



HAL
open science

Rôle du TLR9 et des lymphocytes B dans l'échappement du virus de l'hépatite B à l'immunité innée

Issam Tout

► **To cite this version:**

Issam Tout. Rôle du TLR9 et des lymphocytes B dans l'échappement du virus de l'hépatite B à l'immunité innée. Immunologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT: 2017LYSE1308 . tel-01781861

HAL Id: tel-01781861

<https://theses.hal.science/tel-01781861v1>

Submitted on 30 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1308

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°ED340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire de Lyon

Spécialité de doctorat :
Immunologie

Soutenue publiquement le 15/12/2017, par

Issam TOUT

Rôle du TLR9 et des lymphocytes B dans l'échappement du virus de l'hépatite B à l'immunité innée

Devant le jury composé de :

Dr. Pierre ROQUES	DR2	CEA	Rapporteur
Dr. Laurence CHAPEROT	DR2	IAB	Rapporteur
Dr. Olivier DIAZ	MCU	CIRI	Examineur
Dr. Patrick SOUSSAN	MCU-PH	CIMI	Examineur
Dr. Isabelle CHEMIN	DR2	CRCL	Directeur de thèse
Dr. Uzma HASAN	CR2	CIRI	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse et d'être présents parmi nous. Un grand merci au Dr. Pierre ROQUES et au Dr. Laurence CHAPEROT d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, du temps qu'ils m'ont consacré et de leurs lectures critiques du manuscrit. Vos parcours et vos qualités scientifiques sont pour moi un exemple. Dr. Patrick SOUSSAN, vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail tout au long de ma thèse en étant membre de mon comité de suivi de thèse et maintenant en tant qu'examineur. Merci pour votre disponibilité et votre bienveillance. Dr. Olivier DIAZ, soyez assuré de ma sincère reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de juger ce travail en tant qu'examineur. Dr. Laurent GENESTIER, vous m'avez fait l'honneur de suivre ce travail au cours de mes deux comités de suivi de thèse, je vous remercie de vos conseils et vos suggestions pour améliorer ce travail de thèse.

Je tiens maintenant à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à ma Directrice de thèse, Dr Isabelle CHEMIN, pour avoir cru en moi et accueilli au sein de son laboratoire. Je me rappelle de notre premier interview de thèse au CRCL comme si c'était maintenant. Grâce à vos précieux conseils et votre rigueur dans le travail, vous m'avez offert la possibilité d'approfondir mes connaissances scientifiques. Ces quatre années de thèse sous votre direction resteront pour moi une très grande expérience, tant sur le plan professionnel que humain.

J'adresse mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de thèse, Dr Uzma HASAN pour m'avoir accueilli au sein de son équipe à Lyon Sud et à la Tour. Merci de ta confiance, ton sourire et de ton soutien durant ces 4 ans de thèse. Je n'oublierai jamais nos échanges scientifiques, les lab meeting, les diners d'équipe et tous les moments que j'ai passé avec vous.

Isabelle et Uzma, votre disponibilité, vos remarques pertinentes et votre soutien tout au long de cette thèse m'ont permis d'acquérir la rigueur scientifique indispensable à la réalisation de ce travail, ainsi que votre gentillesse et patience ont instauré les meilleures conditions de travail. Merci de m'avoir toujours encouragé et d'avoir toujours été optimiste, surtout pendant les périodes difficiles.

J'ai pu travailler pendant ma thèse avec des personnes vraiment formidables qui m'ont énormément aidé et qui ont toujours été là pour moi. Je tiens donc à les remercier pour leur soutien et leur esprit d'équipe. Merci Claudia (Wawrinka), Guillaume (notre superbe ingénieur d'études), Marie (mon ex-stagiaire et bientôt docteur !), Maman Michelle, Laurette, Brice, la « team Walzer » et Thierry pour votre accueil et gentillesse. Merci à tous pour tous ces moments passés ensemble, merci d'avoir fait de ces années passées avec vous une expérience humaine très enrichissante. Vous me manquerez tous et j'espère garder longtemps contact avec vous.

Merci aux donateurs anonymes de l'EFS et aux patients qui ont participé à cette étude en donnant de leur personne, au plateau cytométrie de la Tour avec Thibault et Sébastien, aux secrétaires de la Tour pour toutes vos aides, aux techniciennes de laboratoire, à tous les gens

que j'ai pu côtoyer à la Tour et à Lyon Sud.

Une pensée à toi Ludovic, merci pour tes conseils de manip et ton aide, que ton âme repose en paix.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de mon projet, Melissa, Pr Sophie Alain et toute son équipe à Limoges.

Je tiens à remercier également mes amis et mes anciens colloques qui m'ont soutenu pendant cette aventure. Merci Abdallah, Chadi, Abdel Salam, Mohammad, Bilal, Jawad. Je remercie également mes amis d'enfance au Liban qui m'ont soutenu moralement, merci Hadi, Amro, Bassem, Wissam, Chawki, Toute, Wassim, Khaldoun the baalbakian et Abou Abir.

A ma famille, notre union est notre richesse. Je vous aime plus que les mots ne peuvent le dire. Karim, mon petit frère et mon cher ami, merci pour tes encouragements, tes conseils et ton grand support et j'espère avoir été pour toi source d'inspiration comme tu l'as été pour moi et bientôt tu seras Docteur. Hala, ma chère sœur et ma copine merci pour le support moral, Zouzou mon neveu, mon chouchou et Mazen. Hassan, mon petit frère qui me taquine toujours mais qui me motive à faire toujours mieux.

Mes grand-pères, qui ont malgré eux ont guidé mon parcours.

A ma mère et mon père,

A mes parents sans qui l'enfant que j'étais ne serait pas devenu l'homme que je suis. C'est avec émotion qu'à mon tour je leur dévoile le fruit de mes efforts. J'espère être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle. Vos encouragements et votre amour m'ont porté jusqu'ici ! Merci pour tout le bonheur que vous m'apportez. Je vous aime fort ! Le bonheur se trouve sous vos pieds..

A mon amour Mirna, qui pour mon plus grand bonheur partage ma vie et mes expériences professionnelles. Elle a su, tout au long de cette thèse, m'encourager dans ma voie. Son soutien et sa patience ont été sans faille durant ce long et dur travail. Notre « long-distance relationship » a été plus forte que jamais. Je t'aime beaucoup !

Je dédie cette thèse à mes grand-mères, que vos âmes reposent en paix..

Rôle du TLR9 et des lymphocytes B dans l'échappement du virus de l'hépatite B à l'immunité innée

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) est un problème de santé majeur dans le monde et peut conduire à la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Des réponses déficientes des cellules T ont été démontrées, mais les événements précis qui peuvent contribuer à l'insuffisance des réponses des cellules B restent à déterminer. L'expansion et la différenciation optimales des cellules B reposent sur l'activité du récepteur Toll Like Receptor 9 (TLR9) qui détecte l'ADNdb et est exprimée chez l'homme principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les cellules B. L'impact de HBV sur TLR9 dans les cellules B humaines reste à explorer. Dans cette étude, nous avons exploré les effets de HBV sur l'expression et les fonctions médiées par TLR9 dans les cellules B humaines en utilisant une lignée cellulaire de cellules B ainsi que des lymphocytes B primaires. De plus, on a corroboré nos résultats dans une cohorte de patients HBV chroniques. L'expression de TLR9 a été réduite chez toutes les sous-populations de cellules B du sang périphérique, exposées au VHB. Les fonctions des cellules B médiées par TLR9 comme la prolifération et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ont été abrogées en présence de HBV. Nos résultats montrent que l'antigène de surface HBsAg inhibe la phosphorylation du facteur de transcription CREB qui ne peut plus se lier sur son site CRE situé sur le promoteur TLR9 ce qui affecte la transcription de ce dernier. Enfin, nous avons corroboré nos résultats *in vitro* dans une cohorte de porteurs chroniques du HBV et constaté que l'expression et la fonction de TLR9 étaient significativement diminuées. Nos résultats révèlent le mécanisme qui induit une réponse immunosuppressive par HBV sur la fonction TLR9 dans les cellules B humaines, ce qui peut contribuer à la persistance de ce virus chez l'hôte et la complication de la phase chronique de la maladie.

Mots clefs : Infection chronique, HBV, Cellules B, TLR9, CREB

The role of TLR9 and B cells in innate immune escape by hepatitis B virus

Chronic HBV infection is a major health problem worldwide. Ineffective T cell and antibody responses have been demonstrated, yet the precise events that may contribute to insufficient B cell responses remain to be determined. Optimal B cell function, expansion and differentiation rely on Toll Like Receptor 9 (TLR9) activity which senses dsDNA and is expressed in human mainly by plasmacytoid dendritic (pDC) and B cells. The impact of HBV on TLR9 in human B cell subsets remains to be explored.

Here, we investigated the effects of HBV on TLR9 function in human B cells. Both primary and B cell lines were used to analyze the effect of HBV on TLR9 expression and function. These results were corroborated in a cohort of chronically infected HBV patients. TLR9 expression was reduced in all peripheral blood B cells subsets exposed to HBV. B cell function mediated by TLR9, such as proliferation and pro-inflammatory cytokines secretion were abrogated in the presence of HBV. Our results show that the viral surface antigen HBsAg inhibited the phosphorylation of the transcription factor CREB which could no longer bind the CRE site located on the TLR9 promoter. Finally, we corroborated our *in vitro* findings in a cohort of chronic HBV carriers (CHB) and found that TLR9 expression and function were significantly suppressed.

Our findings reveal the mechanism that induces an immunosuppressive response by HBV on TLR9 function in human B cells, which may contribute to HBV persistence in the host.

Keywords: Chronic infection, HBV, B cells, TLR9, CREB



U1111 INSERM, Equipe
« Innate Immunity in Infectious and
Autoimmune Diseases »
21, Avenue Tony Garnier
69007 Lyon, France



U1052 INSERM, Equipe
«Hepatocarcinogenesis and viral
infection»
151 Cours Albert Thomas
69003 Lyon, France

TABLE DES MATIERES

Table des matières

TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
Figures	12
Tableaux	14
ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION	19
1 Infection virale et cancer.....	20
1.1 Historique	20
1.2 Oncovirus et maladies associées.....	20
2 Virus de l'hépatite B (HBV).....	22
2.1 Historique et découverte du virus.....	22
2.1.1 Découverte du virus de l'hépatite B.....	22
2.1.2 Développement du vaccin et des premiers traitements contre l'hépatite B.....	23
2.2 Classification.....	24
2.3 Structure du HBV.....	24
2.3.1 Caractéristiques structurales du virus.....	24
2.3.2 La particule de Dane.....	24
2.3.3 Génome du virus	25
2.3.4 Les particules subvirales.....	27
2.4 Les protéines virales.....	28
2.4.1 Protéines d'enveloppe	28
2.4.2 La protéine de capsid : core (AgHBc).....	28
2.4.3 La protéine précore ou antigène HBe (HBeAg)	28
2.4.4 La polymérase virale.....	29
2.4.5 La protéine X.....	29
2.5 Cycle de réplication	29
2.5.1 Entrée virale	30
2.5.2 Expression du génome et synthèse des protéines virales.....	30
2.5.3 Sécrétion des virions et des particules virales.....	30
2.5.3.1 Formation et sécrétion des particules de Dane	30
2.5.3.2 Formation et sécrétion des particules subvirales et des nucléocapsides non enveloppées	31
2.6 L'hépatite B.....	32

2.6.1	Epidémiologie.....	32
2.6.2	Modes de transmission	33
2.7	Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B	34
2.7.1	Infection aiguë.....	34
2.7.2	Infection chronique	35
2.7.2.1	Immunotolérance	36
2.7.2.2	Clairance virale (phase immunoactive)	36
2.7.2.3	Stade de porteur inactif HBsAg	37
2.7.2.4	Réactivation.....	37
2.7.3	Hépatite occulte	38
2.7.4	Fibrose/cirrhose	39
2.7.5	Carcinome hépatocellulaire	39
2.7.6	Vaccins contre le HBV.....	39
2.7.7	Traitements contre le HBV	40
3	Rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection par HBV et dans la pathogenèse	40
3.1	La réponse immunitaire adaptative et le HBV	41
3.1.1	La réponse à médiation cellulaire des lymphocytes T.....	42
3.1.2	Effet de l'infection chronique sur les lymphocytes T	43
3.1.3	La réponse à médiation humorale des lymphocytes B	44
3.1.4	Altération de la réponse B durant l'hépatite B chronique	45
3.2	La réponse immunitaire innée et HBV	46
3.2.1	HBV et l'immunité innée	48
3.2.2	Rôle des cytokines dans la réponse antivirale.....	49
3.2.2.1	La réponse interféron.....	49
3.2.2.2	L'interleukine-6 (IL-6)	50
3.3	Les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR).....	51
3.3.1	Les PRRs cytosoliques.....	53
3.3.1.1	Les RIG-I like récepteurs (RLR).....	53
3.3.1.2	NOD-like récepteurs (NLR)	54
3.3.1.3	Les récepteurs à ADN cytosoliques	55
3.3.2	Les PRRs transmembranaires	56
3.3.2.1	Les protéines C-type lectin-like domain	56
3.4	Les Toll-like récepteurs (TLR).....	57

3.4.1	Historique et découverte.....	57
3.4.2	Structure.....	58
3.4.3	Voies de signalisation	58
3.4.4	TLRs membranaires	60
3.4.5	TLRs intracellulaires (endosomaux).....	61
3.5	TLR9	61
3.5.1	Du gène à la protéine	62
3.5.2	Expression du TLR9 et reconnaissance des pathogènes	64
3.5.3	Activation du TLR9.....	64
3.5.4	Signalisation du TLR9.....	65
3.5.5	Ligands de TLR9	65
3.5.5.1	Ligands synthétiques du TLR9	65
3.5.5.2	Ligands naturels du TLR9 : PAMP et DAMP	66
3.5.6	Immunomodulation cellulaire induite par le TLR9.....	66
3.5.7	Régulation transcriptionnelle du TLR9	68
3.6	Interaction entre TLRs et HBV	69
3.6.1	TLR9 et HBV	71
	OBJECTIF	73
	RESULTATS.....	75
	Article: Hepatitis B virus blocks the CRE/CREB complex and prevents TLR9 transcription in human B cells.....	76
	Revue: HBV and the importance of TLR9 on B cell responses	110
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	125
	REFERENCES	133
	PUBLICATIONS ANNEXES.....	154
	Article 1: Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens	
	Article 2: TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16 (INK4a) protein expression	
	Article 3: The oncovirus Human papillomavirus 1 type 16 antagonizes IRF6 2 regulation of IL-1 β	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1: Principales découvertes et chronologie des interventions contre l'hépatite B	23
Figure 2: Structure du virion HBV (A) et des particules HBsAg (B).....	25
Figure 3: Organisation du génome de HBV.....	26
Figure 4: Le cycle répliatif de HBV.....	31
Figure 5: Répartition géographique des principaux génotypes du virus de l'hépatite B et fréquence mondiale de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B	33
Figure 6 : Cinétique de marqueurs sériques de l'Hépatite virale B aiguë.....	35
Figure 7: Histoire naturelle de l'infection HBV chronique	38
Figure 8: La réponse immunitaire adaptative anti-HBV.....	42
Figure 9 : Représentation schématique des principales classes de PRRs du système immunitaire inné.....	53
Figure 10: Transduction de signal suite à l'activation des TLRs.....	60
Figure 11: Structure cristalline des trois formes de TLR9	62
Figure 12 : Comparaison des séquences peptidiques et nucléotidiques des différents isoformes de TLR9	63
Figure 13 : Caractéristiques structurales des différentes classes de CpG-ODN.....	66
Figure 14: Activation des cellules B et pDCs exprimant le TLR9.....	67
Figure 15 : Promoteur TLR9 avec les sites de liaison pour des facteurs de transcription régulateurs localisés dans une région en amont de 800 pb	68

Figure 16: Effets répresseurs des oncovirus sur le promoteur TLR9..... 128

Figure 17: HBV et les particules HBsAg altèrent les réponses des lymphocytes B médiées par TLR9 131

Tableaux

Tableau 1 : Virus cancérogènes humains..... 21

Tableau 2: Mécanismes employés par HBV pour contrer les réponses immunitaires médiées par les TLRs 70

ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
AND	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN super-enroulé, (covalently closed circular)
ADN-RC	ADN relâché circulaire
Ag	Antigène
AIM2	Absent in melanoma 2
ALAT	Alanine Amino transferase
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen presenting cell
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNm-PC	ARNm précore
ARNpg	ARN pré-génomique
ASAT	Aspartate aminotransferase
Au	Australia antigen
BCR	B Cell Receptor
Breg	Lymphocyte B régulateur
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster of differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CpG	Cytidine-phosphate-guanosine
CRE	CREB binding protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
DAI	DNA-dependant Activator of IFN-regulatory factors
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DC	Dendritic Cell
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DR	Direct Repeat
ds	double strand
EASL	European Association for the Study of the Liver
EBV	Epstein Barr Virus
ERK	Extracellular signal- Regulated Kinase
GSHBV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
HBc	Hepatitis B core
HBe	Hepatitis B e
HBs	Hepatitis B surface
HBeAg	HBe Antigen
HBsAg	HBs Antigen
HBSP	Hepatitis B Splice Protein
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Carcinome Hépatocellulaire
HCV	Hepatitis C virus
HHV-8	Human herpes virus type 8

HIV	Human Immunodeficiency virus
HPV	Human papillomaviruses
HTLV-1	Human T lymphotropic virus 1
IFI16	Human interferon (IFN)-inducible 16
IFN	Interferon
IKK β	I κ B kinase beta
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon Stimulated Genes
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KSHV	Kaposi sarcoma-associated herpes virus
LB	Lymphocyte B
LBP	LPS-Binding Protein
LCR	Long control region
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeats
LT	Lymphocyte T
LTc	Lymphocytes T cytotoxiques
LTh	Lymphocytes T helper
MAPK	Mitogen- Activated Protein Kinase
MCPyV	Merkel cell polyomavirus
mt	Mitochondrie
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NKT	Lymphocyte T NK
NLR	NOD like receptor
NTCP	Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide
ODN	Oligodeoxynucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
pb	paire de base
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	Plasmacytoid dendritic cells
PEG	Polyéthylène Glycol
Peg IFN	Interféron pégylé
PHH	Primary Human Hepatocyte
PKA	Protein kinase A
PRR	Pattern recognition receptor
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RE	Réticulum Endoplasmique

RE	Responsive element
RLR	RIG-1 like receptor
ROS	Reactive Oxygen-Species
RSV	Rous sarcoma virus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STING	Stimulator of Interferon Genes
SVF	Serum de veau foetal
SVP	Subviral Particle
TAK1	Transforming growth factor β -activated kinase 1
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming growth factor
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLM	Translocation Motif
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TRAM	TICAM2 Toll-like receptor adaptor molecule 2
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β
UDIV	Usagers de Drogues par voie Intraveineuse
UV	Ultraviolet light
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Wooly Monkey Hepatitis B Virus

INTRODUCTION

1 Infection virale et cancer

1.1 Historique

La reconnaissance du cancer comme maladie a été constatée il y a plusieurs milliers d'années. Différentes théories sur la cause du cancer ont été favorisées au fil du temps, mais personne n'a décrit l'étiologie des infections avant le 20^{ème} siècle. L'hypothèse de la nature contagieuse d'un cancer donné était envisagée au début du 20^{ème} siècle, quand des chercheurs ont pu prouver la transmission du cancer chez les animaux en utilisant un filtrat à partir de cellules de leucémie de poulet, capable d'induire des tumeurs. Peu d'années plus tard, des expériences similaires ont identifié l'agent étiologique comme étant des virus (1–3). Par la suite, plusieurs virus animaux cancérigènes ont été identifiés, par exemple le virus du sarcome de Rous (RSV), qui a été le premier à être identifié, et le virus de la tumeur murine mammaire (4–7).

L'identification ultérieure des virus tumoraux des mammifères a attiré l'attention de la communauté scientifique sur l'identification de nouveaux virus associés à des tumeurs malignes humaines. En 1965, Tony Epstein et ses collègues ont réussi à isoler un virus de patients atteints de lymphome de Burkitt nommés Epstein Barr Virus (EBV) (8,9). Cette découverte a ouvert un nouveau chapitre dans la virologie tumorale et cinq autres virus tumoraux, à savoir le virus de l'hépatite B (HBV), le virus lymphotrophique humain 1 (HTLV-1), le virus du papillome humain (HPV), le virus de l'hépatite C (HCV) et l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), ont été identifiés avant la fin du 20^e siècle (10–16). D'autres études ont démontré l'implication de plusieurs autres virus dans le cancer comme le polyomavirus de Merkel (MCPyV) (17) et indirectement les virus de l'immunodéficience humaine (HIV) de type 1 et 2.

Ainsi, l'association entre les virus et le cancer a commencé à être bien acceptée, principalement en raison de l'identification d'autres virus impliqués dans le développement du cancer et ces virus ont été appelés virus oncogènes ou « oncovirus ». Une telle connaissance s'est révélée déterminante pour le développement des premiers vaccins contre les cancers ayant une étiologie infectieuse. En outre, les spécialistes de la tumeur ont reconnu que les virus pourraient servir de puissants outils de découverte pour révéler les mécanismes impliqués dans toutes les tumeurs malignes humaines.

1.2 Oncovirus et maladies associées

Les infections chroniques représentent près de 20% des causes de cancer dans le monde (18). Cette fraction est plus élevée dans les pays moins développés, ce qui reflète la prévalence plus élevée des principales infections à virus oncogènes dans ces zones (18). Les virus sont considérés comme l'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement du cancer chez l'homme. Parmi les agents infectieux qui ont été classés comme cancérigènes pour l'homme, on distingue principalement le HBV, le HCV, le HPV, l'EBV, le HTLV-1 et le KSHV (également

connu sous le nom de virus de l'herpès humain de type 8, HHV-8). Le tableau 1 représente chaque agent infectieux viral avec son (ses) type(s) de cancer associé(s).

Tableau 1 : Virus cancérogènes humains (adapté de (19))

Virus	Génome	Cancers décrits	Décrit en
Epstein-Barr virus (EBV; aussi connu sous: human herpesvirus 4 (HHV4))	Herpesvirus à ADN double brin	La plupart des lymphomes de Burkitt et des cancers du nasopharynx, la plupart des troubles lymphoprolifératifs, quelques maladies de Hodgkin, quelques lymphomes non Hodgkinien and quelques lymphomes gastrointestinaux	1964
Virus de l'hépatite B (HBV)	Hepadénovirus à ADN simple et double brin	Quelques carcinomes hépatocellulaires	1965
Human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I)	Brin positif, rétrovirus à ARN simple brin	Leucémie adulte des cellules T	1980
High-risk human papillomavirus (HPV) 16 et HPV 18 (d'autres types α -HPV sont aussi carcinogènes)	Papillomavirus à ADN double brin	La plupart des cancers du col de l'utérus, cancers du pénis et quelques cancers anogénitaux et les cancers de la tête et du cou	1983-1984
Virus de l'hépatite C (HCV)	Brin positif, flavivirus à ARN simple brin	Quelques carcinomes hépatocellulaires et quelques lymphomes	1989
L'herpesvirus du sarcome de Kaposi (KSHV; aussi connu sous : human herpesvirus 8 (HHV8))	Herpesvirus à ADN double brin	Sarcome de Kaposi, lymphomes à épanchement primaire et quelques maladies de Castleman multicentriques	1994
Merkel cell polyomavirus (MCV)	Polyomavirus à ADN double brin	La plupart des carcinomes des cellules de Merkel	2008

Les agents infectieux peuvent être classés comme carcinogènes directs, tels que plusieurs types de la famille HPV, HTLV-1, EBV et KSHV, ou des agents carcinogènes indirects en provoquant une inflammation chronique (HBV, HCV..). Le premier groupe de virus exprime des oncogènes (gènes impliqués dans le développement d'un cancer) dont le produits jouent un rôle direct dans la transformation des cellules infectées, ce qui altère la régulation de voies cellulaires clés. Concernant le deuxième groupe de virus, une infection chronique suivie d'une inflammation chronique conduira à la production de chimiokines et de cytokines sécrétées par des cellules infectées et/ou des cellules inflammatoires. Cet événement conduira également à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), à la dérégulation du système immunitaire et à la promotion de l'angiogenèse, ce qui est essentiel pour la survie des tumeurs. Le HBV et le HCV se sont révélés carcinogènes principalement par leur induction d'inflammation chronique du foie et sont impliqués dans le développement de carcinome hépatocellulaire (20,21). Une meilleure compréhension du rôle des agents infectieux dans l'étiologie du cancer et l'application de méthodes de santé publique existantes pour la prévention des infections, telles que la vaccination ou les traitements antimicrobiens, est un élément essentiel pour le politique de santé publique et pourrait avoir un impact sur la prévalence des cancers dans le monde.

2 Virus de l'hépatite B (HBV)

2.1 Historique et découverte du virus

2.1.1 Découverte du virus de l'hépatite B

Pendant des siècles, la connaissance des hépatites est restée très limitée et la compréhension progressive de ces maladies et de leurs origines, ne s'est faite qu'au prix de nombreuses épidémies.

Hippocrate (460-375 avant J.C.), philosophe et médecin grec, a été le premier à recenser les caractéristiques cliniques d'une épidémie de jaunisse, en particulier des formes fulminantes entraînant le décès de patients en seulement 11 jours. Bien que les Grecs et les Romains aient continué à rapporter des épidémies de jaunisse, leurs descriptions sont restées imprécises, confondant souvent les symptômes avec ceux d'autres maladies comme le paludisme.

En 1885, Lührman et Jehn observèrent des épidémies de « jaunisse » au sein de populations ayant récemment été immunisées contre la variole à l'aide d'un vaccin consistant en une préparation de lymphes humaines (22). A partir de ces observations, Lührman suspecta le vaccin comme source de la maladie, observant pour la première fois des « hépatites sériques », aujourd'hui connues sous le nom d'hépatites B et C (23). En 1908, Mc Donald émit l'hypothèse de la nature infectieuse virale des « hépatites sériques » ; un virus étant considéré à l'époque comme un agent subcellulaire infectieux pouvant être filtré. Des cas similaires furent rapportés jusque dans les années 40, renforçant l'idée d'une transmission des « hépatites sériques » provoquée par des aiguilles contaminées par du sang, l'administration de vaccins dérivés de tissus humains et enfin l'administration de produits sanguins. Durant la seconde guerre mondiale, la propagation des hépatites virales chez de nombreux sujets transfusés motiva la réalisation d'études aux Etats-Unis et en Angleterre, basées sur la transmission d'hépatites infectieuses à des sujets volontaires (24–26). Ainsi, en 1947, MacCallum proposa une distinction claire entre les infections aiguës transmises par des aliments souillés par le virus (transmission oro fécale), ou « hépatites A », et les hépatites sériques, ou « hépatites B », dont le temps d'incubation est de plusieurs mois et qui conduisent parfois à la chronicité (25,27).

C'est en 1963, alors qu'ils étudiaient le polymorphisme des lipoprotéines, Blumberg et son équipe ont observé une réaction inhabituelle entre le sérum de patients multi transfusés et celui d'un patient australien. Par la suite, ils ont isolé et identifié l'antigène responsable appelé « Australia antigen » (Au), connu aujourd'hui sous le nom d'antigène de surface du HBV (antigène HBs) (28,29). Plusieurs études ont ensuite permis de corréler la présence de cet antigène avec la survenue d'une hépatite (30–34), et ce dernier a été identifié comme étant un constituant du virus responsable de la survenue des hépatites sériques de type B, appelé dès les années 1970 virus de l'hépatite B. Les travaux entrepris par la suite ont décrit cet antigène HBsAg, protéine de surface du virus ainsi que d'autres protéines de surface, et ont également caractérisé le virus entier. Les premières images du virus de l'hépatite B ont été publiées par l'équipe de Dane (35,36). Trois types de particules virales sont identifiés : de grosses particules de 42 nanomètres, correspondant au virus complet (ces particules sont connues depuis sous le nom de particule de Dane), de petites sphères et des bâtonnets, de 20 nanomètres de diamètre environ. Depuis les années 1970, les découvertes concernant ce virus se sont enchaînées, avec notamment l'identification d'autres constituants du virus, comme l'antigène de capsid (HBc)

(37), l'antigène e (HBe) (38,39), l'ADN polymérase (40), l'ADN viral (41) et enfin la structure de l'ADN relaxé circulaire (ADNrc) (42). La première séquence complète du génome du HBV a été publiée en 1979 (43).

2.1.2 Développement du vaccin et des premiers traitements contre l'hépatite B

Grâce à ces découvertes le premier vaccin testé chez l'homme et efficace contre le HBV fut mis au point en 1976 par l'équipe de Philippe Maupas au sein du service d'hémodialyse du CHU de Tours. Ces derniers ont testé son efficacité après s'être eux même injecté la préparation vaccinale. Il fut développé à grande échelle par l'institut Pasteur et commercialisé sous le nom « Hevac B » en 1981 (44,45). La première génération de vaccins a été obtenue à partir de plasmas riches en HBsAg. Grâce au développement des techniques de clonage, les vaccins obtenus par recombinaison génétique firent ensuite leur apparition. Le premier vaccin basé sur l'utilisation de protéines recombinantes de l'enveloppe virale, « Engerix B », fut développé en 1985 et mis sur le marché en 1989.

A partir de 1976, les traitements à base d'interféron furent utilisés chez les patients infectés chroniquement permettant ainsi de réduire la réplication du HBV (46–48). Suite à la découverte de l'activité reverse transcriptase, ou transcriptase inverse, de la polymérase virale par Summers et al. en 1982, les inhibiteurs de polymérase virale firent leur apparition (49). Ces deux catégories d'antiviraux, interféron et analogues nucléos(t)idiques, sont toujours utilisés à ce jour dans la prise en charge thérapeutique des malades atteints d'une hépatite B chronique (50).

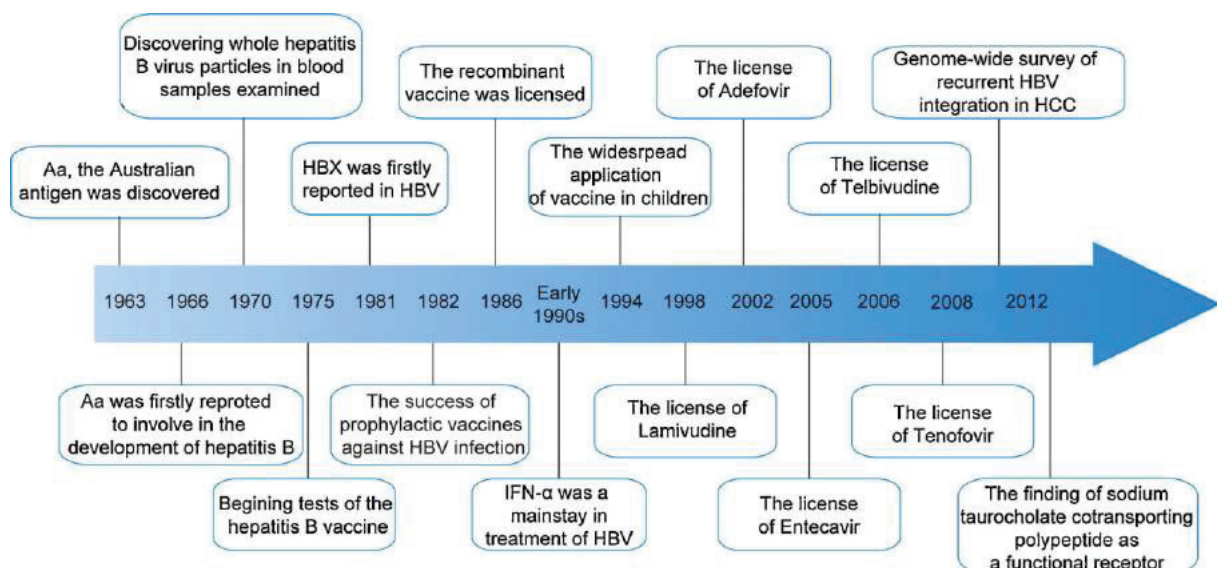


Figure 1: Principales découvertes et chronologie des interventions contre l'hépatite B (51)

2.2 Classification

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des Hepadnaviridae ou virus à ADN qui possèdent un certain nombre de caractéristiques communes concernant :

- leur structure : les particules virales sont sphériques, de petite taille et enveloppées ; les particules subvirales, correspondant à des enveloppes vides, sont produites en grande quantité.
- Leur génome : il est constitué d'une molécule d'ADN « relaxée » circulaire partiellement bicaténaire dont la taille et l'organisation génétique sont peu variables.
- Le mode de répllication de leur génome : il implique une étape de transcription inverse à partir de leur ARN viral.
- Leur tropisme essentiellement hépatocytaire : les hepadnavirus sont considérés comme des virus hépatotropes bien que de l'ADN viral soit aussi retrouvé dans plusieurs autres tissus (52–55).
- Leur spécificité d'hôte : le HBV humain n'infecte que l'homme et les primates.

Les Hepadnaviridae regroupent deux genres : les Orthohepadnavirus et les Avihepadnavirus. Ces derniers diffèrent du point de vue de la structure de leur génome ainsi que de la pathogénèse qu'ils induisent. Le genre Orthohepadnavirus comprend les virus infectant les mammifères tels que le virus de l'hépatite B humain ainsi que les virus de la marmotte (WHV), de l'écureuil (GSHBV) ou les virus des singes comme celui du chimpanzé ChHBV ou du singe laineux WMHV. Le WMHV est génétiquement proche du HBV avec lequel il présente une identité de 60 % (56). Le genre Avihepadnavirus regroupe les virus des oiseaux comme les virus de l'hépatite B du canard de Pékin (DHBV), celui du héron (HHVB) ou de l'oie des neiges (Ross's Goose Hepatitis B virus). Les membres viraux appartenant à ce genre diffèrent des virus de mammifères par l'absence du gène X et par le fait de posséder seulement deux protéines d'enveloppe (la grande protéine preS/S et la petite protéine S).

2.3 Structure du HBV

2.3.1 Caractéristiques structurales du virus

Trois types de particules virales de morphologie distincte sont observés en microscopie électronique dans le sérum de patients infectés par le HBV : les particules de Dane ou particules virales complètes et les particules dites subvirales (SVPs) correspondant à des sphères et des bâtonnets (36).

2.3.2 La particule de Dane

Le virion infectieux, appelé particule de Dane, du nom de son découvreur (36) est une petite particule sphérique de 45 nm de diamètre. Elle circule dans le sang à une concentration pouvant atteindre jusqu'à 10^{10} particules/mL chez certains patients. Le génome de ces particules est constitué d'une molécule d'ADN circulaire partiellement bicaténaire d'environ 3200 nucléotides sur laquelle est fixée une polymérase virale, ainsi que des protéines d'origine cellulaire dont une sérine/thréonine kinase phosphorylant la protéine HBc (57,58).

Le génome est entouré d'une capsid protéique icosaédrique, appelée « core », d'environ 30 nm de diamètre. Elle est formée par l'auto-assemblage d'environ 200 antigènes HBc (Ag HBc) ou protéines C (21 kDa) selon une symétrie icosaédrique T3 ou T4 (58,59). L'antigène HBc est une protéine de 183 à 185 aa en fonction du génotype viral, relativement conservée parmi les différents génotypes viraux (58). La nucléocapsid virale est enveloppée par une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines de surface virales. L'exacte composition en lipides de l'enveloppe est inconnue, mais la présence de cholestérol semble indispensable au processus d'infection, lors des étapes suivant la fixation des virus à la surface des cellules (60). L'enveloppe lipoprotéique est acquise lors du bourgeonnement à partir du réticulum endoplasmique cellulaire. Les glycoprotéines de taille variable sont les suivantes : la protéine L (« Large »), la protéine M (« Middle ») et la protéine S (« Small »). Ces protéines L, M et S sont présentes dans l'enveloppe du virus selon un ratio 1:1:4 (61).

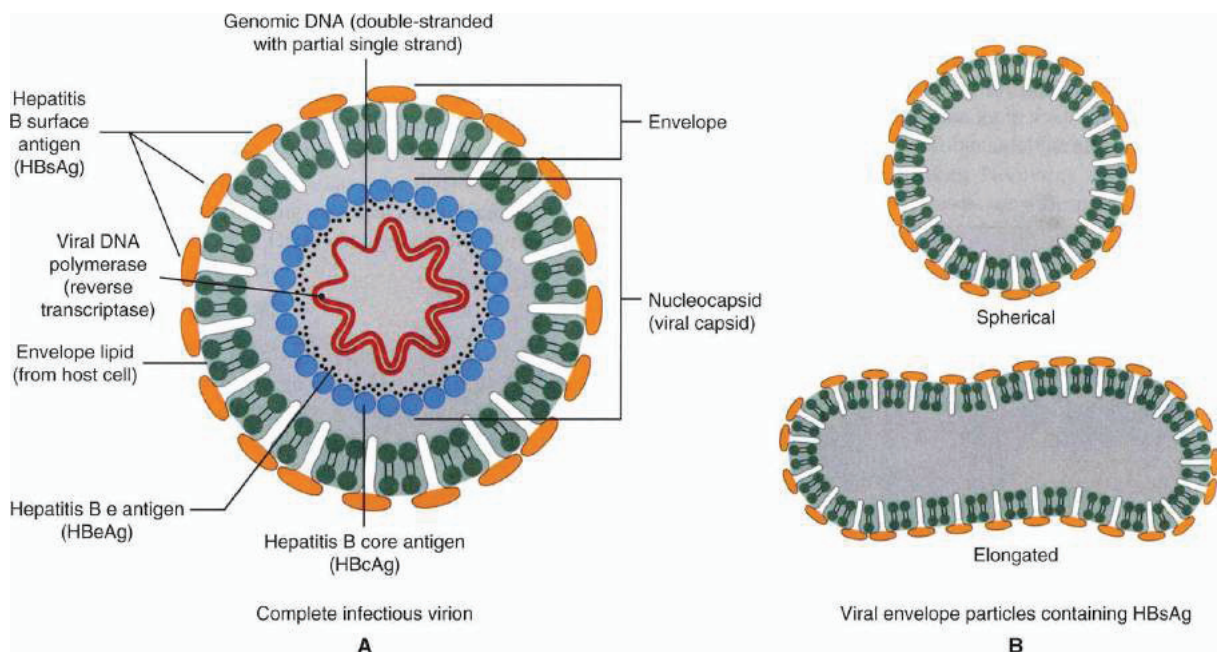


Figure 2: Structure du virion HBV (A) et des particules HBsAg (B) (de Nester EW: Microbiology: A Human Perspective, 6th edition, 2009). La particule de 42 nm est la "particule de Dane" ou le virus de l'hépatite B (A). Les particules de 22 nm sont les formes filamenteuses et circulaires de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) (B).

