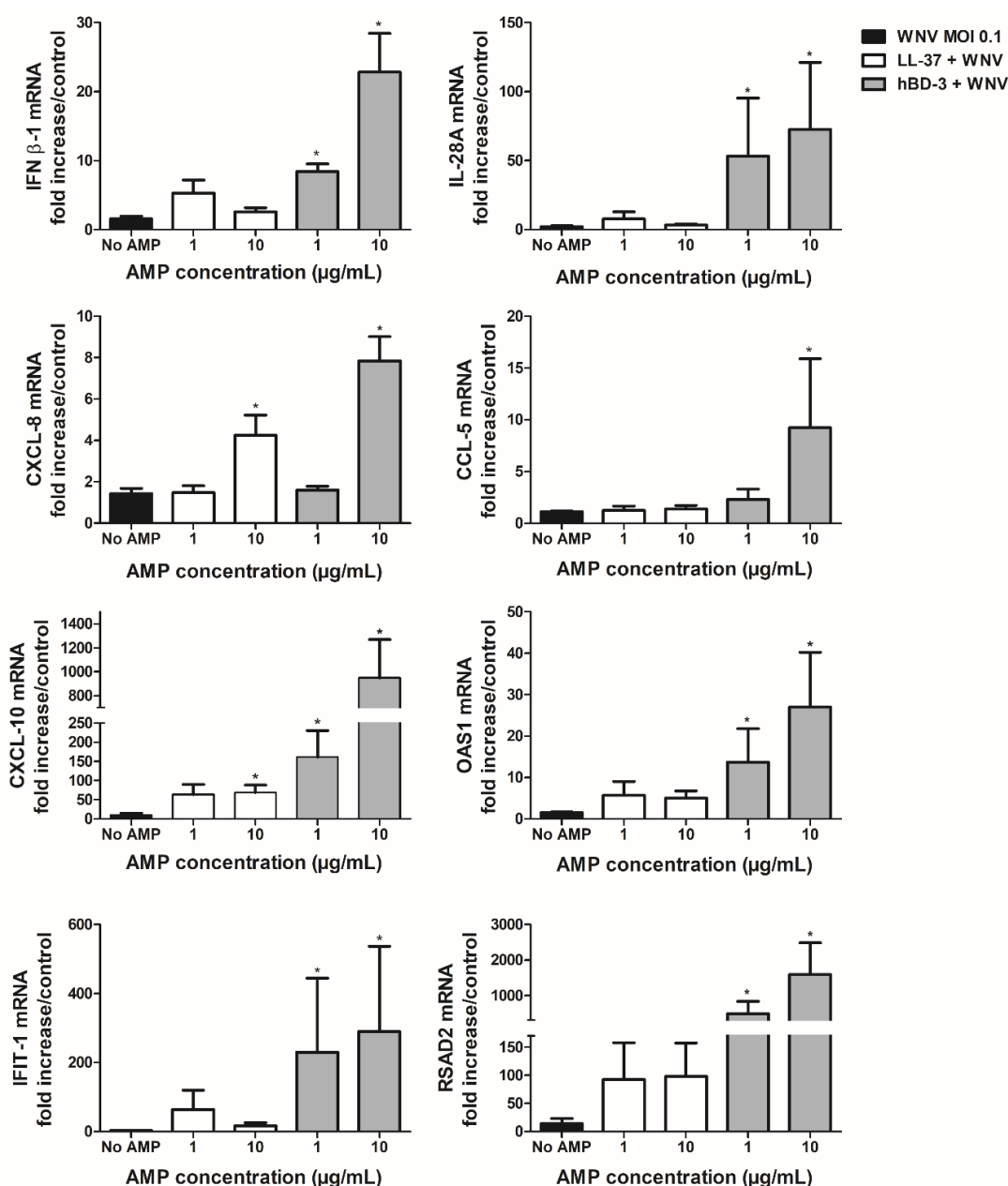


Figure 5. Inflammatory response of NHEK infected by WNV at a MOI of 0.1 in presence or not of 1 or 10 μ g/mL of LL-37 or hBD-3 for 24 h. Mean $\pm$ SEM of 5 independent experiments are presented here. * p < 0.05.

Secondly, similar experiments were performed in the context of keratinocyte infection with WNV. NHEK were infected at a MOI of 0.1 for 24h in presence or absence of LL-37 and hBD-3 (Figure 5). Treatment with peptides during WNV infection resulted in a significant increase of the expression of several ISGs. More specifically, LL-37 induced mRNA transcription of CXCL-8 and CXCL-10 while hBD-3 increased that of all the inflammatory markers tested.

Increased mRNA expression of RSAD2 and IFNs was then confirmed at the protein level. In the cell monolayer of keratinocytes infected in presence or not of the peptides, the synthesis of RSAD2 also called viperin, an ISG previously reported as inhibiting flaviviral infection, was assessed by immunofluorescence assay. After 48 h of infection, immunofluorescent staining showed that RSAD2 protein expression was enhanced in keratinocytes treated with LL-37 and hBD-3, whatever the concentration of the peptide used (Figure 6). However, this expression was significantly increased only in cells infected and treated with 1 µg/mL of each peptide.

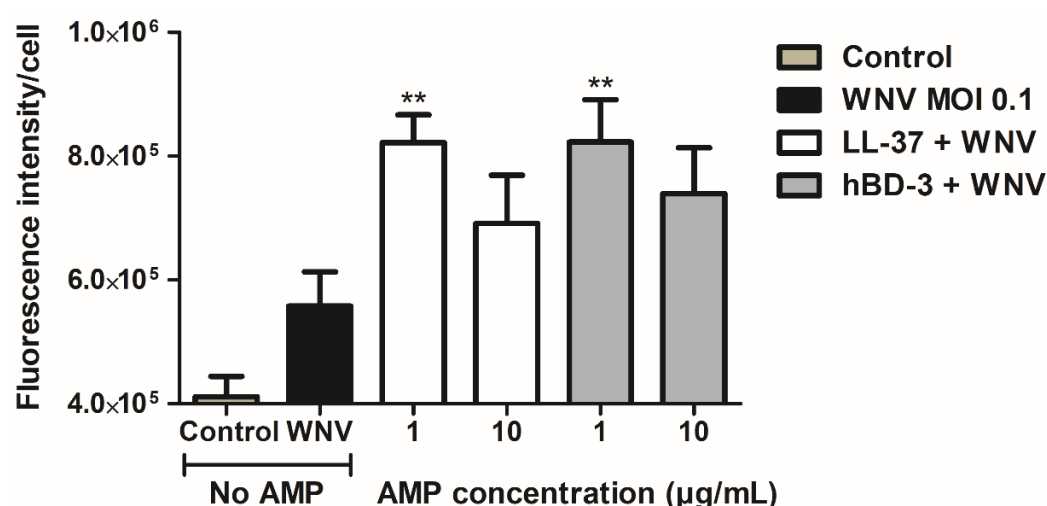


Figure 6. Immunostaining of viperin (RSAD2) in human primary keratinocytes infected with WNV in presence or not of LL-37 and hBD-3. Keratinocytes were infected by WNV at a MOI of 0.1 and stimulated with 1 or 10 µg/mL of LL-37 or hBD-3. RSAD2 was quantified in each cell by immunofluorescence after 48 hours of incubation. Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments are presented here. Statistical analysis has been performed compared to WNV alone. $^{**}p < 0.01$.

In addition, secretion levels of IFNs- λ were measured in the cell culture supernatants using reporter HEK293 cells (Figure 7). Results showed enhanced interferon secretion in cells infected and treated with the peptides compared to infected cells alone even if this increase was significant only in the presence of 10 µg/mL of hBD-3.

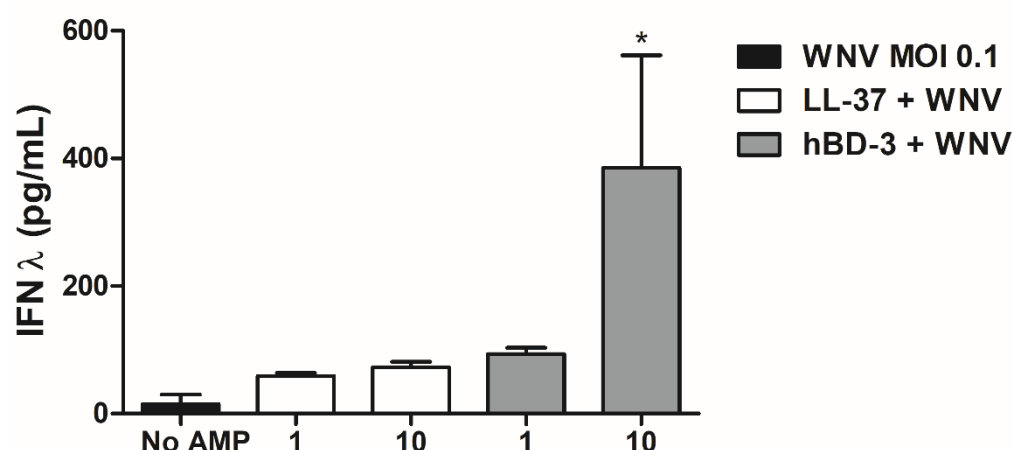


Figure 7. IFN-λ secretion determination using HEK-blue cells in supernatant of human primary keratinocytes infected by WNV at a MOI of 0.1 and stimulated with 1 or 10 μg/mL of LL-37 or hBD-3 for 48 hours. Results are presented as mean ± SEM of 4 independent experiments. **p* < 0.05.

All in all, simultaneous addition of LL-37 and hBD-3 during keratinocyte stimulation by poly(I:C) or infection with WNV resulted in increased expression of the main inflammation mediators compared to poly(I:C) or virus alone. These results at the transcriptomic and proteomic levels demonstrate the immunomodulatory properties of the two peptides studied in the context of synthetic dsRNA stimulation or WNV infection.

4. Discussion

Antimicrobial peptides produced by skin cells represent a major weapon against infections and contribute to the maintenance of the skin microbiota. They play a major role in the barrier function exerted by the skin, through direct antimicrobial activities against pathogens or indirect antimicrobial activities by stimulating innate immunity. If their antibacterial and antifungal roles are now well-known, their antiviral properties remain little studied. Among the 9 peptides known to be secreted by the human keratinocyte, our interest focused on LL-37 and hBD-3, whose secretion is induced during infection of skin cells by flaviviruses [29,38,39]. This research aimed to assess the effect of these AMPs during infection of human primary keratinocytes with WNV, an emerging flavivirus in Europe inoculated within the skin during the blood meal of the mosquito vector.

We first studied the antiviral properties of LL-37 and hBD-3 during infection kinetics of human primary keratinocytes. A reduction in the viral RNA concentration in the culture supernatant of keratinocytes treated with LL-37 was observed. In addition, a 2 log₁₀-reduction in viral infectious titer of a WNV strain incubated with LL-37 was also shown, suggesting direct antiviral activity against WNV. This activity may be linked to an alteration of the viral particle, and more precisely of its envelope, by the antimicrobial peptide. This is a classic mode of action of antimicrobial peptides related to their cationic and amphiphilic nature, which allows them to create pores within the viral envelope [16,17,40,41]. The ability of LL-37 to degrade the viral envelope has been demonstrated against a large panel of viruses. For example, electronic microscopy has revealed the disruption of the vaccinia virus envelope or influenza A

virus exposed to LL-37 [16,17]. LL-37-related inhibition of HHV-8 internalization in oral epithelial cells relies on the same mechanism [34]. Finally, pre-incubation of the arboviruses DENV, ZIKV and Venezuelan Encephalitis Equine Virus (VEEV) with LL-37, or one of its analogues, has resulted in a significant decrease in the number of active virions suggesting, here again, an alteration of the viral particle [22,33,35,42,43]. In the previous studies, degradation of the viral envelope was observed from a LL-37 concentration of 10 µg/mL, therefore identical to the highest concentration tested during this work [15,34]. LL-37 has also been shown to exert direct antiviral properties by inhibiting the endosomal cell entry of Ebola virus or by inhibiting enterovirus A71 cell attachment [44,45]. Otherwise, the immunomodulatory properties of LL-37 observed during WNV infection, especially stimulation of the expression of several ISGs, are also likely to contribute to the reduced viral replication observed in treated keratinocytes. In particular, we noted increased expression of RSAD2 in keratinocytes infected with WNV in the presence of LL-37. RSAD2, also called viperin, is a well-known anti-flavivirus ISG [46–50]. It converts cytidine triphosphate into 3'-deoxy-3',4'-didehydro-CTP, which acts as a chain terminator for the flavivirus RNA-dependent RNA-polymerase in mammalian cells [51]. RSAD2 also inhibits several steps of viral translation, as demonstrated during HEK 293 cell infection with WNV or DENV [52]. RSAD2 binds and leads to the proteosomal degradation of flaviviral NS3 protease [53]. Finally, RSAD2 blocks viral budding, which could explain the reduction of WNV RNA in keratinocyte supernatant, whereas RNA concentration is increased within the cell monolayer (reviewed in [46]).