Les protéines M et L sont présentes en quantités équivalentes sur la particule de Dane et représentent environ 30 % des protéines d'enveloppe, la protéine S étant majoritaire (58,59). Ces trois protéines partagent une région commune correspondant à l'antigène HBs.

2.3.3 Génome du virus

Le génome du HBV est constitué d'une petite molécule d'ADN d'environ 3200 nucléotides (42,62). L'ADN viral est partiellement bicaténaire, sur les $\frac{3}{4}$ de sa circonférence, adoptant ainsi une conformation circulaire relâchée (ADNrc). Le brin

long ou brin codant, de polarité négative et de taille constante, comporte quatre cadres de lecture ou « open reading frame » (ORF) disposés selon la même orientation transcriptionnelle. Le brin court non codant, de polarité positive, possède une extrémité 5' fixe comportant une courte séquence d'ARN et une extrémité 3' variable (43). L'ADN est maintenu sous forme circulaire grâce à l'appariement des extrémités 5' des deux brins au niveau d'une région longue d'environ 200 nucléotides dite « région cohésive » (63). Cette région est encadrée par deux séquences répétées, « Direct Repeat » (DR) de 11 nucléotides, DR1 (à l'extrémité 5' du brin long) et DR2 (à l'extrémité du brin court) jouant un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse de chacun des deux brins d'ADN. La polymérase virale est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-), par un lien phospho-tyrosine (64,65), alors que l'extrémité 5' du brin (+) comporte un oligo-ribonucléotide servant d'amorce lors de la réplication virale (66,67).

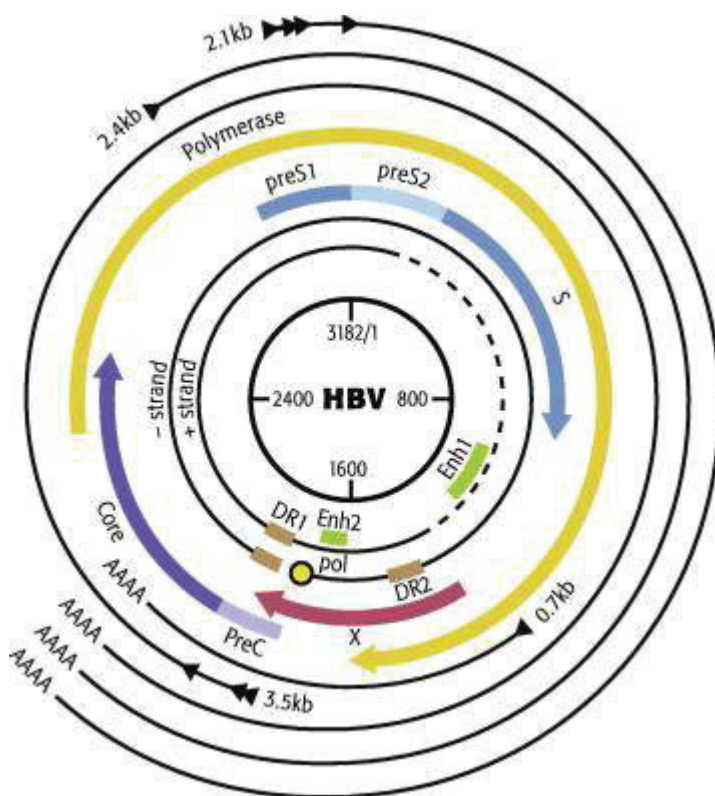


Figure 3: Organisation du génome de HBV (68). Le génome se compose d'une molécule d'ADN circulaire, partiellement double brin, d'une longueur de 3,2 kb. Au cours de la réplication virale, le génome partiellement bicaténaire, également appelé ADN relâché circulaire (RC), est transformé en ADN circulaire (CCC) super-enroulé. Ce cccDNA est un mini-chromosome qui sert de matrice pour la transcription virale, générant cinq mRNA majeurs de taille 3,5-, 2,4-, 2,1- et 0,7-kb. Un ARNm de 3,5 kb appelé ARNm pré-C sert de matrice pour la traduction de HBeAg (protéine précore), et un ARNm légèrement plus court appelé pgRNA sert de matrice pour les protéines de core et la polymérase, ainsi que l'ARN pré-génomique utilisé comme matrice lors de la réplication virale. Le transcrite de 2,4 kb (ARNm pré-S1) est utilisé dans la traduction de l'antigène de surface (L); les transcrits de 2,1 kb (ARNm pré-S2) sont utilisés pour produire les antigènes de surface M et S; et le transcrite de 0,7 kb est utilisé dans la production de la protéine X.

Le génome du HBV est le plus petit parmi les génomes des virus humains à ADN. Malgré sa petite taille, son organisation génétique compacte lui permet de coder sept protéines différentes. Le génome est entièrement codant et tous les signaux de régulation (quatre promoteurs, deux enhanceurs, activateurs et sites d'initiation de la transcription, le signal de poly-adénylation) sont intégrés dans les régions codantes (69). Tous les gènes du HBV ont un ou plusieurs promoteurs régulant leur activité et ces promoteurs sont eux même régulés par un ou les deux éléments enhanceurs viraux En1 et En2 situés en amont du promoteur core (59). Quatre cadres de lecture chevauchant sont ainsi définis sur le brin négatif. L'ORF préC/C comporte deux codons initiateurs fonctionnels et code :

- la protéine précore (ou p25), précurseur de l'antigène HBe (ou p17) sécrété dans le sérum. L'antigène HBe, protéine non structurale, semble impliqué dans les phénomènes de persistance virale et d'évasion à l'immunité de l'hôte.
- la protéine core (183-195 aa), élément structural de base de la capside, portant l'antigène HBc. L'ORF P s'étend sur 80 % du génome et chevauche au moins partiellement les autres cadres de lecture. Il code une protéine multifonctionnelle, la polymérase virale, possédant plusieurs activités impliquées dans la réplication virale (69). L'ORF X code une petite protéine (145-154 aa) régulatrice non structurale : la protéine X. Elle est conservée chez tous les hepadnavirus de mammifères (69,70). Cette protéine, essentielle pour la réplication virale, est un transactivateur transcriptionnel capable d'activer un grand nombre de promoteurs viraux et cellulaires (69). Son interaction avec des facteurs de transcription cellulaires permet d'augmenter l'expression des gènes du HBV lors de la réplication. Elle semble intervenir également dans la régulation du cycle cellulaire, les voies de dégradation des protéines, les voies de signalisation cellulaires pro-apoptotiques et la stabilité génétique. Un rôle dans l'oncogenèse lui est donc aussi attribué (69,70). L'ORF préS/S code les protéines d'enveloppe virales S, M et L. Cette région comprend trois gènes préS1, préS2 et S et trois codons initiateurs dans une même phase ouverte de lecture (58). Deux transcrits ARNm, PréS1 et PréS2/S, sont générés et la transcription initiée au niveau d'un promoteur en amont de l'ORF pour l'ARNm préS1 et au niveau d'un promoteur interne en amont du second site d'initiation de la traduction pour l'ARNm préS2/S (58). La traduction de l'ARNm le plus long aboutit à la synthèse de la protéine L (389 à 400 aa) et celle du transcrit le plus court à la protéine M (281 aa) ou à la protéine S (226 aa). La protéine S est codée par le gène S, la protéine M par les gènes préS2 et S et la protéine L par les gènes préS1, préS2 et S. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes d'attachement/entrée cellulaire et dans la réponse immunitaire. La protéine HBSP (hepatitis B splice protein) est une protéine de 93 aa codée par un ARN épissé à partir du codon d'initiation de la polymérase. Elle inclut les 46 premiers aa de la polymérase, 47 aa d'une nouvelle séquence due à un changement de cadre de lecture généré par l'épissage. Cette protéine aurait un rôle dans la persistance de l'infection virale (69).

2.3.4 Les particules subvirales

Les infections à hepadnavirus sont caractérisées par la production en large excès de particules subvirales non infectieuses (SVP). Les particules vides, dépourvues de génome et de nucléocapside, ne contiennent que les protéines de surface du HBV. L'auto-assemblage de ces particules résulte de l'accumulation des protéines d'enveloppe virale produites en excès. Elles peuvent atteindre une concentration de 10^{12} particules/mL et être jusqu'à 1000 fois plus nombreuses que les particules virales infectieuses chez un individu infecté (58,71). Ces SVP peuvent être de forme

sphérique de 22 nm de diamètre (billes ou sphères) ou filamenteuse (bâtonnets). En effet, les particules sphériques sont principalement constituées de protéines S et M, alors que la protéine L n'est présente que dans les particules filamenteuses et les virions (61). Ces SVP s'auto assemblent dans un compartiment post-RE et pré-Golgi (71). Les formes sphériques sont majoritaires. Les formes filamenteuses, moins représentées, peuvent atteindre une longueur de plusieurs centaines de nanomètres (58,71). Leur rôle exact dans le cycle de réplication du virus n'est pas connu. Elles pourraient faciliter la dissémination du virus et sa persistance dans l'organisme en réduisant le pool d'anticorps neutralisants, en jouant un rôle de leurre pour l'immunité humorale. En effet, même si elles n'ont pas de potentiel infectieux, ces particules suscitent une réponse antigénique importante (72). Ce sont ces protéines HBs en excès qui sont détectées dans le sérum des patients et qui jouent un rôle majeur en interagissant avec les cellules du système immunitaire et en favorisant l'entrée des virions dans la cellule cible (73).

2.4 Les protéines virales

2.4.1 Protéines d'enveloppe

Les trois protéines de l'enveloppe virale (S ou HBsAg, M et L) sont synthétisées à partir de deux ARNm différents issus du même ORF. Le plus grand ARNm de 2,4 kb code pour la grande protéine d'enveloppe L. L'autre ARNm de 2,1 kb code pour les protéines M ou S selon le site d'initiation de la traduction utilisé. Le site d'initiation de l'ARNm codant pour la protéine HBsAg étant plus fréquemment reconnu par les ribosomes, quatre fois plus d'HBsAg sont synthétisées par rapport à la protéine M (74). A noter que l'HBsAg est la base des vaccins anti-HBV recombinants actuels.

2.4.2 La protéine de capsid : core (AgHBc)

La protéine core, encore appelée protéine de capsid, est une protéine de 21 kDa qui forme la capsid icosaédrique virale du HBV. Cette protéine est composée de deux domaines séparés par un linker : le domaine « core » des acides aminés 1 à 140 et le domaine « protamine » (résidus 150-183). Le domaine « core » à l'extrémité amino-terminale (N ter) permet l'auto-assemblage de la protéine core en capsid (75). Il contient aussi deux épitopes prédictifs pour la réponse immunitaire dont la boucle immunodominante comprenant les résidus 78 à 83 (76). En effet, l'AgHBc est reconnu par le système immunitaire de l'hôte lorsqu'il est exprimé à la surface des hépatocytes ce qui induit une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T contre les cellules infectées (77).

2.4.3 La protéine précore ou antigène HBe (HBeAg)

La protéine HBe est un peptide circulant dérivé de la protéine core. Il est traduit à partir de l'ARNm de 3,5 kb. Le codon initiateur de la traduction utilisé est situé 87 nucléotides en amont de celui utilisé pour la synthèse de la protéine HBc. Sa présence chez tous les Hepadnaviridae suggère un rôle prépondérant de cette protéine pour le virus. En effet, l'antigène HBe est un tolérogène qui, du fait de sa ressemblance avec la protéine de capsid, atténue la réponse immunitaire de l'hôte

contre HBc en se fixant sur les récepteurs CMH de classe I des lymphocytes T (78). HBe contribue donc à la persistance du HBV *in vivo*. En revanche, cette protéine ne semble pas essentielle à la réplication virale (79).

2.4.4 La polymérase virale

La polymérase (850 aa) couvre près de 80% du génome des hepadnavirus. Le gène Pol est le plus grand gène du HBV, il chevauche entièrement l'ORF S mais aussi une partie des ORFs C et X (69). La polymérase contient quatre domaines possédant différentes fonctions enzymatiques. Ces différents domaines lui permettent d'assurer plusieurs rôles importants impliqués dans la réplication virale :

- Fonction primase permettant l'initiation de la transcription inverse en synthétisant une amorce de 3 à 4 nucléotides (80,81).
- Activité polymérase ARN dépendante permettant la rétro-transcription de l'ARNpg en ADN de polarité négative (82).
- Activité polymérase ADN dépendante qui génère le brin de polarité positive (83).
- Fonction RNase H : destruction de l'ARNpg hybridé à l'ADN de polarité négative après la rétrotranscription (70).

2.4.5 La protéine X

La protéine HBx est une protéine non structurale. Cependant, elle est essentielle pour établir et maintenir l'infection virale *in vitro* (84) et *in vivo* (85) et a été identifiée comme se liant à un complexe smc5/6 qui agit comme facteur de restriction du HBV (86). Il s'avère que la protéine HBx joue un rôle d'activateur transcriptionnel de l'ADNccc en recrutant des histones acétylases aboutissant à une augmentation de la réplication (87). La protéine HBx possède de nombreuses activités. *In vitro*, cette protéine est un transactivateur transcriptionnel de nombreux gènes cellulaires et viraux. Ainsi, cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies cellulaires comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN (88).

2.5 Cycle de réplication

Le HBV est un virus hépatotrope. Bien que de l'ADN viral ait été retrouvé dans les cellules épithéliales des canaux biliaires, les cellules du système lymphoïde, les cellules mononuclées du sang périphérique (monocytes, lymphocytes B et T), au niveau du pancréas et du rein, la réplication a lieu exclusivement dans l'hépatocyte (70). Cependant, ces « réservoirs extrahépatiques » de virus, persistant à long terme, pourraient être la source de réactivation virale (89,90).

En fait, un lymphotropisme du virus a été décrit. Il a été démontré que l'ADN du virus est détectable dans les PBMCs de la majorité des patients atteints d'une infection chronique avec le HBV,). Des études sur des modèles animaux ont encore confirmé que des intermédiaires répliatifs d'ADN viral, ainsi que des transcrits viraux, peuvent être détectés dans des PBMC sous certaines conditions (91–94).

La principale originalité du cycle de réplication de ce virus à ADN est le recours à une étape de transcription inverse à partir d'un ARN pré-génomique (ARNpg) pour la réplication de son génome. Les études menées sur des virus animaux proches du HBV, comme ceux du canard (DHBV) et de la marmotte (WHV) ont permis d'acquérir

les premières connaissances sur le cycle viral, enrichies par la suite des données acquises grâce notamment à l'utilisation de la lignée cellulaire HepaRG (95,96).

2.5.1 Entrée virale

En 2012, Yan et al. identifiaient le « Sodium Taurochlorate Cotransporting Polypeptide » ou NTCP comme l'un des récepteurs spécifiques du HBV à la surface des hépatocytes. Cette protéine transmembranaire présente sur la partie basolatérale des hépatocytes est en conditions physiologiques impliquée dans le transport des sels biliaires (97). De plus, l'extinction de cette protéine inhibe l'infection par le HBV et son expression suffit à rendre des cellules permissives à ce dernier (97).

Suite à l'attachement du virus, par la partie preS1 des protéines d'enveloppe, sur son récepteur, le virus entre dans la cellule permissive par une voie dépendante de l'endocytose médiée par la clathrine (98). Un clivage des protéines d'enveloppe aurait lieu à l'intérieur de l'endosome permettant de démasquer des motifs peptidiques nommés TLM (translocation motif) situé en région C-terminale de la région préS2. L'exposition des TLM permet ensuite la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et donc le transfert de la nucléocapside vers le cytoplasme (99). Les nucléocapsides libérées dans le cytoplasme vont emprunter le réseau de microtubules et rejoindre le centre organisateur des microtubules (MOCT) à proximité du noyau et des pores nucléaires. Elles vont ensuite se « désassembler » en dimères de protéine C au sein des pores nucléaires et libérer l'ADN viral, sous forme d'ADN relâché circulaire (ADNrc), dans le noyau cellulaire (100).

2.5.2 Expression du génome et synthèse des protéines virales

Dans les 24 heures suivant l'infection, l'ADNrc est converti en ADNccc (101). L'ADNccc ainsi formé sert de matrice pour la transcription de cinq ARN messagers viraux par l'ARN polymérase II cellulaire. L'ARN pré-génomique sert d'ARN messager pour la synthèse de la protéine core et de la polymérase. En plus de son rôle d'ARNm pour la synthèse de la protéine core et de la polymérase virale, l'ARNpg est aussi la matrice nucléotidique. Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme puis les protéines de l'enveloppe subissent une maturation (58) dans l'appareil de Golgi.

2.5.3 Sécrétion des virions et des particules virales

Après formation, les nucléocapsides virales ont deux devenir : soit elles sont enveloppées puis sécrétées sous forme de virions, soit elles sont recyclées dans le noyau pour former le pool d'ADNccc. Deux autres types de particules sont sécrétés : les particules subvirales composées uniquement de protéines d'enveloppe et les capsides non enveloppées.

2.5.3.1 Formation et sécrétion des particules de Dane

L'initiation de la formation des virions nécessite l'interaction, directe ou non, entre les protéines d'enveloppe et la nucléocapside. Seules les capsides matures, c'est-à-dire contenant un ADN double brin, sont enveloppées. En effet, les nucléocapsides ne sont pas enveloppées s'il n'y a pas de maturation du génome (102). Grâce à ce contrôle de la maturation du génome avant enveloppement, les particules sécrétées sont toutes infectieuses. Une fois la vérification de la maturité du génome effectuée,

les capsides sont dirigées vers les corps multivésiculaires ou MVB pour être enveloppées. Il semblerait que la sécrétion des virions se fasse par la voie exosomale mais le mécanisme reste inconnu (71,103).

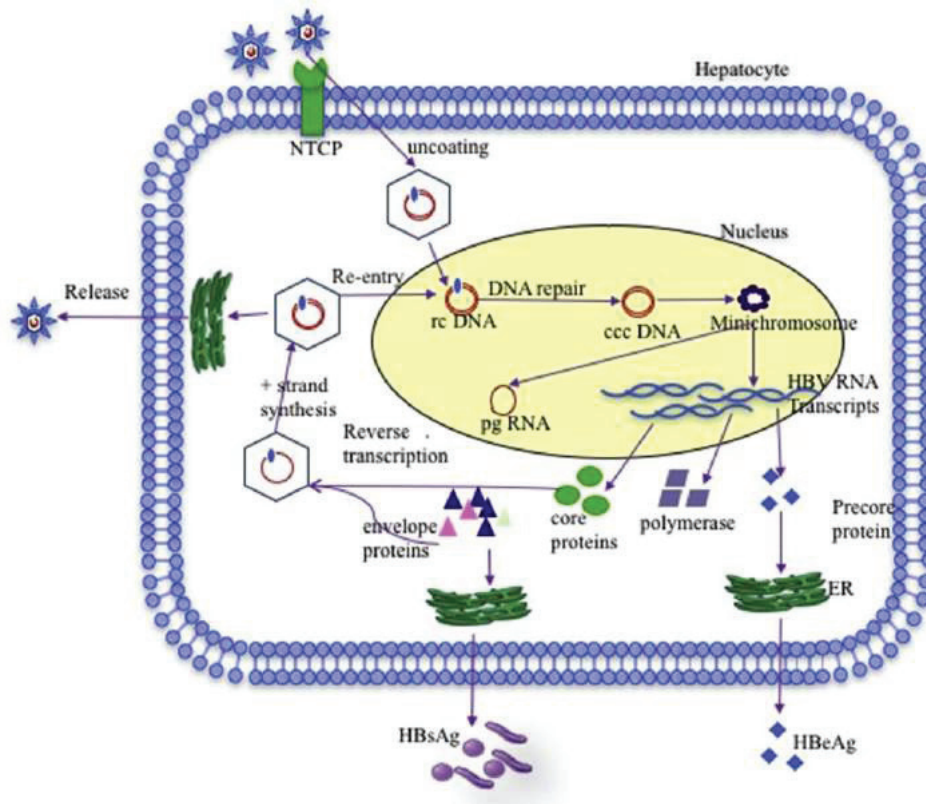


Figure 4: Le cycle répliatif de HBV (104). Le VHB entre dans l'hépatocyte via le récepteur sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). La nucléocapside est exposée et migre vers le noyau où elle délivre le génome (ADN-RC). L'ADN-RC est réparé pour former un cccDNA bicaténaire et un mini chromosome à partir duquel les protéines virales suivantes sont transcrites: antigène de core (HBcAg) et précore (HBeAg), antigènes de surface S, M et L, protéine X et polymérase. Après le passage par le réticulum endoplasmique (ER), HBeAg et HBsAg sont sécrétés. De nouveaux virions sont libérés et l'ARN génomique est recyclé dans le noyau pour une répliation virale continue.

2.5.3.2 Formation et sécrétion des particules subvirales et des nucléocapsides non enveloppées

La protéine HBs s'auto-assemble en filaments dans l'espace périnucléaire qui fait partie du réticulum endoplasmique. Des structures se forment autour de ces filaments et vont fusionner avec l'appareil de Golgi. Les filaments sont ensuite scindés pour former des sphères qui sont sécrétées de manière indépendante des MVB et de la sécrétion des virions (71,103). L'efficacité de la production de virions ne dépend pas de la quantité de particules subvirales produites. Les nucléocapsides se fixent à la membrane plasmique et sortent de façon non lytique (105).

2.6 L'hépatite B

Les infections par HBV, malgré la disponibilité d'un vaccin efficace et bien toléré depuis 1986, reste un problème de santé publique majeur. Plus de 2 milliards d'individus dans le monde présentent des marqueurs sérologiques évoquant une infection ancienne ou en cours par le virus de l'hépatite B, soit environ 30 % de la population mondiale. On estime que 257 millions de personnes (données de l'OMS, mises à jour en Avril 2017), soit 5 % de la population mondiale, présentent une infection chronique et risquent de développer des pathologies hépatiques liées au virus (essentiellement cirrhose et carcinome hépatocellulaire). En 2015, 887 000 personnes sont décédées des suites d'une infection par l'hépatite B notamment de cirrhose ou de cancer du foie. La majorité des porteurs chroniques du virus se trouvent en Asie (78 %) et en Afrique (16 %) (106).

2.6.1 Epidémiologie

Il existe des zones de prévalence variable en terme géographique de l'infection par le HBV. On peut ainsi définir trois zones :

- Des zones de faible prévalence (inférieure à 2 %) comme l'Amérique du Nord, l'Europe du Nord et de l'Ouest, l'Australie et une partie de l'Amérique du Sud.
- Des zones de prévalence intermédiaire (entre 2 % et 7 %) comme l'Asie du Sud-Ouest, le Maghreb, le Japon, la Russie, l'Europe du Sud et de l'Est, le Nord de l'Alaska ainsi que les zones autour du bassin amazonien.
- Des pays où la prévalence de l'infection du HBV est supérieure à 8 % tels que le continent africain, l'Asie du Sud, les Philippines et l'intérieur du bassin amazonien. Dans ces pays, plus de la moitié des individus est infectée à un moment donné de leur vie.

Globalement, environ 45 % de la population mondiale vit dans des zones de haute endémicité (106,107). Le mode de transmission, l'âge au moment de la contamination et les manifestations cliniques diffèrent beaucoup selon la prévalence de l'infection dans une région donnée (106).

* Variabilité du virus de l'hépatite B :

La classification du HBV est basée sur la comparaison de séquences nucléotidiques des souches du HBV. Cette classification prend en compte l'intégralité du génome du HBV et compte actuellement 8 génotypes non recombinants, notés A à J (108,109). La différence entre deux génotypes du HBV est définie par une variation de plus de 8 % de leur séquence nucléotidique entière et d'au moins 4,1 % dans le gène de surface (préS1, préS2, S).

Les génotypes du HBV sont mondialement répartis avec des régions à plus forte prévalence. Le génotype A est majoritairement présent en Amérique et en Europe du Nord ; le génotype B en Asie du Sud-Est et en Amérique du Nord ; le génotype C en Amérique du Nord, en Australie et en Asie du Sud-Est ; le génotype D en Australie, en Russie et en Europe du Nord ; le génotype E en Afrique ; le génotype F en Amérique du Sud ; le génotype G en Europe du Nord et en Amérique du Nord et le génotype H en Amérique du Sud (110).

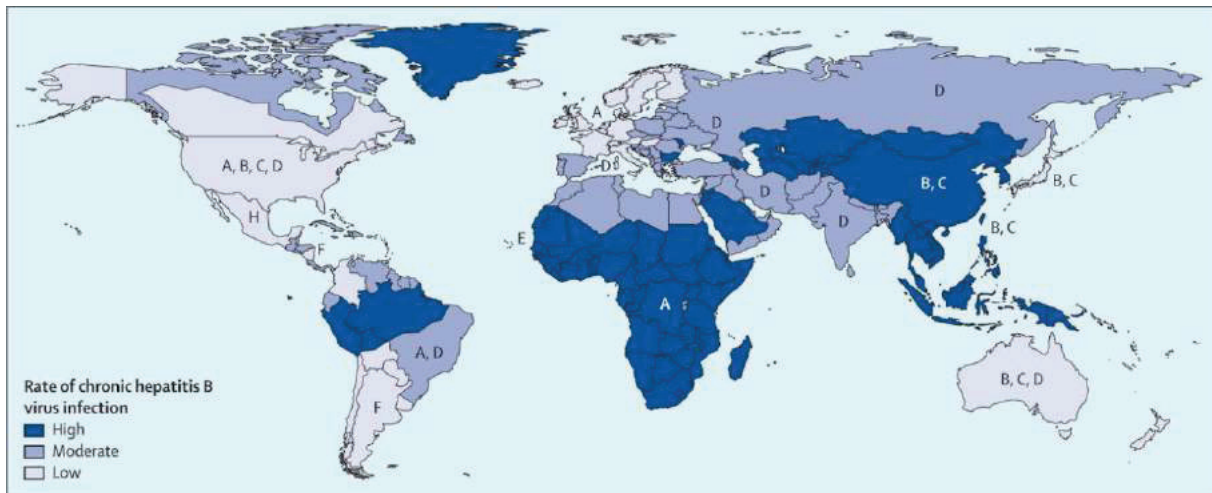


Figure 5: Répartition géographique des principaux génotypes du virus de l'hépatite B et fréquence mondiale de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (111).

2.6.2 Modes de transmission

Le virus de l'hépatite B est présent dans différents fluides corporels de patients infectés : le sang (jusqu'à 10^9 virions/mL), le sperme et les sécrétions vaginales (10^6 à 10^7 virions/mL), la salive (10^5 à 10^7 virions/mL) et le lait maternel. Le HBV est très résistant dans le milieu extérieur (il reste infectieux pendant plus de sept jours dans le milieu extérieur à 30°C). Il est 10 fois plus contaminant que le virus de l'hépatite C (HCV) et 100 fois plus que le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). Le virus de l'hépatite B peut survivre en dehors du corps pendant au moins 7 jours. Au cours de ce laps de temps, le virus est encore susceptible de provoquer une infection s'il pénètre dans l'organisme d'une personne non protégée par la vaccination. La période d'incubation de l'hépatite B est de 75 jours en moyenne, mais peut varier de 30 à 180 jours. Le virus est détectable 30 à 60 jours après l'infection et peut persister dans l'organisme pour donner une hépatite B chronique (112). La présence du HBV dans ces différents liquides biologiques reflète les différents modes de transmission de l'infection :

- Contamination par voie parentérale survenant chez les usagers de drogues par voie intraveineuse (UDIV) ou périnasale, lors de dons du sang dans certains pays dues à de mauvaises pratiques dans les hôpitaux ou au non-respect des règles d'hygiène ou lors d'accidents d'exposition au sang (AES, piercing, tatouage ...).
- Contamination par voie sexuelle survenant lors de rapports non protégés avec une personne porteuse de l'HBsAg. Ce mode est prépondérant dans les pays de faible endémie (113).
- Contamination horizontale survenant : lors d'un contact étroit (lésions cutanées, muqueuses) avec des porteurs chroniques au sein d'une collectivité ou d'un foyer.
- Contamination verticale ou materno-infantile, survenant : chez des mères porteuses chroniques du virus, majoritairement en période périnatale (accouchement,

maternage) et plus rarement in utero. Ce risque est d'autant plus élevé que la charge virale de la mère est plus haute.

Aucun mode de transmission ne serait identifié dans environ 30 à 35 % des cas. Ces différents modes de transmission ont une importance variable à travers le monde. En effet, dans les zones de forte endémie, la contamination survient à un âge précoce et la transmission s'effectue par voie verticale (périnatale) ou horizontale. En Asie, où la plupart des femmes enceintes porteuses chroniques du virus ont une charge virale élevée, le risque de transmission verticale est très important. En Afrique, les charges virales élevées sont plutôt retrouvées chez les jeunes enfants nouvellement infectés lors de transmissions horizontales (106,114). La survenue d'une contamination tôt dans l'enfance, facilitant un portage chronique, permet la pérennisation du réservoir du virus.

2.7 Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B

Une hépatite virale est un processus inflammatoire du foie en réponse à un virus. Lorsqu'ils sont présents, les symptômes d'une hépatite que sont l'asthénie, les nausées, l'hyperthermie et l'ictère, n'étant pas spécifiques de cette maladie, sa prise en charge est retardée. Ce délai entre l'infection et sa détection entraîne la propagation du virus à travers la population. L'hépatite B est une maladie à long terme. Son évolution est lente et progressive. La sévérité de l'atteinte hépatique observée lors d'une infection par le HBV varie fortement selon les individus et notamment en fonction de l'âge au moment de la contamination. Lors d'une contamination à l'âge adulte, dans plus de 90 % des cas, les personnes infectées développent une hépatite aiguë très rapidement résolutive grâce au contrôle du système immunitaire. Dans 5 % des cas chez l'adulte et 90 % des cas chez l'enfant, l'hépatite aiguë évolue vers la chronicité (72,115). En absence de traitement, cette chronicité peut, par la suite, évoluer en cirrhose hépatique voire en carcinome hépatocellulaire. En fait, l'évolution vers la chronicité est plus fréquente chez les sujets immunodéprimés (infection HIV, transplantés ou hémodialysés) que chez les sujets immunocompétents.

2.7.1 Infection aiguë

L'intensité des symptômes d'une infection aiguë varie beaucoup selon les individus. Dans 75 % des cas, l'infection aiguë est asymptomatique, passe inaperçue et n'est pas diagnostiquée. L'infection peut être symptomatique dans 25 % des cas chez les adultes, 10 % chez les enfants de moins de 5 ans et encore plus rarement chez les enfants de moins d'un an (106). La fréquence des signes cliniques augmente avec l'âge au moment de la contamination. Après la contamination, la période d'incubation est généralement longue (1 à 6 mois) (106,116). Chez les patients symptomatiques, une phase pré-ictérique (3 à 7 jours) survient, ensuite, au cours de laquelle des symptômes non spécifiques sont observés : des nausées, une asthénie, une anorexie, plus ou moins accompagnées de fièvre et plus rarement de manifestations cutanées de type urticaire (116). De manière intéressante, l'hépatite aiguë est caractérisée par la présence des antigènes HBs (HBsAg) et HBe (HBeAg). Le taux

des transaminases et notamment l'alanine-amino-transaminase (ALAT) est également très élevé (20 à 30 fois supérieure à la normale) en raison d'une forte cytolysé hépatique. La première séroconversion apparaît dans le système HBe avec la disparition de HBeAg et la production d'anticorps anti-HBe. Cette séroconversion est concomitante à une diminution puis une négativation de la charge virale. La séroconversion HBs est plus tardive et l'apparition d'anticorps anti-HBs signe la guérison. Seules des traces d'ADN circulaire clos covalent (ADNccc), minichromosome viral, persisteront dans les cellules infectées (117). Au cours de la phase de convalescence, l'asthénie diminue progressivement et le taux des transaminases se normalise (116).

D'autre part, l'hépatite fulminante est une complication rarement observée, dans moins de 1 % des hépatites aiguës. Elle correspond à une nécrose hépatocytaire massive qui est fatale dans environ 80 % des cas en l'absence d'une transplantation hépatique (118,119).

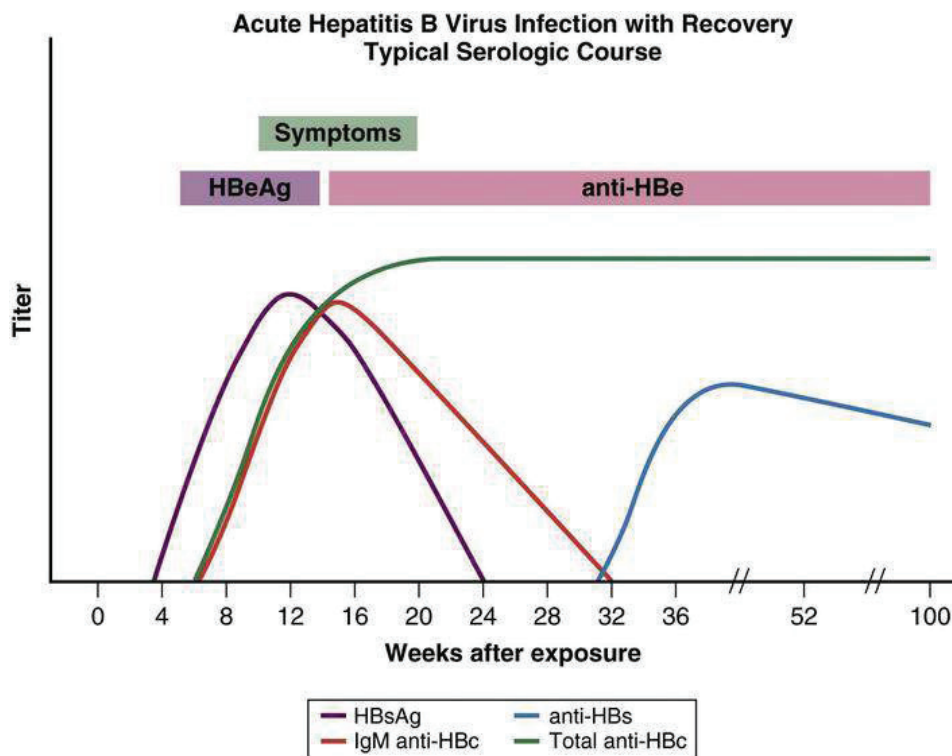


Figure 6 : Cinétique de marqueurs sériques de l'hépatite virale B aiguë (120).

2.7.2 Infection chronique

L'infection chronique est définie par le maintien des antigènes HBs plus de 6 mois dans le sérum sans apparition d'anticorps anti-HBs (121). Le principal facteur favorisant le passage à la chronicité de l'infection est l'âge au moment de la contamination (122). La présentation clinique d'une infection chronique par le HBV est très variable d'un patient à l'autre. L'évolution naturelle de l'atteinte hépatique est

la destruction plus ou moins rapide du parenchyme hépatique avec les risques associés de progression vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. L'histoire naturelle de l'infection chronique peut se décrire en 4 phases successives caractérisées par l'équilibre dynamique existant entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte (116,123) : la phase d'immunotolérance, celle de clairance virale immunomédiée encore appelée phase immunoactive, celle de porteur inactif et enfin la phase de réactivation virale (121).

2.7.2.1 Immunotolérance

La phase répllicative ou phase de « tolérance immune » survient le plus souvent suite à une transmission verticale du virus. Elle est caractérisée par l'absence de réaction immunitaire efficace de l'organisme contre le HBV. Elle correspond à une forte multiplication du HBV dans le foie, confirmée par la persistance de l'antigène HBe et HBs et la présence d'une grande quantité d'ADN viral dans le sang (de l'ordre de 10^9 , soit un milliard de particules virale/mL). Cette phase de tolérance immune dure plusieurs années. La mise en place de l'hépatite chronique demeure faible, comme témoigne l'élévation modérée des transaminases, lesquelles sont même parfois normales. Les lésions hépatiques sont minimales, voire absentes. Durant cette phase, la virémie très élevée rend les malades extrêmement contagieux. En cas de contamination à la naissance, la phase de tolérance immunitaire peut être très longue (plusieurs dizaines d'années). Par contre lors d'une infection à l'âge adulte, la première phase de tolérance est inexistante. L'expansion du virus et son échappement à la réponse immunitaire caractérisent cette phase de l'infection et l'étude de l'interaction entre le virus et la réponse immune chez les patients asymptomatiques est très difficile (124–126). Néanmoins, plusieurs études récentes *in vitro* et dans le modèle de souris humanisées ont suggéré une détection rapide du virus par le système immunitaire qui se manifeste par une activation des lymphocytes et la sécrétion des cytokines qui vont non seulement contribuer au contrôle de la réplication virale mais vont aussi jouer un rôle dans la maturation et le recrutement d'une réponse adaptative spécifique (127). Ces études, donc, défient le concept d'une phase immunotolérante en montrant que l'immunité anti-HBV n'est pas totalement absente durant cette phase et suggèrent que la classification de cette phase manque de données immunologiques significatives pour supporter le concept de « tolérance » et qu'elle se base surtout sur les données cliniques et virologiques (122).

2.7.2.2 Clairance virale (phase immunoactive)

Au cours de cette phase la réponse immunitaire adaptative se met en place ce qui conduit à la lyse des hépatocytes infectés (123). Ce processus peut durer de plusieurs mois à plusieurs années (116). Une diminution progressive et fluctuante du taux des marqueurs de la réplication virale, l'HBeAg et l'ADN viral, est donc observée (106,116,123). La charge virale reste en général supérieure à 20 000 UI/ml chez les patients montrant un HBeAg positif (123). Le taux sérique des ALAT augmente et on observe le développement d'une hépatite active avec des lésions histologiques nécrotiques et inflammatoires, puis l'apparition d'une fibrose cicatricielle. A l'issue de

cette phase, on observe chez certains patients une séroconversion HBeAg. L'antigène HBe devient négatif et les anticorps anti-HBe deviennent détectables. Cette phase peut durer plusieurs années durant lesquelles le taux de séroconversion de l'HBeAg augmente parallèlement à la diminution de la charge virale qui devient enfin indétectable (128).

Lorsque la réponse immunitaire n'est pas assez vigoureuse, il se crée un état d'équilibre. Si la clairance immune est prolongée et inefficace une charge virale élevée persistante est observée, ainsi que des taux d'ALAT élevés et un risque d'évolution vers la cirrhose qui augmente (129). Les taux d'HBsAg sériques mesurés chez les patients en phase de tolérance immune seraient supérieurs à ceux mesurés chez les patients en phase de clairance immune. Un taux très élevé de l'ordre de 100 000 UI/mL serait une preuve de tolérance immune. Par conséquent, la quantification de l'HBsAg pourrait fournir une donnée supplémentaire pour différencier les phases de tolérance immune et de clairance immune lorsque la charge virale est encore élevée et que les taux d'ALAT sont normaux ou peu élevés (129).

2.7.2.3 Stade de porteur inactif HBsAg

Au cours de cette phase, et après la séroconversion HBe, la réplication virale est efficacement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte de façon spontanée ou sous l'effet conjoint d'un traitement antiviral. La réplication au sein des hépatocytes est donc minime (charge virale inférieure à 2000 UI/ml). Les antigènes viraux sont également très faiblement exprimés, réduisant ainsi la lyse des cellules infectées par les lymphocytes cytotoxiques. Le taux sérique des ALAT se normalise (106,123) traduisant une absence d'activité inflammatoire hépatique. Le risque de développer une cirrhose ou un HCC est moindre pendant cette phase (130,131). Malgré l'absence de réplication virale mesurée, l'ADNccc persiste dans les cellules infectées et peut être source d'une réactivation virale à la faveur d'une immunosuppression (106,123).

A l'issue de cette phase, la disparition ou clairance de l'HBsAg sérique peut survenir, accompagnée ou non de l'apparition des Ac anti-HBs. La clairance de l'HBsAg et l'apparition des Ac anti-HBs neutralisants signent la résolution de l'infection (131).

2.7.2.4 Réactivation

Une réactivation virale à partir de copies d'ADNccc persistant dans les noyaux des hépatocytes est toujours possible dans un contexte d'immunosuppression constitutionnelle ou acquise (chimiothérapies, greffes ...) (123). Cette phase est généralement asymptomatique avec la réapparition d'une nécroinflammation du foie. Elle peut se produire chez des sujets porteurs chroniques en phase de rémission (HBsAg positifs, Ac anti-HBe positifs, ADN viral faible ou indétectable) et correspond à la disparition des Ac anti-HBe et à la réapparition de l'HBeAg et de l'ADN HBV dans le sérum. Elles peuvent aussi avoir lieu chez des sujets présentant un profil sérologique d'hépatite B ancienne résolue (HBsAg négatif, Ac anti HBc positifs, Ac anti HBs positifs). Dans ce cas, l'HBeAg et l'ADN viral seront à nouveau détectés dans le sérum. Ces réactivations peuvent être dues au virus sauvage avec retour à l'état HBeAg positif (1 à 4 % des cas) et surtout à des variants n'exprimant pas

l'HBeAg (mutants précore) (106). La reprise de la réplication virale peut avoir comme conséquence le développement d'une hépatite chronique « HBeAg négative », ainsi que le développement de lésions hépatiques. Il est donc important de surveiller le taux intracellulaire d'ADN du HBV et les taux d'enzymes hépatiques sériques pendant le portage inactif pour s'assurer de l'inactivité du virus et de l'absence de réactivation virale (116).

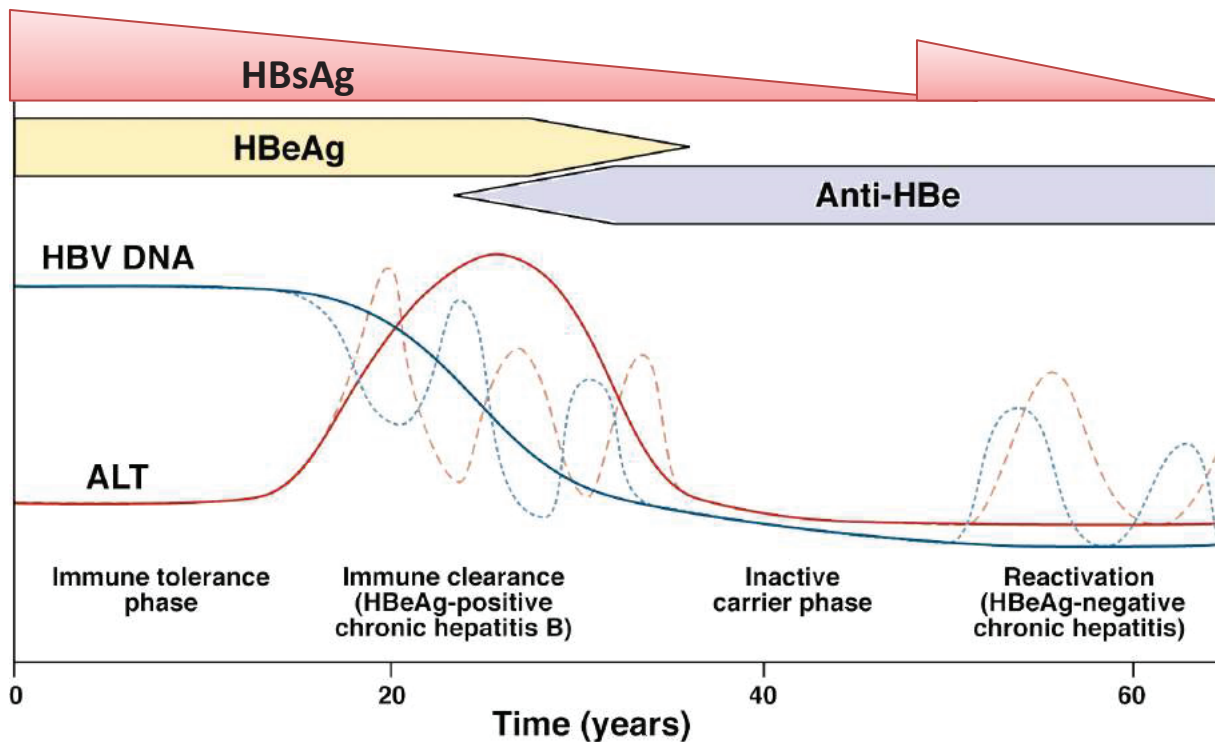


Figure 7: Histoire naturelle de l'infection HBV chronique (132). Elle se compose de 4 phases : la phase de tolérance immunitaire se caractérise par la présence de HBeAg, des taux élevés d'ADN viral et des taux d'ALT normaux, mais aucune preuve d'atteinte hépatique active. La phase de clairance virale (phase immunoactive) se caractérise par la présence de HBeAg et les niveaux élevés et variables d'ADN viral et d'ALT. Un résultat de la phase de clairance virale est la séroconversion de HBeAg. La plupart des patients entrent alors dans la phase de porteur inactif, caractérisée par l'absence de HBeAg et la présence d'anticorps anti-HBe, des niveaux d'ADN viral faibles ou indétectables (<2000 UI / mL), des niveaux d'ALT normaux et peu ou pas d'inflammation du foie. La phase de réactivation se caractérise par l'absence de HBeAg, l'augmentation persistante ou intermittente des taux d'ALT et de HBV DNA et inflammation du foie.

2.7.3 Hépatite occulte

Une hépatite occulte est définie par la présence d'ADN d'HBV dans le foie et/ou le sérum avec un taux d'HBsAg indétectable dans le sérum. Cette absence d'antigène HBs n'est pas systématiquement due à l'apparition d'un mutant d'échappement mais est souvent la conséquence de modifications épigénétiques et immunitaires bloquant la transcription du génome du HBV (133).

2.7.4 Fibrose/cirrhose

La chronicité de l'infection favorise le développement de maladies sévères du foie comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (HCC) (134).

Le risque global de développer une cirrhose au cours d'une hépatite chronique a été évalué entre 15 et 40 %. Les complications de la cirrhose sont l'hypertension portale, l'insuffisance hépatocellulaire et le HCC (72).

Les lésions hépatiques sont en partie dues à la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et les cellules NK. En effet, le HBV n'est pas cytopathique. Une réponse cellulaire dirigée contre les antigènes du HBV se met en place et les lymphocytes T vont éliminer les hépatocytes infectés entraînant ainsi une inflammation puis une nécrose des tissus. Les activités inflammatoire et nécrotique hépatiques prolongées évoluent ensuite vers le développement d'un tissu cicatriciel ou fibrose. Annuellement, 2 à 10 % des patients infectés chroniquement par HBV développent une cirrhose.

2.7.5 Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire est un cancer hépatique qui provoque mondialement le décès de près d'un million de personnes par an dont près de 4000 en France. Le cancer hépatocellulaire est le sixième cancer le plus fréquent dans le monde dont 50 % des cas sont causés par le HBV (113). Ce cancer est la première cause de mortalité en Chine et en Afrique et constitue la première cause de transplantation hépatique en Europe (OMS, 2013). Il existe des facteurs de co-morbidité qui surexposent le patient au risque de HCC comme la co-infection par le virus de l'hépatite C, la consommation excessive d'alcool ou encore l'exposition à l'aflatoxine B1 (135). Le risque de HCC diminue après résolution de l'infection HBV. Les mécanismes d'oncogenèse du HBV ne sont pas totalement élucidés. Néanmoins, certaines études suggèrent l'implication de certaines protéines virales dans l'activation d'oncogènes et la dérégulation du cycle cellulaire, notamment HBx (136). La protéine virale HBx serait aussi impliquée dans la modulation épigénétique de l'ADN cellulaire (137).

D'autre part, l'insertion aléatoire du génome viral dans le génome de l'hôte pourrait conduire à une instabilité du génome avec l'activation potentielle de gènes pro-carcinogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Récemment il a été démontré que le HBV s'intégrait préférentiellement dans le gène TERT (telomerase reverse transcriptase) suggérant une possible dérégulation du cycle cellulaire (138).

2.7.6 Vaccins contre le HBV

Des vaccins contre le HBV sont disponibles depuis les années 80. Ils sont constitués soit de l'antigène HBs inactivé extrait du sérum de patient, soit de l'antigène HBs recombinant. Ce sont les premiers vaccins à protéger contre un cancer. En effet, ils permettent de diminuer de 75 % l'incidence du HCC dans les zones à forte endémie. Les vaccins utilisés actuellement sont très immunogènes. Le titre minimal des anticorps considéré comme protecteur est fixé à 10 mUI/ml. Ce titre est généralement très largement obtenu chez plus de 95 % des sujets vaccinés (139).

Les facteurs de moindre réponse à la vaccination sont l'âge (au-delà de 40 ans), le sexe (masculin), l'obésité, le tabagisme et certains groupes HLA (données INPES, 2012). Les vaccins commercialisés actuellement contiennent des antigènes correspondant aux glycoprotéines d'enveloppe virales et surtout au déterminant « a » de l'HBsAg (139).

En général, le schéma de la vaccination contre l'hépatite B inclut une série de trois injections effectuées sur une période de 6 mois. Les adultes reçoivent leurs injections dans le bras, les nourrissons dans la jambe. La première dose du vaccin confère une protection en quelques semaines (Hepatitis B foundation).

Cependant, le vaccin n'est pas efficace contre une infection déjà établie, ni contre des mutants d'échappement à la vaccination. En effet, ces virus d'échappement possèdent des mutations rares dans le déterminant « a » de l'HBsAg qui empêchent la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps (140). Ainsi, en plus de ce vaccin, le développement de traitements efficaces contre le HBV sera nécessaire à éradiquer ce pathogène.

2.7.7 Traitements contre le HBV

Actuellement, les thérapies disponibles pour la prise en charge des patients infectés de manière chronique par le HBV consistent en l'administration d'immunomodulateurs qui stimulent le système immunitaire de l'hôte pour aider l'organisme à éliminer le virus (Interférons) et d'antiviraux qui bloquent la réplication virale afin d'éviter les lésions du foie et l'éventuelle apparition de cirrhose voire d'un HCC (141). L'interféron- α (pégylé ou non) et des analogues de nucléos(t)ides parmi lesquels figure la lamivudine (LAM) sont autorisés pour traiter l'hépatite B chronique (142).

De nouveaux traitements antiviraux ciblant différentes étapes de l'infection (entrée, ADNccc, nucléocapsides,...) sont en cours de développement (143–145).

3 Rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'infection par HBV et dans la pathogenèse

Le HBV n'est pas directement cytopathique pour les hépatocytes infectés et les lésions hépatiques observées sont dues à la réaction du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis des hépatocytes infectés exprimant les antigènes viraux. La gravité des lésions dépend donc de l'intensité de la réponse immunitaire, notamment adaptative (72,95). En général, les deux bras de la réponse immunitaire, innée et adaptative, sont impliqués dans l'élimination et le contrôle de l'infection virale. La réponse innée est la première barrière aux agents infectieux, elle limite rapidement la propagation du pathogène et contrôle l'infection. D'autre part, la réponse adaptative s'installe plus lentement mais contribue efficacement à la clairance virale en impliquant d'une part l'activation des lymphocytes T CD4+ et les CD8+, et d'autre part, une réponse efficace de lymphocytes B entraînant la production de quantités suffisantes d'anticorps neutralisants. Dans ce chapitre nous évoquerons rapidement la réponse adaptative, ensuite, nous discuterons du rôle des cellules immunes

innées et des médiateurs et récepteurs impliqués dans la réponse innée contre le virus (146,147).

3.1 La réponse immunitaire adaptative et le HBV

Deux réponses immunitaires adaptatives se mettent en place lors de l'infection. La réponse humorale par les anticorps contribue à éliminer les virions circulants et empêche l'infection de nouvelles cellules, il s'agit d'une immunité protectrice. Quant à la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T, elle élimine les cellules infectées et les cytokines produites éliminent les intermédiaires de réplication (72). Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent les épitopes HBV présentés par des macrophages sur des CMH de classe II. Ces lymphocytes sont alors activés, sécrètent des cytokines, activent les lymphocytes B producteurs d'anticorps et régulent l'activité des cellules T CD8⁺. Les lymphocytes CD8⁺ reconnaissent un épitope d'HBV présenté par un CMH de classe I à la surface des hépatocytes infectés, sont activés et détruisent la cellule infectée grâce aux perforine et au granzyme (148,149). Des cytokines, comme l'IFN γ et le TNF α , agissant directement au niveau des intermédiaires de réplication sont aussi produites par ces cellules (77,150). Les protéines virales induisant principalement le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative sont HBc et HBs.

Il existe une corrélation claire entre la spécificité de la réponse cellulaire adaptative et le résultat de l'infection. Les réponses des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au HBV deviennent détectables 7 à 10 semaines après l'infection d'une façon significative avant le début des symptômes. Les réponses anti-HBV des lymphocytes T sont suivies de réponses immunitaires humorales, qui, elles, deviennent détectables 10 à 12 semaines après l'infection. Cet intervalle de temps entre l'infection et l'induction des réponses immunitaires adaptatives spécifiques au HBV contraste fortement avec ce qui est connu d'autres infections virales (151). L'ADN viral et les antigènes HBV viraux sont indétectables dans le sérum et le foie pendant les 4 à 6 premières semaines après l'infection (phase d'éclipse). On pense que ce manque d'antigènes HBV dans la phase initiale de l'infection est responsable de l'induction tardive des réponses immunitaires adaptatives spécifiques au HBV (152).

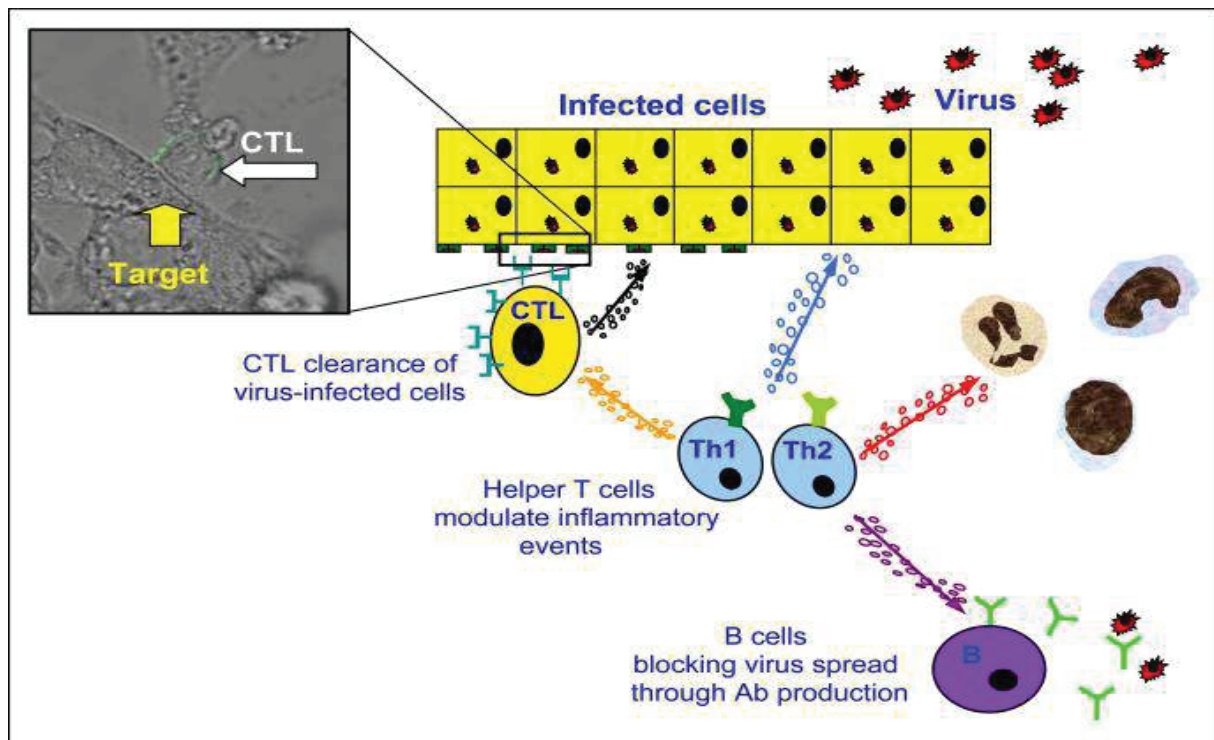


Figure 8: La réponse immunitaire adaptative anti-HBV (153).

3.1.1 La réponse à médiation cellulaire des lymphocytes T

Lors d'une infection aiguë, les antigènes viraux sont la cible des réponses de type T helper (CD4+) et T cytotoxiques (CD8+). La réponse cellulaire T CD4+ est régulée par la taille de l'inoculum viral. Elle est généralement intense, multi-spécifique (un pic est observé associé souvent à la clairance de l'HBsAg sérique) et surtout précoce lors d'une hépatite aiguë résolutive. Au contraire, elle semble relativement faible chez les patients porteurs d'une infection chronique (154). Elle joue un rôle important dans la clairance virale en induisant la réponse T CD8+ et la réponse humorale B. Les lymphocytes T CD4+ dirigés spécifiquement contre l'Ag HBc secrètent des cytokines de type TH1 : IFN γ , TNF α , IL-12 qui inhibent directement ou non la réplication du HBV et participent à l'élimination du virus de façon non cytotolytique (152). Ils induisent la prolifération des LT CD8+ qui reconnaissent spécifiquement les déterminants antigéniques préS2 et HBc couplés au CMHI (réponse Th1). Dans le cas d'une infection résolutive, la réponse T CD8+ sera intense et polyclonale, entraînant des phénomènes d'apoptose et la synthèse d'IFN γ (155–157). La réponse T CD4+ est aussi responsable de l'induction et du maintien de la réponse B spécifique avec production des Acs neutralisants contre les protéines de l'enveloppe virale. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ont un rôle central dans la clairance virale en détruisant les hépatocytes infectés. Ils sont donc responsables des lésions hépatiques. La lyse cellulaire directe n'est pas suffisante pour expliquer la clairance et les LT CD8+ sont aussi à l'origine de mécanismes non cytopathiques comme la sécrétion d'IFN γ ou de TNF α capables d'inhiber la réplication virale et l'expression des gènes viraux. En fait, la contribution directe d'IFN γ et de TNF α a bien été

montrée *in vitro* (158) et *in vivo* (159). Chez les patients présentant une hépatite aiguë résolutive, la réponse cellulaire T CD8+ est intense et polyclonale, tandis que chez les patients porteurs chroniques, elle semble faible et plus étroite. Par ailleurs, il semblerait que la fonctionnalité des cellules T CD8+ spécifiques soit plus importante que le nombre de cellules T mobilisées pour contrôler la réplication virale(151,160,161). Les cellules T CD8+ exercent leur fonction anti-HBV à travers divers mécanismes : elles lysent directement ou induisent l'apoptose des hépatocytes infectés par la sécrétion de granules lytiques (perforine / granzyme A et B) ou par des mécanismes médiés par Fas/Fas ligand (162).

Le virus contribue aussi à cette réponse inefficace des lymphocytes chez les patients chroniquement infectés. En fait, l'antigène HBe est connu pour induire une immunotolérance néonatale à HBV en traversant la barrière placentaire. Ceci mène à la non induction d'une réponse adaptative chez les nourrissons infectés par transmission verticale. L'antigène HBs aurait un rôle similaire de tolérogène lorsqu'il est présent à haute dose dans le sérum des patients (160).

3.1.2 Effet de l'infection chronique sur les lymphocytes T

La persistance du virus et le passage en phase chronique sont toujours associés à un défaut de fonctionnalité des lymphocytes T CD4+ et CD8+ quel que soit l'âge du patient au moment de l'infection. Cette réponse est antigène dépendante, l'exposition de ces cellules à une grande quantité d'antigène semble affecter la présence et l'activation de ces cellules au cours de l'infection (163). Ainsi plusieurs études ont pu relever chez des patients passant en phase chronique une faible réponse lymphocytaire T CD8 dirigée contre l'antigène HBc et l'antigène HBe par rapport à des patients capables de résoudre l'infection (164). Une autre étude a montré que chez les patients en phase chronique la réponse lymphocytaire T CD8 contre l'antigène HBc est fortement modulée par la charge virale. Ainsi en présence d'une charge virale élevée ($> 10^7$ copies/ml), Webster et al. ne mesurent plus la présence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène HBc que ce soit en périphérie ou en intra-hépatique (165). Des mécanismes divers, agissant simultanément, causent ces défauts fonctionnels des lymphocytes T et de leurs réponses médiées, avec des effets variables selon la charge virale et la présence/absence d'évènements inflammatoires du foie. Le résultat est une altération métabolique profonde des lymphocytes T anti-HBV, comme montré par les études de profil d'expression au niveau du génome entier (Genome Wide expression profiling) des lymphocytes T CD8+ spécifiques au HBV. Ces études montrent un phénotype général d'épuisement des cellules T avec dérégulation de divers processus cellulaires (166). A noter qu'une exposition persistante aux antigènes du HBV est cruciale pour maintenir cet épuisement fonctionnel des cellules T.

En parallèle, plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer ce phénomène d'exhaustion des lymphocytes T CD8+. Par exemple, les lymphocytes T intra hépatiques des patients infectés chroniquement par le HBV montrent une surexpression de marqueurs d'activation des voies d'apoptose et principalement de la protéine pro-apoptotique Bim (médiateur interagissant avec Bcl2). Le blocage de

cette protéine a permis *in vitro* et *ex vivo* la restauration de la réponse lymphocytaire T (166). D'autres éléments peuvent expliquer la faiblesse de la réponse lymphocytaire T spécifique. Il a été observé qu'au cours de l'infection chronique, les lymphocytes T intra-hépatiques expriment fortement PD-1 (programmed cell death 1) et l'expression intra-hépatique de son ligand PD1-L1 est fortement augmentée (167). L'interaction de PD-1 avec son ligand joue un rôle important dans le mécanisme de réduction des lymphocytes. En parallèle, l'environnement hépatique contribue au maintien de la tolérance immunologique vis-à-vis du HBV. Au moment du pic de virémie, les lymphocytes T CD8+, bien qu'activés, présentent une faible capacité à proliférer et sont peu fonctionnels. Cette inhibition semble être liée à l'apparition d'un pic d'IL-10 (168), mais pourrait être due à une augmentation de la libération d'arginase par les hépatocytes, l'arginase contribuant à diminuer l'expression de la chaîne δ du CD3 des lymphocytes T et entraînant une moins bonne efficacité de la reconnaissance par le TCR (récepteur de lymphocyte T) et une suppression des fonctions du lymphocyte T (169).

3.1.3 La réponse à médiation humorale des lymphocytes B

Au cours des dernières décennies, la recherche sur la réponse des cellules B spécifiques au HBV a été largement négligée. Après la démonstration que des anticorps sériques distincts spécifiques à différentes protéines de HBV peuvent être utilisés pour définir différentes phases cliniques de patients infectés par le HBV (170), la plupart des recherches sur le rôle des lymphocytes spécifiques du HBV dans la protection et les lésions hépatiques ont porté sur les cellules T au lieu des lymphocytes B.

Les réponses humorales caractérisées par la production d'anticorps peuvent être élicités contre les différentes protéines virales (core HBc, précore HBe, enveloppe HBs, polymérase ou protéine X) et la présence/absence de ces anticorps notamment ceux spécifiques à l'enveloppe (anti-HBs) et à la nucléocapside virale (anti-HBc et anti-HBe) ont été utilisés pour distinguer entre les différentes phases cliniques lors d'une infection chronique par le HBV (170).

Au cours d'une infection aiguë par le HBV, les anticorps anti-HBs et anti-HBc sont produits avec des cinétiques différentes, mais seule la détection d'anti-HBs est associée à la résolution de la maladie et au contrôle du virus, tandis que l'anti-HBc peut coexister avec un haut niveau de répllication du HBV (171). Alors que les anticorps anti-HBs sont considérés comme protecteurs, les anticorps IgG anti-HBc se développent pendant la phase aiguë et persistent à vie après la récupération clinique. Ainsi, l'IgG anti-HBc représente la seule caractéristique fiable d'une exposition antérieure au HBV. Une réponse anti-HBc excessive a également été associée à une atteinte aiguë du foie (172). Les anticorps anti-HBs jouent un rôle crucial dans l'élimination virale et la prévention de l'infection, en bloquant l'attachement et la fixation du virus à la surface des hépatocytes. Ils sont détectés dans le sérum des patients ayant résolu l'infection et sont au contraire indétectables chez les porteurs chroniques du virus(160,161,173). Cependant l'apparition des anticorps neutralisants survient relativement tard après l'infection et semble peu

contribuer à la phase précoce de la clairance virale au cours de l'infection aiguë résolutive (160,161,173). L'apparition d'anticorps anti-HBe témoigne en général de l'arrêt de la réplication du HBV.

Cette capacité protectrice des anticorps anti-HBV n'a pas été entièrement élucidée jusqu'à la découverte récente du polypeptide cotransporteur de sodium-taurocholate (NTCP), le récepteur du HBV (97,174), ainsi que l'établissement de lignées cellulaires *in vitro* faciles à infecter. Cela a permis une cartographie précise des régions de HBV essentielles à la capacité infectieuse du domaine préS1 et de la région de la boucle antigénique (également appelée «déterminant a») de l'antigène HBs (175). Les anticorps dirigés contre ces deux régions HBs sont capables de bloquer l'infection par le HBV (176,177) tandis que les anticorps spécifiques à d'autres régions du HBV qui ne sont pas impliqués dans la capacité infectieuse du HBV, comme la région Pré-S2, ne présentent aucune capacité de neutralisation (178).

Même si elles ne sont pas principalement impliquées dans le contrôle de l'infection pendant la phase aiguë, l'importance des cellules B dans la phase de résolution de l'infection est remarquable. À ce stade, malgré la négativité sérologique pour HBsAg, le HBV est encore capable de synthétiser de petites quantités d'antigènes, qui sont indétectables par les tests disponibles mais suffisants pour maintenir une réponse immunitaire spécifique au HBV et être contrôlés par des anti-HBs. Cette hypothèse semble être soutenue par l'étude récente de la réactivation du HBV déclenché par les traitements anti-CD20 appauvrissant les cellules B (179). En plus des aspects inexplorés de la fonction d'anticorps dans l'infection par le HBV, les cellules B peuvent avoir un rôle important, quoique indirect, dans le contrôle de l'infection par le HBV, en agissant comme cellules présentatrices de l'antigène (APC) pour les lymphocytes T CD4 + antiviraux (180,181). Cette présentation préférentielle par les cellules B explique en partie l'immunogénicité de HBcAg, ce qui est essentiel pour le développement d'une réponse CD4 anti-HBc surtout que la réponse anti-HBc joue un rôle crucial dans les infections aiguës et chroniques (182,183). Finalement, les lymphocytes B jouent aussi le rôle de régulateur de la réponse immunitaire via l'IL-10. En fait, les cellules B productrices d'IL-10 sont enrichies, en particulier lors des éruptions hépatiques de l'hépatite B chronique, et il a été montré qu'elles modulent non seulement les événements inflammatoires mais aussi peuvent diminuer les réponses des lymphocytes T CD8+ anti-HBV (184,185).

3.1.4 Altération de la réponse B durant l'hépatite B chronique

Le manque d'anti-HBs dans l'infection chronique HBV peut être attribué à un épuisement sélectif des cellules B spécifiques. Le phénomène d'épuisement des cellules B, avec en conséquence une réponse déficiente d'anticorps, a récemment été décrit dans différents modèles d'infection chronique (186,187). Dans ce contexte, une étude récente visant à déterminer l'étendue de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B chez les patients atteints d'infections chroniques persistantes du HBV et du HCV a montré une proportion plus élevée de cellules B naïves et mémoires, avec un phénotype suractivé, que dans les groupes

témoins sains. Cependant, ces cellules ont montré une capacité proliférative réduite (188) et, de façon intéressante, elles ont exprimé de faibles niveaux de récepteur inhibiteur Fc receptor like-4 (FCRL4), un récepteur inhibiteur qui est surexprimé sur une sous-population de cellules B mémoires épuisées (187). En outre, le profil d'expression des gènes effectué dans le sang périphérique de patients infectés par le HBV avec différents profils cliniques et virologiques ont montré une signature génétique compatible avec une activation robuste des cellules B chez les patients atteints d'hépatite chronique active (127) bien que la signification fonctionnelle de cette découverte soit inconnue.

Xu.X et al., Ont également suggéré que la capacité de présentation des antigènes des cellules B était également altérée chez les patients atteints de CHB, ce qui a été démontré par une diminution significative de l'expression de CD80 (189). Parce que la liaison du CD28 sur les cellules T CD4+ au CD80 / CD86 sur les cellules B représente une voie co-stimulatrice dominante qui joue un rôle essentiel dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+, la régulation négative du CD80 sur les cellules B chez les patients atteints de CHB reflète vraisemblablement l'insuffisance dans l'induction de l'activation et de la prolifération de ces lymphocytes CD4+. L'épuisement des lymphocytes T dans l'infection chronique par le HBV peut être donc la conséquence d'un épuisement des lymphocytes B et leur capacité de présentation antigénique.

En résumé, il est de plus en plus évident que la biologie des cellules B dans l'infection par le HBV a été largement négligée à ce jour et qu'elle devrait maintenant représenter un axe de recherche principal pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'interaction entre les bras cellulaires et humoraux du système immunitaire et pour mettre en évidence le rôle potentiel joué par les cellules B dans la pathogenèse et le sort des maladies hépatiques liées au HBV.

3.2 La réponse immunitaire innée et HBV

La réponse immunitaire innée est la première à intervenir lors de la présence d'un pathogène et est primordiale pour contrôler la réplication du pathogène et activer la réponse immunitaire adaptative. Elle fait intervenir des récepteurs reconnaissant des motifs (PRR) comme les Toll-like récepteurs. Suite à la détection d'un motif pathogène par au moins un de ces récepteurs, des voies de signalisation sont mises en place et les facteurs de transcription comme NF- κ B, IRF3 et 7 sont activés. Ces facteurs serviront à la transcription des interférons de type I (IFN- α et IFN- β) et des cytokines proinflammatoires (TNF α , IL-1 et IL-6). Les cytokines proinflammatoires serviront à recruter les cellules inflammatoires comme les cellules NK ou encore les macrophages. Les interférons de type I vont quant à eux agir sur la cellule infectée via leurs récepteurs et la voie Jak/STAT pour activer les interféron-stimulated genes (ISGs), acteurs majoritaires de l'inhibition de la réplication d'un pathogène (190,191). Le virus de l'hépatite B est non cytopathogène et le contrôle de l'infection ainsi que la pathologie associée sont médiés par le système immunitaire de l'hôte. Jusqu'à

récemment, l'accent a été mis sur le rôle crucial du système immunitaire adaptatif dans le contrôle de l'infection mais la contribution du système immunitaire inné est aujourd'hui réévaluée. Cependant, les données restent limitées notamment en raison de la difficulté de recrutement des patients dans les étapes pré symptomatiques de l'infection aiguë par le HBV (173,192) et des limites des modèles d'infection par le HBV *in vitro* (193,194).

En dépit des difficultés expérimentales rencontrées dans les études de l'infection HBV dans les modèles animaux, plusieurs de ces études ont montré que la réponse immunitaire innée suite à une infection aiguë par le HBV est faible ou absente. Chez des patients infectés par le HBV, les cytokines pro-inflammatoires sont souvent indétectables pendant les premières phases de l'infection (sous 30 jours) et lorsqu'elles sont présentes plus tardivement, le niveau est très faible comparativement aux patients infectés par le HCV et le HIV (195). Une autre étude clinique sur des patients avec une infection aiguë a démontré une absence d'induction de l'interféron de type I dans le sérum des patients au début de l'infection et pendant la phase de la réplication virale (168,196). Ces résultats confirment des résultats obtenus dans le modèle de chimpanzé infecté par le HBV où les gènes inducibles par l'interféron sont indétectables pendant la phase d'entrée ou de réplication virale suggérant une absence de détection par le système PRRs et une absence d'induction des cytokines au début de l'infection (197). Au contraire, une induction très rapide des gènes du système immunitaire innée a été observée dans les animaux infectés avec le HCV (198), démontrant clairement que deux virus qui ont le même tropisme cellulaire utilisent des stratégies différents pour leur interaction avec leurs hôtes. La déficience d'induction des gènes inducibles par l'interféron peut être expliquée par une capacité du virus à échapper à la réponse innée. La stratégie de réplication du HBV rend le virus invisible et indétectable par le système de reconnaissance cellulaire pendant plusieurs étapes du cycle viral. La localisation nucléaire de l'ADNccc, l'encapsidation des ARNpg ainsi que la ressemblance des transcrits viraux avec les transcrits normaux de la cellule empêchent leur reconnaissance par les récepteurs PRRs. Par conséquent ils n'induisent aucune réponse innée et la persistance de l'infection est vraisemblablement due à la persistance de l'ADNccc dans le noyau des cellules infectées(160,192,199). Cependant, plusieurs équipes ont réussi à montrer qu'HBV pouvait être détecté par les senseurs de la réponse innée. De manière intéressante, la transduction de la lignée HepaRG par un baculovirus HBV mène à l'activation de la réponse IFN- β et à un contrôle de la réplication virale (200). Il est important de noter que la pertinence physiologique de cette étude reste incertaine puisque les auteurs ont induit la réplication virale en utilisant un baculovirus portant le génome HBV pour déclencher la réponse immune. Ce dispositif expérimental peut influencer les résultats d'autant qu'une étude sur les mécanismes de détection de l'ADN intracellulaire suggère que la quantité d'ADN plutôt que la qualité influence la machinerie de détection intracellulaire (201).

Les senseurs cytoplasmiques ou membranaires impliqués dans la détection du virus sont encore inconnus. De plus, la réplication du HBV est inhibée via la sécrétion d'IFN- α et β , suite à l'activation des TLR (toll-like receptor) par leurs ligands chez la souris (202). Au-delà des hépatocytes, le HBV est aussi reconnu par des cellules non parenchymateuses. Ainsi, Hôsel et al. ont démontré que les macrophages et en particulier les cellules de Kupffer, dans lesquels le virus n'est pas capable de répliquer, sont capables de reconnaître ce dernier par le système PRRs. Cette reconnaissance conduit après 3h d'exposition à HBV à l'activation de la voie NF- κ B et l'induction de l'IL-6 et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Dans cette étude l'IL-6 est capable de bloquer la transcription et la réplication du HBV très tôt après l'infection, indépendamment de l'action antivirale de l'interféron ou d'autres cytokines (203). Enfin des données montrant l'activation précoce des cellules NK et la sécrétion d'IFN γ dans des patients en phase aiguë d'infection HBV sont aussi publiées (196). Ces données suggèrent que, bien que HBV n'induit qu'une faible production de cytokines (IFN- α , TNF α , IL-15, IL-10, IL-6 et IL1- β) comparé au HIV ou au HCV, une réponse immunitaire innée est tout de même mise en place (195). La capacité du système immunitaire inné à détecter une infection HBV a aussi été montrée dans des souris humanisées, où il y avait une légère augmentation des gènes humains stimulés par l'interféron (ISGs) dans les souris infectées par rapport à celles non infectées (204). Malheureusement, les mécanismes responsables de la détection du HBV dans les cellules infectées ne sont pas bien déterminés et les composants moléculaires de virus reconnus par le système PRRs ne sont pas encore bien définis. Cependant, il a été montré que les capsides du HBV sont reconnues par le TLR2 (205) et une étude récente suggère que le récepteur MDA5 (la famille RLRs) est associé aux acides nucléiques spécifiques du HBV et joue un rôle dans la détection de l'infection (206).

3.2.1 HBV et l'immunité innée

Comment expliquer que le HBV soit détecté par l'immunité innée mais que la réponse en découlant, c'est-à-dire la production d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires, soit si faible voire absente ?

Cela nous conduit à l'autre hypothèse qui serait que le HBV développe une stratégie d'inhibition de la réponse immune. Les antigènes HBs et HBe sécrétés pendant le cycle de réplication viral, sont des marqueurs de l'infection et se trouvent en grande quantité dans le sérum. Ces antigènes ont un effet immunomodulateur permettant au virus d'échapper au système immunitaire.

Il s'avère que le HBV « semble » invisible pour le système immunitaire inné car il est capable de l'inhiber très rapidement après le début de l'infection (dès 2 heures d'infection (207). Après 2 semaines d'infection, plus aucune trace ne peut laisser penser à l'activation de cette réponse. En effet, il a été montré chez des patients avec une hépatite chronique que le niveau plasmatique de l'HBsAg corrèle avec le dysfonctionnement du récepteur TLR2 et TLR4 et perturbe l'induction des cytokines pro inflammatoires dans les cellules mononuclées du sang (208). De plus, d'autres études ont montré que l'HBsAg interfère avec les voies de signalisation Erk, JNK et

NF- κ B déclenchées par les TLRs dans les monocytes et macrophages (209–212). L'antigène HBs est démontré capable d'altérer la fonction des cellules dendritiques myéloïdes (213). La capacité du virus à inhiber la réponse immunitaire innée n'est pas limitée à l'inhibition de l'induction de l'interféron de type I mais il peut aussi bloquer son action antivirale. Une étude dans le modèle des souris humanisées a montré que le HBV empêche la voie de signalisation induite par l'interféron en inhibant la translocation du facteur de transcription STAT-1 (204). De même, la polymérase virale pourrait inhiber la réponse antivirale de l'interféron (214) en interagissant directement avec la protéine kinase C-delta (PK-C γ) et l'importine α 5 pour inhiber la translocation du complexe STAT1/STAT2 dans le noyau et inhiber la transcription des ISGs (215).