Conversely, our results suggest an absence of direct antiviral activity of hBD-3 against WNV at the concentrations tested. Indeed, the viral load in the keratinocyte monolayer as well as in the supernatant was not reduced by the addition of the peptide. Likewise, incubation of the virus with hBD-3 did not reduce the infectious titer of WNV. These data are consistent with previous work showing that a pretreatment by 30 µg/mL of hBD-3 did not result in a significant decrease in DENV titer, contrary to that observed with LL-37 [28]. Nevertheless, other studies have shown that this peptide can bind the envelope glycoprotein B of herpes simplex virus or its host cell receptors, thereby preventing viral entry [32]. The ability of hBD-3 to bind human immunodeficiency virus particles and to down-modulate its cell surface receptor CXCR4 has also been demonstrated [54]. This antiviral effect is concentration-dependent and significant for hBD-3 concentrations greater than 25 µg/mL, which is cytotoxic for human primary keratinocytes. On the other hand, we showed that hBD-3 can stimulate keratinocyte innate immune response during poly (I:C) stimulation or WNV infection. Some pro-inflammatory properties of hBD-3 have been previously described. hBD-3 can induce inflammatory response by itself, through CCR6 binding or G protein-coupled receptor (GPCR) and phospholipase C (PLC) signaling pathway, leading to the release of several cytokines such as IL-6, IL-10, IL-37, IFN-γ, CXCL-10, CCL-2 and CCL-5 by human keratinocytes [55,56]. It can also modulate the response to TLR agonists. Semple *et al.* observed increased production of IFN-β, TNF-α, CXCL-8 and IL-6 in monocytes and PBMCs stimulated with poly(I:C) in presence of hBD-3 [57]. Higher concentrations of IFN-β and TNF-α were observed in the sera of transgenic mice expressing hBD-3 and stimulated with poly(I:C) as compared to control mice [57]. Our study is, however, the first description of the potentiating effect of

hBD-3 on the inflammatory response of the keratinocyte in the context of viral infection, highlighting the ability of this AMP to boost the antiviral response of the skin through the induction of IFNs and ISGs. On the other hand, LL-37 has also shown immunomodulatory properties. It has previously been shown to increase pro-inflammatory cytokine expressions such as IFN β -1, IL-6 and CXCL-8 induced by poly(I:C) stimulation in human keratinocytes [58,59]. LL-37 also modulates inflammatory response induced by viral infection. The addition of LL-37 to human rhinovirus-infected human bronchial epithelial cells enhances IL-6 and CCL-2 production while increasing the expression of type I IFN during VEEV infection [42,58]. This enhancement of the inflammatory response required TLR3, which is activated by the complex formed by the association between LL-37 and dsRNAs [58]. Interestingly, this mechanism was demonstrated to be cell-specific and concentration-dependent since high concentrations of LL-37, from 25 μ g/mL, were associated with decreased pro-inflammatory cytokine release in the cell supernatant [60]. The secretion by infected cells of inflammatory mediators, especially IFNs, represents an important antiviral weapon not only for the cell itself, but also for the neighboring ones, as this mediator can exert both auto- and paracrine effects. This phenomenon could consequently prepare the non-infected surrounding cells for a potential viral infection by inducing the synthesis of antiviral mediators as ISGs. Taken together, our results suggest that both LL-37 and hBD-3 secreted within the skin can interplay a role in the defense against early steps of WNV infection. Further studies should evaluate the immunomodulatory properties of hBD-3 in other cell types, whether after stimulation with poly(I:C) or viral infection.

5. Conclusions

Our results confirmed the major immunostimulatory role of LL-37 and hBD-3 through induction of the production of cytokines and chemokines in NHEK in combination with the ability of LL-37 to directly inactivate the enveloped WNV. This study highlights the antiviral potentialities of these two AMPs produced directly at the site of viral inoculation by the mosquito and site of viral replication, thereby suggesting their role in the pathophysiology of early steps of infection. The characterization of such activities could help to devise new antiviral strategies, through the design of novel therapeutic analogs against infection or evaluation of agonists capable of specifically stimulating antiviral response.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Inflammatory response of NHEK stimulated with increasing concentrations of LL-37 or hBD-3 for 3 h.

Author Contributions: conceptualization, CC, CB, MG, NL; methodology, CC, CB, JG, MG, NL; software, CC, MG; validation, CB, MG, NL; formal analysis, CC, MG; resources, CB, NL.; data curation, MG.; writing—original draft preparation, CC, MG; writing—review and editing, CC, CB, MG, NL; supervision, CB, MG, NL; funding acquisition, CB, NL. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Agence Nationale de la Recherche, grant number ANR-17-CE35-0001-01.

Acknowledgments: V. Lerat, L. Lebeau for technical support, J. Arsham for English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Smithburn, K.; Hughes, T.; Burke, A. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am J Trop Med* **1940**, 471–492.
2. Gould, E.A.; Higgs, S. Impact of Climate Change and Other Factors on Emerging Arbovirus Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2009**, 103, 109–121, doi:10.1016/j.trstmh.2008.07.025.
3. Simpson, D.I. Arbovirus Diseases. *Br Med Bull* **1972**, 28, 10–15, doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a070876.
4. Ventura, C.V.; Maia, M.; Bravo-Filho, V.; Góis, A.L.; Belfort, R. Zika Virus in Brazil and Macular Atrophy in a Child with Microcephaly. *Lancet* **2016**, 387, 228, doi:10.1016/S0140-6736(16)00006-4.
5. Saiz, J.-C.; Martín-Acebes, M.A.; Blázquez, A.B.; Escribano-Romero, E.; Poderoso, T.; Jiménez de Oya, N. Pathogenicity and Virulence of West Nile Virus Revisited Eight Decades after Its First Isolation. *Virulence* **2021**, 12, 1145–1173, doi:10.1080/21505594.2021.1908740.
6. Choumet, V.; Attout, T.; Chartier, L.; Khun, H.; Sautereau, J.; Robbe-Vincent, A.; Brey, P.; Huerre, M.; Bain, O. Visualizing Non Infectious and Infectious Anopheles Gambiae Blood Feedings in Naive and Saliva-Immunized Mice. *PLoS ONE* **2012**, 7, e50464, doi:10.1371/journal.pone.0050464.
7. Styer, L.M.; Lim, P.-Y.; Louie, K.L.; Albright, R.G.; Kramer, L.D.; Bernard, K.A. Mosquito Saliva Causes Enhancement of West Nile Virus Infection in Mice. *J. Virol.* **2011**, 85, 1517–1527, doi:10.1128/JVI.01112-10.
8. Lim, P.-Y.; Behr, M.J.; Chadwick, C.M.; Shi, P.-Y.; Bernard, K.A. Keratinocytes Are Cell Targets of West Nile Virus in Vivo. *J. Virol.* **2011**, 85, 5197–5201, doi:10.1128/JVI.02692-10.
9. Garcia, M.; Alout, H.; Diop, F.; Damour, A.; Bengue, M.; Weill, M.; Missé, D.; Lévêque, N.; Bodet, C. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, 8, 387, doi:10.3389/fcimb.2018.00387.
10. Suthar, M.S.; Aguirre, S.; Fernandez-Sesma, A. Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog* **2013**, 9, e1003541, doi:10.1371/journal.ppat.1003541.
11. Garcia, M.; Wehbe, M.; Lévêque, N.; Bodet, C. Skin Innate Immune Response to Flaviviral Infection. *Eur. Cytokine Netw.* **2017**, 28, 41–51, doi:10.1684/ecn.2017.0394.
12. Brinton, M.A. Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses* **2013**, 6, 13–53, doi:10.3390/v6010013.
13. Peter Bergman; Lilian Walter-Jallow; Kristina Broliden; Birgitta Agerberth; Johan Soderlund The Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits HIV-1 Replication. *Current HIV Research* **2007**, 5, 410–415.
14. Crack, L.R.; Jones, L.; Malavige, G.N.; Patel, V.; Ogg, G.S. Human Antimicrobial Peptides LL-37 and Human β -Defensin-2 Reduce Viral Replication in Keratinocytes Infected with Varicella Zoster Virus. *Clinical and Experimental Dermatology* **2012**, 37, 534–543, doi:10.1111/j.1365-2230.2012.04305.x.
15. Currie, S.M.; Findlay, E.G.; McHugh, B.J.; Mackellar, A.; Man, T.; Macmillan, D.; Wang, H.; Fitch, P.M.; Schwarze, J.; Davidson, D.J. The Human Cathelicidin LL-37 Has Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus. *PLOS ONE* **2013**, 8, e73659, doi:10.1371/journal.pone.0073659.
16. Howell, M.D.; Jones, J.F.; Kisich, K.O.; Streib, J.E.; Gallo, R.L.; Leung, D.Y.M. Selective Killing of Vaccinia Virus by LL-37: Implications for Eczema Vaccinatum. *The Journal of Immunology* **2004**, 172, 1763–1767, doi:10.4049/jimmunol.172.3.1763.
17. Tripathi, S.; Tecle, T.; Verma, A.; Crouch, E.; White, M.; Hartshorn, K.L.Y. 2013 The Human Cathelicidin LL-37 Inhibits Influenza A Viruses through a Mechanism Distinct from That of Surfactant Protein D or Defensins. *Journal of General Virology* **94**, 40–49, doi:10.1099/vir.0.045013-0.

18. Steinstraesser, L.; Tippler, B.; Mertens, J.; Lamme, E.; Homann, H.-H.; Lehnhardt, M.; Wildner, O.; Steinau, H.-U.; Uberla, K. Inhibition of Early Steps in the Lentiviral Replication Cycle by Cathelicidin Host Defense Peptides. *Retrovirology* **2005**, *2*, 2, doi:10.1186/1742-4690-2-2.
19. Wong, J.H.; Legowska, A.; Rolka, K.; Ng, T.B.; Hui, M.; Cho, C.H.; Lam, W.W.L.; Au, S.W.N.; Gu, O.Wangang.; Wan, D.C.C. Effects of Cathelicidin and Its Fragments on Three Key Enzymes of HIV-1. *Peptides* **2011**, *32*, 1117–1122, doi:10.1016/j.peptides.2011.04.017.
20. Niyonsaba, F.; Kiatsurayanon, C.; Chieosilapatham, P.; Ogawa, H. Friends or Foes? Host Defense (Antimicrobial) Peptides and Proteins in Human Skin Diseases. *Experimental Dermatology* **2017**, *26*, 989–998, doi:10.1111/exd.13314.
21. Wilson, S.S.; Wiens, M.E.; Smith, J.G. Antiviral Mechanisms of Human Defensins. *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425*, 4965–4980, doi:10.1016/j.jmb.2013.09.038.
22. Chessa, C.; Bodet, C.; Jousselin, C.; Wehbe, M.; Lévêque, N.; Garcia, M. Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.01155.
23. Damour, A.; Garcia, M.; Cho, H.-S.; Larivière, A.; Lévêque, N.; Park, C.; Bodet, C. Characterisation of Antiviral Activity of Cathelicidins from Naked Mole Rat and Python Bivittatus on Human Herpes Simplex Virus 1. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 715, doi:10.3390/ph14080715.
24. Dürr, U.H.N.; Sudheendra, U.S.; Ramamoorthy, A. LL-37, the Only Human Member of the Cathelicidin Family of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 1408–1425, doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.030.
25. Holly, M.K.; Diaz, K.; Smith, J.G. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.* **2017**, *4*, 369–391, doi:10.1146/annurev-virology-101416-041734.
26. Frohm, M.; Agerberth, B.; Ahangari, G.; Stähle-Bäckdahl, M.; Lidén, S.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 15258–15263, doi:10.1074/jbc.272.24.15258.
27. Ogawa, Y.; Kawamura, T.; Matsuzawa, T.; Aoki, R.; Gee, P.; Yamashita, A.; Moriishi, K.; Yamasaki, K.; Koyanagi, Y.; Blauvelt, A.; et al. Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host & Microbe* **2013**, *13*, 77–86, doi:10.1016/j.chom.2012.12.002.
28. López-González, M.; Meza-Sánchez, D.; García-Cordero, J.; Bustos-Arriaga, J.; Vélez-Del Valle, C.; Marsch-Moreno, M.; Castro-Jiménez, T.; Flores-Romo, L.; Santos-Argumedo, L.; Gutiérrez-Castañeda, B.; et al. Human Keratinocyte Cultures (HaCaT) Can Be Infected by DENV, Triggering Innate Immune Responses That Include IFN λ and LL37. *Immunobiology* **2018**, *223*, 608–617, doi:10.1016/j.imbio.2018.07.006.
29. Surasombatpattana, P.; Hamel, R.; Patramool, S.; Luplertlop, N.; Thomas, F.; Desprès, P.; Briant, L.; Yssel, H.; Missé, D. Dengue Virus Replication in Infected Human Keratinocytes Leads to Activation of Antiviral Innate Immune Responses. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 1664–1673, doi:10.1016/j.meegid.2011.06.009.
30. Garcia, M. Réponse Immunitaire Innée Des Kératinocytes Primaires Humains Lors d’infections Cutanées, Université de Poitiers, 2017.
31. Buck, C.B.; Day, P.M.; Thompson, C.D.; Lubkowski, J.; Lu, W.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. Human α -Defensins Block Papillomavirus Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 1516–1521, doi:10.1073/pnas.0508033103.
32. Hazrati, E.; Galen, B.; Lu, W.; Wang, W.; Ouyang, Y.; Keller, M.J.; Lehrer, R.I.; Herold, B.C. Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. *J Immunol* **2006**, *177*, 8658–8666, doi:10.4049/jimmunol.177.12.8658.