Ces études et de nombreuses autres ont donc décrit cette capacité inhibitrice du HBV à l'égard de l'immunité innée et ces résultats seront détaillés plus tard.

3.2.2 Rôle des cytokines dans la réponse antivirale

Récemment, plusieurs études ont mis en évidence les cytokines comme médiateurs fondamentaux dans la réponse immunitaire antivirale et la clairance du HBV (216,217). Le niveau d'expression des cytokines peut jouer un rôle clé dans l'immunité antivirale et le contrôle de l'infection. Après une infection virale, les cellules infectées répondent rapidement en produisant des cytokines antivirales telles que l'interféron α / β pour inhiber une ou plusieurs étapes du cycle virale et limiter l'infection. Ces mêmes cytokines ont la capacité de recruter des cellules inflammatoires telles que les cellules NK, NKT qui constituent la première ligne de défense, ces cellules reconnaissent très tôt les cellules infectées et agissant en sécrétant des cytokines antivirales en particulier l'IFN γ (218). Les macrophages et les cellules dendritiques jouent aussi un rôle clé dans le contrôle des premières phases de l'infection en sécrétant des chémokines et des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12 et l'IL-18 qui induisent la sécrétion de l'IFN γ et d'autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α possédant des effets antivirales directes ou indirectes (203,218,219). Tous ces événements précoces contribuent au développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique du virus. Ces cytokines inflammatoires des deux réponses immunitaires innée et adaptative agissent à différents niveaux pour contrôler l'infection virale.

3.2.2.1 La réponse interféron

Les interférons sont divisés en 3 types : les interférons de type 1 dont l'IFN α / β qui en interagissant avec leurs récepteurs spécifiques (IFNR) activent plusieurs voies de signalisation antivirale impliquées dans le contrôle de la réplication virale à plusieurs niveaux du cycle virale dans la cellule infectée ainsi que dans les cellules voisines. A côté de cet action antivirale directe, Les IFN α / β contrôle aussi l'infection en modulent la réponse immunitaire innée et adaptative (216). Elles stimulent l'activité des cellules NK, des lymphocytes cytotoxiques (CTL) et des macrophages. Elles augmentent l'expression des molécules CMH-1 et CMH-2 et activent les cellules B mémoires.

L'IFN γ est un interféron type II et est surtout produite par les cellules NK, NKT et les cellules T (218). L'IFN γ assure la transition de la réponse immune innée à une réponse adaptative en activant les cellules T cytotoxiques et régulent la fonction des cellules NK, les cellules mémoires B et les macrophages. Le troisième groupe des interférons sont les interférons lambda (IFN- λ) qui sont comme les interférons de type 1 induits d'une façon ubiquitaire par l'infection virale (220). Les interférons jouent le rôle principal dans la résolution de l'hépatite aiguë et probablement sont les médiateurs les plus importants dans le contrôle non cytolytique de l'infection (161). La réplication du virus dans les cellules infectées induit souvent une production rapide de l'interféron. Ainsi, la résolution de l'infection aiguë est caractérisée par une forte production de l'IFN γ par les cellules immunitaires innées et adaptative (196,221). Des études sur des souris transgéniques et des lignées hépatocytaires ont démontré que le niveau de la réplication du HBV dans les souris déficientes pour l'IFN γ ou pour le récepteur des IFN α/β de type I, est plus élevé que celui observé dans les souris contrôles suggérant que le niveau basal de ces cytokines contrôle la réplication du virus (222). L'interféron inhibe la réplication du HBV au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Plusieurs groupes ont montré que l'interféron de type I réduit l'activité de l'enhancer I et II du génome du HBV indispensables pour l'expression des gènes et la réplication du HBV (223,224). Enfin, les interférons en se fixant sur les récepteurs, sont capables de déclencher des voies de signalisations intracellulaires tels que JAK/ STAT impliquées dans l'induction de plusieurs gènes antiviraux nommés ISGs (225,226).

L'interféron gamma (IFN γ) agit aussi sur la réplication du HBV par un mécanisme non cytolytique. Guidotti et al. ont démontré que les cellules T cytotoxiques dans le modèle de souris transgéniques peuvent inhiber dans un premier temps l'expression des gènes viraux sans tuer les cellules via la sécrétion de l'IFN γ et TNF α par les cellules T cytotoxiques, et les macrophages qui sont antigène indépendant (227). Ces mêmes auteurs ont démontré plus tard que ces cytokines agissent par 2 mécanismes indépendants. Le premier consiste en l'élimination des nucléocapsides et par conséquent l'inhibition de la réplication virale et le second passe par la déstabilisation des ARN viraux (159). *In vitro*, Philips et al. ont démontré dans un modèle de co-culture que les cellules T-CD8 $^{+}$ inhibent la réplication du HBV dans les hépatocytes infectés par HBV avec une lyse cellulaire minimale (158). Le blocage de l'IFN γ et du TNF α abolit l'inhibition non cytolytique du HBV, ce qui indique que ces 2 cytokines secrétées par les cellules T CD8 $^{+}$ contrôlent le virus par des mécanismes non cytolytiques. De plus, le traitement des hépatocytes infectés par l'IFN γ et le TNF α recombinants résulte en une inhibition efficace de la réplication virale sans cytotoxicité (158). De même, une étude a montré que l'expression de l'IFN γ par un vecteur d'expression inhibe la réplication du virus dans les cellules HepG2 sans induire l'apoptose de ces cellules (228).

3.2.2.2 L'interleukine-6 (IL-6)

L'interleukine-6 est une cytokine inflammatoire impliquée dans plusieurs effets biologiques tels que la différenciation et la croissance cellulaire, l'apoptose et

l'induction des protéines de phase aiguë (229,230). En réponse à une lésion hépatique, l'IL-6 est induite dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les hépatocytes et les cellules de Kupffer (231). En outre, il a été démontré que l'IL-6 joue un rôle important dans la survie des hépatocytes en stimulant la régénération du foie et en le protégeant contre les facteurs de lésion hépatique. Plusieurs études ont démontré que le niveau d'IL-6 est élevé dans le sérum des patients en phase chronique et les patients qui ont développé une cirrhose et un hépatocarcinome (232). De plus, une étude chez des patients en phase chronique, a démontré que l'activité d'IL-6 est significativement augmentée pendant la phase d'exacerbation de l'hépatite chronique. Ces études soulignent le rôle important de l'IL-6 dans la réponse immunitaire contre l'infection par le HBV (203,219). Des approches expérimentales *in vitro* confirment l'effet d'IL-6 sur la réplication du HBV. Ainsi, dans les cellules HepG2 transfectées avec le génome HBV, l'IL-6 supprime la réplication du virus en réduisant le niveau des transcrits viraux, les protéines de la capsid et le niveau des nucléocapsides contenant le génome (233). Une autre étude réalisée par Hösel et al. sur des hépatocytes humains a démontré qu'après l'infection, les macrophages reconnaissent le virus et induisent la production de plusieurs cytokines dont l'IL-6 et que seul l'IL-6 a la capacité à contrôler la réplication, via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (203).

D'autres cytokines sont impliqués dans la clairance virale du HBV :

- L'interleukine 12 (IL-12) qui est fortement produite et stimule la production des cytokines de type Th1 chez les patients en phase chronique, joue un rôle important dans la clairance du virus (234). IL-12 supprime la réplication du virus dans le foie des souris transgéniques, elle est impliquée dans la disparition de l'AgHBc dans le cytoplasme prévenant l'assemblage du virus ou visant la dégradation des nucléocapsides où la réplication aura lieu. Dans cette étude l'effet antiviral de l'IL-12 est médié principalement par la stimulation de la sécrétion d'IFN γ (235).
- L'interleukine 18 (IL-18) agit rapidement et supprime la réplication du HBV dans le foie des souris transgéniques d'une façon non cytopathique en stimulant des cellules NK et NKT à produire l'IFN α/β et l'IFN γ dans le foie (236).
- L'interleukine 15 (IL-15) diminue le niveau d'ADN viral et le niveau des antigènes HBsAg et HBeAg dans le foie de souris transgéniques (237).
- L'interleukine 1 β (IL-1 β), en se fixant sur les récepteurs IL-1R ou TLR2, active le facteur de transcription NF- κ B impliqué dans la transcription et la production d'IL-8 et TNF α eux-mêmes associés à l'inhibition de la réplication du HBV (238,239).
- TNF α bloque la réplication du HBV, via l'activation de la voie NF- κ B, en inhibant l'accumulation de particules de core virales (238,240).

3.3 Les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR)

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes et elle est commune à tous les animaux. Elle repose sur la reconnaissance de motifs

moléculaires présents sur de nombreux pathogènes, les pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Ces motifs, très conservés au cours de l'évolution, sont reconnus par des récepteurs cellulaires nommés PRR (pattern-recognition receptors). Un tel système permet qu'un nombre restreint de PRRs puisse reconnaître l'énorme diversité des micro-organismes. Certains lipides, lipoprotéines, carbohydrates ou peptidoglycanes issus de bactéries, champignons, ou protozoaires constituent des exemples de PAMPs. Par ailleurs, certaines molécules endogènes relarguées lors d'atteintes tissulaires, les DAMP (damage-associated molecular patterns), peuvent activer les PRRs. Les PRRs peuvent être séparés en plusieurs catégories : les PRRs sécrétés ou les PRRs cytosoliques et membranaires. La plupart des membres du système du complément sont par exemple des PRRs sécrétés. La reconnaissance des PAMPs par les PRRs déclenche l'activation des cellules de l'immunité innée qui les portent, qui sécrètent alors des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, histamines...) responsables de l'activation des cellules endothéliales et de l'initiation de la phase vasculaire de la réponse inflammatoire puis de la phase effectrice. Ces cellules sont aussi les initiateurs de l'activation de l'immunité adaptative. Actuellement, 4 familles de PRRs ont été identifiés : TLRs (Toll-like receptor), RLRs (RIG-1 like receptors), NLR (NOD-like receptors), LCR (C-type lectin) (241,242).

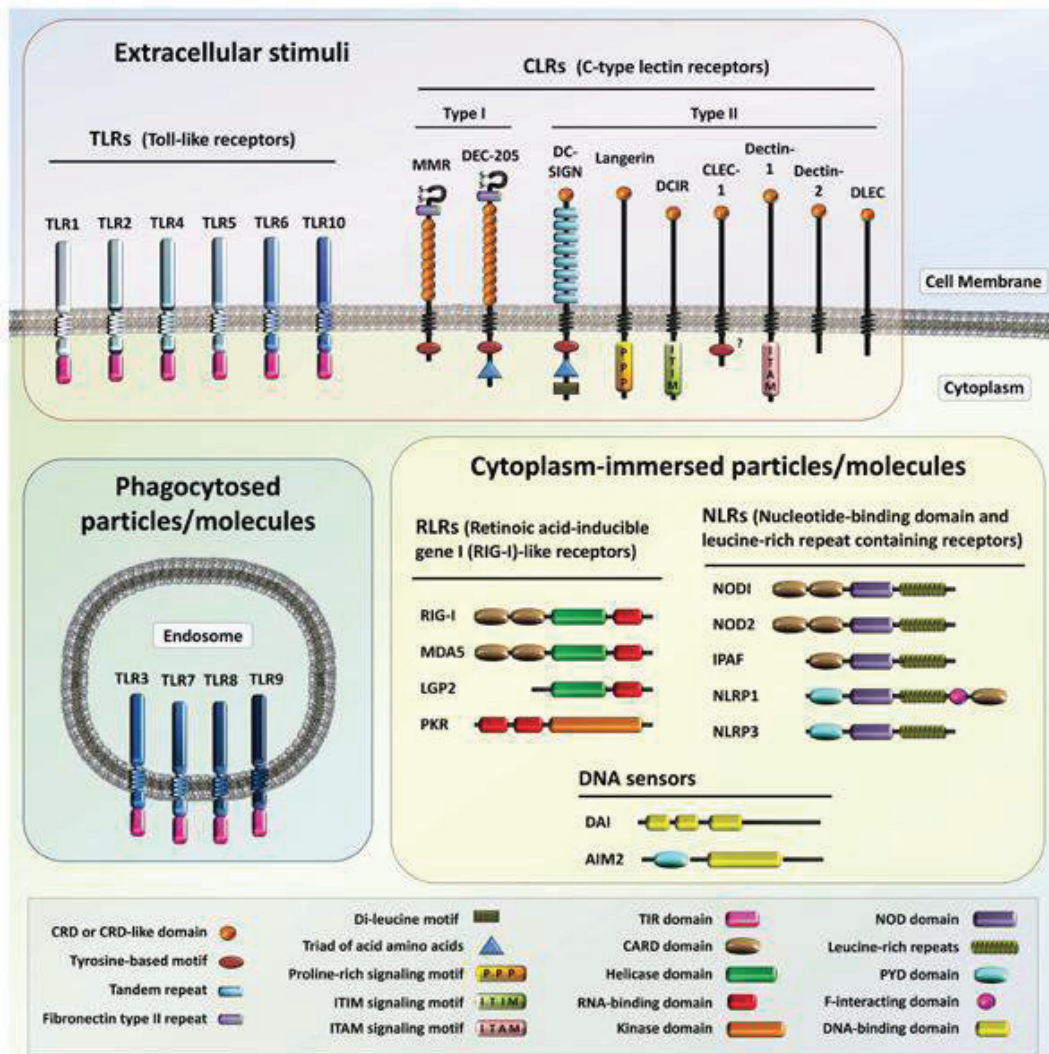


Figure 9 : Représentation schématique des principales classes de PRRs du système immunitaire inné (243).

3.3.1 Les PRRs cytosoliques

3.3.1.1 Les RIG-I like récepteurs (RLR)

Les RLR sont des ARN hélicases cytoplasmiques et reconnaissent les divers types d'ARN produits dans le cytoplasme. Ils représentent un mécanisme général de détection du virus car ils sont exprimés de façon omniprésente par les cellules immunitaires et non immunitaires (244). Cette famille comprend RIG-I, MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene-5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) (245). Les RLRs détectent des virus à ARN avec des spécificités distinctes et sont ainsi essentiels pour la reconnaissance des virus ssRNA, y compris le virus syncytial respiratoire (RSV), le virus de la grippe A, le virus de stomatite vésiculeux (VSV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus de l'hépatite C (HCV) et des composés de virus dsDNA tels que le virus Epstein-Barr (EBV) (246–248). En outre, MDA5 reconnaît l'ARN acide polyinosinique polycytidique (poly :IC) (249). RIG-I et MDA-5 interagissent avec l'ARN viral avec une spécificité de ligand

différente. Bien que la plupart des études aient montré que l'ARN 5'-triphosphate était capable de se lier et d'activer RIG-I (247,250–253), Kato et al., ont montré que RIG-I détecte les ARNs sans extrémité 5'-triphosphate, et que RIG-I et MDA5 reconnaissent sélectivement les dsRNAs courts et longs, respectivement (254). Schlee et al. ont identifié la structure moléculaire exacte pour le ligand RIG-I (255). Bien que la présence d'un 5'-triphosphate soit requise pour l'activation de RIG-I, une extrémité brisée et double brin à l'extrémité triphosphate est nécessaire pour son activation complète. Ces caractéristiques structurelles sont absentes dans l'hôte cellulaire en raison des différents mécanismes incluant le recouvrement 5' de l'ARNm cellulaire, ce qui évite l'auto-reconnaissance de l'ARN (252–254). L'activation de RIG-I et MDA5 déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation, y compris NF- κ B et IRF3 et -7, conduisant à la production d'interféron de type I et à un ensemble de cytokines pro-inflammatoires (250,256,257). RIG-I et MDA5 recrutent comme protéine adaptatrice, INF β promoter stimulator (IPS-1), nommé aussi protéine de signalisation mitochondriale antivirale (MAVS), adaptateur de signalisation induit par le virus (VISA) et adaptateur CARD induisant IFN β (CARDIF) car il a été découvert simultanément par quatre groupes (258–261). Le domaine transmembranaire d'IPS1 assure sa localisation mitochondriale, qui est nécessaire pour l'activité IPS1 (262).

Actuellement, RIG-I et MDA5 sont supposés être les seuls récepteurs reconnaissant les virus d'ARN pour induire les IFN de type I. Ils agissent séparément ou ensemble dans divers types de cellules pour lutter contre les virus à ARN. Cependant, un autre rôle de RIG-I a été élucidé par deux études : RIG-I est capable de reconnaître l'ADN-B par un intermédiaire d'ARN généré par la transcription par l'ARN polymérase III (263,264), et plus récemment Choi et al. ont montré l'implication de RIG-I et MDA5 dans la reconnaissance de l'ADN cytosolique (265).

Dans la littérature, certaines études ont montré que l'expression de RIG-I est inhibée par HBV et que cette inhibition a des implications dans la détection du virus par l'immunité innée. En fait, Hou et al. montrent que le HBV, via l'activation du miR146a, peut inhiber l'expression de RIG-I et RIG-G et en conséquence la réponse innée antivirale contre le virus (266). Une autre étude a montré que la polymérase du HBV inhibe l'induction de l'interféron- β méditée par RIG-I et TLR3 dans les hépatocytes humains et cela à travers l'activation du interferon regulatory factor 3 et l'amortissement de l'interaction entre TBK1 / IKK ϵ et DDX3 (267).

3.3.1.2 NOD-like récepteurs (NLR)

Les NLR appartiennent à une grande famille de 20 membres de protéines intracellulaires qui partagent des similitudes structurelles, y compris : un LRR carboxy-terminal, un domaine central de liaison à un nucléotide NACHT (neuronal inhibitory protein (NAIP), CIITA, HET-E and TP-1), qui a une activité ATPase intrinsèque et un domaine d'interaction protéine-protéine amino-terminal. Les NLR sont classés en différentes sous-familles selon la nature du domaine présent à l'extrémité amino: (1) un domaine de recrutement de caspase (CARD), présent dans la sous-famille NOD soit (2) un domaine pyrine, dans la sous-famille

NALP (245).

NOD1 / NLRC1 et -2 / NLRC2 sont des membres bien caractérisés de la famille NLR, qui reconnaissent à travers leurs domaines riches en leucine (LRR) les peptidoglycanes (PGN) qui sont des composants de la paroi cellulaire bactérienne. NOD2 agit comme un senseur général de bactéries par la reconnaissance de PGN contenant du muramyl dipeptide (MDP) (268,269), tandis que NOD1 reconnaît l'acide diaminopimélique (DAP) trouvé dans toutes les bactéries Gram-négatives et un nombre limité de bactéries Gram-positives (270,271). Après la reconnaissance de PGN, la signalisation de NOD1 et NOD2 entraîne l'induction de cytokines inflammatoires en activant les voies NF- κ B et MAPK (272,273).

La sous-famille NALP contient 14 membres qui répondent à de nombreux PAMPs bactériens et participent à la formation d'un complexe multiprotéique appelé inflammasome. L'inflammasome contrôle le traitement et l'activation des cytokines pro-inflammatoires de la famille IL-1. IL-1 β , IL-18 et IL-33 sont synthétisés comme des pro-cytokines inactives et nécessitent une activation par la caspase 1 pour donner des cytokines bioactives matures (245,274). Ce complexe multi-protéique contient un NALP ou NAIP, en plus d'une protéine adaptatrice ASC avec un domaine CARD qui facilite l'activation de la caspase-1 (275), suivie de la maturation de l'IL-1 β . Il existe deux types différents d'inflammasomes classés en fonction des protéines présentes dans le complexe : d'une part les inflammasomes composés de membres de la famille NLRs (par exemple NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4) et d'autre part les inflammasomes ne comprenant pas de NLRs (par exemple AIM2, IFI16 et RIG-I, activés par des acides nucléiques provenant de pathogènes) (276,277).

En résumé, les NLRs jouent un rôle essentiel dans le contrôle des microorganismes pathogènes et des troubles immunologiques. Ils constituent une ligne de défense cytoplasmique contre les pathogènes microbiens et peuvent être complémentaires des TLRs (discutés plus loin) pour protéger contre les microbes ayant différentes voies d'infection.

3.3.1.3 Les récepteurs à ADN cytosoliques

La reconnaissance des ADN provenant de plasmides (utilisés par exemple pour la vaccination), provenant de cellules du soi en train de mourir, ou encore de pathogènes tels que les virus ou les bactéries, peut également avoir lieu par des voies indépendantes des TLRs. Il s'agit d'autres senseurs à ADN, comme par exemple les DAI (pour « DNA-dependant Activator of IFN-regulatory factors » et aussi appelés ZBP1), qui sont localisés dans le cytosol (comme les RLRs) de cellules immunitaires ou non immunitaires et ont d'ailleurs été les premiers senseurs d'ADN cytosoliques découverts (278). Leur activation déclenche les voies de signalisation NF- κ B et IRF-3 et pourrait entraîner une réponse IFN de type I, mais aussi de type III.

Les DAI interagissent avec divers types d'ADN avec une préférence stricte pour la séquence et la configuration de l'ADN; cependant, une production d'IFN inférieure a été observée après une stimulation avec un ADN de moins de 100 paires de bases

de longueur (279,280). De plus, la protéine transmembranaire STING (pour « Stimulator of Interferon genes », appelée aussi TMEM173 ou MITA), localisée dans le réticulum endoplasmique, semblerait être impliquée dans la reconnaissance d'ADN, indépendante des TLRs et RLRs, mais ce processus ne passerait pas par une interaction directe avec STING. L'ADN serait donc détecté par des senseurs en amont de STING, qui correspondraient par exemple aux DAI. La protéine STING pourrait donc représenter une protéine adaptatrice centrale.

En outre, une étude récente a souligné le rôle central de DAI dans l'infection à MCMV (281). La production d'IFN de type I induite par l'ADN et médiée par DAI varie selon les types de cellules; les données obtenues après l'inhibition de l'expression de DAI ont suggéré l'existence d'autres capteurs d'ADN (280).

AIM2 est un composant crucial impliqué dans la production d'IL-1 β induite par l'ADNs via ASC/Caspase 1 mais est indispensable pour la production d'IFN de type I (largement dépendante de STING) (282). AIM2 s'associe à ASC et à la caspase 1 qui est ensuite activée et peut déclencher la maturation d'IL-1 β . Il a également été montré comme une composante essentielle de la réponse IL-1 β aux virus à ADN cytosoliques tels que le MCMV, le vaccinia virus et la bactérie cytosolique *Franciscella tularensis* (283).

IFI16 est le seul PRR impliqué dans la production d'IFN de type I et dans la maturation et la sécrétion d'IL-1 β en réponse aux virus à ADN (284,285). IFI16 est localisé principalement dans le noyau; par conséquent, il pourrait éventuellement détecter la réplication de l'ADN viral. En effet, IFI16 s'associe à ASC dans les cellules endothéliales infectées par le KSHV et déclenche la formation d'inflammasome dépendante de la caspase 1 et l'activation de NF- κ B (285).

3.3.2 Les PRRs transmembranaires

3.3.2.1 Les protéines C-type lectin-like domain

La superfamille de protéines C-type lectin-like domain (CTLD) contient des protéines avec un domaine de reconnaissance de carbohydrate commun (CRD) ou un domaine de CRD-like impliqué dans la reconnaissance de pathogènes grâce à la reconnaissance des structures de mannose, de fructose et de carbohydrates. La spécificité du mannose permet la reconnaissance des virus, des champignons et des mycobactéries, le fructose est spécifique à certaines bactéries et les helminthes et les glucanes sont présents dans les mycobactéries et les champignons (286,287). La superfamille de CTLD comprend le macrophage mannose receptor (MMR), le dendritic cell (DC) associated C-type lectin 1 (dectin-1) et les sous-familles de DC immunoreceptor (DCIR) (288,289). La reconnaissance par CTLD conduit à l'internalisation des pathogènes, à leur dégradation et à leur présentation antigénique (287). En outre, certains CTLD, y compris dectin-1, dectin-2, et macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) activent directement NF κ B, tandis que d'autres CTLD, tels que DC specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), blood DC antigen 2 protein (BDCA2), DCIR et myeloid C-type lectin-like receptor (MCL) modulent la signalisation par d'autres PRRs tels que le TLRs (289).

3.4 Les Toll-like récepteurs (TLR)

La famille des Toll-like récepteurs (TLR) est l'une des familles de PRRs les mieux caractérisées. La découverte des TLR a été un événement important pour la recherche en immunologie et a été reconnue avec l'attribution du prix Nobel 2011 de physiologie et de médecine à Jules Hoffmann et Bruce Beutler pour leur recherche innovante en immunologie.

3.4.1 Historique et découverte

Les TLRs ont d'abord été décrits chez *Drosophila melanogaster* pour leur rôle dans l'orientation dorso-ventrale des organes pendant l'embryogénèse (290). En effet, les insectes dépourvus du gène toll codant pour cette protéine présentaient des anomalies du positionnement des organes. Environ 10 ans plus tard, en 1996, le rôle immunitaire des TLRs a été mis en évidence par l'équipe de Jules Hoffmann après l'observation que certaines mutations du gène Toll chez *Drosophila* induisaient un défaut de résistance face à des infections fongiques (291). A l'époque, on rapprochait le rôle des TLRs à celui du récepteur 1 de l'IL-1 (IL1-R1). En effet, il a été montré que les TLRs et l'IL-1R1 partageaient des homologies de séquence dans leur domaine cytosolique (le domaine TIR pour Toll-Interleukin 1 Receptor), suggérant l'implication de la voie du NF- κ B et l'induction des processus immunologiques (292). Ces études sont le point de départ d'une série de recherches actives pour identifier des molécules similaires chez les mammifères. En 1997, l'équipe de Janeway montre des homologies de séquence entre la protéine Toll de drosophile et une protéine chez l'homme. Ils ont cloné pour la première fois cette « protéine Toll humaine » ou hToll (ancien nom du TLR4) dans des monocytes humains et ont montré que ces cellules étaient capables d'exprimer des molécules de co-stimulation et de produire des cytokines pro-inflammatoires et ce de manière NF- κ B-dépendante (293). Ces caractéristiques sont nécessaires pour l'activation des T naïfs. Depuis les années 90, 13 récepteurs TLR ont été découverts chez les mammifères dont 10 qui sont exprimés et fonctionnels chez l'Homme (TLR1-TLR10 chez les humains ; TLR1-TLR9 et TLR11-TLR13 chez les souris) mais il est fort probable que le nombre va augmenter dans les années à venir. De plus, certains TLR n'ont pas encore de ligands naturels connus (TLR10, 12, 13).

Sur la base des homologies de séquence, les TLRs des vertébrés peuvent être regroupés en six sous-familles : TLR1/2/6/10, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 et TLR11/12/13 (294). Les TLRs sont exprimés sur diverses cellules immunitaires, y compris les pDCs, les macrophages, les cellules B et T et de même les cellules non immunitaires, telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes, et ont une localisation soit en surface cellulaire soit intracellulaire. Les TLRs exprimés sur la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 5 et 6) reconnaissent largement les composants membranaires microbiens, tandis que les TLR qui se trouvent presque exclusivement dans les compartiments intracellulaires (TLR3, 7, 8 et 9) reconnaissent les acides nucléiques.

3.4.2 Structure

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I (partie N-terminale du côté extracellulaire) traversant soit la membrane plasmique (TLR1, 2, 4, 5, 6) soit celle de l'endosome (TLR3, 7, 8, 9). Leur domaine extracellulaire ou intra-endosomal est le domaine de liaison au ligand ; il comporte des répétitions de motifs riches en leucines (LRR pour leucine rich repeats). Les LRRs sont disposés en forme de fer à cheval (295) et contiennent les séquences xLxxLxLxx, où x représente de nombreux acides aminés et L est la leucine. Les TLRs nécessitent les LRRs pour la reconnaissance des ligands (296). La structure cristalline et le modèle 3D des domaines extracellulaires de nombreux TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 8 et 9) avec leurs PAMP agonistes ou antagonistes ont été caractérisés (295,297–301).

Le domaine cytoplasmique des TLRs est désigné comme Toll/interleukin-1 receptor (TIR) en raison d'une homologie partagée avec les domaines de signalisation des membres de la famille IL-1R (302). Ce domaine est composé de trois régions très conservées appelées box 1, 2 et 3 et est nécessaire pour la signalisation en aval grâce à une interaction avec d'autres protéines contenant le domaine TIR. Sans stimulation, les TLRs se trouvent sous forme monomérique (TLR de surface), homodimérique ou hétérodimérique préformés (endolysosomaux). La dimérisation des TLRs est essentielle à leur activation. La liaison du ligand à l'ectodomaine du TLR induit une modification de sa conformation, ce qui permet l'interaction entre les domaines TIR des dimères TLR. La dimérisation de ces domaines TIR est le signal de départ de la formation d'un complexe très ordonné. En fait, le domaine TIR dimérisé est reconnu par les domaines TIR de protéines adaptatrices telles que MyD88, MAL (Toll-like receptor 4 in MyD88 adapter-like), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-beta) et TRAM (TICAM2 Toll-like receptor adaptor molecule 2) ce qui déclenche ensuite des voies de signalisation en aval conduisant à l'induction de cytokines inflammatoires pour initier la réponse immunitaire adaptative (303). Les TLR sont fortement conservés et partagent des similarités structurales et fonctionnelles.

3.4.3 Voies de signalisation

Tous les TLRs activent une voie de signalisation commune menant à la production de cytokines proinflammatoires via la protéine adaptatrice MyD88. Des études ultérieures ont, toutefois, clairement démontré l'existence d'une voie indépendante de MyD88 qui est propre à la voie de signalisation TLR3 et TLR4 (304). MyD88 possède un domaine TIR dans la partie C-terminale et un domaine de mort (death domain) dans la partie N-terminale. Dans les voies de signalisation dépendantes de MyD88, MyD88 s'associe au domaine TIR des TLRs. Lors de la stimulation du ligand, MyD88 recrute IRAK (interleukin-1 receptor associated kinase) par l'interaction de leurs domaines de mort (305,306). Les mammifères ont quatre membres de la famille IRAK, appelés IRAK1, IRAK2, IRAK3 et IRAK4. IRAK est activé par phosphorylation et s'associe à TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6). Cet événement induit la polyubiquitination de TRAF6 et l'activation du complexe TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase 1) et TAK1/TAB (TAK1 binding

proteïn). Ce complexe TAK1/TAB va stimuler le complexe I κ B kinase (IKK), qui consiste en deux composants catalytiques, IKK α et IKK β , et un composant régulateur, NEMO (NF- κ B essential modifier, connu aussi sous le nom d'IKK γ). Lors de l'activation, le complexe IKK déclenche la phosphorylation rapide de résidus de sérine spécifiques dans les protéines I κ B, une famille de protéines inhibitrices qui maintiennent les facteurs de transcription NF- κ B séquestrés dans le cytoplasme sous forme inactive. Les protéines I κ B phosphorylées sont ensuite polyubiquitinilées et dégradées par le protéasome 26S, permettant la translocation de NF- κ B dans le noyau où il va stimuler des molécules effectrices pour l'immunité innée (307). La famille NF- κ B comprend des facteurs de transcription dimériques qui contiennent des domaines Rel-homology (RHD) présents dans les régions promotrices et les régions enhancer de divers gènes (308). Dans les cellules de mammifères, il existe cinq membres de la famille NF- κ B: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF- κ B1; un précurseur de p50) et p100 (NF- κ B2; un précurseur de P52). Les protéines NF- κ B forment des homo- ou des hétérodimères et régulent l'expression des gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative, l'inflammation, l'anti-apoptose, la prolifération, les réponses au stress et la progression du cancer (308,309). La forme la plus activée de NF- κ B dans la signalisation TLR est un hétérodimère composé de RelA et p50 (310). Cette voie est appelée «voie canonique» et est responsable de l'induction, médiée par les TLRs, de cytokines inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et l'IL-6 (311). En plus de l'activation du complexe IKK, TAK1 peut également recruter des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), telles que les JNKs (c-Jun N-terminal kinases) et p38, pour l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein 1), qui déclenche également la production de réponse pro-inflammatoire (312,313). Par ailleurs, les voies dépendantes de MyD88 médiées par TLR7 et TLR9 recrutent également un autre facteur de transcription, IRF7, pour induire la production d'IFN de type I (314). En outre, la voie passant par MyD88 peut rejoindre la voie passant par TRIF, ce qui explique le fait que le TLR3 peut activer NF- κ B et que le TLR9 (par exemple) peut activer la synthèse d'IFN de type I.

D'autre part, dans les voies de signalisation indépendantes de MyD88, la stimulation des lipopolysaccharides conduit au recrutement des molécules adaptatrices TRAM et TRIF, qui interagissent à leur tour avec TRAF3. TRAF3 induit les IKK non canoniques, TANK-binding kinase 1 (TBK1) et IKK ϵ /IKK ι ce qui active le facteur de transcription IRF3 et induit ainsi l'IFN- β . L'IFN- β , à son tour, active STAT1, conduisant à l'induction de plusieurs gènes inductibles par l'IFN (315,316).

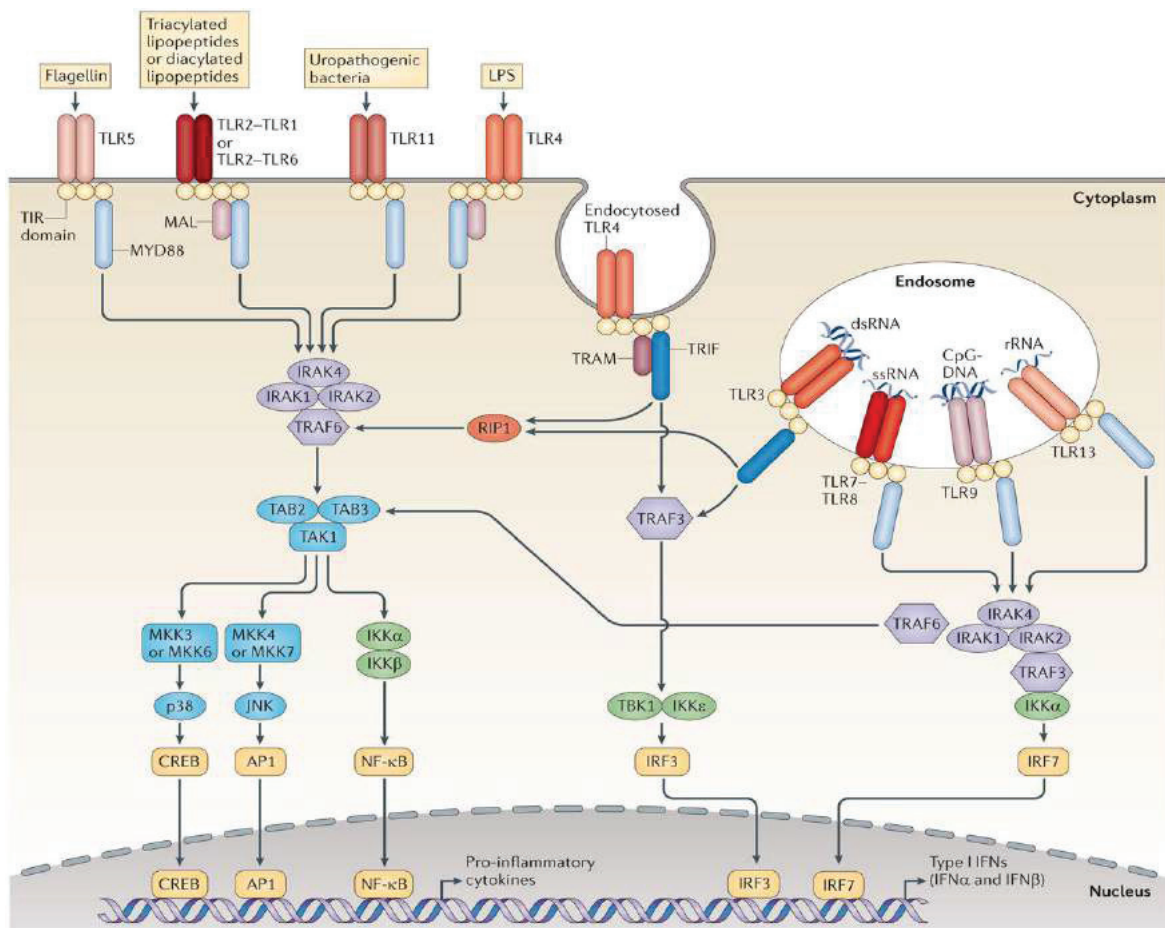


Figure 10: Transduction de signal suite à l'activation des TLRs (317). L'activation des TLRs conduit à la dimérisation des récepteurs et au recrutement de protéines adaptatives telles que MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM. La dimérisation des récepteurs conduit à l'activation des IRAKs-TRAF6 et, par conséquent, du complexe IKK et culmine avec l'activation des facteurs de transcription NF-κB et IRF, qui régulent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN.

3.4.4 TLRs membranaires

Les TLRs de surface (TLR1, 2, 4, 5 et 6) sont impliqués dans la reconnaissance de molécules issues de bactéries et de champignons et peuvent être recrutés dans les phagosomes. Le TLR2 s'associe soit au TLR1 soit au TLR6 pour former des hétérodimères qui vont reconnaître des peptidoglycanes. Chez l'homme, le TLR10, contrairement aux autres TLRs, possède des actions inhibitrices lorsqu'il forme un hétérodimère membranaire avec le TLR2 (204). Le rôle du TLR10 reste toujours mal connu et ne possède pas de ligand naturel identifié à ce jour. Le TLR5 reconnaît la flagelline qui est une protéine structurale du filament flagellaire des bactéries. Ces différents TLRs de surface activent MyD88 et la suite de la signalisation (déjà décrite) après interaction avec leur ligand. Le TLR4, quant à lui, a été l'un des premiers TLRs à avoir été mis en évidence chez les mammifères. C'est un récepteur Toll particulier car il nécessite la contribution d'autres molécules comme la protéine circulaire LBP (LPS-Binding protein) qui va se complexer au LPS circulant. C'est sous cette forme complexée que la protéine membranaire CD14 reconnaît le LPS, qui va alors interagir avec le TLR4, lui-même associé à la protéine MD2 (myeloid differentiation factor 2). MD2 est une protéine soluble qui est associée de manière non covalente

au TLR4. La fixation du ligand au TLR4 active la voie de signalisation et induit ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et les IFN de type I.

3.4.5 TLRs intracellulaires (endosomaux)

Les TLR endolysosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) reconnaissent les acides nucléiques bactériens et viraux. Ils se distinguent aussi de leurs homologues de surface car ils sont synthétisés sous la forme de dimères stables (298,318) (sauf le TLR3 qui est synthétisé sous forme de monomère). Bien que les raisons restent mal connues, le pH légèrement acide de l'endosome est nécessaire à l'activité de ces TLRs (319). Par ailleurs, des endoprotéases activées par des milieux acides (cathepsine, asparagine endopeptidase) clivent les ectodomains des TLR endosomaux (320). Ce clivage serait nécessaire à la pré-activation des TLRs, notamment le TLR9 (321,322). De plus, une hypothèse a été émise quant à la localisation endosomale de ces quatre TLRs: ils sont séquestrés dans les compartiments endosomaux afin d'éviter une reconnaissance des acides nucléiques du soi, et ainsi d'empêcher la survenue de maladies auto-immunes. Le TLR3 reconnaît les ARN double brin (ds) de plus de 35 nucléotides, caractéristiques de certains virus. La liaison d'un ARNs entraîne la dimérisation de deux chaînes de TLR3 dont les domaines TIR vont activer la voie passante par TRIF. Les TLR7 et 8 reconnaissent quant à eux les ARN simple brins (ss). Chez la souris, le TLR8 semble avoir une action inhibitrice sur le TLR7 (323). Le TLR9 (dont nous développerons les caractéristiques dans la suite de ce manuscrit) reconnaît les motifs CpG hypométhylés présents en plus grande quantité sur les ADN bactériens et viraux. Les TLR7/8/9 activent la voie dépendante de MyD88.

3.5 TLR9

TLR9 est le membre le plus étudié de la famille TLRs. Il a d'abord été découvert en 1984 par Tokunaga et ses collègues comme reconnaissant de l'ADN bactérien dans les cellules immunitaires humaines (324). Plus tard, Krieg et al. ont attribué l'activation des cellules B à des motifs d'ADN cytidine-phosphate-guanosine (CpG) fortement conservés dans le génome bactérien et viral (325). En 2000, Hemmi et ses collègues ont montré pour la première fois que la réponse cellulaire à l'ADN CpG est arbitrée par TLR9 chez la souris (326). Un an plus tard, Takeshita et al. clonèrent le gène humain TLR9 (hTLR9) et ont révélé que l'expression de TLR9 est une condition préalable à l'activation de cellules humaines par les CpG DNA (327). La méthylation est décrite comme importante pour la reconnaissance des ligands bactériens et viraux par le TLR9. En effet, l'ADN génomique des organismes eucaryotes se distingue des autres ADN car il est beaucoup plus méthylé, ce qui permet au TLR9 de distinguer le soi du non soi. Mais nous savons maintenant que le TLR9 peut reconnaître d'autres molécules ou que l'ADN bactérien ou viral peut aussi être reconnu par d'autres récepteurs. Par ailleurs, dans un modèle artificiel où le TLR9 est exprimé à la surface de cellules (chimère TLR4/TLR9), ce récepteur est capable de reconnaître de l'ADN du soi (328), appuyant l'hypothèse que la localisation endosomale du TLR9 serait nécessaire au maintien de la tolérance vis-à-

vis d'ADN du soi.

La structure cristalline des trois formes de TLR9 (sans liaison, liée à l'agoniste CpG DNA et liée à l'ADN inhibiteur) a récemment été déterminée (299,329). Cette structure sert de base importante pour améliorer notre compréhension de l'attachement du ligand au TLR9 et à sa fonctionnalité.

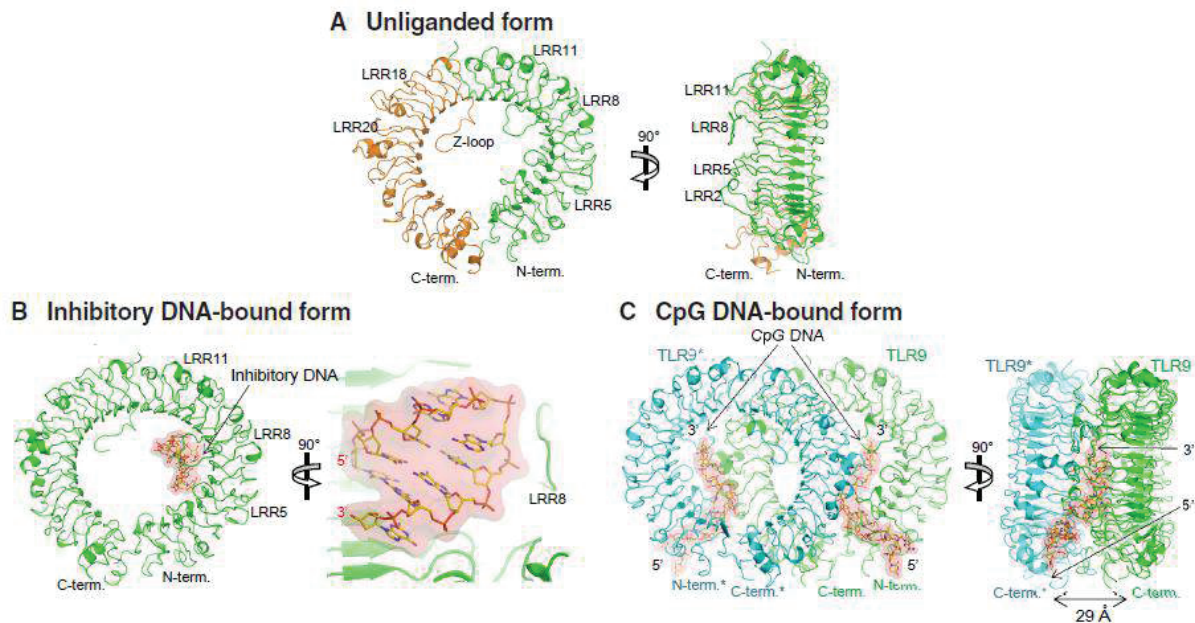


Figure 11: Structure cristalline des trois formes de TLR9 (modifié de (299)). Sans liaison (A), liée à l'ADN inhibiteur (B) et liée à l'agoniste CpG DNA (C).

3.5.1 Du gène à la protéine

Le gène du TLR9 est porté par le chromosome 3 chez l'homme et 9 chez la souris. Il mesure 5,08 kb et possède deux exons. Un polymorphisme du TLR9 existe et certains SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont associés à la maladie de Crohn (330), à l'augmentation de la transmission du virus HIV-1 à l'enfant pendant la grossesse (331) ou encore au risque de développer un cancer de l'utérus (332). Chez l'homme, cinq isoformes issues d'un épissage alternatif des transcrits du gène TLR9 existent : TLR9-A, TLR9-B, TLR9-C, TLR9-D et TLR9-E (221,222). Une région de 975 aa est commune à tous les variants (333). Les isoformes du TLR9 semblent être exprimées de manière différente selon le type cellulaire, leur état de maturation, leur localisation tissulaire ou encore le degré d'inflammation systémique (333). Néanmoins, toutes les isoformes du TLR9 semblent avoir la même capacité à lier leur ligand. Dans la suite de ce manuscrit, TLR9 désignera l'isoforme A qui est la plus décrite.

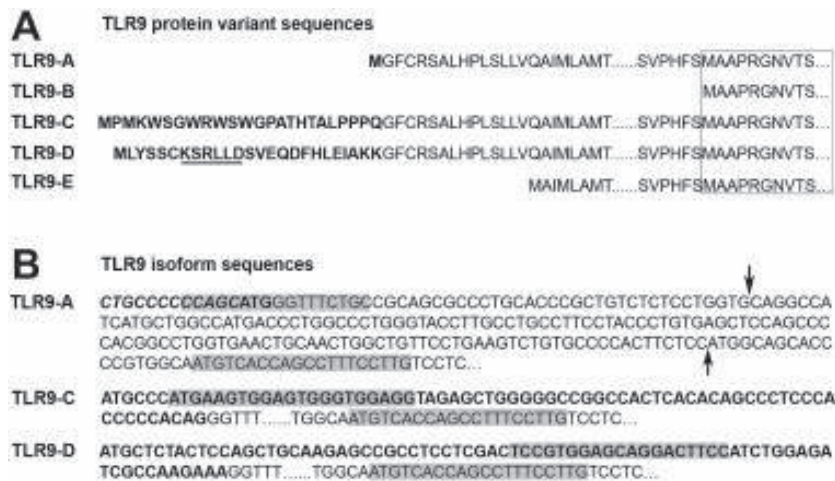


Figure 12 : Comparaison des séquences peptidiques et nucléotidiques des différents isoformes de TLR9 (333). Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription pour les séquences TLR9-B (↑) et TLR9-E (↓) à partir de la séquence TLR9-A canonique.

Le TLR9 est une protéine de 1032 aa composée d'un domaine TIR, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de liaison avec le ligand riche en LRRs (comptant en moyenne 24 résidus). Les domaines LRRs se regroupent sous forme de fer à cheval et, entre les domaines LRR 14 et 15 (approximativement au milieu de l'ectodomaine) se trouve une longue insertion, la boucle Z (299,334). Cette forme décrite du TLR9 est sa forme « full length » inactive. Elle est capable de lier les ligands mais n'initie pas le recrutement de MyD88 (335). Un homodimère inactif peut être formé à partir de deux protéines « full length ».

En absence de stimulation, le TLR9 réside dans le réticulum endoplasmique (RE). Sa migration vers les endosomes va se produire en réponse à une stimulation. C'est dans cet organite que va se dérouler le clivage protéolytique de la fraction N-terminale du TLR9, au niveau de la boucle Z (en position 471) par des enzymes endosomales comme l'asparagine endopeptidase et les cathepsines. Ce clivage aboutit à la formation d'un TLR9 fonctionnel qui va permettre le recrutement de MyD88 (336). Il est à noter que cette réaction est dépendante du pH acide retrouvé dans l'endosome (337).

Les signaux TLR9 conduisant à l'activation de l'IFN de type I, mais pas des gènes de cytokines pro-inflammatoires, nécessitent le trafic de TLR9 des endosomes vers un organite spécialisé lié au lysosome. En outre, le complexe protéique AP3 (adaptor protein-3) est responsable du trafic de TLR9 vers ce compartiment subcellulaire (338). D'autre part, les endosomes IRAP+ ont été identifiés comme les principaux compartiments cellulaires pour les premières étapes de l'activation du TLR9 dans les DCs. IRAP peut stabiliser les endosomes contenant CpG en interagissant avec le facteur de nucléation de l'actine FHOD4, ce qui a ralenti le trafic de TLR9 vers les lysosomes. Ainsi, la rétention endosomale de TLR9 via l'interaction de IRAP avec le cytosquelette d'actine est un mécanisme qui empêche l'hyperactivation de TLR9 dans les DCs (339).

3.5.2 Expression du TLR9 et reconnaissance des pathogènes

Le TLR9 est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes B, pDC, NK, lymphocytes T NK (NKT)) (340–344) mais aussi par des cellules non immunes (cellules épithéliales pulmonaires, intestinales, kératinocytes, neurones) (345–347).

Le TLR9 humain reconnaît les îlots de CpG non méthylés trouvés dans l'ADN bactérien et viral (326). Parallèlement à d'autres partenaires comme TLR2 et TLR4, TLR9 est un acteur clé de la réponse immunitaire innée et adaptative contre plusieurs espèces bactériennes telles que *Mycobacterium tuberculosis* (348), *Brucella* (349), *Streptococcus pneumoniae* (350) et *Helicobacter pylori* (351). Plusieurs virus d'ADN contenant ces îlots CpG dans leur génome tels que l'adénovirus, le virus de l'herpès simplex (HSV) 149 et 2, le virus de l'herpès gamma murin (MHV) 68, le cytomégalovirus de souris (MCMV) et HPV16 sont reconnus par TLR9 (352–355).

3.5.3 Activation du TLR9

Des études récentes ont montré que la liaison de l'ADN contenant des CpG, mais pas de l'ADN dépourvu de CpG, aux dimères de TLR9 entraîne des changements de conformation dans les domaines de signalisation cytoplasmique TLR9 (306,318) qui favorisent le recrutement de molécules adaptatrices de signalisation. La spécificité CpG facilite la reconnaissance d'un large éventail de microbes, mais introduit le potentiel de reconnaissance d'acides nucléiques du soi ce qui contribue à des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (SLE) (356,357). La discrimination entre le soi et les acides nucléiques microbiens ne peut être obtenue uniquement grâce à la reconnaissance de caractéristiques distinctes, mais dépend plutôt de la distribution différentielle de ces ligands potentiels aux TLRs (358). Tous les TLRs capables de reconnaître des acides nucléiques se localisent dans des compartiments endosomaux qui préservent ces récepteurs loin des acides nucléiques du soi se trouvant dans l'espace extracellulaire (358).

Les TLR endosomaux sont reconnus par une protéine chaperonne : UNC93B1. Cette protéine est retrouvée dans le réticulum endoplasmique (RE) et est essentielle pour l'adressage des TLR endolysosomaux depuis le RE vers l'appareil de Golgi (359). UNC93B1 se lie aux TLR destinés à une localisation endosomale, dirige ces protéines vers l'appareil de Golgi via l'empaquetage dans des vésicules coatées de COPII (coat protein complex II) (transport antérograde classique des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi). UNC93B1 facilite aussi le transport des TLR7 et 9 depuis l'appareil de Golgi vers les endosomes via la mise en jeu respectivement des protéines adaptatrices AP4 ou 1 (adaptator protein complex) (359,360). Contrairement au TLR7 qui rejoint directement les endosomes grâce à AP4, le TLR9 couplé à UNC93B1 rejoint la membrane plasmique de manière transitoire grâce à son interaction avec AP1 (319). Le couple TLR9-UNC93B1 est ensuite pris en charge à la membrane par AP2 qui va permettre leur localisation endosomale (361,361). Ainsi, le TLR9 se trouve de manière transitoire à la surface de la cellule mais la conformation à cette interface reste inconnue. Une fois acheminé vers les

endolysosomes, TLR9 est clivé par des protéases résidentes et la forme tronquée fonctionnelle du récepteur est capable de lier MyD88 et d'initier la signalisation en aval (362).

3.5.4 Signalisation du TLR9

Lors de la translocation à l'endosome, le récepteur TLR9 reconnaît les ligands et recrute la protéine adaptatrice MyD88, ce qui conduit à l'activation des voies de signalisation en aval, y compris NF- κ B et MAPK (363). Après sa stimulation, MyD88 recrute et active IRAK4 à travers les domaines de mort. L'activation de IRAK4 entraîne sa dissociation de MyD88 et son association avec TRAF6, qui active (i) IRF5 et l'hétérodimère NF- κ B RelA-p50 pour l'induction de cytokines inflammatoires et (ii) IRF7 pour l'induction de l'IFN-1 (364,365).

IRF7 est l'un des plus importants membres de la famille IRF impliqués dans la production d'IFN de type I. En effet, il a été démontré qu'IRF7 est exprimé de manière constitutive dans les pDCs et, de ce fait, les souris déficientes en IRF7 ne produisent pas d'IFN- α à partir de pDCs en réponse à des stimuli (314). Notamment, l'induction d'IFN de type I par TLR7 et TLR9 dépend absolument de MyD88 (366).

3.5.5 Ligands de TLR9

3.5.5.1 Ligands synthétiques du TLR9

Les effets de l'ADN peuvent être mimés par des oligonucléotides synthétiques simple brin riches en motif CpG : les CpG-ODN (327). Il est à noter que les mêmes ODN portant des motifs GpC ne sont pas activateurs. L'activation cellulaire par les CpG-ODN induit la surexpression du CMH de type II et de molécules de costimulation, la présentation de l'antigène par les APC, la production de cytokines type Th1, de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-8, IL-6) et d'IFN de type I par les pDCs (325). Différentes classes d'ODN ayant des séquences et des activités biologiques distinctes ont été créées:

- les CpG-ODN de classe A (aussi appelés classe K) sont composés d'une séquence palindromique phosphodiester (liaison P=O) centrale ainsi qu'une queue 3' poly-G phosphorothioate (liaison P=S) leur permettant de former des structures secondaires et leur conférant une résistance aux nucléases. Ces structures permettent une forte stabilité et augmentent la prise en charge de ces ODN vers l'endosome. Ils ont la capacité d'induire la maturation des pDCs et leur production d'IFN de type I mais sont de mauvais activateurs de la voie NF κ B (367).
- Les CpG-ODN de classe B (aussi appelés classe D) sont des ODN monomériques à squelette phosphorothioate contenant un ou plusieurs dinucléotides CpG. Ils peuvent activer différentes cellules, induire la production de cytokines pro-inflammatoires, induire la prolifération et la maturation des LB, mais n'induisent pas ou peu la production d'IFN de type I (367,368).

- Les CpG-ODN de classe C combinent la structure et les effets des deux classes précédentes. Cette classe d'ODN permet la production d'IFN de type I ainsi que l'activation des LB et DC (369).

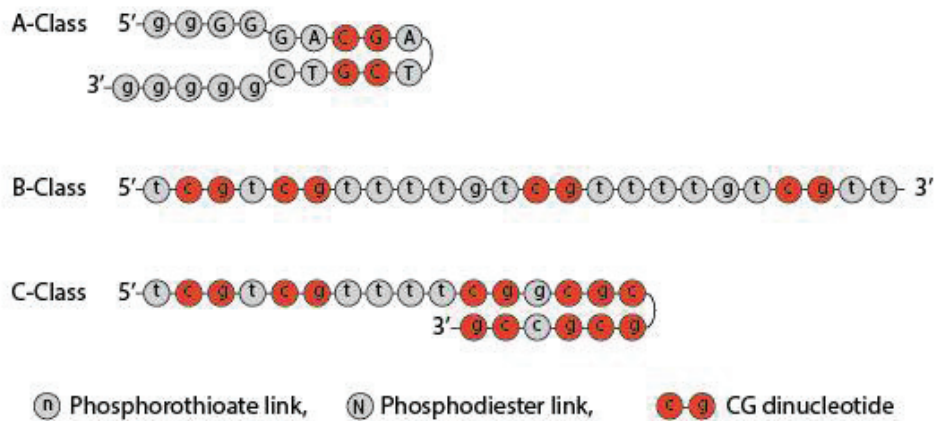


Figure 13 : Caractéristiques structurales des différentes classes de CpG-ODN (invivogen.com).

Il existe par ailleurs des ODN synthétiques antagonistes. Par exemple, ceux contenant des motifs formés de plusieurs G (G-ODN) inhibent l'activation induite par le TLR9.

3.5.5.2 Ligands naturels du TLR9 : PAMP et DAMP

La reconnaissance de l'ADN est essentielle pour lutter contre les pathogènes mais peut aussi induire des réponses auto-immunes. Parmi les ligands naturels du TLR9, en plus des ADN dérivés de pathogènes (Se référer à : « Expression du TLR9 et reconnaissance des pathogènes »), on retrouve des ligands endogènes, de l'ADN du soi ou encore des DAMP. Les DAMP sont des molécules relarguées après une atteinte tissulaire. Ils peuvent être de nature protéique (issus du noyau, des membranes, du cytoplasme, du RE) ou peuvent être des acides nucléiques (ADN, ARN, nucléotides). L'ADN mitochondrial par exemple, quand il est relargué par les cellules en apoptose, nécrose, autophagie ou lors de blessures du tissu est considéré comme un DAMP (370).

3.5.6 Immunomodulation cellulaire induite par le TLR9

Les cellules exprimant le TLR9 produisent principalement des cytokines, des interférons et des chimiokines pro-inflammatoires Th1. Cependant, la production de cytokines dépend de nombreux facteurs tels que le type cellulaire et le type de stimulus de CpG (371). Dans les lymphocytes B, ODN CpG induit la production d'IL-6 et d'IL-10 en quelques heures (372). Les pDCs sont considérés comme le producteur le plus efficace de cytokines dans la signalisation TLR (373). En réponse à l'ADN CpG, les pDCs sécrètent des cytokines (IL-6, TNF α), de l'interféron (IFN- α) et des

chimiokines (IL-8) (371).

Suite à la stimulation de TLR9 par des classes distinctes d'oligonucléotides CpG (CpG ODN), les cellules B sont induites à proliférer et à sécréter des IgM et des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8 et TNF α . Elles jouent également une fonction de présentation d'antigène, commutation d'isotype d'Ig et survie cellulaire dans le cas des cellules plasmiques et des cellules B mémoire (342). Dans le contexte de la réponse des cellules B, la stimulation de TLR9 fournit un troisième signal qui, avec l'anti-BCR (signal un) et le CD40L (signal deux) entraîne la prolifération et la différenciation des cellules B naïves humaines. Alors que les signaux un et deux ensemble sont suffisants pour générer une prolifération initiale des cellules B naïves, ils ne parviennent pas à soutenir l'expansion des cellules B et ces dernières meurent après quelques divisions. La stimulation TLR9 sauve les cellules B en prolifération et ces dernières commutent progressivement l'isotype et se différencient en cellules plasmiques (374,375). D'autre part, la stimulation de TLR9 améliore les fonctions de présentation de l'antigène des cellules B (376). Ainsi, TLR9 est important pour l'activation des cellules B et donc pour induire leurs fonctions. Plus loin, nous allons résumer comment HBV abroge la fonction TLR, en mettant l'accent sur TLR9.

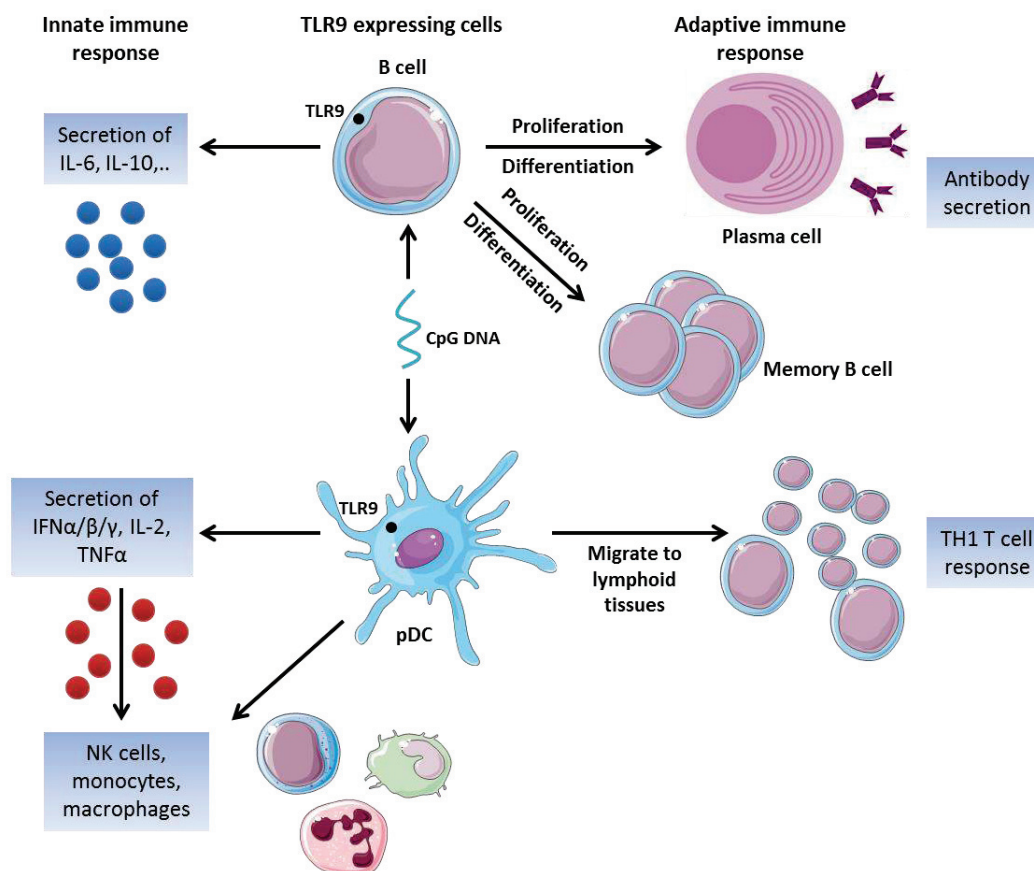


Figure 14: Activation des cellules B et pDCs exprimant le TLR9.

3.5.7 Régulation transcriptionnelle du TLR9

En 2004, Takeshita et al. clonèrent la région flanquante 5' du gène hTLR9 et ont pu caractériser l'activité de son promoteur en comparant les mutants de délétion de hTLR9 au promoteur hTLR9 complet (full length) (-3227 à -1 par rapport au site de transcription) dans un essai de gène rapporteur effectué dans la lignée cellulaire de myélome humain RPMI 8226. De manière intéressante, la délétion (-3227 à -800 pb) sur l'extrémité 5' n'a pas affecté l'activité du promoteur montrant que les éléments critiques pour la régulation transcriptionnelle de hTLR9 sont situés dans une région en amont de 800 pb (377). Dans cette même étude, ils montrent que la régulation de la transcription de hTLR9 est contrôlée par quatre éléments en cis : CRE, 5'-PU box, 3'-PU box et le site C/EBP. Les facteurs de transcription CREB1 (cyclin AMP responsive element binding protein 1), Ets2, Elf1 (E74-like factor 1), Elk1 et C/EBP α (CCAAT-enhancer binding protein α) activent le promoteur en interagissant avec ces éléments en cis, alors que la suppression était médiée via Spi1 (PU.1), c-Jun et NF- κ B p65 (377).

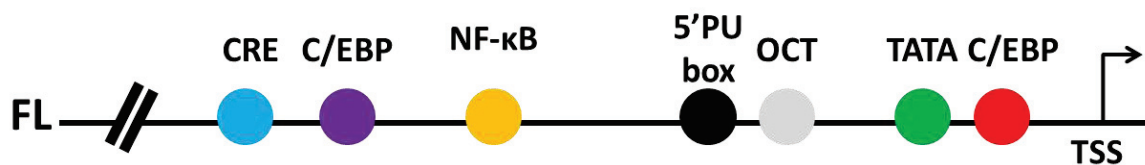


Figure 15 : Promoteur TLR9 avec les sites de liaison pour des facteurs de transcription régulateurs localisés dans une région en amont de 800 pb.

CREB est exprimé dans le noyau des cellules. Lors de son activation par phosphorylation au site serine 133 par la p-PKA, CREB se lie à la CBP (CREB binding protein) et peut se lier au site CRE. CREB a un rôle bien documenté dans la plasticité neuronale et la formation de la mémoire à long terme, bien que des preuves émergentes aient révélé des fonctions spécifiques de CREB dans les réponses immunitaires, y compris l'inhibition de l'activation du NF- κ B, l'induction de la survie des macrophages, l'induction de la prolifération, de la survie et la régulation des cellules T et B (378).

Plus tard, plusieurs facteurs ont été impliqués dans l'activation de la transcription de TLR9 dans différents types de cellules. Par exemple, il a été montré que TGF- α , un facteur de croissance et de différenciation qui est présent pendant la cicatrisation et dans le psoriasis, a augmenté l'expression et l'activité de TLR9 et TLR5 dans les kératinocytes (345).

Récemment, notre équipe a montré que l'activation de TLR9 par le DNAdS induit une boucle de rétroaction négative régulatrice temporaire qui bloque la transcription et la fonction de TLR9. Ce qui signifie que TLR9 s'autorégule. En effet, l'engagement du

récepteur TLR9 induit le recrutement d'un complexe suppressif, consistant en NF- κ B et HDAC3, vers un élément cis NF- κ B sur le promoteur TLR9 (379). Différents virus ont montré des capacités de dérégulation de la transcription de TLR9, en tant que stratégie pour échapper à l'invasion immunitaire. On détaillera ces découvertes plus loin.

3.6 Interaction entre TLRs et HBV

Il existe de nombreuses études montrant que la branche innée du système immunitaire de l'hôte joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par le HBV (380–382). Les études précédentes chez les chimpanzés et chez les patients ont montré que l'infection par le HBV ne conduit pas à une réponse IFN de type I mesurable. En revanche, un grand nombre de gènes régulés par l'IFN γ sont exprimés dans le foie lors de la clairance virale. Ainsi, l'infection par le HBV diffère d'autres infections virales comme l'infection par le HCV en phase précoce, car le HCV induit une forte réponse IFN- α chez les chimpanzés (198). Dunn et al. (168) ont mesuré la production d'IFN de type I chez les patients atteints d'une infection aiguë par le HBV et n'a trouvé qu'un faible niveau d'IFN de type I pas plus élevé que ceux observés dans les témoins sains. Le manque de réponse précoce de l'IFN *in vivo* pendant l'infection aiguë du HBV n'exclut pas nécessairement le déclenchement des réponses de l'IFN hôte par le HBV.

En fait, HBV est un « stealth virus » capable d'échapper à l'immunité innée et cela peut s'expliquer par deux hypothèses: l'incapacité du HBV à activer les PPRs (ou une activation très faible) ou l'inhibition virale des voies de signalisation PPRs. Beaucoup d'études soutiennent la deuxième hypothèse selon laquelle HBV est capable d'interférer avec les voies de signalisation PPRs et que l'expression et la fonction des divers TLRs sont réduites pendant l'infection par le HBV. En utilisant les hépatocytes et les Kupffer cells (KC) isolés de biopsies de foie à partir de patients atteints d'hépatite B chronique, Visvanathan et al. (383) ont d'abord décrit une diminution significative de l'expression de TLR2 sur les hépatocytes, les KC et les monocytes périphériques chez les patients CHB HBeAg⁺ en comparaison avec les patients HBeAg⁻ et les contrôles sains. HBeAg, lorsqu'il est exprimé par transduction à travers un vecteur baculoviral recombinant, a pu inhiber l'induction de TNF α dans les lignées de cellules hépatiques (383). De plus, Chen et al. (208) ont également montré que les taux d'ARNm et de protéines de TLR2 étaient significativement diminués dans les PBMCs provenant de patients CHB. De plus, les protéines virales, telles que la polymérase et la protéine HBx, pourraient interférer avec les voies de signalisation intracellulaires, empêchant les réponses IFN dans les hépatocytes. On a signalé que la polymérase de HBV inhibait l'induction de l'IFN- β médiée par TLR3 dans les hépatocytes humains en dérégulant l'activation de l'IRF3 (267). Une autre étude récente a également démontré que la polymérase du HBV a supprimé la signalisation NF- κ B induite par le TNF α , TLR3 ou TLR4 en inhibant l'activité des IKKs via une interaction avec Hsp90b dans les cellules d'hépatome (384). HBV et ses particules virales pourraient inhiber l'activation des NPCs par les ligands TLR3 (385,386). La co-culture de NPCs hépatiques avec des surnageants de

cellules HBV-Met, HBsAg, HBeAg ainsi que des virions HBV entraîne une abrogation de l'activité antivirale induite par TLR, corrélée avec une diminution de l'activation de IRF3, NF- κ B et ERK1 / 2 dans les NPCs (386). Wang et al. (212) ont montré que HBsAg inhibe la stimulation des PBMC humaines et la production d'IL-12 médiée par TLR2. En présence de HBsAg, l'expression des mRNA de l'IL-12p40 activée par Pam3CSK4 et la production d'IL-12 dans les macrophages THP-1 différenciés par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) sont réduites de manière dose-dépendante, tandis que la production d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 et TNF α n'est pas affectée. La présence de HBsAg inhibe l'activation de NF- κ B et MAPK médiée par TLR2, par abrogation sélective de la phosphorylation de JNK-1/2 et c-Jun. Ainsi, HBsAg interfère probablement avec l'initiation de réponses immunitaires adaptatives par inhibition sélective de la production d'IL-12 stimulée par TLR2 dans les monocytes. Le tableau 2 résume les mécanismes employés par HBV pour atténuer les réponses immunitaires médiées par les TLRs.

Tableau 2: Mécanismes employés par HBV pour contrer les réponses immunitaires médiées par les TLRs

Modèle	Mécanisme	Protéine HBV impliqué	Référence(s)
PBMCs de patients CHB	Diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires induites par les ligands TLR2 et TLR4	HBsAg	(208)
Monocytes/macrophages	Interférence avec les voies ERK, JNK et NF- κ B induites par TLRs	HBsAg	(209,210,387)
Cellules dendritiques myéloïdes	Diminution de la fonction des cellules dendritiques myéloïdes	HBsAg	(213)
Cellules dendritiques plasmacytoïdes	Abrogation de la production d'IFN α médiée par TLR9	HBsAg	(388,389)
Porteurs HBsAg chroniques murins	Diminution du nombre et détérioration de l'activation des cellules NK hépatiques	HBsAg	(191)
Patients CHB HBeAg+	Interférence avec les réponses immunitaires innées médiées par les TLRs et régulation du TLR2	HBeAg	(383,390)
Cellules murines parenchymateuses et non parenchymateuses du foie	Suppression des réponses immunitaires innées médiées par les TLRs	HBV et particules virales	(385)
Lignées HepaRG et hépatocytes humains primaires	Inhibition des voies de signalisation du TLR3 et de la voie RIG-I / MDA5	HBV	(207)
Patients CHB	Suppression de l'activation de la voie de signalisation de TLRs ainsi que de la régulation négative de la signalisation cellulaire médiée par IL-18 et de l'expression d'IFN γ	HBeAg	(391)
Patients CHB	Inhibition de TLR7 et TLR9	HBV	(392)

Hépatocytes humains	Inhibition de l'induction de l'IFN- β médiée par TLR3 via l'interférence avec l'activation de l'IRF3	HBV polymérase et HBx	(267)
Cellules d'hépatome	Suppression de la signalisation NF- κ B induite par TNF α , TLR3 ou TLR4 en inhibant l'activité des IKKs via l'interaction avec Hsp90b	HBV polymérase	(384)
Hépatocytes, cellules de Kupffer et monocytes périphériques	Régulation de l'expression de TLR2	HBeAg	(383)
Hépatocytes	Bloque la signalisation PRR (activation IRF) via l'interaction avec DDX3	HBV polymérase	(211)

3.6.1 TLR9 et HBV

Le rôle de la signalisation TLR9 dans les cellules B (prolifération cellulaire et production d'anticorps) et dans les pDCs (sécrétion d'IFN) pendant l'infection aiguë du HBV pourrait être pertinent compte tenu de l'importance de la réponse humorale dans la pathologie de l'infection par le HBV et mérite donc plus d'attention. Il est intéressant de noter que différents oncovirus ont montré les capacités de dérégulation de la transcription de TLR9, en tant que mécanisme potentiel pour échapper à l'évasion immunitaire(354,393–395). Les oncoprotéines E6 et E7 de HPV16 abolissent la fonctionnalité de TLR9 dans les kératinocytes humains en altérant l'activité du promoteur de TLR9 (354,393). L'oncoprotéine LMP1 de l'EBV a également contribué à une régulation négative de l'expression de TLR9 dans les cellules B, grâce à l'activation de la voie NF- κ B médiée par LMP1 (395). Et une autre étude a montré qu'un virus oncogène, le polyomavirus de cellule de Merkel (MCPyV), est également capable de déréguler l'expression de TLR9 dans les cellules dérivées du carcinome épithélial et de Merkel par l'antigène T (LT) élevé (394).

Durant l'infection chronique par le HBV, les pDCs présentent une expression de TLR9 réduite et une capacité altérée de sécréter l'IFN- α après une stimulation *ex vivo* avec des ligands TLR9 (388,396,397). Les virions HBV ont pu inhiber directement la transcription de TLR9 par régulation négative de l'activité du promoteur TLR9 en bloquant l'axe MyD88-IRAK4 (388). Xu et al. ont démontré que l'HBsAg peut inhiber l'expression de l'IRF7 et sa translocation nucléaire médiées par TLR9 en stimulant l'expression de SOCS-1 (389).

Martinet et al. ont constaté que les pDCs provenant de patients CHB avaient des réponses défectueuses à la stimulation avec des ligands TLR9 et étaient incapables d'induire une activité cytolytique des cellules NK (398). Ratnam et al. ont rapporté que les cellules NK stimulées des patients infectés par le HBV avaient une diminution de la réponse de l'interféron γ aux ligands TLR9 par rapport aux témoins (399). En effet, les patients atteints d'une infection chronique contre l'hépatite B présentent une carence en cellules dendritiques plasmacytoïdes avec une expression réduite de

TLR9 (396).

Dans l'ensemble, l'analyse des PBMCs issus de patients atteints d'hépatite B chronique et de carcinome hépatocellulaire associé au HBV suggère que les niveaux d'ARNm de TLR9 sont diminués et que la protéine TLR9 est considérablement réduite chez les patients CHB et HCC.

Dans leur étude, Vincent et al. ont également montré que le HBV conduit à une régulation négative du TLR9 au niveau transcriptionnel dans les pDCs et les cellules B dans lesquelles les niveaux d'ARNm et de protéines TLR9 ont été altérés (388). Par ailleurs, l'expression de TLR9 est aussi altérée sur les monocytes CD14+ périphériques issus de patients CHB (400).

Donc en résumé, la dérégulation des TLRs par HBV est un mécanisme bien décrit dans la littérature et surtout dans les pDCs qui jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire (cellules présentatrices de l'antigène et assurant la transition entre la réponse innée et la réponse adaptative) contre le HBV. Cependant, la dérégulation et l'effet du HBV sur le niveau de TLR9 dans les lymphocytes B ont beaucoup moins été décrits et méritent plus de recherche vu le rôle pivot des cellules B dans le cours de l'hépatite B. Les lymphocytes B sont non seulement les cellules productrices d'anticorps anti-HBs neutralisants mais aussi jouent le rôle de présentation de l'antigène pour activer les cellules T CD4+ et par suite la réponse adaptative contre le HBV. Tous ces résultats suggèrent que la régulation négative du TLR9 est probablement une étape cruciale dans le cours de la maladie hépatique induite par les virus.

OBJECTIF

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B reste un problème de santé majeur dans le monde entier. Les réponses efficaces des cellules B, notamment avec la production d'anticorps neutralisants, sont essentielles pour éliminer l'infection; Le HBV peut altérer les voies immunitaires afin de persister et d'augmenter l'infection. Le Toll-like receptor 9 (TLR9) est un récepteur inné endosomal bien exprimé dans les cellules B, et qui permet la reconnaissance de l'ADN viral. Les études précédentes ont montré l'altération de l'expression de TLR9 par le HBV notamment dans les pDCs mais par contre son impact sur les cellules B reste mal défini. Dans cette étude, nous visons à déterminer et bien caractériser l'effet de HBV sur l'expression et la fonctionnalité de TLR9 dans les cellules B humaines telles que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la prolifération. Ensuite, en utilisant une lignée de cellules B ainsi que des cellules B primaires, nous voudrions déterminer le mécanisme par lequel le HBV peut agir sur le promoteur TLR9 et modifier son activité. Par ailleurs, nous visons à identifier l'action du HBV sur les différentes sous-populations de cellules B du sang périphérique. Finalement, nous voulons corroborer les résultats obtenus *in vitro* dans une cohorte de patients atteints d'hépatite B chronique pour déterminer si on observe les mêmes altérations fonctionnelles du TLR9 et les conséquences éventuelles de cette altération sur le système immunitaire de l'hôte.

Ces résultats fourniront de nouvelles indications sur les stratégies d'échappement immunitaire oncoviral ce qui renforcera les connaissances pour développer de nouvelles approches immunothérapeutiques chez les patients atteints de CHB.