33. Alagarasu, K.; Patil, P.S.; Shil, P.; Seervi, M.; Kakade, M.B.; Tillu, H.; Salunke, A. In-Vitro Effect of Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 on Dengue Virus Type 2. *Peptides* **2017**, *92*, 23–30, doi:10.1016/j.peptides.2017.04.002.
34. Brice, D.C.; Toth, Z.; Diamond, G. LL-37 Disrupts the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Envelope and Inhibits Infection in Oral Epithelial Cells. *Antiviral Research* **2018**, *158*, 25–33, doi:10.1016/j.antiviral.2018.07.025.
35. He, M.; Zhang, H.; Li, Y.; Wang, G.; Tang, B.; Zhao, J.; Huang, Y.; Zheng, J. Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Zika Virus Through Direct Inactivation and Interferon Pathway. *Front Immunol* **2018**, *9*, 722, doi:10.3389/fimmu.2018.00722.
36. Garcia, M.; Morello, E.; Garnier, J.; Barrault, C.; Garnier, M.; Burucoa, C.; Lecron, J.-C.; Si-Tahar, M.; Bernard, F.-X.; Bodet, C. Pseudomonas Aeruginosa Flagellum Is Critical for Invasion, Cutaneous Persistence and Induction of Inflammatory Response of Skin Epidermis. *Virulence* **2018**, *9*, 1163–1175, doi:10.1080/21505594.2018.1480830.
37. Roy, M.; Lebeau, L.; Chessa, C.; Damour, A.; Ladram, A.; Oury, B.; Boutolleau, D.; Bodet, C.; Lévêque, N. Comparison of Anti-Viral Activity of Frog Skin Anti-Microbial Peptides Temporin-Sha and [K3]SHa to LL-37 and Temporin-Tb against Herpes Simplex Virus Type 1. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11010077.
38. Surasombatpattana, P.; Ekchariyawat, P.; Hamel, R.; Patramool, S.; Thongrungrat, S.; Denizot, M.; Delaunay, P.; Thomas, F.; Luplertlop, N.; Yssel, H.; et al. Aedes Aegypti Saliva Contains a Prominent 34-KDa Protein That Strongly Enhances Dengue Virus Replication in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 281–284, doi:10.1038/jid.2013.251.
39. Surasombatpattana, P.; Patramool, S.; Luplertlop, N.; Yssel, H.; Missé, D. Aedes Aegypti Saliva Enhances Dengue Virus Infection of Human Keratinocytes by Suppressing Innate Immune Responses. *J Invest Dermatol* **2012**, *132*, 2103–2105, doi:10.1038/jid.2012.76.
40. Kota, S.; Sabbah, A.; Chang, T.H.; Harnack, R.; Xiang, Y.; Meng, X.; Bose, S. Role of Human β -Defensin-2 during Tumor Necrosis Factor- α /NF-KB-Mediated Innate Antiviral Response against Human Respiratory Syncytial Virus. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 22417–22429, doi:10.1074/jbc.M710415200.
41. Hsieh, I.-N.; Hartshorn, K. The Role of Antimicrobial Peptides in Influenza Virus Infection and Their Potential as Antiviral and Immunomodulatory Therapy. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 53, doi:10.3390/ph9030053.
42. Ahmed, A.; Siman-Tov, G.; Keck, F.; Kortchak, S.; Bakovic, A.; Risner, K.; Lu, T.K.; Bhalla, N.; de la Fuente-Nunez, C.; Narayanan, A. Human Cathelicidin Peptide LL-37 as a Therapeutic Antiviral Targeting Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infections. *Antiviral Research* **2019**, *164*, 61–69, doi:10.1016/j.antiviral.2019.02.002.
43. Matsumura, T.; Sugiyama, N.; Murayama, A.; Yamada, N.; Shiina, M.; Asabe, S.; Wakita, T.; Imawari, M.; Kato, T. Antimicrobial Peptide LL-37 Attenuates Infection of Hepatitis C Virus. *Hepatology Research* **2016**, *46*, 924–932, doi:10.1111/hepr.12627.
44. Yu, Y.; Cooper, C.L.; Wang, G.; Morwitzer, M.J.; Kota, K.; Tran, J.P.; Bradfute, S.B.; Liu, Y.; Shao, J.; Zhang, A.K.; et al. Engineered Human Cathelicidin Antimicrobial Peptides Inhibit Ebola Virus Infection. *iScience* **2020**, *23*, 100999, doi:10.1016/j.isci.2020.100999.
45. Yu, J.; Dai, Y.; Fu, Y.; Wang, K.; Yang, Y.; Li, M.; Xu, W.; Wei, L. Cathelicidin Antimicrobial Peptides Suppress EV71 Infection via Regulating Antiviral Response and Inhibiting Viral Binding. *Antiviral Res* **2021**, *187*, 105021, doi:10.1016/j.antiviral.2021.105021.
46. Helbig, K.J.; Beard, M.R. The Role of Viperin in the Innate Antiviral Response. *J Mol Biol* **2014**, *426*, 1210–1219, doi:10.1016/j.jmb.2013.10.019.
47. Szretter, K.J.; Brien, J.D.; Thackray, L.B.; Virgin, H.W.; Cresswell, P.; Diamond, M.S. The Interferon-Inducible Gene Viperin Restricts West Nile Virus Pathogenesis. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11557–11566, doi:10.1128/JVI.05519-11.

48. Upadhyay, A.S.; Vonderstein, K.; Pichlmair, A.; Stehling, O.; Bennett, K.L.; Dobler, G.; Guo, J.-T.; Superti-Furga, G.; Lill, R.; Överby, A.K.; et al. Viperin Is an Iron-Sulfur Protein That Inhibits Genome Synthesis of Tick-Borne Encephalitis Virus via Radical SAM Domain Activity. *Cell Microbiol* **2014**, *16*, 834–848, doi:10.1111/cmi.12241.
49. Vanwalscappel, B.; Tada, T.; Landau, N.R. Toll-like Receptor Agonist R848 Blocks Zika Virus Replication by Inducing the Antiviral Protein Viperin. *Virology* **2018**, *522*, 199–208, doi:10.1016/j.virol.2018.07.014.
50. Berthou, L. The Restrictome of Flaviviruses. *Virol Sin* **2020**, *35*, 363–377, doi:10.1007/s12250-020-00208-3.
51. Gizzi, A.S.; Grove, T.L.; Arnold, J.J.; Jose, J.; Jangra, R.K.; Garforth, S.J.; Du, Q.; Cahill, S.M.; Dulyaninova, N.G.; Love, J.D.; et al. A Naturally Occurring Antiviral Ribonucleotide Encoded by the Human Genome. *Nature* **2018**, *558*, 610–614, doi:10.1038/s41586-018-0238-4.
52. Jiang, D.; Weidner, J.M.; Qing, M.; Pan, X.-B.; Guo, H.; Xu, C.; Zhang, X.; Birk, A.; Chang, J.; Shi, P.-Y.; et al. Identification of Five Interferon-Induced Cellular Proteins That Inhibit West Nile Virus and Dengue Virus Infections. *J. Virol.* **2010**, *84*, 8332–8341, doi:10.1128/JVI.02199-09.
53. Panayiotou, C.; Lindqvist, R.; Kurhade, C.; Vonderstein, K.; Pasto, J.; Edlund, K.; Upadhyay, A.S.; Överby, A.K. Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation. *J Virol* **2018**, *92*, e02054-17, doi:10.1128/JVI.02054-17.
54. Quiñones-Mateu, M.E.; Lederman, M.M.; Feng, Z.; Chakraborty, B.; Weber, J.; Rangel, H.R.; Marotta, M.L.; Mirza, M.; Jiang, B.; Kiser, P.; et al. Human Epithelial β -Defensins 2 and 3 Inhibit HIV-1 Replication. *AIDS* **2003**, *17*, F39.
55. Smithrithee, R.; Niyonsaba, F.; Kiatsurayanon, C.; Ushio, H.; Ikeda, S.; Okumura, K.; Ogawa, H. Human β -Defensin-3 Increases the Expression of Interleukin-37 through CCR6 in Human Keratinocytes. *J Dermatol Sci* **2015**, *77*, 46–53, doi:10.1016/j.jdermsci.2014.12.001.
56. Phan, T.K.; Lay, F.T.; Hulett, M.D. Importance of Phosphoinositide Binding by Human β -Defensin 3 for Akt-Dependent Cytokine Induction. *Immunol Cell Biol* **2018**, *96*, 54–67, doi:10.1111/imcb.1017.
57. Semple, F.; MacPherson, H.; Webb, S.; Kilanowski, F.; Lettice, L.; McGlasson, S.L.; Wheeler, A.P.; Chen, V.; Millhauser, G.L.; Melrose, L.; et al. Human β -Defensin 3 [Corrected] Exacerbates MDA5 but Suppresses TLR3 Responses to the Viral Molecular Pattern Mimic Polyinosinic:Polycytidylic Acid. *PLoS Genet* **2015**, *11*, e1005673, doi:10.1371/journal.pgen.1005673.
58. Lai, Y.; Adhikarakunnathu, S.; Bhardwaj, K.; Ranjith-Kumar, C.T.; Wen, Y.; Jordan, J.L.; Wu, L.H.; Dragnea, B.; San Mateo, L.; Kao, C.C. LL37 and Cationic Peptides Enhance TLR3 Signaling by Viral Double-Stranded RNAs. *PLoS One* **2011**, *6*, e26632, doi:10.1371/journal.pone.0026632.
59. Takiguchi, T.; Morizane, S.; Yamamoto, T.; Kajita, A.; Ikeda, K.; Iwatsuki, K. Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 Augments Interferon- β Expression and Antiviral Activity Induced by Double-Stranded RNA in Keratinocytes. *Br J Dermatol* **2014**, *171*, 492–498, doi:10.1111/bjd.12942.
60. Chen, X.; Takai, T.; Xie, Y.; Niyonsaba, F.; Okumura, K.; Ogawa, H. Human Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Proinflammatory Responses Induced by Cytokine Milieus and Double-Stranded RNA in Human Keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2013**, *433*, 532–537, doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.024.

ETUDE DES PROPRIETES ANTIVIRALES ET IMMUNOMODATRICES DES PEPTIDES S100

I. Introduction

Les données présentées dans la revue de la littérature sur les PAMs produits par le kératinocyte ont montré la surexpression des peptides S100 dans plusieurs contextes d'infections virales. [131-134] En complément, des travaux récents réalisés par notre équipe ont mis en évidence une répression de l'expression de plusieurs peptides S100 lors de l'infection de kératinocytes humains par le WNV. Une analyse transcriptomique a, en effet, révélé une diminution, d'un facteur 2, de l'expression des gènes codant la psoriasine S100A7, la calprotectine S100A8/A9 et la koebnerisine S100A15 après 48h d'infection de kératinocytes primaires par le WNV à une MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 10. Cette observation pourrait signifier l'existence d'un mécanisme d'échappement du virus à l'action antivirale de ces peptides. L'ensemble de ces éléments nous ont amené à considérer les peptides S100 comme des éléments potentiels de la réponse antivirale cellulaire.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les propriétés antivirales des peptides S100A7, S100A8 et S100A9 vis-à-vis du virus West Nile.