RESULTATS

Article: Hepatitis B virus blocks the CRE/CREB complex and prevents TLR9 transcription in human B cells

Résumé:

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) est un problème de santé majeur dans le monde et peut conduire à la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Des réponses déficientes des cellules T ont été démontrées, mais les événements précis qui peuvent contribuer à l'insuffisance des réponses des cellules B restent à déterminer. L'expansion et la différenciation optimales des cellules B reposent sur l'activité du récepteur Toll Like Receptor 9 (TLR9) qui détecte l'ADNdb et est exprimée chez l'homme principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les cellules B. L'impact de HBV sur TLR9 dans les cellules B humaines reste à explorer. Dans cette étude, nous avons exploré les effets de HBV sur l'expression et les fonctions médiées par TLR9 dans les cellules B humaines en utilisant une lignée cellulaire de cellules B ainsi que des lymphocytes B primaires. De plus, on a corroboré nos résultats dans une cohorte de patients HBV chroniques. L'expression de TLR9 a été réduite chez toutes les sous-populations de cellules B du sang périphérique, exposées au VHB. Les fonctions des cellules B médiées par TLR9 comme la prolifération et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ont été abrogées en présence de HBV. Nos résultats montrent que l'antigène de surface HBsAg inhibe la phosphorylation du facteur de transcription CREB qui ne peut plus se lier sur son site CRE situé sur le promoteur TLR9 ce qui affecte la transcription de ce dernier. Enfin, nous avons corroboré nos résultats in vitro dans une cohorte de porteurs chroniques du HBV et constaté que l'expression et la fonction de TLR9 étaient significativement diminuées. Nos résultats révèlent le mécanisme qui induit une réponse immunosuppressive par HBV sur la fonction TLR9 dans les cellules B humaines, ce qui peut contribuer à la persistance de ce virus chez l'hôte et la complication de la phase chronique de la maladie.

Importance de cette étude :

Qu'est-ce qui est déjà connu sur ce sujet?

- Toll Like Receptor 9 (TLR9) détecte l'ADNdb et est exprimé chez l'homme principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et B.
- Durant l'infection chronique par HBV, les réponses TLR9 dans les pDC sont altérées.
- L'absence de réponses efficaces des lymphocytes B et surtout le manque de production des anticorps neutralisants anti-HBs est une des conséquences du CHB.
- L'effet du HBV sur TLR9 dans les cellules B humaines est inconnu.

Quelles sont les nouvelles découvertes?

- HBV bloque l'expression de TLR9 sur toutes les sous-populations de cellules B humaines.
- La prolifération des cellules B et la production de cytokines médiées par TLR9 sont abrogées par HBV.
- HBV inhibe l'activité du promoteur TLR9 dans les cellules B humaines.
- L'inhibition de la voie pPKA / pCREB par HBsAg conduit à une réduction de la transcription de TLR9.
- TLR9 pourrait jouer un rôle central dans l'infection par HBV.

Quel impact cela pourrait-il avoir sur la pratique clinique dans un avenir prévisible?

Cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'altération du TLR9 et de la conséquence de cette altération sur la fonction des cellules B et donc aide à mieux comprendre la façon dont HBV maintient une infection persistante. En parallèle avec le traitement antiviral, de futures études peuvent être dirigées pour améliorer les ligands actuels de TLR9 pour améliorer les réponses immunitaires contre HBV chez les patients présentant une infection chronique prolongée.

Tout et al., soumis à « Journal of Immunology »(IF=5.287), 2017

Title: Hepatitis B virus blocks the CRE/CREB complex and prevents TLR9 transcription and function in human B cells.

Authors: Tout I¹⁻⁵, Gomes M⁶, Ainouze M¹⁻⁵, Marotel M¹⁻⁵, Pecoul T¹⁻⁵, Durantel D⁷, Vaccarella S⁸, Loustaud Ratti V⁶, Walzer T¹⁻⁵, Alain S⁶, *Chemin I⁷, *Hasan U¹⁻⁵.

¹Centre International de recherche en Infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Lyon, France

²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁴École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, France

⁵Hospices Civils de Lyon, France

⁶CHU Dupuytren – 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France

⁷Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Lyon, France

⁸International Agency for Research on Cancer, Lyon, 69372 CEDEX 08, France

**Corresponding authors*

Isabelle CHEMIN: isabelle.chemin@inserm.fr ; tel: +33 4 72 68 19 70

Uzma HASAN : uzma.hasan@inserm.fr ; tel : +33 4 26 23 59 78

ABSTRACT

Background and aims. Chronic HBV infection is a major health problem worldwide. Ineffective T cell and antibody responses have been demonstrated, yet the precise events that may contribute to insufficient B cell responses remain to be determined. Optimal B cell function, expansion and differentiation rely on Toll Like Receptor 9 (TLR9) activity. However, the impact of HBV on TLR9 in human B cells remains to be explored. Here, we investigated the effects of HBV on TLR9 function in human B cells.

Methods. Both primary and B cell lines were used to analyze the effect of HBV on TLR9 expression and function. Techniques employed were Flow cytometry, Image Stream, Electron Microscopy, qPCR, Immunoblotting, EMSA, Oligo pull down, ELISPOT and ELISA. Furthermore, B cells were analyzed for TLR9 expression and function in chronically infected HBV patients' vs healthy controls.

Results. TLR9 expression was reduced in all naïve, memory and plasma B cells exposed to HBV. B cell function mediated by TLR9 such as proliferation and pro-inflammatory cytokines secretion were abrogated in the presence of HBV. We found that HBsAg inhibited the phosphorylation of the transcription factor CREB which could no longer bind the CRE site on the TLR9 promoter. Finally, we corroborated our *in vitro* findings in a cohort of chronic HBV carriers and found that TLR9 expression and function were significantly suppressed.

Conclusions. Our findings reveal the mechanism that induces an immunosuppressive response by HBV on TLR9 function in human B cells, which may contribute to HBV persistence in the host.

INTRODUCTION

Infection with human hepatitis B virus (HBV) in immunocompetent adults results in transient liver disease leading to acute viral infection. However, 5 to 10% of adults and 80 to 90% of children develop a chronic infection[1]. Over 240 million people worldwide are chronically infected with HBV and are at high risk to develop liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[2]. Chronic HBV infection (CHB) occurs because the antiviral immune response is insufficient. Although ineffective T cell and antibody responses have been demonstrated, the precise events that may contribute to insufficient B cell responses remain to be determined[3]. B cells play an essential role in humoral immunity as well as capturing antigens for presentation, producing immunomodulatory cytokines, influencing T cell and DC responses[4]. B cell function, expansion and differentiation are controlled by three signals; the first two are BCR cross-linking and CD40/CD40L signaling, the third signal is delivered by Toll like receptors (TLR) 7 or TLR9 in response to infection. Combination of the three signals allows for optimal antibody responses towards T cell-dependent antigens[5].

TLR9 recognizes DNA sequences from bacteria or viruses in the form of unmethylated CpG motifs. In humans, TLR9 expression in human is restricted to plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and B lymphocytes[6]. Upon TLR9 stimulation by distinct classes of CpG oligonucleotides (CpG ODN), pDCs are activated to produce IFN- α/β and various chemokines, and B lymphocytes proliferate, differentiate and secrete cytokines and antibodies. The B cell population in the peripheral blood is composed of naive, memory and plasma cells. Naive and memory B cells produce cytokines such as IL-2, IL-4, TNF α and IL-6 in response to TLR9 stimulation. Following development, B cells migrate to peripheral lymphoid organs and recirculate in blood where they require external signals for survival and constitute IgD⁺ naïve mature B cells reservoir. Cells that recognize their cognate antigen are activated, proliferate and differentiate into CD27⁺ memory B cells or effector cells, i.e. CD38^{hi} antibody-producing plasma cells[7].

HBV is primarily hepatotropic, yet accumulating evidence strongly supports its extra-hepatotropic nature. In fact, the dsDNA genome of HBV, as well as viral transcripts and proteins, have been found in the peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) including B cells from carriers chronically infected with the virus[8]. The Hepatitis B surface antigen (HBsAg) is the most abundant HBV protein in the liver and peripheral blood of patients with CHB. Numerous studies have shown direct interactions between HBV-encoded proteins and innate immune responses, suggesting that HBV has developed multiple mechanisms to counteract the host cellular defense. Anti-viral immune responses by pDCs, Kupffer, NK and T cells are reduced due to HBV infection[9–11]. Furthermore, several reports have shown specific interactions with viral proteins from HIV, EBV and HPV with regulatory molecules that impair TLR9 expression and/or signaling[12,13]. HBV has been shown to impair specifically TLR9, but not TLR7 function in pDCs by decreasing the amount of IFN α upon

TLR9 stimulation[14]. By contrast, very little is known about the impact of HBV or HBV components on B cell physiology. Therefore we tested the effect of HBV infection on TLR9 cell expression and function on human B cells using complementary *in vitro* systems and cohorts of CHB patient samples.

MATERIALS AND METHODS

Peripheral blood mononuclear cells and B cells isolation

Human blood from healthy subjects was obtained from the French blood agency (Etablissement Français du sang, Lyon, France). Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from peripheral blood of healthy donors by gradient centrifugation on Ficoll (AbCys Eurobio) at room temperature. For the clinical study, cells were suspended in heat-inactivated fetal calf serum (FCS) with 20% DMSO, progressively cooled down to -80°C, and stored in cryotubes in liquid nitrogen. B cells were negatively selected using B Cell Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec). Purity of sorted B cells (95 to 99%) was analyzed by staining with anti-CD19 monoclonal antibody (BD Biosciences) by flow cytometry (LSR II and LSR Fortessa, BD Biosciences). PBMCs from chronic HBV carriers (Limoges samples) were obtained with informed consent from each patient with the procedure approved by the local Ethics Committee (Comité Protection des Personnes, CHU Limoges, France). Patients were recruited according to several inclusion and exclusion criteria detailed in Table 1. Demographic characteristics and clinical features of recruited patients are described in Table 2. The majority of CHB patients were HBeAg negative (Ratio HBeAg < 1).

PBMCs staining and flow cytometry analysis

Flow cytometry determined the expression of distinct surface molecules on PBMCs. B cell subsets markers were used to differentiate between the different B cell populations. Cells were simultaneously immunostained using the following anti-human antibodies: CD19-PE-CF594 (BD Biosciences), IgD-PerCP-Cy5.5, CD27-APC-Cy7, CD38-PE-Cy7 (all from BioLegend). In brief, cells were stained for 30 min at 4°C in the dark. After two additional washing steps, cells were stained with LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Life technologies) for 30 min at 4°C in the dark to assess viability. After two additional washing steps, cells were incubated with 100 µl of BD Cytofix/Cytoperm™ solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C in the dark and then washed twice with BD Perm/Wash buffer, prior to being exposed to human TLR9-PE antibody (Affymetrix eBiosciences) for assessment of TLR9 expression. Cells were re-suspended in FACS buffer and analyzed on a BD LSR II. Fluorescence Minus One (FMO) controls were used to set the gates. FlowJo 7.4.5 software (Tree Star) was used for analysis.

Hepatitis B virus inoculum production

HBV inoculum was a 100-fold concentrated culture supernatant from HepG2.2.15 cells or HBV infected-HepaRG cells. Briefly, supernatants were clarified, layered onto a sucrose cushion (10 and 20% in 20 mM Tris, pH 8) and centrifuged at 4°C for 16h at 25,000 rpm using a SW41 rotor (Beckman). HBV inoculum was also obtained following concentration using Centricon Plus-70 (Biomax 100, Millipore Corp). Similar procedure was applied to HepG2 or HepaRG cells supernatants to generate the mock lysate. HBV stock titre (genome equivalent/ml, GEq/ml) was assessed using real time PCR. After DNA extraction (QIAmp Ultrasens Virus kit, Qiagen), HBV inoculum was titrated by qPCR with forward 5' - GCTGACGCAACCCCACT-3' and reverse 5' -AGGAGTTCCGCAGTATGG-3' probes using a standard curve from a quantified HBV encoded plasmid. All preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza Verviers).

HBV virions and viral proteins

Recombinant HBsAg (adw subtype) and HBeAg were purchased from Jena Biosciences and were used at 40 µg/mL. Viral particles and HBV virions (Dane particles) were obtained from David Durantel's laboratory (U1052, CRCL). HBsAg productions were used at 5 µg/mL, HBeAg at 4,5 µg/mL and 400 v.g.e of Dane particules. Endotoxin levels in HBsAg and HBeAg productions were less than 0.01 EU/mL within HBV stocks (Limulus amoebocyte lysate assay, BioWhittaker).

Cell culture

PBMCs, primary B cells and RPMI 8226 cells were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO; Invitrogen life Technologies) supplemented with 10% of fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 10 µM of Ciprofloxacin or Penicillin-Streptomycin (HCL), and 1 mM sodium pyruvate (PAA).

TLR ligands

CpG 2006 and Imiquimod were purchased from Invivogen and were used at the concentration of 5 µM according to the manufacturer's recommendations.

ELISA

Cells were seeded at 2×10^5 /200 µL/well and stimulated for 24 h. The supernatant was harvested, and IL-6, TNFα and IL-10 (R&D Systems) were measured following the manufacturer's protocol. Nunc Immuno Plate MaxiSorp plates (Thermo Fisher Scientific)

were coated with the correspondent capture antibody and incubated overnight at 4°C. After blocking with 1% BSA in PBS, the plates were incubated with serially diluted standard or samples and then with HRP-conjugated detection antibodies. After colorimetric reaction (tetramethylbenzidine; Moss), the absorbance at 450 nm was measured using an ELISA plate reader. The IgG secretion was evaluated in supernatants harvested 120 h after CpG 2006 and Imiquimod stimulation using the Human IgG ELISA Quantitation kit (Bethyl Laboratories).

Electron microscopy

B cells were fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde complemented with 0.2% glutaraldehyde. Cells were washed three times in Cacodylate (0.2M) Saccharose (0.4M) for 1hr at 4°C, dehydrated through a series of washes with 30, 50, 70% ethanol maintained priorly at 4°C for 5 min, infiltrated with London Resin White (LRWhite) using 1:1 LRWhite and 4°C absolute ethanol for 60 min followed by pure LRWhite at 4°C for three periods of 60 min each, then embedded in pure LRWhite in gelatin capsules for polymerization at 50°C for 48 hours. Ultrathin sections (approximately 70 nm thick) were cut on a Reichert ultracut E (Leica) ultramicrotome, mounted on 200 mesh nickel grids coated with 1:1,000 polylysin, and stabilized for 1 day at room temperature (RT). Immunogold labelling was performed by flotation of the grids on drops of reactive media. Nonspecific sites were coated with 1% BSA and 1% normal goat serum in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 for 20min at RT. Thereafter, incubation was carried out overnight at 4°C in a wet chamber with a rabbit anti-HBsAg antibody (MA Petit, INSERM U1052, CRCL). Sections were successively washed three times in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and pH 8.2 at RT. They were incubated in a wet chamber for 45 min at RT in 1% BSA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.2 for 20 min at RT, labeled with gold-conjugated secondary antibody (Aurion). Sections were successively washed three times in 50 Mm Tris-HCl pH8.2 and pH7.4 and three times with infiltrated distilled water. The immunocomplex was fixed by a wash in glutaraldehyde 4% for 3 min. Sections were stained with 0,5% uranyl acetate in ethanol 50% for 5 min in darkness and observed with a transmission electron microscope JEOL 1400JEM operating at 80kV equipped with a camera Orius 600 Gatan and Digital Micrograph. Analysis was done using Olympus Soft Imaging System.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from cells (RPMI 8226 cells, PBMCs and B cells) using the protein/RNA extraction kit (Macherey Nagel) and was reverse transcribed using the first strand cDNA synthesis kit according to the manufacturer's protocol (Fermentas).

Quantitative RT-PCR

qPCR was performed using the Mx3000P real-time PCR system (Stratagene) with Mesa green qPCR MasterMix plus (Eurogentec) and TLR9 and β 2-microglobulin specific primers for relative quantification. PCR assays were conducted for each sample using the following

primers specific for TLR9: forward: 5'-CGT CTT GAA GGC CTG GTG TTG A-3'; reverse: 5'-CTG GAA GGC CTT GGT TTT AGT GA-3'. Housekeeping gene β 2-microglobulin was used. The sequence of the BCL-2 primers was: forward: 5'-TGG CCA GGG TCA GAG TTA AA-3'; reverse: 5' -TGG CCT CTC TTG CGG AGT A-3' and Cyclin D1: forward: 5' -AAC TAC CTG GAC CGC TTC CT-3' ; reverse: 5' -CCA CTT GAG CTT GTT CAC CA-3' . Relative quantification was performed using standard curve analysis. TLR9, BCL-2 and Cyclin D1 expression data were normalized with β 2-microglobulin.

Western Blotting

Total protein extracts were obtained with the protein/RNA kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. Protein extracts were quantified with the protein quantification assay (Macherey-Nagel). Antibodies used for immunoblotting were TLR9, β -tubulin, CREB, ³²P-CREB, ³²PKA, PKA-R1 α / β and Histone H3 (Cell signaling). Western blots were developed using the intelligent dark box (Fuji film).

Gel Densitometry

Densitometries were performed on TIFF images of radiographical films exposed to Western blots. We used ImageJ software analysis and assigned values to each lane by integrating the area under the curve.

Transient transfection and dual luciferase assay

RPMI 8226 cells have been transiently transfected (1 μ g per well) in triplicate using Fugene® HD transfection Reagent (Promega). Cells were harvested after 48 h, and the activities of both Firefly and Renilla luciferase were measured with a Luminometer (AB-2200; ATTO) using a dual luciferase reporter system (Promega). Firefly luciferase activity was normalized to that of Renilla luciferase.

Constructs

The pGL3-TLR9 luciferase promoter and the deleted TLR9 promoters were obtained from Fumihiko Takeshita [59]. The CRE site in TLR9 promoter (-686TGACGTGG-679) was mutated to (-686TGTGATGG-679) using the Quick-change lightning site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions. All mutations were confirmed by direct sequencing.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) assay was performed using the CREB (1) EMSA kit (eBioscience, Affymetrix). For each binding reaction, 10 µg of nuclear extracts was used. Proteins or protein–DNA complexes were detected using ECL kit (GE Healthcare).

Oligonucleotide pull-down assay

The wild-type (CRE) and mutated (CRE m) oligonucleotides used were melted at 95°C then annealed to their respective complementary oligonucleotides at room temperature for 1 hr. the oligonucleotide sequences were as follow: TLR9pWT-F: 5'-biotin-ATCTGGAGTGACGTGGTGTGTG-3'; TLR9pWT-R: 5'-CACACACCACGTCCTCCAGAT-3'; TLR9pMut-F: 5'-biotin-ATCTGGAGTGGTATGGTGTGTG-3'; TLR9pMut-R: 5'-CACACACCATACTCCAGAT-3'. Nuclear extracts prepared from RPMI 8226 cells, previously treated with 400 v.g.e of HBV for 24 hours, were incubated with streptavidin-coupled agarose beads and 500 pmol of each double-stranded oligonucleotide for 2 h at room temperature with gentle rocking. The protein–DNA–streptavidin–agarose complex was washed four times with PBS containing protease inhibitors. The precipitates were subjected to immunoblotting using the indicated antibodies.

ELISPOT assay

2 x 10⁵ PBMCs per well were stimulated for 7 days with F (ab')₂ Anti-Human IgM+IgG (Affymetrix eBiosciences), CD40L (soluble human recombinant) (Enzo Life Sciences), IL-4 (Affymetrix eBiosciences) and either CpG 2006 or Imiquimod (Invivogen) in flat bottomed 96-well culture plates. Multiscreen plates (Millipore Multiscreen) were pre-coated with unlabeled Goat Anti-Human Ig (SouthernBiotech). Cultured PBMCs were seeded onto anti-Ig coated plates at 2 x 10⁵ cells/well and diluted successively to achieve the best dilution factor and incubated overnight. Alkaline phosphatase (AP) conjugated goat anti-human IgG, IgA and IgM antibodies (Southern Biotech) were used as secondary antibodies. Spots were developed using BCIP/NBT (Bio-Rad) and counted using the CTL ImmunoSpot Analyzer (Cellular Technologies). The background was accounted for by subtracting the average number of spots in non-coated wells from the spots in antibody coated wells.

Proliferation assay

PBMCs (1.5 x 10⁵ per well) were stained with CellTrace (CTV) (Molecular Probes, Invitrogen) fluorescent dye (5µM) at 37°C for 8 minutes and were then cultured in completed RPMI 1640 medium in 96 well flat-bottomed plates (Nunc). Stimulation involved the use of a

cocktail consisting of F(ab')₂ Anti-Human IgM+IgG (Affymetrix eBiosciences) (10 μM), CD40L soluble human recombinant + enhancer (Enzo Life Sciences) (1μM), IL-4 (Affymetrix eBiosciences) (10 nM) and CpG 2006 (Invivogen) (5μM). Analytical flow cytometry was performed with a BD Fortessa (BD Biosciences).

Cell Fractionation

Nuclear and cytosolic protein extracts from RPMI 8226 cells were obtained using the Nuclear/Cytosolic Fractionation Kit (Biovision) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Prism software (GraphPad) was used for two-tailed unpaired Student's t tests. P-values of * <0.05, **<0.01, ***<0.001. For the clinical study, statistical analyses were carried out using R software version 3.2.3. Statistical significance was determined by an unpaired, two-tailed Student's t-test, with P-values < 0.05 that were considered statistically significant.

RESULTS

HBV down-regulates TLR9 expression in human B cells

We used a human B cell line (RPMI 8226) as well as freshly isolated primary human B cells to study the effect of HBV on TLR9 expression. Cells were exposed to HBV at 200, and 400 viral genome equivalents per cell (v.g.e/cell) for 24 h and TLR9 mRNA and protein levels were examined. The HBV inoculum produced in our study contained viral proteins HBsAg, HBcAg and HBeAg as well as Dane particles (HBV virions). As shown in Fig.1A, HBV significantly down-regulated TLR9 mRNA levels in RPMI 8226 cells at 200 and 400 v.g.e. We next corroborated our findings in primary human B cells; and observed HBV inhibited TLR9 mRNA levels (Fig.1 B). Accordingly, the inhibition of TLR9 mRNA levels correlated with a decrease in TLR9 protein expression in both RPMI 8226 cells and primary human B cells treated with HBV (Fig 1C and 1D respectively). We confirmed the loss of TLR9 expression by HBV in human primary B cells using flow cytometry. Fresh PBMCs were cultured for 24h ± HBV; cells were stained for CD19 (a surface total B cell marker) and intracellular TLR9. We observed that the TLR9 mean fluorescence intensity (MFI) decreased when cells were treated with HBV (Fig 1E and 1F p<0.01). This effect was reversed using a blocking anti-HBs antibody (Fig 1G) and TLR9 expression was restored which shows a specific effect of HBV.

Accumulating pieces of evidence show that HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) as well as viral transcripts and proteins have been found in PBMCs, including B cells from chronically infected carriers[8]. To assess the ability of B cells to internalize HBV virions, primary B cells were exposed to HBV for 24 h and cells were analyzed by electron microscopy. Internalization of HBV virions was determined by Immunogold labelling using anti-HBsAg antibodies. 42 to 45 nm spheres that represent the size of HBV virions (red arrows) were identified within the cytoplasm of B cells (Sup Fig 1). We also noted that HBsAg (blue arrows) were present in human B cells. These results show that HBV and its HBsAg particles can be efficiently internalized in peripheral blood B cells.

We next assessed the effect of HBV on TLR9 expression on peripheral B cell subpopulations (see gating strategy in Sup Fig 2). We observed that TLR9 was highly expressed on memory and plasma B cells and to a lower extent on naïve B cells (Fig 1H and 1I). This observation is concordant with previous studies that have shown that plasma cells express the highest level of TLR9[15]. QPCR also confirmed these results on sorted B cell subsets showing that TLR9 mRNA was the most abundant in plasma and memory B cells (data not shown). TLR9 expression was blocked in all three subsets when exposed to HBV predominantly on memory and plasma B cells (Fig 1J). No effect on cell viability was observed between HBV and non-HBV treated cells. Our results show that HBV exerts TLR9 downregulation in all B cell subsets found in peripheral blood.

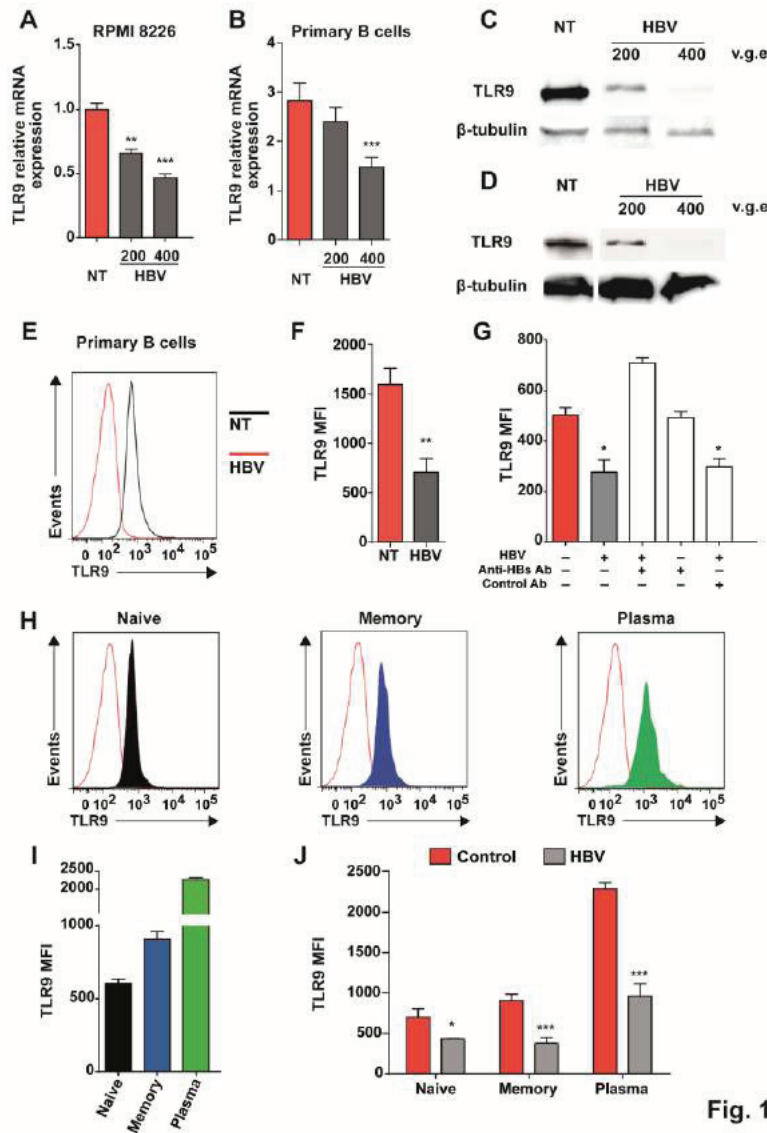


Fig. 1

Figure 1: TLR9 expression is downregulated by HBV in all peripheral B cell subsets. (A) RPMI 8226 cells were incubated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h. Cells were harvested for RNA extraction and RT-PCR reaction. The expression level of TLR9 was assessed by qPCR, normalized to the β 2-microglobulin expression and expressed relative to untreated cells. (B) Freshly isolated human B cells were incubated with HBV (v.g.e 200 or 400) or left untreated for 24h. Cells were harvested for RNA extraction and RT-PCR reaction. The expression level of TLR9 was assessed by qPCR, normalized to the β 2-microglobulin expression and expressed relative to untreated cells. (C) RPMI 8226 cells were incubated with HBV (v.g.e 200 or 400) or left untreated for 24h. Proteins were extracted and TLR9 expression level was assessed by immunoblotting and β -tubulin immunodetection was performed as a loading control. (D) Freshly isolated human B cells were incubated with HBV (v.g.e 200 or 400) or left untreated for 24h. Proteins were extracted and TLR9 expression level was assessed by immunoblotting and β -tubulin immunodetection was performed as a loading control. (E) Fresh PBMCs were incubated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h. Cells were harvested and stained with anti-CD19 and anti-TLR9 antibodies. Histogram presents overlay of the TLR9 staining and the isotype control. (F) TLR9 expression was assessed by flow cytometry using mean fluorescence intensity (MFI) of anti-TLR9 antibody. Graph presents TLR9 MFI of HBV-treated B cells compared to untreated cells. (G) Anti-HBs antibodies restore TLR9 expression in HBV-treated B cells: fresh PBMCs were incubated with HBV (v.g.e 400), HBV+anti-HBs, anti-HBs, and negative control antibodies or left untreated for 24h. Cells were harvested and stained with CD19 and TLR9. TLR9 expression was assessed in B cells by flow cytometry using mean

fluorescence intensity of TLR9-PE antibody. (H) Isolation of naïve, memory and plasma B cell subsets. Human PBMCs were stained with CD19 to selectively isolate CD19⁺ B cells, and then the three B cell subsets were sorted according to IgD, CD27 and CD38 expression: IgD⁺ CD27⁻ naïve B cells, IgD⁻ CD27⁺ memory B cells and IgD⁻ CD27⁺⁺ CD38^{hi} plasma B cells. Histograms present TLR9 fluorescence intensity shift (compared to the isotype control) in naïve (black), memory (blue) and plasma (green) B cells. Histogram in (I) presents TLR9 MFI in the three peripheral B cell subsets. (J) Fresh PBMCs were incubated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h. Cells were harvested and stained as previously mentioned and TLR9 expression was assessed by flow cytometry between the non-treated and the HBV-treated B cells.

Loss of TLR9 expression by HBV reduces B cell proliferation and IL-6 secretion but not total Ig production

To assess whether HBV alters TLR9 function by HBV in primary B cells, we stimulated freshly isolated B cells with CpG ODN 2006 (henceforth simply referred to as CpG) \pm HBV for 24h, and IL-6 secretion was measured. CpG-induced IL-6 secretion was significantly reduced in the presence of HBV inoculum; however, the mock lysate (a control for HBV production) exerted no effect (Fig 2A). Human B cells also express TLR7[16,17], yet HBV exerted no effect on TLR7-mediated IL-6 secretion (Fig 2B). As shown for pDCs, these results showed that HBV targets specifically TLR9 without affecting TLR7[18]. Additionally, we stimulated the TLR9 pathway using HSV-2 and observed that HBV also blocked IL-6 secretion (Sup Fig 3). We next investigated the effect of HBV on TLR9-induced B cell proliferation. PBMCs were treated with anti-BCR (signal 1), CD40L (signal 2) \pm CpG (signal 3) \pm HBV for 5 days. B cell proliferation was assessed using the CellTrace Violet dye proliferation marker. TLR9 engagement boosted B cell proliferation induced by BCR and CD40L. However, this effect was strongly reduced in the presence of HBV (Fig 2C). In fact, the percentage of proliferating B cells upon TLR9 stimulation decreased by 50% following HBV treatment. The HBV inoculum did not alter the effect on the percentage of divided B cells induced only by BCR and CD40L (Fig 2C and 2D). Next, we wanted to address if HBV could abrogate Ig secretion by B cells upon TLR9 stimulation. By ELISPOT analysis, upon CpG stimulation, we observed that IgG and IgA producing cells were significantly higher in HBV treated conditions in comparison to non-treated cells (Fig 2 E and 2F). Our data were validated by measuring IgG by ELISA assay on supernatants of HBV treated human B cells (Fig 2G). In summary loss of TLR9 expression by HBV leads to a loss of proliferation and cytokine secretion but increased Ig production in human B cells.

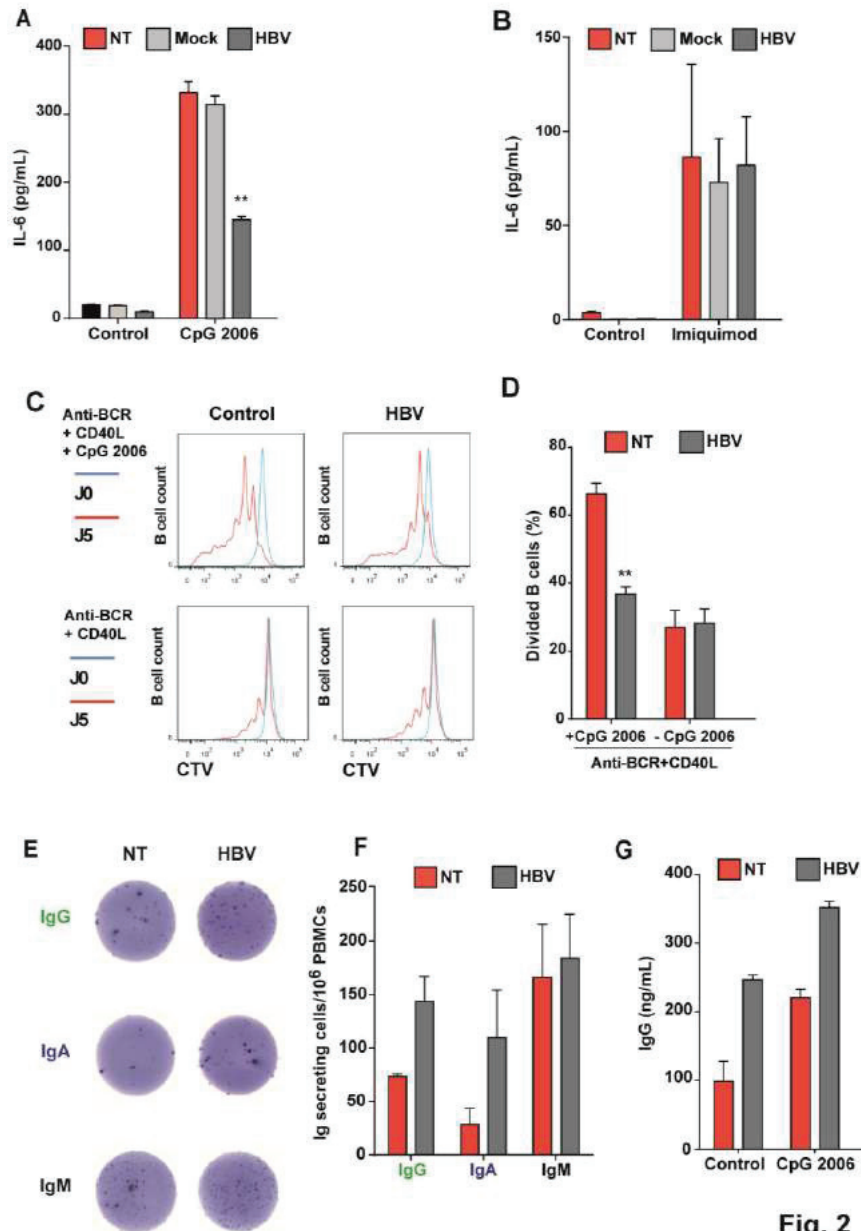


Fig. 2

Figure 2: HBV abrogates TLR9-mediated IL-6 secretion and proliferation but has no effect on global Ig secretion in human B cells. (A) Freshly purified B cells were treated with CpG 2006 (5 μ M) or left unstimulated \pm HBV (v.g.e 400) for 24h. Mock lysate was also used as a control. Levels of IL-6 in supernatants were measured by ELISA assay. (B) Freshly purified B cells were treated with Imiquimod at 5 μ M or left unstimulated \pm HBV (v.g.e 400) and for 24h. Mock lysate was also used as a control. Levels of IL-6 in supernatants were measured by ELISA assay. (C) PBMCs were stained with CellTrace Violet dye and treated with anti-IgM (10 μ M), CD40L (1 μ M), IL-4 (10 nM) with or without CpG 2006 (5 μ M) \pm HBV (v.g.e 400) for 5 days. Only CD19⁺ B cells were gated by flow cytometry analysis and proliferation was assessed by dilution of CellTrace violet dye. Graph presents the percentage of divided B cells in different conditions and histograms in (D) are representative of the CellTrace violet staining. (E) Fresh PBMCs cultured with anti-IgM, CD40, IL-4 and CpG 2006 \pm HBV (v.g.e 400) for 7 days, were collected and cultured in ELISPOT plates and processed as described to detect IgG, IgA and IgM producing cells. Representative ELISPOT assay wells are shown and graph summarizing the results obtained in triplicate of every condition is shown in (F). (G) Freshly isolated B cells were cultured with or without CpG2006 stimulation \pm HBV (v.g.e 400) for 5 days. Levels of IgG in

supernatants were measured by ELISA assay. Graph presents global IgG levels in supernatants of untreated versus HBV-treated B cells following different stimulations.

HBV uses HBsAg to block CREB phosphorylation and binding to the CRE site on the TLR9 promoter

Previous reports showed that oncoviruses such as HPV16, EBV and HCV downregulate TLR9 transcription using NF- κ B which is a negative regulator of TLR9 transcription [12,13,19]. We hypothesized that HBV used the same mechanism to block TLR9 transcription in human B cells. By transient transfection into RPMI 8226 B cell line, we evaluated TLR9 promoter activity \pm HBV inoculum and observed that HBV blocked TLR9 luciferase activity (Fig 3A). To investigate which region of the promoter was implicated in TLR9 deregulation by HBV we used several deletions of the TLR9 promoter (Fig 3B). We found that deleting the cAMP responsive element (CRE) *cis* site (-686'/ TGACGTGG / -679') on TLR9 promoter eliminated the inhibitory effect exerted by HBV (Fig 3C).

To further investigate the implication of the CRE region, we performed site-directed mutagenesis of the CRE site on the full-length construct of the TLR9 promoter as well as the del 1 deleted construct (also containing the CRE site). The mutated site is shown in Fig 3D. As expected, HBV decreased TLR9 WT promoter activity however when the CRE site was mutated HBV could no longer exert a suppressive effect on TLR9 transcription (Fig 3E). CRE is a *cis*-element responsible for recruiting the cAMP response element-binding protein (CREB) to activate the transcription of target genes. CREB at steady state is expressed in the nucleus of cells. To bind to CRE sites, CREB must be phosphorylated at Ser¹³³. We sought to see if HBV affects CREB or p-CREB levels in B cells which may affect TLR9 promoter activity. RPMI 8226 B cells were exposed to HBV and cell fractionation of nuclear and cytoplasmic proteins was performed. As expected, HBV suppressed TLR9 expression in the cytoplasm (Fig 3F). In the nuclear extracts, we observed that total CREB, as well as p-CREB proteins, were reduced in B cells exposed to HBV (Fig 3F). Furthermore, Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) revealed a reduction in the CRE/CREB complex in HBV-treated cells vs non-treated cells (Fig 3G). Our data were corroborated by an oligonucleotide pull-down assay using oligonucleotides for the specific CRE site found on the TLR9 promoter (Fig 3H). Here we concluded that HBV affects the TLR9 promoter by abrogating TLR9 transcription specifically via the CRE/CREB pathway. HBV disrupts CREB phosphorylation in order to prevent binding on the CRE region within the TLR9 promoter.

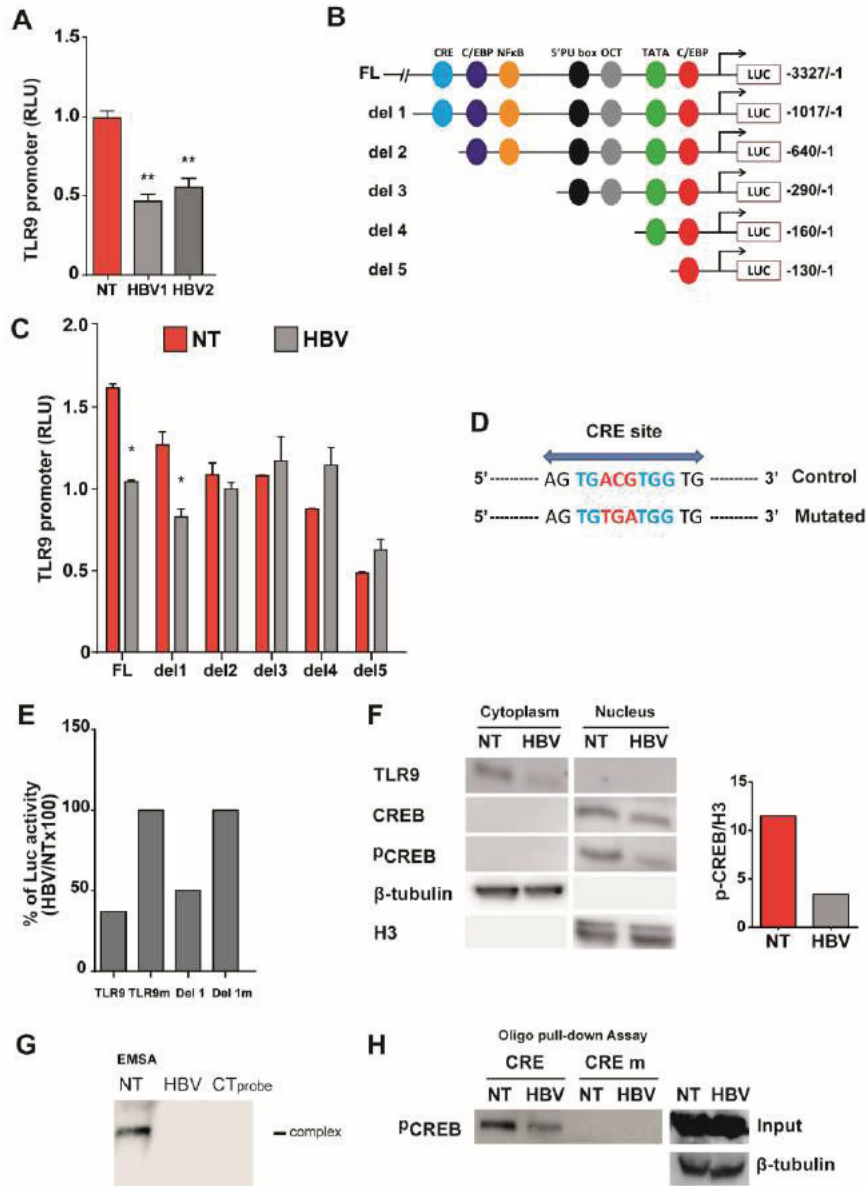


Fig. 3

Figure 3: TLR9 inhibition is mediated through CRE/CREB pathway abrogation by HBV. (A) RPMI 8226 cells were transfected with the TLR9 promoter and incubated with 2 different HBV productions (HBV1 and HBV2) at 400 v.g.e or left untreated for 24h and finally harvested in total 48h post transfection. Cells were then lysed and luciferase activity was measured. Renilla luciferase co-transfection served as a normalization control. (C) RPMI 8226 cells were transfected with different TLR9 promoter deletions presented in (B) and incubated 24h later with HBV at 400 v.g.e or left untreated for 24h and harvested in total 48h post transfection. Cells were then lysed and luciferase activity was measured. (D) Site-directed mutagenesis was performed on TLR9 promoter to modify 3 nucleotides (in red) within the CRE cis region. (E) RPMI 8226 cells were then transfected with these different mutated promoters and incubated with HBV at 400 v.g.e or left untreated for 24h and finally harvested in total 48h post transfection. Cells were then processed to detect luciferase activity. Renilla luciferase co-transfection served as a normalization control. Graph presents the percentage of relative luciferase activity. (F) RPMI 8226 B cells were incubated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h. Cytoplasmic and nuclear protein fractions were extracted and TLR9, CREB and pCREB expression levels were assessed by immunoblotting. Histone H3 and β-tubulin immunodetection were performed as a purity and loading control.

Graph presents relative p-CREB/H3 densitometry. (G) CREB activation in RPMI 8226 B cells measured by EMSA. Nuclear extracts from RPMI 8226 B cells treated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h, were used for CREB EMSA. (H) The oligonucleotide pull-down assay was conducted using oligonucleotides with wild-type CRE region or mutated CRE (CRE m) region and CREB binding was assessed by Western Blot. RPMI 8226 cells were treated or not with HBV for 24 h prior to the assay. Input and β -tubulin are presented and served as a loading control.

Several HBV proteins have been shown to alter or suppress innate immune responses[20–22]. HBV components include HBsAg which is expressed on the surface of virions or secreted into the blood of HBV infected patients, HBcAg which is the core protein of the virus enveloping the partially double-stranded DNA of the virus and HBeAg which is derived from the pre-core protein. As the HBV inoculum contains viral components, we decided to determine which viral component downregulates TLR9. Primary B cells were exposed to HBV viral components (HBsAg and HBeAg) as well as Dane particles (HBV virions). We observed that both HBsAg and HBeAg suppressed TLR9 at the protein level while Dane particles (purified virions) had a minor effect on TLR9 levels (Fig 4A). Both HBsAg and HBeAg also decreased TLR9 promoter activity comparably to HBV inoculum (Fig 4B). These results showed that HBsAg and HBeAg are involved in HBV-mediated suppression of TLR9 expression in B cells. Indeed, HBsAg, but not HBeAg lost its inhibitory effect on the TLR9 promoter when the CRE site was mutated (Fig 4C, Sup Fig 4). We also observed that HBsAg inhibited CREB phosphorylation similarly to HBV (Fig 4D). Furthermore, EMSA assay revealed a reduction in the CRE/CREB complex in HBs-treated cells vs non-treated cells (Fig 4E). As CREB is phosphorylated by Protein Kinase A (PKA) upstream of the CRE/CREB pathway, we wanted to assess the effect of HBsAg on the PKA. Human B cells were exposed to HBsAg and total PKA regulatory subunits α and β as well as p-PKA protein levels were examined. We show in Fig 4F that PKA regulatory subunits α and β , as well as p-PKA levels were decreased in the presence of HBsAg; which correlated with the reduction in p-CREB and TLR9 levels.

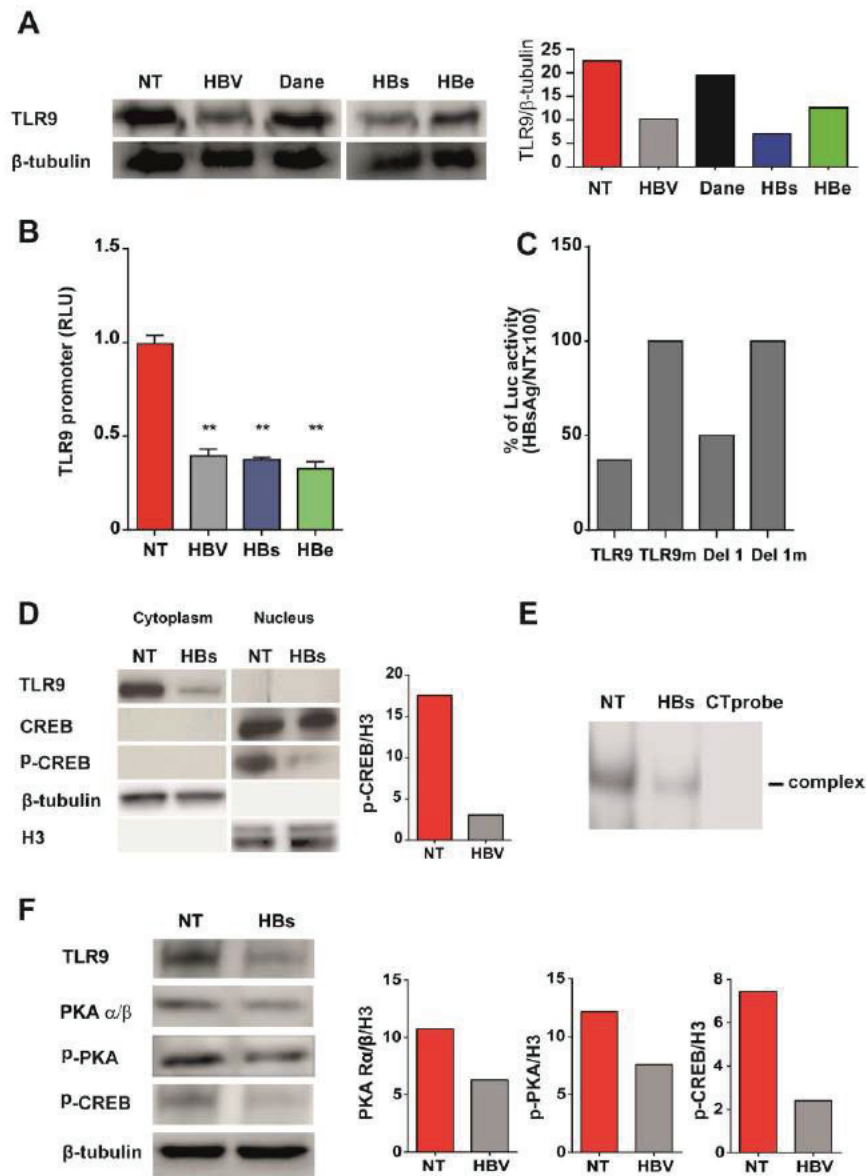


Fig. 4

Figure 4: HBsAg inhibits TLR9 expression via CRE/CREB pathway in human B cells. (A) Freshly isolated B cells were treated, as indicated, with HBV or purified productions of Dane particles, HBsAg or HBeAg. Protein extracts were prepared 24h later. TLR9 protein level was assessed by immunoblotting. β -tubulin served as a loading control. Graph presents relative TLR9/ β -tubulin densitometry. (B) RPMI 8226 cells were transfected with the TLR9 promoter construct, incubated with HBV (v.g.e 400), HBsAg, or HBeAg or left untreated for 24h and harvested in total 48h post transfection. Renilla luciferase co-transfection served as a normalization control. Cells were then processed to detect luciferase activity. (C) RPMI 8226 cells were then transfected with the different mutated promoters previously mentioned (Figure 4 B), incubated with HBV at 400 v.g.e or HBsAg or left untreated for 24h and harvested in total 48h post transfection. Cells were then processed to detect luciferase activity. Renilla luciferase co-transfection served as a normalization control. Graph presents the percentage of relative luciferase activity. (D) RPMI 8226 B cells were incubated with HBsAg or left untreated for 24h. Cytoplasmic and nuclear protein fractions were extracted and TLR9, CREB and pCREB expression levels were assessed by immunoblotting. Histone H3 and β -tubulin immunodetection were performed as a purity and loading control. Graph presents relative p-CREB/H3 densitometry. (E) CREB activation in RPMI

8226 B cells measured by EMSA. Nuclear extracts from RPMI 8226 B cells treated with HBsAg or left untreated for 24 h, were used for CREB EMSA. (F) RPMI 8226 B cells were incubated with HBsAg or left untreated for 24h. Protein fractions were extracted and TLR9, pCREB, p-PKA and PKA-R1 α / β expression levels were assessed by immunoblotting. β -tubulin immunodetection was used as a loading control. Graphs present relative PKA-R1 α / β / β -tubulin, p-PKA/ β -tubulin and p-CREB/ β -tubulin densitometry respectively.

To assess whether HBV altered other CRE/CREB target genes in B cells, we analyzed the mRNA expression of Cyclin D1, implicated in the cell cycle[23] and BCL-2 involved in B cell survival and apoptosis control[24]. Regulation of both these targets could explain the altering effect of HBV on B cell proliferation as shown in Fig 2C. HBV suppressed the expression of Cyclin D1 and BCL-2 thus confirming the involvement of the CRE/CREB pathway (Sup Fig 5). In summary, we have shown a new mechanism by which HBV blocks TLR9 transcription. HBV uses HBsAg to alter the phosphorylation of PKA and thus the activation of CREB to prevent it from binding to the CRE site on the TLR9 promoter.

TLR9 expression and function is inhibited in CHB patients

Our results demonstrate TLR9 inhibition by HBV using *in vitro* models. Next we wanted to corroborate these results in a clinical cohort; we collected blood samples from patients with chronic hepatitis B without any evidence of liver disease and a family history of HCC or cirrhosis (Table 1). Demographic characteristics and clinical features of recruited patients are described in Table 2.

Table 1: Inclusion and exclusion criteria of recruited patients

Inclusion criteria	Exclusion criteria
<ul style="list-style-type: none"> Chronic Hepatitis B with positive HBsAg No acute Hepatitis in the year prior to the recruitment Absence of obvious cause of liver disease (alcohol, overweight ...) Absence of underlying immunological or cancerous diseases Anti-HIV negative -anti-HCV-negative Hepatic cytolysis (ALAT > N) Not treated for chronic hepatitis B 	<ul style="list-style-type: none"> Acute Hepatitis in the year prior to recruitment Other cause of liver disease (alcohol, overweight,..) Evolving immunological or cancerous disease Immunomodulatory or anti-neoplastic treatment in progress HIV / HCV infected patient Under treatment for Hepatitis B

HBsAg, Hepatitis B surface antigen; HIV, Human Immunodeficiency Virus; HCV, Hepatitis C Virus; ALAT, serum alanine aminotransferase levels

Table 2: Demographic characteristics and clinical features of participants

Parameters	CHB patients	Healthy donors
Number	57	22
Age (years)		
Mean±SD	39±12	38±12
Median (range)	38 (19 – 77)	32 (20 – 70)
Sex N (%)		
Male	30 (52,5)	12 (54,5)
Female	27 (47,5)	10 (45,5)
Viremia (log ₁₀ copies/mL)		
Median (range)	2,67 (0,5 – 9,5)	NA
ALAT (IU/mL)		
Median (range)	20 (6 – 56)	NA
ASAT (IU/mL)		
Median (range)	21 (11 – 34)	NA
HBsAg (IU/mL)		
Median (range)	4813,6 (0,05 – 80392,8)	/

CHB, Chronic Hepatitis B; ALAT, serum Alanine Aminotransferase levels ; ASAT, Aspartate Transaminase levels; HBsAg, Hepatitis B surface antigen

PBMCs were isolated from CHB patients as well as from healthy individuals (HD). TLR9 expression was analyzed by flow cytometry on different B cell subsets. Concordant with our data *in vitro* we observed that CHB patients had a significant reduction of TLR9 expression in total B cells (Fig 5A); and in the different B cell subsets (Fig 5B, 5C and 5D).

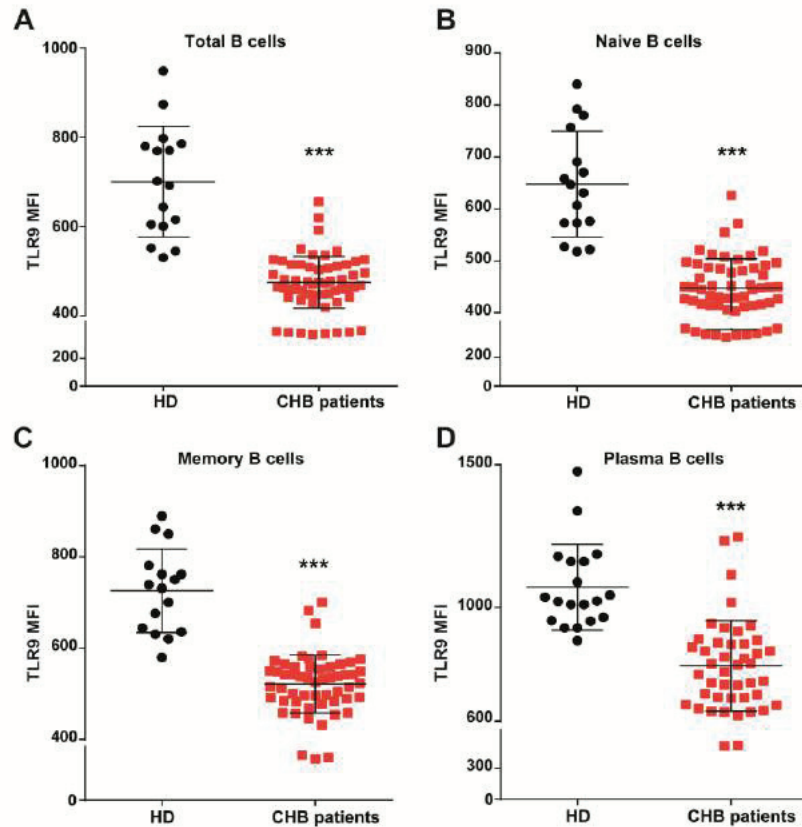


Figure 5: TLR9 expression is downregulated in chronically infected hepatitis B patients. Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=55) (red squares) and from healthy donors (n=18) (black dots) were isolated and stained with anti-CD19 to selectively gate CD19⁺ B cells, as well as anti-IgD, anti-CD27 and anti-CD38 to identify the three different B cell subsets: IgD⁺ CD27⁻ naïve B cells, IgD⁻ CD27⁺ memory B cells and IgD⁻ CD27⁺⁺ CD38^{hi} plasma B cells. After permeabilization, PBMCs were stained with anti-TLR9 antibody to study TLR9 expression. Graphs present TLR9 mean fluorescence intensity (MFI) in healthy donors and CHB patients group, in total B cells (A), naïve (B), memory (C) or plasma (D) B cells.

Next, we investigated if TLR9-mediated functions were also suppressed in CHB patients. In HD, TLR9 stimulated with CpG motifs led to the secretion of IL-6 and TNF α which was significantly reduced in CHB patients (Fig 6A and 6B). We noticed that even the basal secretions of IL-6 and TNF α in CHB patients were reduced in comparison to controls (Fig 6A and 6B). IL-10 has been described to be upregulated in the plasma of CHB patients[25] preserving an immune suppressive state. Upon TLR9 stimulation, IL-10 secretion was not affected by HBV infection as we observed comparable amounts of IL-10 between control and CHB groups (Fig 6C).

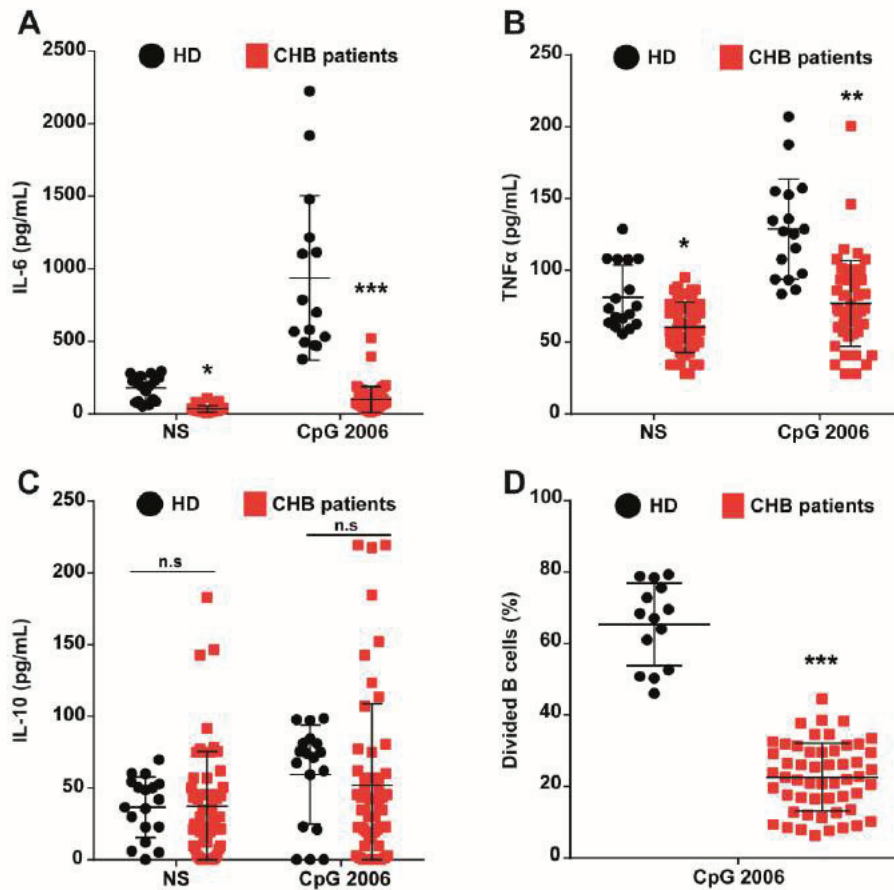


Figure 6: TLR9 function is abrogated in chronically infected hepatitis B patients. Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=55) (red squares) and from healthy donors (n=15) (black dots) were treated with CpG 2006 (5 μ M) for 24h. Levels of IL-6 (A), TNF α (B) and IL-10 (C) in the supernatants were measured by ELISA assay. Graphs represent the levels of cytokines in each group. (D) Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=57) (red squares) and from healthy patients (n=15) (black dots) were isolated and were stained with CellTrace Violet dye and treated with anti-IgM (10 μ M), CD40L (1 μ M), IL-4 (10nM) and CpG 2006 (5 μ M) for 5 days. Only CD19 $^{+}$ B cells were gated by flow cytometry analysis and proliferation was assessed by dilution of CellTrace violet dye. Graphs present the percentage of divided B cells in each group.

Next, we wanted to analyze the ability of B cells to proliferate in CHB patients following TLR9 stimulation along with anti-BCR and CD40L. PBMCs were activated with anti-BCR, CD40L and CpG for 5 days. PBMCs were then stained with CD19 to identify B cells and their proliferation status was analyzed by flow cytometry. TLR9-mediated B cell proliferation was reduced in CHB patients in comparison with the control group (Fig 6D). Indeed, chronically infected patients displayed a significant decrease in the percentage of proliferating B cells by nearly 70% (decrease in the percentage of divided B cells). Furthermore, PBMCs from CHB patients displayed an overall reduction of TLR9 mRNA expression in comparison to controls (Fig 7A). TLR7 mRNA expression, however, was similar between healthy donors and CHB patients (Sup Fig 6). We did not find any significant disruption in B cell subsets percentages between HD and CHB patients (Sup Fig 7) as it has been shown in other studies [26].

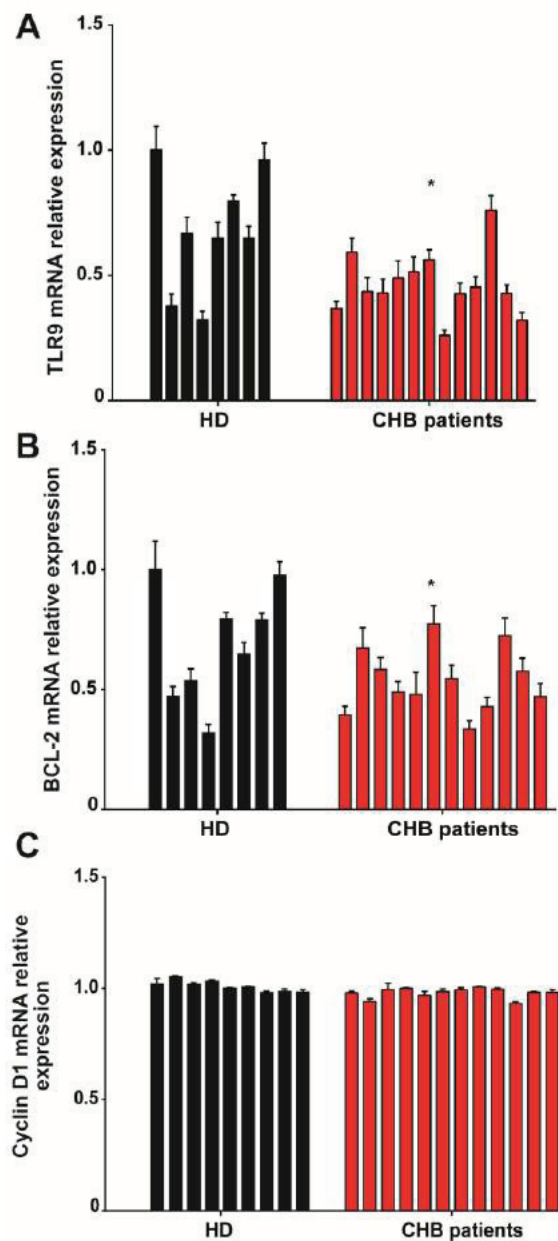


Figure 7: TLR9 and BCL-2 mRNA expression are decreased in CHB patients. Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=13) (red bars) and from healthy donors (n=8) (black bars) were harvested for RNA extraction and RT-PCR reaction. The expression level of TLR9 (A), BCL-2 (B) and Cyclin D1 (C) was assessed by qPCR, normalized to the β 2-microglobulin expression and expressed relative to untreated cells. Results are representative of 1 of 4 experiments that gave similar results.

To assess the implication of CRE/CREB pathway observed in *in vitro* data, we also analyzed the mRNA expression of Cyclin D1 and BCL-2[27]. While Cyclin D1 mRNA levels were not significantly affected by the HBV infection in patients, BCL-2 levels were down-regulated in CHB patients compared to the control group (Fig 7B and 7C). This result suggests the involvement of CRE/CREB pathway in the TLR9 down-regulation observed in CHB patients. In summary, these results show that in HBV chronically infected patients, TLR9 expression and function is significantly decreased in PBMCs and specifically in human B cells.

DISCUSSION

Several oncoviruses can escape immune recognition by deregulating TLR9 expression and function[13,28–30]. Reported is the ability of each virus to use a unique strategy to target transcription factors that regulate the TLR9 promoter, or mRNA stability. LMP-1 from EBV as well as E7 from HPV16 activated NF- κ B leading to the suppression of TLR9 transcription in B cells and keratinocytes respectively[13,28]. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus blocked the C/EBP β transactivator which also regulated TLR9 transcription.[29]. Recently Fischer et al., showed that TLR9 promoter SNPs associated with natural clearance of HCV infection showed higher transcriptional activities[19]. We previously showed that TLR9 expression on pDCs as well as TLR9-mediated secretion of IFN is impaired by HBV[14]. Furthermore, we showed that TLR9 promoter activity was deregulated in RPMI 8226 cells. However, the effect and mechanism of HBV on TLR9 expression and function in peripheral blood B cell subsets is still unknown.

Our data suggest a novel mechanism by which HBV can block TLR9 transcription and function in human B cells. We demonstrated that HBsAg inhibited p-CREB levels and function thereby reducing its ability to bind to the CRE site located in the TLR9 promoter. Furthermore, HBV via HBsAg could no longer suppress TLR9 promoter activity when we introduced a mutation on the CRE site. CREB has a well-documented role in neuronal plasticity and long-term memory formation although emerging evidence has revealed specific functions of CREB in immune cells by inducing macrophage survival as well as promoting the proliferation, survival, and regulation of T and B cells[31]. BCL-2 is also regulated by CREB and is implicated in B cell proliferation and inhibiting the actions of pro-apoptotic proteins[32]. BCL-2 mRNA levels in B cells were also reduced by HBV, indicating that the loss of CREB function could also contribute to a decrease in B cell proliferation, an effect we observed in this study. Furthermore, several studies have shown that HBsAg can suppress the release of cytokines by interfering with TLR signaling pathways in monocytes/macrophages which may contribute to the establishment of chronic infections[10,33,34]. We show that HBsAg can abrogate PKA levels upstream of CREB. However further investigation is needed to elucidate how HBsAg can affect PKA-as well as CREB phosphorylation in human B cells. HBV has been shown to use CREB/PKA signal transduction pathways in hepatocytes to enhance HBsAg expression during homeostasis and hepatic inflammation[35,36]. However, to our knowledge, this is the first time that CRE/CREB pathway has been shown to downregulate the expression of TLR9 to enhance immune evasion by HBV. Therefore HBV may use the CRE/CREB pathway to 1) Expand its infection in hepatocytes and 2) To abrogate TLR9-mediated B cells functions.

Here, we showed by electron microscopy that HBV virions, as well as HBsAg, can enter B cells. The nature of the cellular site of attachment involved in virus binding to B cells is under investigation. While sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) is a potential candidate, as shown for hepatocytes[37], unpublished data indicate that B cells do not express this receptor and therefore, another cell receptor might be implicated. We found that upon

stimulation of the TLR7 pathway, IL-6 secretion is not affected by HBV compared to the control showing that in B cells HBV specifically targets TLR9. TLR7 has been shown in several studies not to be affected by HBV or HCV infection. Woltman et al. demonstrated that HBV and HBsAg were unable to suppress Loxoribine/TLR7-induced immune responses[38]. We also showed that HBV particle internalization by pDCs did not lead to suppression of TLR7 mediated secretion of IFN- α [14]. Moreover, other groups have shown that TLR9 expression and function is altered in CHB patients. Martinet et al found that pDCs from patients infected with CHB displayed poor responses to stimulation with TLR9 ligands and were unable to induce cytolytic activity of NK cells[39]. Furthermore, mRNA levels of TLR9 were negatively correlated with serum levels of liver enzymes, while positively associated with HBV viral load in patients with CHB[40]. IL-6 and TNF α play antiviral roles and are implicated in limiting HBV replication[41–44]. We observed that HBV blocked TLR9-mediated IL-6 as well as TNF α secretion in PBMCs and B cells which could contribute to the loss of the antiviral response. Along with the abrogation of IFN observed for pDCs and recently shown immunosuppressive monocytes[45], these data show that several innate immune responses are abrogated in CHB patients.

We also studied the effect of HBV on the expression of TLR9 in different peripheral blood B cell subsets from CHB patients. Similarly to our *in vitro* data, TLR9 expression was downregulated in naïve, memory and plasma B cells from CHB patients. Of note, this effect appeared to be stronger in memory B cells. Our results show that TLR9 inhibition is not specific to a peripheral B cell subset. HBV infection did not affect the percentages of these three B cell subsets (Sup Fig 7) which has been shown in other clinical studies[26,46]. Between memory and plasma, a fourth subset exists called transitional B cells[47]. It would be interesting to explore if HBV inhibits TLR9 expression on this population. We also observed that HBV does not affect TLR9 mediated global immunoglobulin production. In our experimental conditions, neither IgG secretion nor IgA and IgM production were affected by HBV treatment. On the contrary, IgG and IgA secretion were up-regulated by the virus. Similarly, Oliviero et al. who showed enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in a cohort of chronically infected hepatitis C and CHB patients[48]. Furthermore, Lin et al. reported that IgA responses are increased in patients with onset liver cirrhosis, and as such, they suggested that IgA could be used as a biomarker for cirrhosis[49]. TLR stimulation can increase the magnitude of plasma B cells and selection for high affinity specific anti-viral IgG responses[50]. Based on this we can conclude that although TLR9 stimulation of B cells did not alter total Ig production, the loss of TLR9 on B cells may have altered the ability to generate anti-HBV antibodies required to prevent chronic HBV infection.

Our data highlight a key role for TLR9 mediated B cells responses against hepatitis B. Our results suggest that TLR9 ligands can be considered as a powerful objective for adjuvants to use in HBV vaccination, especially in patients who fail to respond to conventional vaccination. Along with antiviral treatment, future studies can be directed to discover new or to enhance current ligands for TLR9 to improve immune responses against HBV in patients with prolonged chronic infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the “National Agency for AIDS and Viral Hepatitis Research (ANRS)”, “La Ligue Contre le Cancer” du Rhone, Lyon, France and the Lebanese Ministry of Education, Lebanon. We thank the Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444 and the French Blood agency (EFS) for their contribution in the clinical studies especially Sébastien Dussurgey. We thank also the Quantitative imagery Center Lyon East (CIQLE) and Elisabeth Erraduriz-Cerda for the EM photos. The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

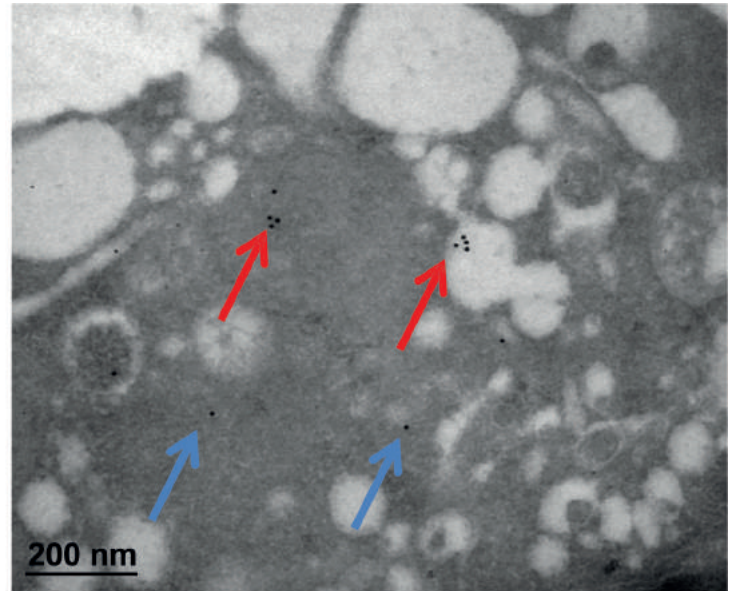
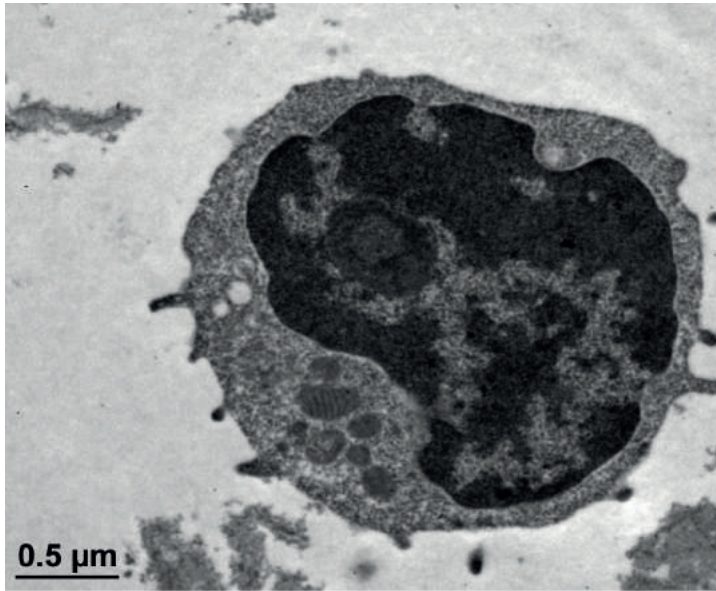
- 1 Lai CL, Ratziu V, Yuen M-F, *et al.* Viral hepatitis B. *Lancet Lond Engl* 2003;**362**:2089–94. doi:10.1016/S0140-6736(03)15108-2
- 2 Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:215–29. doi:10.1038/nri1573
- 3 Bertoletti A, Gehring A. Immune response and tolerance during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 2007;**37 Suppl 3**:S331-338. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00221.x
- 4 Garraud O, Borhis G, Badr G, *et al.* Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunol* 2012;**13**:63. doi:10.1186/1471-2172-13-63
- 5 Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003;**101**:4500–4. doi:10.1182/blood-2002-11-3569
- 6 Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000;**8**:452–6.
- 7 Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:741–50. doi:10.1038/nri1886
- 8 Mazet-Wagner AA, Baclet MC, Loustaud-Ratti V, *et al.* Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients. *J Virol Methods* 2006;**138**:70–9. doi:10.1016/j.jviromet.2006.07.019
- 9 Xu N, Yao H-P, Lv G-C, *et al.* Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN- α from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc A1* 2012;**61**:997–1004. doi:10.1007/s00011-012-0493-z

- 10 Wang S, Chen Z, Hu C, *et al.* Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;**190**:5142–51. doi:10.4049/jimmunol.1201625
- 11 Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, *et al.* Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology* 2012;**143**:1586–1596.e8. doi:10.1053/j.gastro.2012.08.046
- 12 Hasan UA, Bates E, Takeshita F, *et al.* TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;**178**:3186–97.
- 13 Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, *et al.* EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;**185**:6439–47. doi:10.4049/jimmunol.0903459
- 14 Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, *et al.* Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2011;**6**:e26315. doi:10.1371/journal.pone.0026315
- 15 Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;**168**:4531–7.
- 16 Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, *et al.* Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol* 2008;**9**:39. doi:10.1186/1471-2172-9-39
- 17 Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol* 2013;**10**:103–6. doi:10.1038/cmi.2012.61
- 18 Hirsch I, Caux C, Hasan U, *et al.* Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* 2010;**31**:391–7. doi:10.1016/j.it.2010.07.004
- 19 Fischer J, Weber ANR, Böhm S, *et al.* Sex-specific effects of TLR9 promoter variants on spontaneous clearance of HCV infection. *Gut* 2017;**66**:1829–37. doi:10.1136/gutjnl-2015-310239
- 20 Xu Y, Hu Y, Shi B, *et al.* HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009;**46**:2640–6. doi:10.1016/j.molimm.2009.04.031
- 21 Lang T, Lo C, Skinner N, *et al.* The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol* 2011;**55**:762–9. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.042
- 22 Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, *et al.* Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatol Baltim Md* 2007;**45**:102–10. doi:10.1002/hep.21482
- 23 Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 2004;**18**:2699–711. doi:10.1101/gad.1256504
- 24 Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**:169–77. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.010
- 25 Gong Y, Zhao C, Zhao P, *et al.* Role of IL-10-Producing Regulatory B Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Dig Dis Sci* 2015;**60**:1308–14. doi:10.1007/s10620-014-3358-1