II. Matériels et méthodes

a. Lignées cellulaires

L'activité antivirale des peptides S100 a été tout d'abord évaluée par ajout de peptides exogènes au cours d'une cinétique d'infection d'une lignée de kératinocytes humains HaCaT (fournies par la société CLS Cell Lines Service GmbH) cultivée dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) et incubée à 37 °C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

Des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293T) génétiquement modifiées afin de surexprimer les peptides d'intérêt et permissives à l'infection par le WNV ont été ensuite utilisées. Les cellules HEK 293T, fournies par le Dr. Fabien Blanchet de l'Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), ont été transduites avec des vecteurs viraux codant les peptides S100A8, S100A9 et S100A8/A9 ainsi qu'avec un vecteur contrôle E2C. Les cellules transduites ont été ensuite sélectionnées par un traitement par puromycine 1 µg/mL et/ou hygromycine 1 µg/mL. Elles ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂ dans du DMEM complémenté par 10 % de SVF, 1 % de pénicilline/streptomycine et leur pression de sélection respective.

b. Peptides recombinants

Les peptides humains recombinants S100A7, S100A8, S100A9, et S100A8/A9 ont été obtenus auprès de la société R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA). Ils ont été reconstitués selon les recommandations du fournisseur, aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

c. Virus

La souche de virus West Nile de lignage 1 utilisée était identique à celle décrite dans l'article « *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary keratinocyte infection with West Nile virus* ».

d. Evaluation de la cytotoxicité des peptides recombinants

Le test XTT, basé sur le clivage du sel jaune de tétrazolium XTT pour former un formazan hydrosoluble orange dans les mitochondries actives, a été utilisé afin d'évaluer la cytotoxicité des peptides S100 sur les kératinocytes primaires humains. Le mode opératoire était identique à celui décrit dans l'article « *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary keratinocyte infection with West Nile virus* ».

e. Evaluation de l'activité antivirale par ajout de peptides recombinants

Pour ces expériences, les cellules HaCaT ont été cultivées en plaques 24 puits à une densité de 300 000 cellules par puits dans du DMEM supplémenté par 5 % de SVF. Après 24h d'incubation, les cellules ont été traitées pendant une 1h par les peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 à une concentration de 10 µg/mL dans du DMEM non supplémenté puis infectées par le WNV à une MOI de 0,1 pendant une heure en présence des peptides. Après avoir retiré le surnageant de culture contenant le virus, les cellules ont été lavées avec 500 µL de tampon phosphate salin (PBS, Gibco). 500 µL de DMEM contenant du peptide frais ont ensuite été ajoutés avant une incubation de 23h. Après 24h d'infection au total (une heure d'infection par un mélange virus-peptide suivie de 23h d'incubation en présence du peptide seul), 140 µL de surnageant de culture ont été collectés dans 560 µL de tampon AVL (Quiagen, Hilden, Germany). 200 µL ont été utilisés pour la quantification virale par RT-qPCR et 360 µL ont été stockés à -80°C. La monocouche cellulaire a été lysée avec 350 µL de tampon RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) additionnés de 3,5 µL de β-mercaptoéthanol avant l'extraction des acides nucléiques.

f. Evaluation du rôle des peptides S100 dans un modèle cellulaire surexprimant les peptides d'intérêt

Pour ces expériences, les cellules HEK E2C, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 ont été mises en plaques 24 puits à une densité de 700 000 cellules par puits dans leurs milieux de sélection respectif. Après 24 h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les cellules ont été infectées par le virus WNV aux deux MOI de 0,1 et 0,01 pendant 24 h, toujours dans leur milieu de sélection. A 24 et 48h post-infection, surnageants de culture et nappes cellulaires ont été collectés comme indiqué au paragraphe précédent.

g. Extraction des acides nucléiques à partir des surnageants de culture et des nappes cellulaires

La charge virale a été mesurée dans les surnageants de culture et les nappes cellulaires après extraction des ARN totaux. Pour la quantification de l'ARN viral dans les surnageants cellulaires, l'ARN total a été extrait en utilisant le kit QIAamp[®] viral RNA (Quiagen) suivant

les recommandations du fournisseur. Pour l'ARN viral intracellulaire, l'ARN total a été extrait en utilisant le kit d'extraction Nucleo-spin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany). La concentration en acides nucléiques et la pureté de l'échantillon ont été évaluées en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

h. Quantification virale par RT-qPCR

La technique de quantification de l'ARN du WNV par RT-qPCR utilisée était identique à celle décrite dans l'article « *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary keratinocyte infection with West Nile virus* ».

i. Titrage viral

La méthode de titrage du virus à partir des surnageants de culture était identique à celle décrite dans l'article « *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary keratinocyte infection with West Nile virus* ».

j. Statistiques

Les méthodes statistiques utilisées étaient identiques à celles décrites dans l'article « *Antiviral effect of hBD-3 and LL-37 during human primary keratinocyte infection with West Nile virus* ».

III. Résultats

a. Cytotoxicité des peptides S100 vis-à-vis des cellules HaCaT

La cytotoxicité des peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 a été testée sur une lignée de kératinocytes humains (HaCaT), aux concentrations de 5, 10 et 20 µg/mL, à l'aide d'un test colorimétrique au XTT, après 48h d'incubation.

Aux concentrations testées, la viabilité cellulaire restait supérieure à 80 %, non significativement modifiée en comparaison aux cellules non traitées (Figure 12). Ainsi, la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ a été retenue pour tester les activités de ces peptides sur la réplication virale et la réponse inflammatoire.

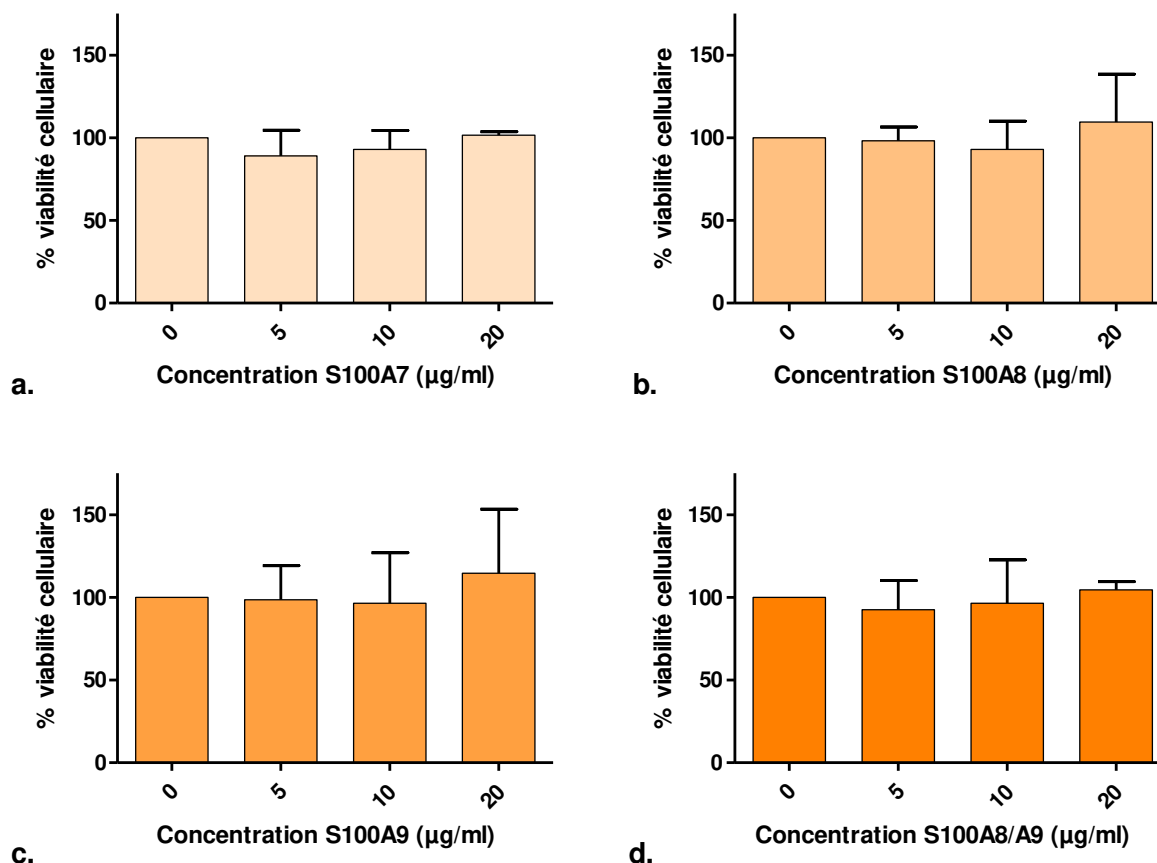


Figure 12 : Etude de la cytotoxicité des peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 vis-à-vis de la lignée de kératinocytes humains HaCaT. La cytotoxicité des peptides a été mesurée aux concentrations de 5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$, sur cellules HaCaT après 48h d'incubation à l'aide d'un test colorimétrique au XTT. Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 2 expériences indépendantes.

b. Réplication du WNV dans des cellules HaCaT traitées par les peptides S100

Afin d'étudier les propriétés antivirales des peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9, la réplication du WNV a été monitorée lors de l'infection, à une MOI de 0,1, de cellules HaCaT en présence ou non de chacun des peptides à une concentration finale 10 $\mu\text{g/mL}$. La charge virale a été mesurée dans la nappe cellulaire et le surnageant de culture, par RT-qPCR, à 24h post-infection.

Une concentration moyenne en ARN génomique viral de $10^{3,3}$ copies/ng d'ARN total extrait de la nappe cellulaire a été mesurée en l'absence de peptide. Elle était en moyenne de $10^{3,0}$ copies/ng d'ARN en présence de S100A7, $10^{3,2}$ copies en présence de S100A8, $10^{2,8}$ copies en présence de S100A9 et de $10^{2,9}$ copies/ng d'ARN en présence de la combinaison S100A8/A9 (Figure 13a).

Dans le surnageant de culture, la charge virale était de $10^{6,6}$ copies d'ARN viral par mL en l'absence de peptide *versus* $10^{6,9}$ copies/mL en présence de S100A7, $10^{7,0}$ copies/mL en présence de S100A8, $10^{6,3}$ copies/mL en présence de S100A9 et $10^{6,4}$ copies/mL en présence de la combinaison S100A8/A9 (Figure 13b).

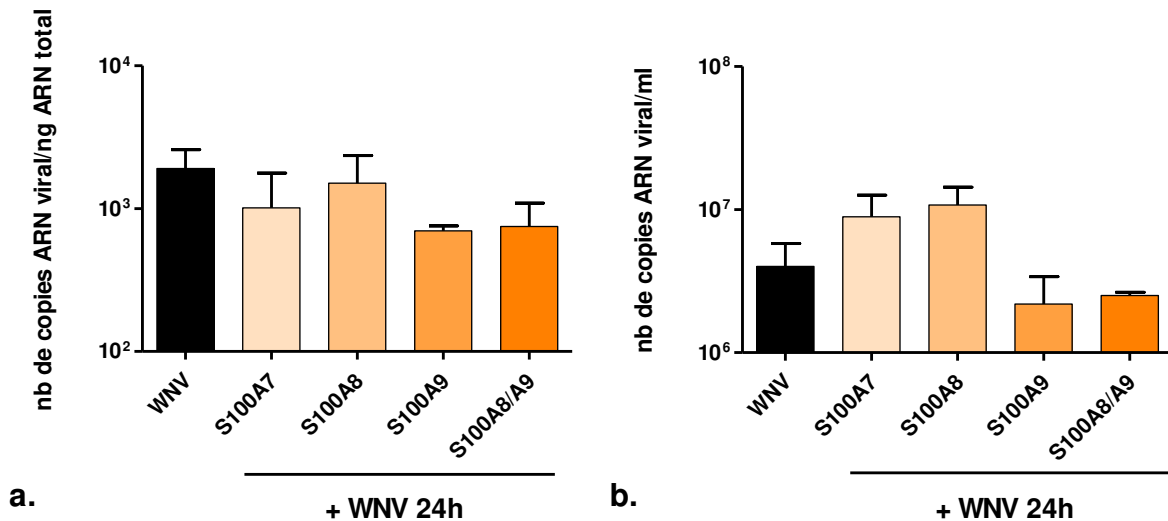


Figure 13 : Quantification de l'ARN du WNV dans les cellules HaCaT en présence de S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 à 24h. La charge virale a été mesurée après 24h d'infection par RT-PCR quantitative dans la nappe cellulaire (a) ou dans le surnageant de culture (b) de kératinocytes infectés par le WNV à une MOI de 0,1, en présence ou en l'absence des peptides ajoutés à la concentration finale de 10 µg/mL. Les données présentées correspondent à la moyenne et à l'écart type de 2 expériences indépendantes.

Afin de confirmer la réduction de la charge virale observée dans les cellules traitées par S100A9 et S100A8/A9, les surnageants de culture des cellules HaCaT, infectées en présence ou non des peptides, ont été titrés sur cellules de rein de signe vert, cellules Vero, par la méthode des dilutions limites (Figure 14). Aucune différence significative de titre viral entre les cellules infectées en présence ou en l'absence des peptides n'a été constatée.

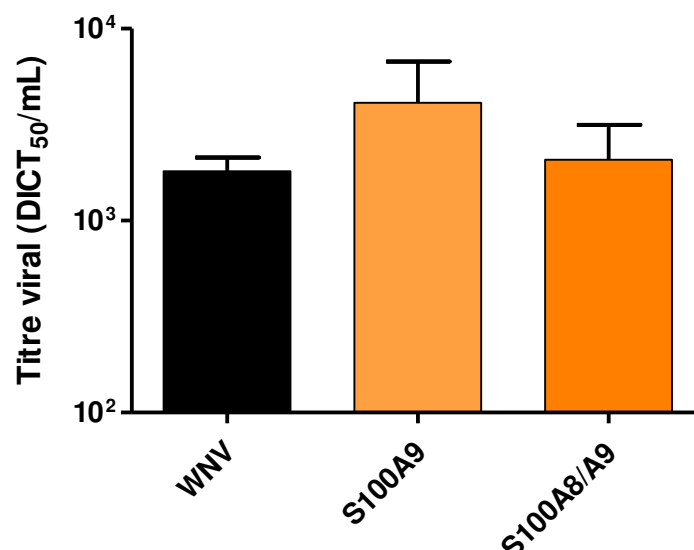


Figure 14 : Titration du surnageant de culture des cellules HaCaT infectées par le WNV en présence ou non de S100A9 et S100A8/A9. Les kératinocytes ont été infectés pendant 24h par le WNV, à une MOI de 0,1, en présence ou en l'absence des peptides S100A9 et S100A8/A9 ajoutés à la concentration finale de 10 µg/mL. Chaque surnageant de culture a ensuite été titré sur cellules Vero par la méthode des dilutions limites impliquant la lecture de l'effet cytopathique à 4 jours. Le titre de la suspension a été calculé par la méthode de Kärber. Les données présentées correspondent à la moyenne et à l'écart type de 2 expériences indépendantes.

c. Réplication du WNV dans des cellules HEK surexprimant les peptides S100

En complément des expérimentations par ajout exogène de peptides S100, la réplication du WNV a été également mesurée au cours de l'infection de cellules HEK 293T génétiquement modifiées afin de surexprimer S100A8, S100A9 ou l'hétérodimère S100A8/A9. Les cellules ont été infectées aux MOI de 0,01 et 0,1, et la charge virale mesurée dans la nappe cellulaire et le surnageant de culture à 24 h post-infection.

Les résultats obtenus n'ont pas montré de diminution significative de la charge virale dans les trois lignées cellulaires surexprimant les peptides S100A8, S100A9 ou l'hétérodimère S100A8/A9 par rapport aux cellules HEK contrôle E2C (Figure 15).

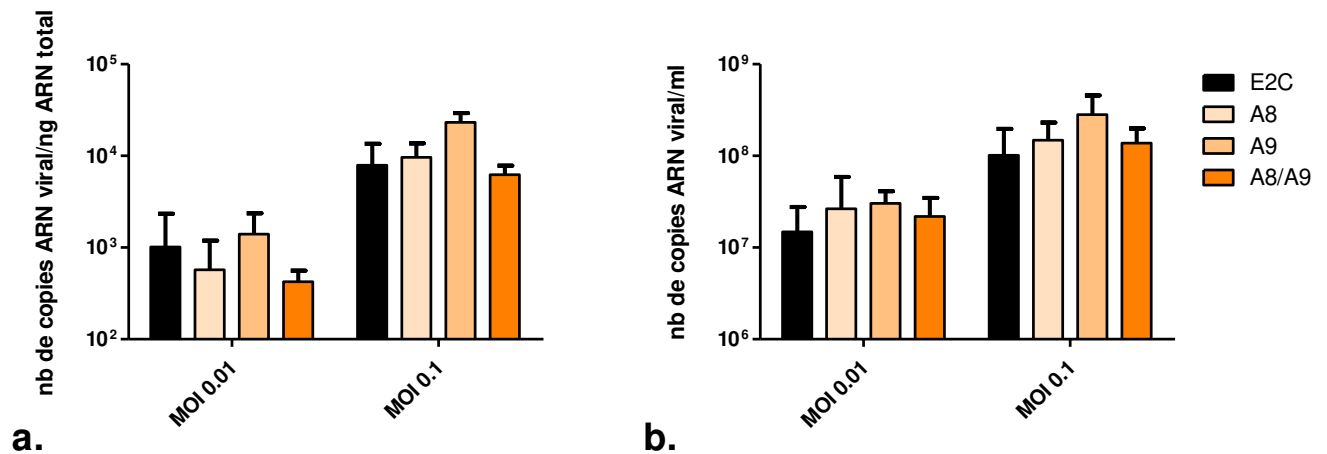


Figure 15 : Quantification de l'ARN du WNV dans les cellules HEK 293T transduites pour surexprimer ou non S100A8, S100A9 et S100A8/A9. La charge virale a été mesurée à 24h post-infection par RT-PCR quantitative dans la nappe cellulaire (a) et dans le surnageant de culture (b) de cellules HEK 293T transduites avec des vecteurs viraux codant les peptides S100A8, S100A9 et S100A8/A9 ou un vecteur contrôle E2C, infectées par le WNV aux MOI de 0,1 et 0,01. Les données présentées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les différentes conditions ont été comparées aux HEK 293T contrôle E2C infectées dans les mêmes conditions par un test de Mann-Whitney (ns).

En complément de l'analyse de la charge virale par RT-qPCR, les surnageants de culture des cellules HEK 293T contrôle ou surexprimant les peptides, infectées par le WNV à une MOI de 0,01 pendant 24 et 48h, ont été titrés sur cellules Vero par la méthode en dilutions limites (Figure 16). Aucune diminution du titre viral n'a été constatée dans le surnageant des cellules surexprimant les peptides S100A8, S100A9 et S100A8/A9 en comparaison à celui du surnageant des cellules contrôle. Une tendance à l'augmentation a même été observée, notamment pour les cellules surexprimant S100A8.

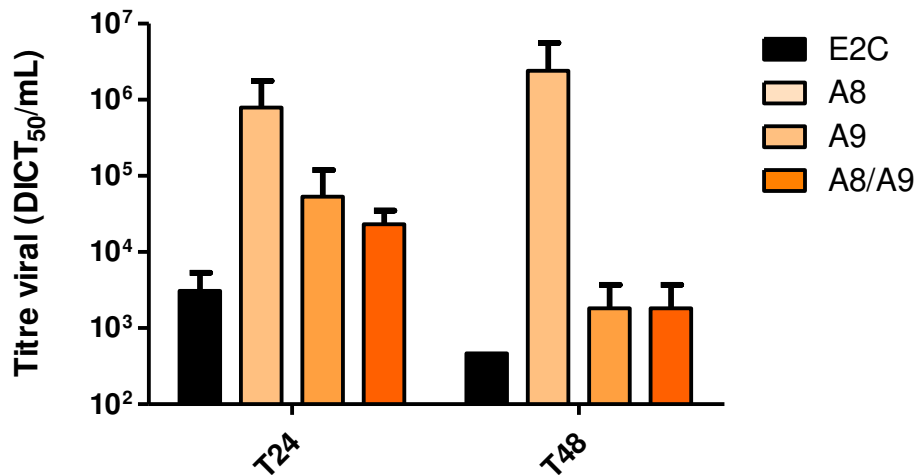


Figure 16 : Titrage du surnageant de culture des cellules HEK 293T transduites pour surexprimer ou non S100A8, S100A9 et S100A8/A9 infectées par le WNV. Des cellules HEK 293T transduites avec des vecteurs viraux codant les peptides S100A8, S100A9 et S100A8/A9 ou un vecteur contrôle E2C ont été infectées par le WNV à une MOI de 0,01. A 24 et 48h post-infection, chaque surnageant a été titré sur cellules Vero par la méthode en dilutions limites impliquant la lecture de l'effet cytopathique à 4 jours. Le titre de la suspension a été calculé par la méthode de Kärber. Les données présentées correspondent à la moyenne et à l'écart type de 2 expériences indépendantes.

d. Effet antiviral direct des peptides S100

Une évaluation des propriétés virucides des peptides S100 a été réalisée par une pré-incubation de 2 h à 37°C d'un inoculum viral de $2,0 \times 10^4$ DICT₅₀/mL du WNV (volume total de la suspension virale : 750 µL) en présence de S100A7, S100A8 et S100A8/A9 à la concentration finale de 10 µg/mL. Le titre infectieux résiduel de la suspension virale a ensuite été défini sur cellules Vero et comparé à celui obtenu pour la suspension virale non traitée.

Le titre de la suspension virale, incubée sans peptide, était de $10^{5,0}$ DICT₅₀/mL. Lors de la pré-incubation en présence des peptides, le titre des suspensions virales était respectivement de $10^{5,17}$ DICT₅₀/mL en présence de S100A7, $10^{5,33}$ DICT₅₀/mL en présence de S100A8 et $10^{5,17}$ DICT₅₀/mL en présence de S100A8/A9 ne montrant donc aucune réduction par rapport à la suspension virale non traitée (Figure 17).

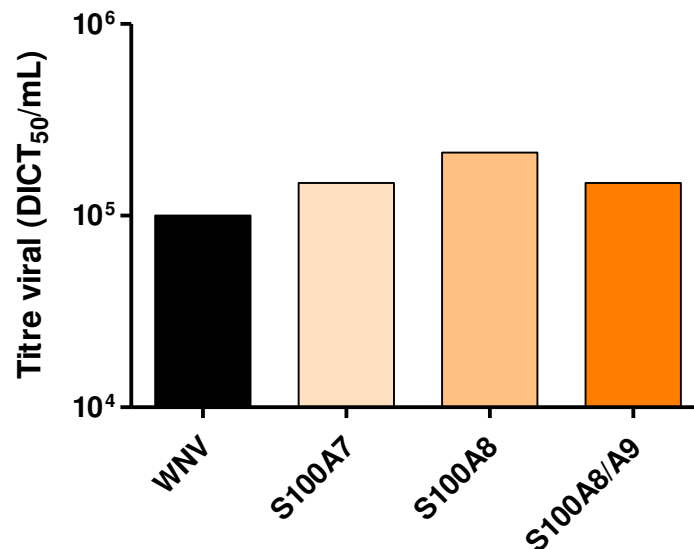


Figure 17 : Titration d'une suspension de WNV après pré-incubation ou non en présence des peptides S100A7, S100A8 et S100A8/A9. Une suspension de $2,0 \cdot 10^4$ DICT₅₀/mL de WNV a été pré-incubée 2 h, à 37°C, sous 5% CO₂, en présence ou en l'absence de S100A7, S100A8 et S100A8/A9 à la concentration finale de 10 µg/mL. Le titre a ensuite été mesuré sur cellules Vero par la méthode des dilutions limites impliquant la lecture de l'effet cytopathique à 4 jours. Le titre de la suspension a été calculé par la méthode de Kärber. Les données présentées correspondent à une seule expérimentation.

e. Evaluation de l'action immunomodulatrice des peptides S100 sur la réponse inflammatoire du kératinocyte induite par le WNV

L'activité immunomodulatrice des peptides S100 a été évaluée à travers la quantification, par RT-qPCR, de la transcription des ARN messagers codant un panel d'ISGs constitués de MX1, IFIT-2 et RSAD2 pour les cellules HaCat traitées par les peptides S100.

L'expression des ARNm codant ces trois ISGs a été étudiée après 24 h d'infection des cellules HaCaT par le WNV à une MOI de 0,1, en présence ou en l'absence de S100A7, S100A8, S1009 et S100A8/A9, à la concentration finale de 10 µg/mL.

Aucune modification de l'expression des 3 marqueurs étudiés n'était observée dans les cellules infectées en présence des peptides par rapport aux cellules HaCaT infectées non traitées (Figure 18).

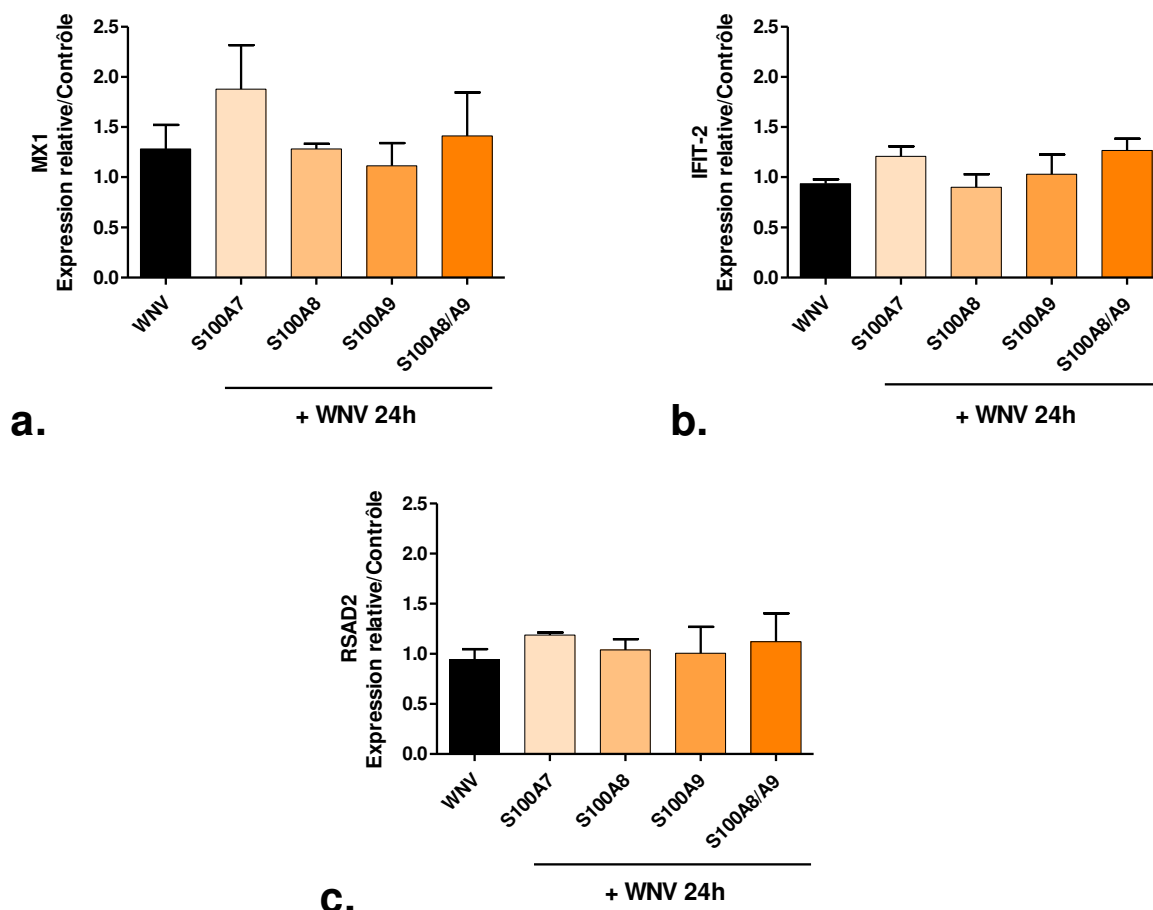


Figure 18 : Analyse transcriptomique, par RT-qPCR, de l'expression de trois ISGs dans des cellules HaCaT infectées par le WNV en présence ou en l'absence de S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9. Sont représentées les quantités relatives de transcrits codants MX1 (a), IFIT-2 (b) et RSAD2 (c) dans le lysat de cellules HaCaT infectées par le WNV à une MOI de 0,1 et incubées 24h en présence ou en l'absence des peptides à la concentration finale de 10 µg/mL. Le niveau d'expression des ISGs dans les cellules infectées par le WNV, traitées ou non par les peptides, a été comparé à celui mesuré dans des HaCaT non infectées et en absence de peptide. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à deux gènes de ménage (GAPDH et 28S). Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type de 2 expériences indépendantes.

IV. Discussion

Plusieurs publications ont décrit une majoration de l'expression des peptides de la famille S100 dans différents contextes d'infections virales. L'infection de kératinocytes primaires humains par le DENV induit ainsi l'expression de la psoriasine S100A7 tandis que cette induction, comme celle des ARNm codant la LL-37, la RNase 7, les IRF3 et -7, et les IFNs, était réduite en présence de protéines issues de la salive de moustique du genre *Aedes*. [135] De même, les concentrations en psoriasine S100A7 et en calprotectine S100A8/A9 étaient augmentées dans les lésions génitales causées par les papillomavirus humains (HPV).

[131, 132] De plus, dans les cellules épithéliales infectées par HPV16, la calprotectine inactivait la caséine kinase II empêchant la phosphorylation et l'activation de l'oncoprotéine virale E7. [133] Il s'agit à ce jour de la seule démonstration d'une activité antivirale de la part d'un peptide de la famille S100. En complément, nos propres travaux ont montré une inhibition de l'expression de plusieurs peptides S100 lors de l'infection de kératinocytes humains par le WNV pouvant constituer un mécanisme d'échappement virologique à la réponse immunitaire innée cellulaire.

Ces données de surexpression ou de répression des peptides S100 au cours de l'infection virale suggéraient un rôle potentiel de ces peptides dans la réponse antivirale cellulaire qui n'avait été que peu ou pas investigué jusqu'ici. Ce travail avait donc pour objectif de déterminer la capacité des peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 à inhiber la réplication du virus West Nile. Les résultats obtenus, que ce soit par ajout des peptides au cours d'une cinétique d'infection d'une lignée kératinocytaire ou par surexpression dans des cellules HEK génétiquement modifiées, n'ont pas permis de mettre en évidence de réduction significative de la charge virale dans la nappe cellulaire ou le surnageant de culture même si une tendance à la baisse était observée en présence de S100A9 et de l'hétérodimère S100A8/A9. La pré-incubation virus-peptide avant mesure du titre infectieux résiduel n'a pas non plus révélé de propriétés antivirales des peptides S100. Enfin, l'étude de l'expression de plusieurs ISGs n'a pas montré de propriétés immunomodulatrices des peptides testés.

L'existence d'une activité antivirale de molécules ayant la capacité à capter les ions Ca^{2+} (et les cations bivalents en général) était pourtant attendue. En effet, l'infection par le WNV provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} . Cet apport active différents processus cellulaires nécessaires à la réplication virale tels que les réarrangements du réticulum endoplasmique donnant naissance aux « usines à virus ». [136] Il déclenche également l'activation de plusieurs kinases, dont FAK (*Focal Adhesion Kinase*), la protéine-sérine kinase B alpha (Akt) et la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK1/2), qui ont un rôle anti-apoptotique prolongeant la survie des cellules infectées par le WNV. [136] Enfin, il avait été publié que le recours à des chélateurs des ions Ca^{2+} et à des inhibiteurs des canaux calciques limitant l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} réduisait drastiquement la réplication virale et la durée de vie des cellules infectées. [137]

En conclusion, les peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 n'ont montré, dans notre étude, aucun effet sur la réplication du WNV aux concentrations et aux MOI

virales testées. Il pourrait toutefois être intéressant de reproduire ces expériences à des concentrations en peptides plus importantes si les études de cytotoxicité le permettent. Des concentrations plus élevées ne seraient toutefois plus le reflet de ce qu'il se passe au niveau cutané, y compris dans un contexte inflammatoire

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de l'infection par un arbovirus, la peau constitue le site d'inoculation du virus dans l'organisme et son premier site de réplication. Paradoxalement, la peau représente également la première ligne de défense face à l'infection. En effet, les kératinocytes de l'épiderme sont un composant essentiel de la mise en place de la réponse immunitaire innée antivirale. Ils sont capables de reconnaître des structures particulières, spécifiques des pathogènes, les *PAMPs*, grâce à leurs nombreux récepteurs, les *PRRs*, parmi lesquels les *TLRs* et les *RLRs* (*RIG-I like Receptor*). La reconnaissance des *PAMPs* par les *PRRs* génère une réponse immunitaire innée dont les molécules effectrices sont constituées de cytokines, de chimiokines, d'*ISGs* et de PAMs. Les peptides antimicrobiens peuvent avoir une action directe sur les virus, par dégradation de la particule virale ou action sur son cycle de réplication, et indirecte, immunomodulatrice. Le kératinocyte humain synthétise plusieurs peptides antimicrobiens appartenant aux familles des cathélicidines (LL-37), des β -défensines, des ribonucléases A et des protéines de la famille S100. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux propriétés antivirales de la cathélicidine humaine LL-37, de la β -défensine humaine de type 3 et des peptides S100A7, S100A8 et S100A9 vis-à-vis du virus West Nile, un arbovirus neurotrope émergent.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation des propriétés antivirales et immunomodulatrices de la LL-37 et d'hBD-3. En effet, aucune étude ne s'était jusqu'ici intéressée à l'activité antivirale de ces PAMs sur les arbovirus, en général, et sur le WNV, en particulier. LL-37 et hBD-3 ont été utilisées à des concentrations de 1 à 10 $\mu\text{g/mL}$, susceptibles de correspondre à la fois aux concentrations physiologiques (faible concentration) et inflammatoires (forte concentration) rencontrées *in vivo*. L'évaluation de l'activité immunomodulatrice à différentes concentrations devait également nous permettre d'explorer un éventuel effet paradoxal des PAMs, immunostimulateur ou immuno-inhibiteur en fonction des concentrations étudiées. Enfin, les kératinocytes étant permissifs à l'infection, le choix du critère d'évaluation de l'activité antivirale s'était porté sur le suivi de la charge virale dans la nappe cellulaire et le surnageant de culture de kératinocytes humains primaires infectés par le WNV en présence ou en l'absence des peptides.

Nos résultats ont montré une activité antivirale directe de la LL-37, à forte concentration (10 µg/mL), se traduisant par une réduction de la charge virale dans le surnageant des kératinocytes infectés et du titre d'un inoculum viral incubé en présence du peptide. En revanche, le traitement par hBD-3 n'a pas eu d'impact sur l'infection par le WNV aux concentrations testées. Cette seconde observation était inattendue car plusieurs publications antérieures avaient conclu à une activité antivirale des défensines par déstabilisation des bicouches phospholipidiques des enveloppes virales que ce soit du VIH-1 ou de l'*Herpes simplex* virus de type 2. [117, 138-140] Néanmoins, ces manipulations avaient été réalisées à des MOI de 0,01, soit 10 fois inférieures à celle utilisée dans notre étude. Des expérimentations supplémentaires seront donc nécessaires pour conclure à l'absence de propriétés antivirales directes anti-WNV d'hBD-3. Elles devront inclure une modification de la proportion entre le nombre de particules virales et la quantité de peptide, ainsi des MOI virales plus faibles ou plus fortes pourraient être testées. De même, nous n'avons pas fait varier les conditions expérimentales de milieu (pH, concentration en NaCl, ...) qui pourraient avoir un impact sur l'interaction virus-peptide.

Les conséquences du traitement par chacun des deux peptides sur la réponse immunitaire innée du kératinocyte ont ensuite été évaluées dans le contexte de la stimulation par un ARN de synthèse bicaténaire, le poly (I:C), ou de l'infection par le WNV. L'expression de deux interférons de type I (IFN β -1) et de type 3 (IL-28A), de deux chimiokines (CCL-5 pour les macrophages et les cellules NK et CXCL-8 pour les polynucléaires neutrophiles) et de trois ISGs (IFIT-1, OAS1 et RSAD2) avec des activités anti-arbovirus déjà connues a été monitorée. [141] Une augmentation significative de l'expression des 7 marqueurs inflammatoires aux niveaux transcriptomique et protéique a été observée en présence de chacun des deux peptides par rapport aux cellules stimulées ou infectées en leur absence. Ces résultats confirmaient les effets potentialisateurs de la LL-37 sur la réponse inflammatoire induite par le poly (I:C). En revanche, la mise en évidence du caractère pro-inflammatoire d'hBD-3 était contradictoire avec certaines données de la littérature où une concentration de 10 µg/mL ne modifiait pas la réponse pro-inflammatoire de kératinocytes stimulés avec différents agonistes des *TLRs* (poly (I:C), LPS, antigènes de streptocoque). [142] Le recours à des cellules primaires issues de patients présentant des caractéristiques génétiques différentes est susceptible d'expliquer ces résultats discordants. Enfin, et surtout, nos résultats démontraient, pour la première fois, l'effet potentialisateur de la réponse inflammatoire du kératinocyte à l'infection par le WNV exercé par la LL-37 et la β -défensine humaine de type 3. Ils suggèrent donc un rôle antiviral indirect potentiel de ces deux PAMs par majoration de

la réponse immunitaire innée antivirale du kératinocyte lors de l'infection. Ces propriétés immunomodulatrices viendraient s'ajouter, pour la LL-37, aux activités antivirales directes précédemment observées.

Dans la seconde partie de ce travail, les expérimentations menées avec les peptides S100A7, S100A8, S100A9 et S100A8/A9 se sont, en revanche, révélées décevantes. L'apport exogène des peptides au cours de l'infection de kératinocytes ou le recours à des cellules génétiquement modifiées pour surexprimer les peptides d'intérêt n'a montré aucun impact significatif sur la réplication du WNV. En complément, aucun effet virucide des peptides S100 à la concentration de 10 µg/mL n'a été observé. En conclusion, les peptides de la famille S100 ne semblent pas avoir de rôle majeur dans la réponse antivirale du kératinocyte à l'infection par le WNV.

Ce projet s'inscrivait dans un objectif, plus général, d'identification des molécules antivirales produites par les cellules de la peau et, notamment, les cellules résidentes, non spécifiquement immunitaires, telles que les kératinocytes de l'épiderme ou les fibroblastes du derme, en réponse à l'infection par les arbovirus. Il s'agissait d'étudier et de mieux comprendre la réponse antivirale cutanée afin de pouvoir ensuite l'exploiter pour lutter contre les infections à arbovirus. Parmi les acteurs de la réponse immunitaire innée cutanée, les PAMs occupent une place de choix. Ces molécules peptidiques de petites tailles, produites en grandes quantités par les kératinocytes, ont désormais des activités antibactériennes bien décrites. Ainsi, parmi les dernières molécules antibiotiques récemment approuvées par la *Food and Drug Administration* et désormais utilisées en thérapeutique, trois sont des PAMs : la daptomycine, la dalbavancine et la télavancine. [143] A l'inverse, la caractérisation de leurs activités antivirales potentielles est encore balbutiante. De plus, la formidable diversité des PAMs, présents dans le règne animal comme végétal, offre l'opportunité de tester un nombre quasi-infini de molécules pour tous types de virus, nus comme enveloppés, au-delà donc du cadre strict des arbovirus. Au sein même de la peau, il reste encore à finaliser l'investigation des propriétés des autres PAMs du kératinocyte et à s'intéresser aux peptides produits par les autres types cellulaires cutanés. Enfin, les PAMs dont l'activité antivirale est déjà décrite sont virucides, capables d'inactiver les particules virales infectieuses, ce qui tranche avec les thérapeutiques actuelles, toutes virostatiques. Il existe néanmoins un certain nombre de limitations à l'utilisation des PAMs en médecine. La méthodologie employée pour évaluer leurs propriétés antivirales se heurte à deux obstacles : (i) la capacité des peptides ajoutés de façon exogène à la culture cellulaire à pénétrer dans la cellule cible et à faire ainsi preuve d'une

activité antivirale intracellulaire post-fusion ; (ii) la pertinence des peptides obtenus par synthèse chimique ou produits par des cellules procaryotes en comparaison à ceux synthétisés par les cellules humaines soumis à des modifications post-traductionnelles. Par la suite, une fois l'activité antivirale prouvée, l'utilisation en thérapeutique des peptides identifiés sera un autre défi. En effet, leur nature peptidique les rend inaptes à une administration par voie orale où ils seront purement et simplement digérés. Des modifications chimiques garantissant leur stabilité ou un mode de vectorisation devront être ainsi envisagés. De ce fait, l'utilisation comme topique est une piste séduisante car évitant une administration systémique, orale ou parentérale, du peptide à risque de dégradation ou d'effets indésirables principalement liés à l'immunostimulation, tout en permettant une action locale efficace. La cytotoxicité importante de certains peptides, comme la LL-37, constitue également un argument en faveur d'une administration locale. Néanmoins, cette voie d'administration s'entendrait davantage pour des infections virales provoquant des altérations localisées de la barrière cutanée, telles que les infections herpétiques, car une barrière cutanée intacte ne laissera vraisemblablement pas passer le peptide jusqu'au site d'infection. La recherche d'un traitement anti-herpétique virucide est d'autant plus pertinente que l'on ne dispose actuellement que de molécules virostatiques contre lesquelles émergent, encore marginalement, des mécanismes de résistance virologique.

Concevoir des traitements efficaces contre les arbovirus constitue une priorité. Les populations vivant dans les zones endémiques et/ou épidémiques actuelles et futures vont représenter une part croissante de l'humanité du fait du réchauffement climatique élargissant les aires de distribution de leurs vecteurs. Une caractérisation approfondie des molécules effectrices de la réponse antivirale de la peau et de leur rôle pourrait offrir une meilleure compréhension des interactions hôte-arbovirus, pourquoi ces virus peuvent établir une infection et comment il sera possible de faire pencher la balance en faveur de l'hôte à leur premier point d'entrée et site de réplication initial, bien avant que la propagation systémique ne se produise vers les organes cibles, tels que le système nerveux central, le foie ou le fœtus, et avant que la réponse immunitaire adaptative ne se déclenche. Il s'agira alors de synthétiser de nouveaux analogues thérapeutiques contre l'infection ou des agonistes capables de stimuler spécifiquement la réponse antivirale soit localement, dans la peau, pour prévenir l'installation de l'infection à arbovirus, soit à l'échelle de l'organisme, pour renforcer la réponse immunitaire innée de l'hôte dans le cadre d'une infection déjà établie. Ces nouvelles stratégies antivirales conçues vis-à-vis de différents arbovirus actuels nous permettront de faire face aux futurs arbovirus qui ne manqueront pas d'émerger tôt ou tard.

RÉFÉRENCES

1. Huang, Y.S., S. Higgs, and D.L. Vanlandingham, *Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 22.
2. Tabachnick, W.J., *The evolutionary relationships among arboviruses and the evolutionary relationships of their vectors provides a method for understanding vector-host interactions*. J Med Entomol, 1991. **28**(3): p. 297-8.
3. Hammon, W.M. and W.C. Reeves, *Recent Advances in the Epidemiology of the Arthropod-borne Virus Encephalitides: Including Certain Exotic Types*. Am J Public Health Nations Health, 1945. **35**(10): p. 994-1004.
4. Viglietta, M., et al., *Vector Specificity of Arbovirus Transmission*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 773211.
5. Mourez, T., et al., *Traité de Virologie Médicale*. 2e édition. Vol. 1. 2019, Paris: Société française de Microbiologie. 793.
6. Esser, H.J., et al., *Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: a systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas*. Parasit Vectors, 2019. **12**(1): p. 265.
7. Caminade, C., et al., *Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito Aedes albopictus: recent trends and future scenarios*. J R Soc Interface, 2012. **9**(75): p. 2708-17.
8. Bellini, R., et al., *Practical management plan for invasive mosquito species in Europe: I. Asian tiger mosquito (Aedes albopictus)*. Travel Med Infect Dis, 2020. **35**: p. 101691.
9. Luplertlop, N., et al., *Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the Aedes aegypti salivary gland, following Infection with Dengue Virus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001252.
10. Ziegler, S.A., et al., *In vivo imaging of chikungunya virus in mice and Aedes mosquitoes using a Renilla luciferase clone*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(11): p. 1471-7.
11. Salazar, M.I., et al., *Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 9.
12. Vazeille, M., et al., *Orally co-Infected Aedes albopictus from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(6): p. e706.
13. Schneider, B.S., et al., *Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding*. Viral Immunol, 2006. **19**(1): p. 74-82.
14. Styer, L.M., K.A. Bernard, and L.D. Kramer, *Enhanced early West Nile virus infection in young chickens infected by mosquito bite: effect of viral dose*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(2): p. 337-45.
15. Brown, A.N., et al., *Tissue tropism and neuroinvasion of West Nile virus do not differ for two mouse strains with different survival rates*. Virology, 2007. **368**(2): p. 422-30.
16. Lim, P.Y., et al., *Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 5197-201.
17. Byrne, S.N., et al., *Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(3): p. 702-9.
18. Schneider, B.S. and S. Higgs, *The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008. **102**(5): p. 400-8.
19. Styer, L.M., et al., *Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1517-27.
20. Junt, T., et al., *Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 110-4.
21. Purtha, W.E., et al., *Early B-cell activation after West Nile virus infection requires alpha/beta interferon but not antigen receptor signaling*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 10964-74.
22. Knipe, D.M. and P. Howley, *Fields Virology 6th edition*. 6 ed. 2013: Lippincott Williams & Wilkins
23. Klein, R.S., *Encephalitic Arboviruses of Africa: Emergence, Clinical Presentation and Neuropathogenesis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 769942.

24. Islam, M.T., et al., *Production, Transmission, Pathogenesis, and Control of Dengue Virus: A Literature-Based Undivided Perspective*. Biomed Res Int, 2021. **2021**: p. 4224816.
25. Stapleton, J.T., et al., *The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 2): p. 233-46.
26. Poidinger, M., R.A. Hall, and J.S. Mackenzie, *Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus*. Virology, 1996. **218**(2): p. 417-21.
27. Calisher, C.H., et al., *Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera*. J Gen Virol, 1989. **70** (Pt 1): p. 37-43.
28. Berthet, F.X., et al., *Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 9): p. 2293-7.
29. Mackenzie, J.S. and D.T. Williams, *The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses*. Zoonoses Public Health, 2009. **56**(6-7): p. 338-56.
30. Prow, N.A., *The changing epidemiology of Kunjin virus in Australia*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(12): p. 6255-72.
31. *West Nile Fever*. 2013.
32. Pacenti, M., et al., *Human West Nile Virus Lineage 2 Infection: Epidemiological, Clinical, and Virological Findings*. Viruses, 2020. **12**(4).
33. Brinton, M.A., *The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 371-402.
34. Quicke, K.M. and M.S. Suthar, *The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection*. Viruses, 2013. **5**(11): p. 2643-58.
35. Hoover, L.I. and B.L. Fredericksen, *IFN-dependent and -independent reduction in West Nile virus infectivity in human dermal fibroblasts*. Viruses, 2014. **6**(3): p. 1424-41.
36. Brinton, M.A., *Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus*. Viruses, 2013. **6**(1): p. 13-53.
37. Smithburn, K.C., *A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.*, T.P. Hughes, Editor. 1940, Am. J. Trop. Med. p. 471-492.
38. WHO, *West Nile Virus*. 2011.
39. Saiz, J.C., et al., *Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation*. Virulence, 2021. **12**(1): p. 1145-1173.
40. Dauphin, G., et al., *West Nile: worldwide current situation in animals and humans*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 343-55.
41. Gossner, C.M., et al., *West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach*. Euro Surveill, 2017. **22**(18).
42. ECDC. *Weekly updates: 2021 West Nile Virus transmission season*. 2021 [cited 2022 20-01-2022]; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>.
43. SPF. *West Nile Virus*. 2021 [cited 2022 02-03-2022]; Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/west-nile-virus/donnees/#tabs>.
44. Hernández-Triana, L.M., et al., *Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease*. Front Public Health, 2014. **2**: p. 271.
45. Petersen, L.R., A.C. Brault, and R.S. Nasci, *West Nile virus: review of the literature*. JAMA, 2013. **310**(3): p. 308-15.
46. CDC. *West Nile virus disease cases and deaths reported to CDC by year and clinical presentation, 1999-2015*. 25/07/17; Available from: https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/data/1-WNV-Disease-Cases-by-Year_1999-2015_07072016.pdf.
47. *West Nile Virus*. 2005, Institut de Veille Sanitaire.
48. *Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes*. 1994, Journal Officiel de la République Française. p. 1178.
49. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 2020, Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. p. 604.
50. Hamel, R., et al., *Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells*. J Virol, 2015. **89**(17): p. 8880-96.
51. Perera-Lecoin, M., et al., *Flavivirus entry receptors: an update*. Viruses, 2013. **6**(1): p. 69-88.
52. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
53. Kolarsick, P.A., M.A. Kolarsick, and C. Goodwin, *Anatomy and physiology of the skin*. J Dermatol Nurses Assoc, 2011. **3**(4): p. 203-213.

54. Di Meglio, P., G.K. Perera, and F.O. Nestle, *The multitasking organ: recent insights into skin immune function*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 857-69.
55. Randall Wickett, R. and M.O. Visscher, *Structure and function of the epidermal barrier*. Am J Infect Control, 2006. **34**(10): p. S98-S110.
56. Johnson, J.M. and D.L. Kellogg, Jr., *Skin vasoconstriction as a heat conservation thermoeffector*. Handb Clin Neurol, 2018. **156**: p. 175-192.
57. Slominski, A.T., et al., *Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2012. **212**: p. v, vii, 1-115.
58. Kechichian, E. and K. Ezzedine, *Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists*. Am J Clin Dermatol, 2018. **19**(2): p. 223-235.
59. Briant, L., et al., *Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses*. Virology, 2014. **464-465**: p. 26-32.
60. Prost-Squarcioni, C., M. Heller, and S. Fraitag, *Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes*. 2005, *Ann Dermatol Venereol*
61. Grice, E.A. and J.A. Segre, *The skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 244-53.
62. Scharschmidt, T.C. and M.A. Fischbach, *What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome*. Drug Discov Today Dis Mech, 2013. **10**(3-4): p. e83-e89.
63. Flipse, J., et al., *Dengue tropism for macrophages and dendritic cells: the host cell effect*. J Gen Virol, 2016. **97**(7): p. 1531-1536.
64. Martin, M.F., et al., *Usutu Virus escapes langerin-induced restriction to productively infect human Langerhans cells, unlike West Nile virus*. Emerg Microbes Infect, 2022. **11**(1): p. 761-774.
65. Brown, M.G., et al., *Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 1145-50.
66. Paddock, C.D., et al., *Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1527-35.
67. Surasombattana, P., et al., *Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(7): p. 1664-73.
68. Limon-Flores, A.Y., et al., *Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells*. Int J Exp Pathol, 2005. **86**(5): p. 323-34.
69. Bernard, E., et al., *Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step*. Virology, 2015. **476**: p. 1-10.
70. Sourisseau, M., et al., *Characterization of reemerging chikungunya virus*. PLoS Pathog, 2007. **3**(6): p. e89.
71. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
72. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
73. Kalali, B.N., et al., *Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2694-704.
74. Jiang, Y., et al., *Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin*. JCI Insight, 2020. **5**(20).
75. Aguirre, S., et al., *DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002934.
76. Welte, T., et al., *Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 11): p. 2660-8.
77. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
78. Fontaine, A., et al., *Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29107.
79. Le Coupanec, A., et al., *Aedes mosquito saliva modulates Rift Valley fever virus pathogenicity*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(6): p. e2237.
80. Surasombattana, P., et al., *Aedes aegypti saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 281-4.
81. Lebre, M.C., et al., *Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 331-41.
82. Sokol, C.L. and A.D. Luster, *The chemokine system in innate immunity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(5).
83. Kroeze, K.L., et al., *Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(1): p. 216-25.

84. Bernard, F.X., et al., *Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 718725.
85. Divekar, R. and H. Kita, *Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2015. **15**(1): p. 98-103.
86. Grone, A., *Keratinocytes and cytokines*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **88**(1-2): p. 1-12.
87. Kim, J.H., et al., *Thymic stromal lymphopoietin downregulates filaggrin expression by signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation in keratinocytes*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(1): p. 205-208.e9.
88. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
89. Perry, A.K., et al., *The host type I interferon response to viral and bacterial infections*. Cell Res, 2005. **15**(6): p. 407-22.
90. Lindqvist, R. and A.K. Överby, *The Role of Viperin in Antiflavivirus Responses*. DNA Cell Biol, 2018. **37**(9): p. 725-730.
91. Diamond, M.S. and M. Farzan, *The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 46-57.
92. Jiang, D., et al., *Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections*. J Virol, 2010. **84**(16): p. 8332-41.
93. Reynaud, J.M., et al., *IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon*. PLoS Pathog, 2015. **11**(4): p. e1004863.
94. Helbig, K.J., et al., *Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(4): p. e2178.
95. Li, Y., et al., *Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(8): p. 2241-6.
96. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, *APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D1087-93.
97. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 23-7.
98. Barlow, P.G., et al., *Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25333.
99. Bergman, P., et al., *The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication*. Curr HIV Res, 2007. **5**(4): p. 410-5.
100. Crack, L.R., et al., *Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus*. Clin Exp Dermatol, 2012. **37**(5): p. 534-43.
101. Currie, S.M., et al., *The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73659.
102. Domachowske, J.B., et al., *Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus*. J Infect Dis, 1998. **177**(6): p. 1458-64.
103. Gómara, M.J. and I. Haro, *Updating the use of synthetic peptides as inhibitors of HIV-1 entry*. Curr Med Chem, 2014. **21**(10): p. 1188-200.
104. Howell, M.D., et al., *Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1763-7.
105. Tripathi, S., et al., *The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 1): p. 40-9.
106. Wong, J.H., et al., *Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1*. Peptides, 2011. **32**(6): p. 1117-22.
107. Saxena, S.K., et al., *Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20783-8.
108. Steinstraesser, L., et al., *Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides*. Retrovirology, 2005. **2**: p. 2.
109. Zhang, Y., et al., *Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells*. J Virol, 2003. **77**(10): p. 5933-47.
110. Harder, J. and J.M. Schroder, *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46779-84.
111. Niyonsaba, F., et al., *Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases*. Exp Dermatol, 2017.

112. Koczulla, A.R. and R. Bals, *Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential*. *Drugs*, 2003. **63**(4): p. 389-406.
113. Mookherjee, N., et al., *Systems biology evaluation of immune responses induced by human host defence peptide LL-37 in mononuclear cells*. *Mol Biosyst*, 2009. **5**(5): p. 483-96.
114. Tjabringa, G.S., et al., *Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006. **140**(2): p. 103-12.
115. De Yang, et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 1069-74.
116. Lai, Y. and R.L. Gallo, *AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(3): p. 131-41.
117. Daher, K.A., M.E. Selsted, and R.I. Lehrer, *Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins*. *J Virol*, 1986. **60**(3): p. 1068-74.
118. Yu, Y., et al., *Engineered Human Cathelicidin Antimicrobial Peptides Inhibit Ebola Virus Infection*. *iScience*, 2020. **23**(4): p. 100999.
119. Yu, J., et al., *Cathelicidin antimicrobial peptides suppress EV71 infection via regulating antiviral response and inhibiting viral binding*. *Antiviral Res*, 2021. **187**: p. 105021.
120. Pramanik, A., et al., *Blocking SARS-CoV-2 Delta Variant (B.1.617.2) Spike Protein Receptor-Binding Domain Binding with the ACE2 Receptor of the Host Cell and Inhibiting Virus Infections Using Human Host Defense Peptide-Conjugated Graphene Quantum Dots*. *ACS Omega*, 2022. **7**(9): p. 8150-8157.
121. Li, D., et al., *HD5 and LL-37 Inhibit SARS-CoV and SARS-CoV-2 Binding to Human ACE2 by Molecular Simulation*. *Interdiscip Sci*, 2021. **13**(4): p. 766-777.
122. Bharucha, J.P., et al., *Human Beta-Defensin 2 and 3 Inhibit HIV-1 Replication in Macrophages*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 535352.
123. Zhang, L., et al., *HBD-2 binds SARS-CoV-2 RBD and blocks viral entry: Strategy to combat COVID-19*. *iScience*, 2022. **25**(3): p. 103856.
124. Zhang, L., et al., *Molecular dynamics simulations and functional studies reveal that hBD-2 binds SARS-CoV-2 spike RBD and blocks viral entry into ACE2 expressing cells*. *bioRxiv*, 2021.
125. Al-Bayatee, N.T. and A.H. Ad'hiah, *Human beta-defensins 2 and 4 are dysregulated in patients with coronavirus disease 19*. *Microb Pathog*, 2021. **160**: p. 105205.
126. Bagheri-Hosseinabadi, Z., et al., *The prognostic value of S100A calcium binding protein family members in predicting severe forms of COVID-19*. *Inflamm Res*, 2022. **71**(3): p. 369-376.
127. Deguchi, A., et al., *S100A8 may govern hyper-inflammation in severe COVID-19*. *FASEB J*, 2021. **35**(9): p. e21798.
128. Guilloreau, K., et al., *Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis*. *J Immunol*, 2010. **184**(9): p. 5263-5270.
129. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. *Nature*, 1997. **387**(6636): p. 861.
130. Chessa, C., et al., *Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 1155.
131. Erhart, W., et al., *Induction of human β -defensins and psoriasin in vulvovaginal human papillomavirus-associated lesions*. *J Infect Dis*, 2011. **204**(3): p. 391-9.
132. Alvendal, C., et al., *Expression of Psoriasin in Human Papillomavirus-Induced Cervical High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions*. *J Low Genit Tract Dis*, 2019. **23**(1): p. 33-38.
133. Tugizov, S., et al., *Inhibition of human papillomavirus type 16 E7 phosphorylation by the S100 MRP-8/14 protein complex*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 1099-112.
134. Reghunathan, R., et al., *Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome*. *BMC Immunol*, 2005. **6**: p. 2.
135. Surasombatpattana, P., et al., *Aedes aegypti saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses*. *J Invest Dermatol*, 2012. **132**(8): p. 2103-5.
136. Scherbik, S.V. and M.A. Brinton, *Virus-induced Ca²⁺ influx extends survival of west nile virus-infected cells*. *J Virol*, 2010. **84**(17): p. 8721-31.
137. Siddharthan, V., et al., *Inhibition of West Nile virus by calbindin-D28k*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e106535.
138. Kota, S., et al., *Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(33): p. 22417-29.
139. Quiñones-Mateu, M.E., et al., *Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication*. *AIDS*, 2003. **17**(16): p. F39-48.
140. Hazrati, E., et al., *Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8658-66.

141. Palomino, D.C. and L.C. Marti, *Chemokines and immunity*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(3): p. 469-73.
142. van Kilsdonk, J.W.J., et al., *The Effects of Human Beta-Defensins on Skin Cells in vitro*. Dermatology, 2017.
143. Chen, C.H. and T.K. Lu, *Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(1).

Résumé :

Le Virus West Nile (WNV) est un flavivirus neurotrope émergent responsable d'une infection contre laquelle il n'existe ni traitement ni vaccin. Transmis à l'Homme lors du repas sanguin du moustique vecteur, le virus est inoculé dans la peau où il infecte les kératinocytes de l'épiderme. L'arsenal défensif du kératinocyte humain inclut la synthèse de 9 peptides antimicrobiens dont l'activité contre le WNV n'a jusqu'ici jamais été étudiée.

Au cours de ce travail, nous avons évalué les propriétés antivirales et immunomodulatrices de la cathélicidine humaine LL-37, de la bêta-défensine humaine de type 3 (hBD-3) et de deux peptides de la famille S100, la psoriasine S100A7 et la calprotectine S100A8/A9. Nos résultats ont montré une activité antivirale directe de la LL-37, à forte concentration (10 µg/mL), se traduisant par une réduction de la charge virale dans le surnageant des kératinocytes infectés et du titre infectieux d'un inoculum viral incubé en présence du peptide. En revanche, le traitement par hBD-3 n'a pas eu d'impact significatif sur l'infection par le WNV aux concentrations testées. Par ailleurs, une augmentation significative de l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires aux niveaux transcriptomique et protéique a été observée en présence de chacun des deux peptides par rapport aux cellules stimulées par un ARN bicaténaire de synthèse, le poly (I:C), ou infectées par le WNV en leur absence.

Dans la seconde partie de ce travail, les expérimentations menées avec les peptides S100A7 et S100A8/A9 se sont révélées décevantes. L'apport exogène des peptides au cours de l'infection de kératinocytes ou le recours à des cellules génétiquement modifiées pour surexprimer les peptides d'intérêt n'a montré aucun impact significatif sur la réplication du WNV. En complément, aucun effet virucide des peptides S100 à la concentration de 10 µg/mL ni immunomodulateur n'a été observé.

En conclusion, ces résultats suggèrent un effet antiviral indirect de la LL-37 et d'hBD-3 par potentialisation de la réponse immunitaire innée du kératinocyte à l'infection. Ces propriétés immunomodulatrices viendraient s'ajouter, pour la LL-37, à une action directe par altération de la particule virale. En revanche, les peptides de la famille S100 ne semblent pas avoir de rôle majeur dans la réponse antivirale du kératinocyte à l'infection par le WNV.

De façon générale, ce travail souligne les potentialités antivirales, encore méconnues, des molécules produites par la peau et les kératinocytes à la porte d'entrée et au site initial de réplication du WNV et des arbovirus dans l'organisme.