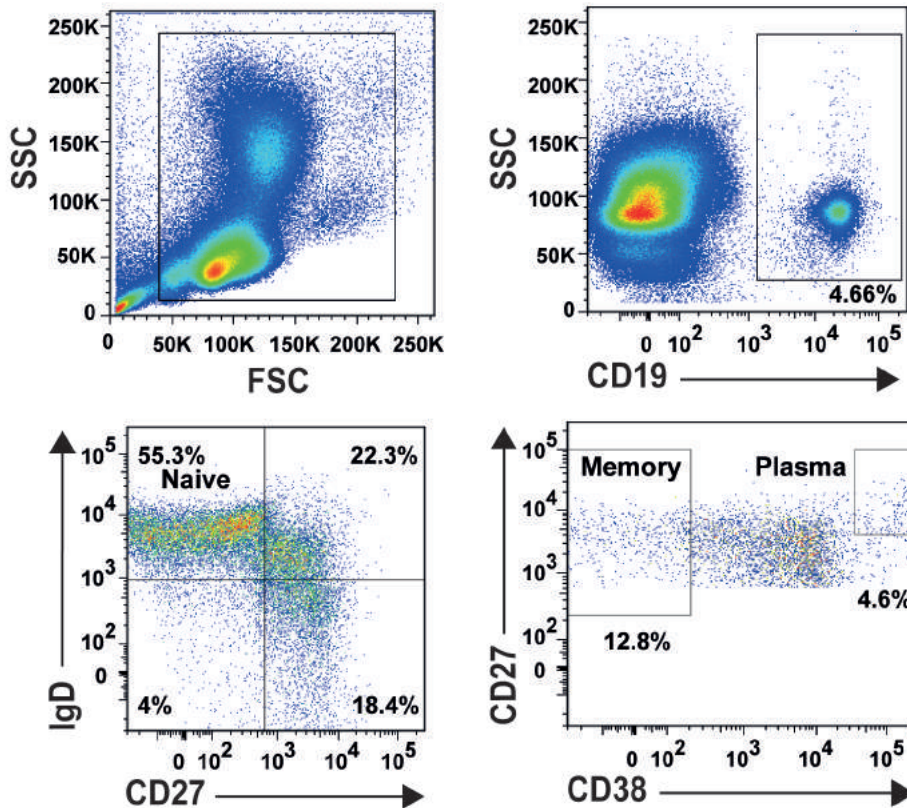
- 26 Sugalski JM, Rodriguez B, Moir S, *et al.* Peripheral blood B cell subset skewing is associated with altered cell cycling and intrinsic resistance to apoptosis and reflects a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;**185**:3019–27. doi:10.4049/jimmunol.1000879
- 27 Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:599–609. doi:10.1038/35085068
- 28 Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 2013;**210**:1369–87. doi:10.1084/jem.20122394
- 29 Shahzad N, Shuda M, Gheit T, *et al.* The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *J Virol* 2013;**87**:13009–19. doi:10.1128/JVI.01786-13
- 30 van Gent M, Braem SGE, de Jong A, *et al.* Epstein-Barr virus large tegument protein BPLF1 contributes to innate immune evasion through interference with toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog* 2014;**10**:e1003960. doi:10.1371/journal.ppat.1003960
- 31 Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;**185**:6413–9. doi:10.4049/jimmunol.1001829
- 32 Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**. doi:10.1101/cshperspect.a008722
- 33 Boltjes A, Groothuisink ZM, van Oord GW, *et al.* Monocytes from chronic HBV patients react in vitro to HBsAg and TLR by producing cytokines irrespective of stage of disease. *PLoS One* 2014;**9**:e97006. doi:10.1371/journal.pone.0097006
- 34 Zannetti C, Roblot G, Charrier E, *et al.* Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *J Immunol Baltim Md 1950* 2016;**197**:356–67. doi:10.4049/jimmunol.1502301
- 35 Xiang A, Ren F, Lei X, *et al.* The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway. *Antiviral Res* 2015;**120**:7–15. doi:10.1016/j.antiviral.2015.04.013
- 36 Tacke F, Liedtke C, Bocklage S, *et al.* CREB/PKA sensitive signalling pathways activate and maintain expression levels of the hepatitis B virus pre-S2/S promoter. *Gut* 2005;**54**:1309–17. doi:10.1136/gut.2005.065086
- 37 Yan H, Zhong G, Xu G, *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012;**1**:e00049. doi:10.7554/eLife.00049
- 38 Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, *et al.* Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011;**6**:e15324. doi:10.1371/journal.pone.0015324
- 39 Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, *et al.* Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology* 2012;**143**:1586–1596.e8. doi:10.1053/j.gastro.2012.08.046

- 40 Wang K, Liu H, He Y, *et al.* Correlation of TLR1-10 expression in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis B and chronic hepatitis B-related liver failure. *Hum Immunol* 2010;**71**:950–6. doi:10.1016/j.humimm.2010.07.013
- 41 Kuo T-M, Hu C-P, Chen Y-L, *et al.* HBV replication is significantly reduced by IL-6. *J Biomed Sci* 2009;**16**:41. doi:10.1186/1423-0127-16-41
- 42 Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, *et al.* Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatol Baltim Md* 2009;**50**:1773–82. doi:10.1002/hep.23226
- 43 Tan AT, Hoang LT, Chin D, *et al.* Reduction of HBV replication prolongs the early immunological response to IFN α therapy. *J Hepatol* 2014;**60**:54–61. doi:10.1016/j.jhep.2013.08.020
- 44 Valaydon Z, Pellegrini M, Thompson A, *et al.* The role of tumour necrosis factor in hepatitis B infection: Jekyll and Hyde. *Clin Transl Immunol* 2016;**5**:e115. doi:10.1038/cti.2016.68
- 45 Li H, Zhai N, Wang Z, *et al.* Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection. *Gut* Published Online First: 12 September 2017. doi:10.1136/gutjnl-2017-314098
- 46 Ni J, Hembrador E, Di Bisceglie AM, *et al.* Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;**170**:3429–39.
- 47 Asporid C, Bruder Costa J, Jacob M-C, *et al.* Remodeling of B-Cell Subsets in Blood during Pegylated IFN α -2a Therapy in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *PloS One* 2016;**11**:e0156200. doi:10.1371/journal.pone.0156200
- 48 Oliviero B, Cerino A, Varchetta S, *et al.* Enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in chronic hepatitis C and chronic hepatitis B virus infections. *J Hepatol* 2011;**55**:53–60. doi:10.1016/j.jhep.2010.10.016
- 49 Lin S, Sun Q, Mao W, *et al.* Serum Immunoglobulin A (IgA) Level Is a Potential Biomarker Indicating Cirrhosis during Chronic Hepatitis B Infection. *Gastroenterol Res Pract* 2016;**2016**:2495073. doi:10.1155/2016/2495073
- 50 DeFranco AL, Rookhuizen DC, Hou B. Contribution of Toll-like receptor signaling to germinal center antibody responses. *Immunol Rev* 2012;**247**:64–72. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01115.x

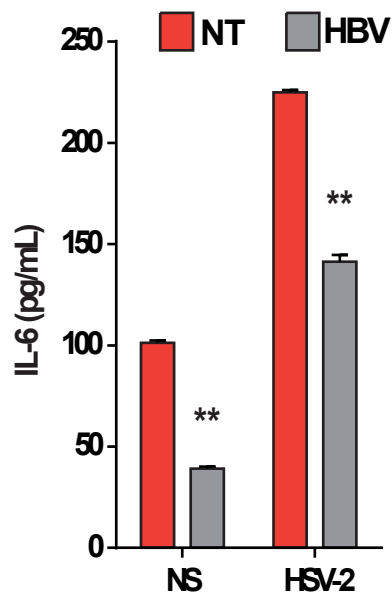
Supplementary Figures



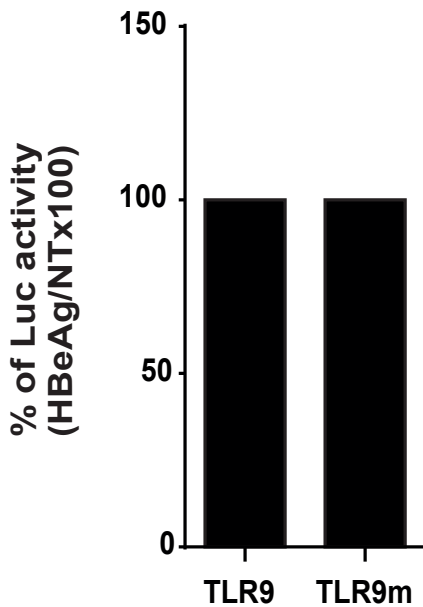
Sup figure 1: HBV virions and HBsAg are internalized in human B cells. Freshly isolated B cells were exposed to HBV inoculum at v.g.e 100 for 24h before cell preparation for Immunogold staining (anti-HBsAg antibody) and Electron microscopy. Left: a human B cell by electron microscopy. HBV virions of 42-45 nm diameter seen within the B cell cytoplasm (right panel). Magnification and scale bars are presented on the images. Arrows in red denote HBV virions location in B cells while arrows in blue denote HBsAg particles. Images are representative of three blood donors.



Sup figure 2: Gating strategy for peripheral B cell subsets. Fresh purified PBMCs from 3 different blood donors were stained using an antibody cocktail (mentioned above) and naïve, memory, plasma B cells were sorted. Human PBMCs were stained with CD19 to selectively isolate CD19+ B cells, and then the three B cell subsets were sorted according to IgD, CD27 and CD38 expression: IgD+ CD27- naïve B cells, IgD- CD27+ memory B cells and IgD- CD27++ CD38hi plasma B cells.

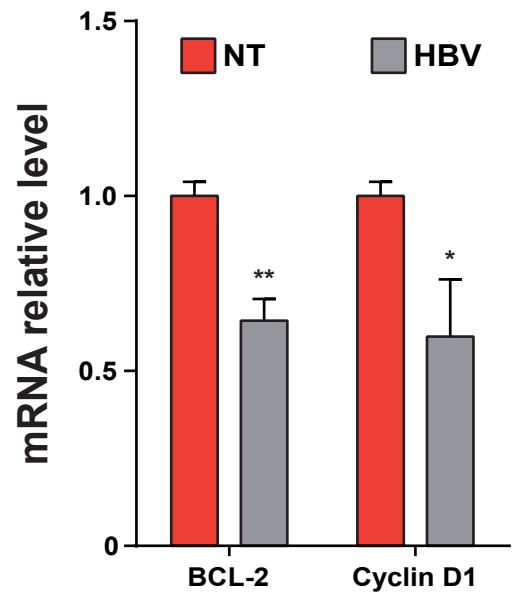


Sup figure 3: HBV impairs HSV-2 mediated IL-6 secretion in human B cells. Freshly purified B cells were stimulated by HSV-2 or left unstimulated \pm HBV (v.g.e 400) and for 24h. Levels of IL-6 in supernatants were measured by ELISA assay.



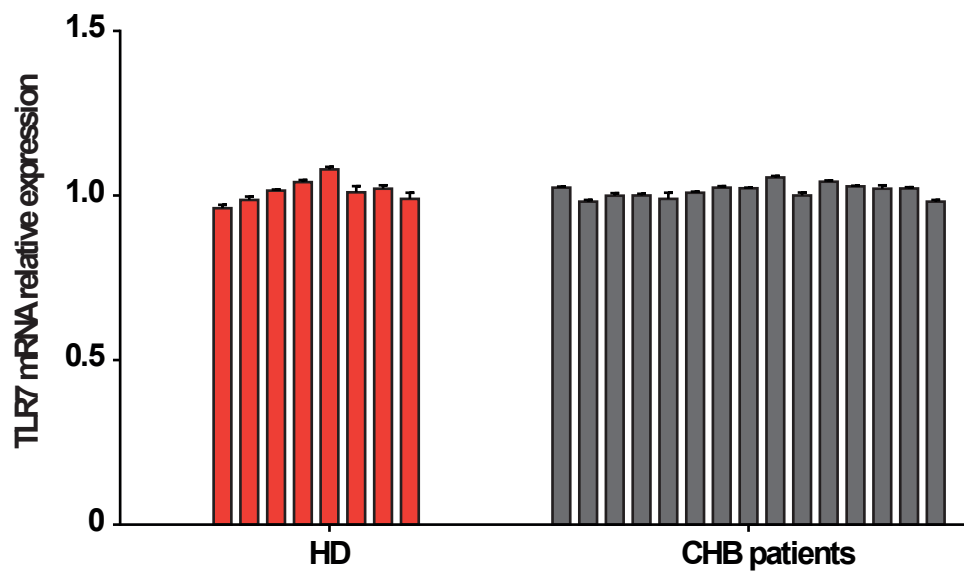
Sup figure 4: HBeAg is not implicated in HBV-mediated TLR9 inhibition in B cells.

RPMI 8226 cells were transfected with different mutated promoters, incubated with HBeAg or left untreated for 24h and harvested in total 48h post transfection. Cells were then processed to detect luciferase activity. Renilla luciferase co-transfection served as a normalization control.

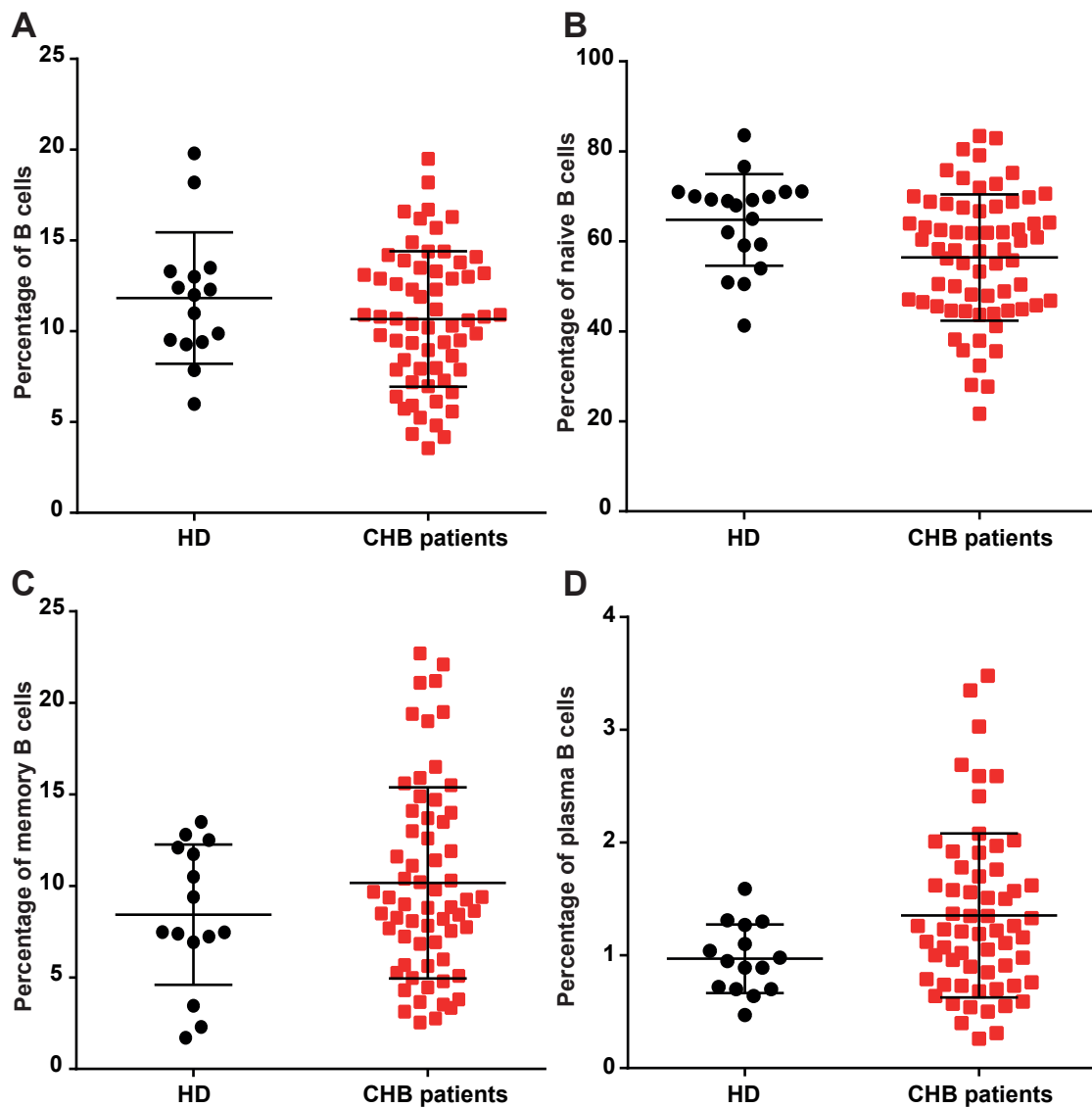


Sup figure 5: BCL-2 and cyclin D1 mRNA expression are down-regulated by HBV.

Freshly isolated primary B cells were incubated with HBV (v.g.e 400) or left untreated for 24h. Cells were harvested for RNA extraction and RT-PCR reaction. The expression level of BCL-2 and cyclin D1 was assessed by qPCR, normalized to the β 2-microglobulin expression and expressed relative to untreated cells.



Sup figure 6: TLR7 mRNA expression is similar between CHB patients and healthy donors. Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=15) (red bars) and from healthy donors (n=8) (black bars) were harvested for RNA extraction and RT-PCR reaction. The expression level of TLR9 (A), BCL-2 (B) and Cyclin D1 (C) was assessed by qPCR, normalized to the β 2-microglobulin expression and expressed relative to untreated cells.



Sup figure 7: Percentages of different B cell subsets in CHB patients. Fresh PBMCs from chronic hepatitis B patients (n=57) (red squares) and from healthy donors (n=15) (black dots) were stained with the antibody cocktail mentioned in figure S3 and percentages of total B cells (A), naïve (B), memory (C) and plasma B cells were determined (D).

Revue: HBV and the importance of TLR9 on B cell responses

Objectif :

Cette revue publiée dans le journal « AIMS Allergy and Immunology » discute des altérations fonctionnelles des lymphocytes B suite à une infection chronique par le virus de l'hépatite B. De plus, elle établit l'importance du TLR9 dans les réponses des cellules B et que la déficience observée dans ces réponses est due, entre autres, à une diminution de l'expression du TLR9 qui caractérise l'hépatite B chronique. Cette revue nous aide donc à se situer dans le contexte de l'atteinte immunitaire par HBV et surtout sur la fonctionnalité des cellules B.



Review

HBV and the importance of TLR9 on B cell responses

Issam Tout^{1,2,3,4,5}, **Marie Marotel**^{1,2,3,4,5}, **Isabelle Chemin**⁶, and **Uzma Hasan**^{1,2,3,4,5,*}

¹ Centre International de recherche en Infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Lyon, France

² Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³ CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁴ École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, France

⁵ Hospices Civils de Lyon, France

⁶ Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052-CNRS, UMR5286, Lyon, France

* **Correspondance:** Email: uzma.hasan@inserm.fr; Tel: +003-343-728-2454.

Abstract: Chronic HBV infection affects more than 240 million people worldwide and is a major risk factor for developing cancer in which 10–30% of cases will progress towards liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Infection outcome relies on the immune system maturity. Toll-like receptor 9 (TLR9) is a sensor of viral and bacterial DNA motifs and activates plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and B cells to generate effective immune responses against infection. B cells, especially CD38^{hi} plasma cells play a major role in mediating humoral immune responses to clear HBV infection. Many studies have shown that TLR9 function is abrogated by HBV in pDCs. We aim to discuss the importance of B cell function in CHB patients and summarize concisely studies that describe the effect of HBV on TLR9 mediated B cell function. The effect of HBV on TLR9 activity in B cells should give insights into oncoviral immune escape strategies providing knowledge that will be essential to develop novel immunotherapeutic approaches.

Keywords: hepatitis B virus; chronic infection; B cells; Toll-like receptor 9; innate immunity

1. Introduction

Chronic hepatitis is a global health concern and an economic burden affecting approximately 240 million people worldwide [1]. HBV causes liver disease ranging from acute self-limiting infection, occurring in the vast majority of cases in adulthood, to chronic infection, which occurs when the infection persists for more than 6 months [2–5]. The latter condition exhibits different

phenotypes, ranging from mild hepatitis to liver cirrhosis, eventually leading to liver cancer and end-stage liver failure. Worldwide, more than 780,000 die from liver-related disease each year [1].

Hepatitis B prevalence is highest in sub-Saharan Africa and East Asia, where between 5–10% of the adult population is chronically infected [1]. According to the estimation of the World Health Organization, children under 6 years of age who become infected with the hepatitis B virus develop chronic infections [1]. B cells play major roles in producing antibodies to clear HBV infection as well as protection against reinfection. In chronically infected patients, several studies have shown a disruption in B cell subset distribution as well as a hyper-activation of some B cell subsets. However, the functional characteristics of these cells that are associated with the outcome of chronic HBV infection remain unknown. In this review, we will assess the functional impairment of B cells during HBV infection. Moreover, we will discuss how HBV alters the immune system with a particular focus on the innate sensor, Toll-like receptor 9 (TLR9).

2. Virology and Etiology of HBV

HBV contains a small (3.2 kb), circular, partially double-stranded DNA organized into 4 open-reading frames. The longest open-reading frame encodes the viral polymerase (P). The core and X open-reading frames partially overlap with the envelope open-reading frame [6,7]. The covalently closed circular DNA (ccc DNA) is the template that is transcribed to generate four major RNA species: the 3.5 kb, 2.4 kb, 2.1 kb, and 0.7 kb viral RNA transcripts [8]. HBV produces Hepatitis B core antigen (HBcAg), Hepatitis B envelope antigen (HBeAg) called the precore, Hepatitis Bx antigen (HBxAg), and Hepatitis B surface antigen (HBsAg). The persistence of HBsAg in the host for more than six months generally marks a chronic infection with HBV and incapacity of the immune system to produce neutralizing anti-HBs antibodies. Whereas the levels of HBV DNA, HBeAg/anti-HBe and inflammatory markers in the liver such as ALT levels are used to differentiate between different clinical phases of the chronic infection [9].

The natural history of chronic HBV infection generally comprises four phases: immune tolerance, immune activation, non/low replication or inactive carrier and reactivation phase. Some patients might further clear hepatitis B surface antigen (HBsAg) either spontaneously or through antiviral therapy and then progress to the HBsAg seroconversion phase [9,10].

The immune response against the virus represents a key factor in determining infection outcome, concerning both viral clearance and the perpetuation of liver damage [11]. The dynamic interactions between the viruses, hepatocytes, and the host's immune system determine viral persistence and disease progression, which are displayed in distinct phases. However, the role of B cell-mediated humoral immune responses in disease activity and the progression of chronic hepatitis are not well understood. Below we will discuss studies highlighting the status of B cells in HBV infection.

3. Humoral Adaptive Response Against HBV Infection

The current knowledge of the humoral response emerges from the routine monitoring of serological patterns of patients with acute or chronic HBV infection. This allows their distribution into distinct clinical profiles by the humoral response developed against the structural antigens of the virus, namely the core antigens (HBcAg) and envelope or surface antigens (HBsAg). Anti-core (anti-HBc)-specific IgM is the earliest marker of infection, whereas antibodies against HBsAg and HBeAg

appear much later and indicate a favorable outcome of the infection [9,11,12,13]. Of note, in certain cases, a mutant form of HBeAg can arise, and therefore cannot be cleared by the host immune response [14,15,16]. These mutants are important because infections caused by these viruses are difficult to treat and can cause infections of prolonged duration and with a higher risk of liver cirrhosis. The mutations are changes in DNA bases from guanine to adenine at base position 1896 (G1896A), and from cytosine to thymine at position 1858 (C1858T) in the precore region of the viral genome [14,15,16].

Anti-HBc specific IgG responses develop during the acute phase and remain after clinical recovery. HBV generated anti-HBs antibodies are viral neutralizing antibodies and mediate protective immunity by both complexing with free viral particles and preventing their uptake by uninfected hepatocytes [17]. Neutralizing antibodies only develop after HBsAg disappearing from the serum and recovery from clinical symptoms. Moreover, they are usually absent in the symptomatic phase of infection as well as in the chronic stage. For this reason, no specific role can be attributed to anti-HBs-positive B cells in the resolution of infection [18]. The cause of the delayed development of neutralizing antibodies is still undefined, even though this feature appears to be unique to viral infections caused by poorly or non-cytopathic viruses [19]. Soluble HBsAg is present in the blood in excess as subviral but not infectious particles and exceeds the number of virions by a factor of 10^2 – 10^5 [20]. Also hepatitis B surface antigen (HBsAg) escape mutations exist which are sP120T, sM133I, sS143L, sD144A/E, sG145R, sE164D, sW172*, and sW182*, which is the most common pattern. Vaccine/HBIg escape mutations sG145R and sP120T in combination with lamivudine (LAM)-associated resistance mutations are often seen in HBV-mono-infected patients following LAM or HBIg treatment. Mutations in HBsAg may (1) result in HBV reactivation by escape mutants in previously antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immune persons, (2) cause diagnostic problems, and (3) result in failure of infection prevention with vaccination or hepatitis B immunoglobulin (HBIg) [21,22].

B cells can have an important, albeit indirect, role in HBV infection control, acting as antigen-presenting cells (APCs) for antiviral CD4+ T cells [23]. They contribute towards distinct functions during the immune response in vivo and affect lymphoid tissue structures [23,24,25]. Indeed, a subset of regulatory, IL-10 producing B cells has been found to be enriched in chronic HBV patients; this subset is correlated with hepatic flares and can suppress the HBV-specific CD8 response in an IL-10-dependent manner [26]. Recently Xu et al. HCC patients exhibited significantly higher frequencies of IL-10 expressing B cells, which were negatively correlated with the frequencies of granzyme A, granzyme B, and perforin-expressing CD4+ T cells. The surface molecule Tim-1 was preferentially expressed on IL-10 expressing B cells. CD4+ T cells incubated with Tim-1+ B cells which exhibited significantly reduced levels of granzyme A, granzyme B and perforin expression, compared to the CD4+ T cells incubated with Tim-1– B cells. Blocking IL-10 in culture rescued CD4+ T cell cytotoxicity. Compared to peripheral blood, the level of IL-10 expressing B cells was upregulated in the resected tumor, while the level of CD4+ cytotoxic T cells was downregulated [27]. The work of Liu et al. also highlighted elevated Bregs that suppressed effector T but enhance Treg functions in CHB patients [28]. Additionally, it is worth mentioning that a direct pathogenetic role of the antibody response has been described in HBV-associated acute liver failure, due to a massive intrahepatic accumulation of anti-HBc IgG- and IgM-secreting plasma cells [29].

In fact, we speculate that the lack of anti-HBs in chronic infection can be partly attributed to a selective exhaustion of specific B cells which has recently been described in different models of

chronic antigen exposure [30,31]. A general hyperactivated non-functional phenotype of some B cell subsets leading to a disrupted B cell distribution [32] may be responsible of the lack of humoral response towards HBsAg in CHB patients. In summary, recent B cell biology research in HBV infection has been largely neglected to date and it should now represent a main research focus to better understand the mechanisms underlying the interaction between the innate and humoral arms of the immune system. These studies will highlight the potential role played by B cells in the pathogenesis and outcome of HBV-related liver disease.

4. Alterations of B Cell Subsets in the Context of HBV Infection

Persistent viral infections, particularly if accompanied by chronic immune activation, are occasionally characterized by an increased frequency of antigen-specific B cells. Some B cells have an exhausted phenotype and are, therefore highly dysfunctional, having been exposed to a large load of viral antigens at sites of inflammation, as shown in HIV infection [30,33]. Moreover, protracted antigenic stimulation may result in B cell activation and polyclonal proliferation, potentially leading to autoimmunity and lymphoproliferative disorders [34]. To approach the elusive role of B cells in HBV and HCV infection, the paper by Oliviero et al. addressed the extent of B cell activation and differentiation in HBV and HCV patients with chronically persisting infections [32]. The authors found a high frequency of activated B cells, both in patients with chronic HBV and HCV infection, and both in the naive and the memory B cell pool. However, B cells did not exhibit increased markers of exhaustion. Upon stimulation by toll-like receptor engagement or combined CD40L and interleukin-10 stimulation, the memory B cells both from HBV and HCV carriers showed a relatively low rate of differentiation into plasma cells; the proliferative response of stimulated naive and memory B cells from virus carriers was lower than that of healthy donors. These findings seem to indicate that polyclonal B cell activation may be a feature of chronic HCV infection, as well as of chronic HBV infection. Nevertheless, the rate of memory B cell proliferation and differentiation to plasma cells was low [32].

Overall, limited data are available regarding B-cell dysfunctions in patients with CHB and the impact of possible therapeutic strategies on the B cell compartment [35–39]. In a previous report, a B cell activation profile with an enhanced differentiation capacity into immunoglobulin-producing cells was observed in the context of HBV infection [32]. The lack of appropriate seroconversion paralleling the evolution towards chronicity nevertheless demonstrates a dramatic impairment in B-cell responses. Interestingly, disorders in B-cell subset phenotype and function have been described in other chronic viral infections such as in HIV-1 [40,41] and HCV [32,42,43]. The mechanisms leading to these dysfunctions as well as the impact of the current therapies on the B cell population have not been elucidated in chronic viral infection and need to be further investigated.

On the other hand, it has been shown that the majority of patients with chronic HCV infection, as well as HIV infected patients, carry a substantial proportion of over-activated B cells that belong to both the naïve and memory B cell compartment [30,40,43,44]. However, patients with HCC demonstrated extreme depletion of memory B lymphocytes, and the ratio of naïve/memory B lymphocytes was significantly increased in HCC patients compared with healthy controls. In addition, there was a significant inverse correlation between HCC disease stage and the percentage of memory B lymphocytes. Thus, humoral immunity was depleted with a progression of HBV mediated HCC and that depletion of memory B lymphocytes may be a characteristic phenomenon in

chronic viral infections [45]. However, more has to be done to understand the precise events leading to this disruption in B cell distribution and consequently an alteration in B cell responses.

Some cytokines, such as IL-6, IL-10 and IFN- γ , have been reported as required for B lymphocyte development, and these cytokines are deregulated in HBV-infected patients [46,47,48]. In fact, we see an upregulation of IL-10 immunosuppressive cytokine in CHB patients which may reflect a weaker immune response. IL-6 levels in hepatitis B early antigen (HBeAg) (+) and HBV-DNA (+) patients were significantly higher than HBeAg (-) and HBV-DNA (-) patients [49].

In fact, the deregulation of pro-inflammatory and/or anti-inflammatory cytokines reflects precisely the change in B cell subsets distribution in HBV infection.

These effects were reversed in subjects with HBsAg seroconversion meaning that there is a restoration of B cell distribution and function in resolved patients [50]. However, the underlying mechanisms of general B cell hyperactivation, an abundance of hyperactive nonspecific-plasma cells evidenced by the elevated plasma IgG and IgM levels and the increased secretion of IgG and IgM upon stimulation *in vitro*, in chronic HBV infection remain unknown.

Additionally, Xu X et al. also suggested that the antigen-presenting capacity of B cells was impaired in CHB patients, shown by a decrease in CD80 expression [27]. Because the ligation of CD28 on CD4 T cells by CD80/CD86 on B cells represents a dominant co-stimulatory pathway that plays a critical role in CD4 T cell activation and proliferation, the downregulation of CD80 on B cells in CHB patients may influence the induction of CD4 T cell activation and proliferation. Indeed, in chronic HBV infection, not only are HBV-specific CD4 and CD8 T cell responses significantly diminished [51,52] but a generalized T cell hypo-responsiveness has also been demonstrated [53]. This T-cell hypo-responsiveness might be a consequence of functionally impaired dendritic cells [54]. Thus, as critical antigen-presenting cells, B cells might also be involved in T-cell impairment in chronic HBV infection. This finding also supports the hypothesis that HBsAg might play a key role in the inhibition of HBV specific responses, thus leading to the failure of HBV clearance in CHB patients and suggest that the promotion of HBsAg-specific B cells would be a favorable new therapeutic strategy for this disease. During persistent virus infections, continuous B cell activation may result in an accumulation of exhausted B cells that have defective function and increased expression of inhibitory receptors as described for HIV [30,33]. However, patients with chronic HBV and HCV infections maintain the ability to produce antibodies to recall antigens and are able to respond to soluble-protein vaccines. Thus the mechanism of B cell impairment is not yet fully understood and requires more investigation.

5. Role of TLR9 on B Cell Function

Viruses are recognized by the host through early receptors called Pathogen Recognition Receptors (PRR). The main PRR families include the Nod-like receptors (NLRs), the retinoic acid-induced gene (RIG)-like receptors (RLRs), and Toll-like receptors (TLRs), and all members play a key role in the initiation of the innate immune response and link innate to adaptive immunity [55]. Among these TLRs, TLR9 recognizes synthetic viral DNA in the form of unmethylated CpG oligonucleotides. TLR9 expression is restricted to pDCs and B cells in human. Upon TLR9 stimulation by distinct classes of CpG oligonucleotides (CpG ODN) B cells are induced to proliferate and secrete IgM and pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8 and TNF- α , antigen presentation, Ig isotype switching and cell survival for long-lived plasma cells and memory B cells [56]. In the

context of B cell response, TLR7 and 9 stimulation provide a third signal that synergizes with BCR triggering (signal one) and T cell help (signal two) resulting in the induction of sustained proliferation and differentiation of human naive B cells. While signal one and two together are sufficient to drive initial proliferation of naive B cells, they fail to sustain B cell expansion and the proliferating B cells die after a few divisions. TLR9/7 stimulation rescues proliferating B cells that progressively switch isotype and differentiate to plasma cells [57,58].

Thus TLR9 is crucial for B cell priming and therefore B cell function. Below we will have summarized how HBV abrogates TLR function, with a particular focus on TLR9.

6. HBV and TLRs

It has been well described that innate immunity is compromised in the presence of viral infections especially by oncoviruses that will induce this downregulation and abrogation of the immune system's components to expand the infection and proliferate within the host. Recent studies have highlighted specific interactions of HIV, HBV, HCV, Epstein Barr virus (EBV) and Human Papillomavirus (HPV) with regulatory molecules [58,59] that lead to impaired PRR signaling [59–62].

HBV is claimed to be a “stealth virus” in the early phase of infection because it does not induce IFNs and IFN-stimulated genes (ISGs) in acute HBV-infected chimpanzees [63] or patients [64]. Two possibilities could explain this fact: the inability of HBV to activate PPRs or viral inhibition of PPR signaling pathways. Accumulating evidence supports the latter hypothesis that HBV can interfere with PRR signaling pathways. It has been consistently shown that TLR expression and function are reduced during HBV infection. Listed in table 1 are mechanisms used by viruses to evade TLR specific-mediated responses (Table 1).

Table 1. Mechanisms employed by HBV to avoid TLR specific-mediated responses.

Model	Mechanism	HBV protein involved	References
PBMCs of CHB patients	Impaired TLR2 and TLR4 ligands-induced pro-inflammatory cytokines production	HBsAg	[60]
Monocytes/macrophages	Interference with TLR-induced ERK, JNK, and NF- κ B pathways	HBsAg	[65,66,67]
Myeloid dendritic cell	Impair myeloid dendritic cell function	HBsAg	[68]
Plasmacytoid dendritic cells	Abrogation of TLR9-mediated IFN- α production	HBsAg	[69,70]
Murine chronic HBsAg carriers	Decreased number and declined activation of the hepatic NK cells	HBsAg	[71]
(HBeAg)-positive CHB patients	Interference with TLR-mediated innate immune responses and regulation of TLR2	HBeAg	[72,73]
Mouse parenchymal and nonparenchymal liver cells	Suppression of TLR-mediated innate immune responses	HBV, HBeAg and subviral particles	[74]
HepaRG cell line and primary human hepatocytes	Inhibition of Toll-like receptor 3 and RIG-I/MDA5 signaling pathways	HBV	[75]
CHB patients	Suppression of the activation of the toll-like receptor signaling pathway as well as downregulating IL-18-mediated cell signaling and IFN- γ expression	HBeAg	[76]

CHB patients	Inhibition of TLR7 and TLR9	HBV	[59]
Human hepatocytes	Inhibition of TLR3-mediated IFN- β induction through interference with IRF3 activation	HBV polymerase and HBx	[77]
Hepatoma cells	Suppression of TNF- α , TLR3 or TLR4-induced NF- κ B signaling by inhibiting the activity of IKKs via interaction with Hsp90b	HBV polymerase	[78]
Hepatocytes, Kupffer cells, and peripheral monocytes	Regulation of TLR2 expression	HBeAg	[73]
Hepatocytes	Blocks pattern recognition receptor signaling (IRF activation) via Interaction with DDX3	HBV polymerase	[79]

7. HBV and TLR9

Of note, the role of TLR9 signaling in B cells during HBV acute infection could be relevant in light of the importance of the humoral response in the outcome of HBV infection and therefore deserves more attention. Indeed TLR9 deregulation by HBV has been noted on other cell types than B cells. Martinet et al. found that pDCs from patients infected with CHB displayed inadequate responses to stimulation with TLR9 ligands and were unable to induce cytolytic activity of NK cells [80]. This result was supported in a study by Xu and colleagues, which used TLR9 ligands to stimulate pDCs and found impaired type I interferon responses [81]. Ratnam et al. reported that the stimulated NK cells of patients infected with CHB had an impaired interferon γ response to TLR9 ligands in comparison with controls [82]. Another study showed that mRNA levels of TLR9 were negatively correlated with serum levels of liver enzymes, while positively associated with HBV viral load in patients with CHB [83]. Zhou et al. also reported that expression levels of TLR9 were significantly decreased in patients with CHB [84]. In parallel with these results, Xie and colleagues showed that expression levels of TLR9 mRNA and protein levels were decreased in pDCs of patients with CHB in comparison with healthy controls [85]. Taken together, these data highlight the efficiency of HBV in silencing the innate response by blocking TLR9 function on pDCs. Therefore, to better understand at which step TLR9 is affected, we may propose that TLR9 expression, as well as TLR9-mediated functions, should be studied in all four stages of the chronic infection as the immune system profile is not the same.

Indeed an analysis of PBMCs from chronic hepatitis B and HBV associated hepatocellular carcinoma patients suggest that TLR9 mRNA levels are downregulated in CHB and that TLR9 protein is drastically reduced in both CHB and HCC patients [86,87] although some studies contradict this data [88]. This can be explained by the differences in the patients profile between various clinical studies and can also come from the fact that TLR9 expression is measured during the different clinical phases of chronic HBV infection. More recently shown is that the frequencies of CD19⁺ B cells and Bregs were elevated in patients with chronic HBV infection compared with healthy control (HC). However compared with the HC group, the expression of TLR9 in Bregs was reduced in chronic hepatitis B (CHB) patients [89]. Our group is currently elucidating the mechanism of TLR9 transcriptional abrogation by HBV in B cells. Takeshita observed that TLR9 transcription depends on phosphorylation of cAMP Response Element-binding protein (CREB) [90]. Data in our lab show that HBV can block pCREB and thus prevents TLR9 transcription. Furthermore,

data from our laboratory suggest that TLR9 expression is downregulated on all peripheral blood B cell subsets and that some TLR9-mediated functions (proinflammatory cytokines secretion, B cell proliferation) are impaired in CHB patients. Figure 1 represents a scheme of the proposed model for HBV chronic infection effect on TLR9 and B cell functionality.

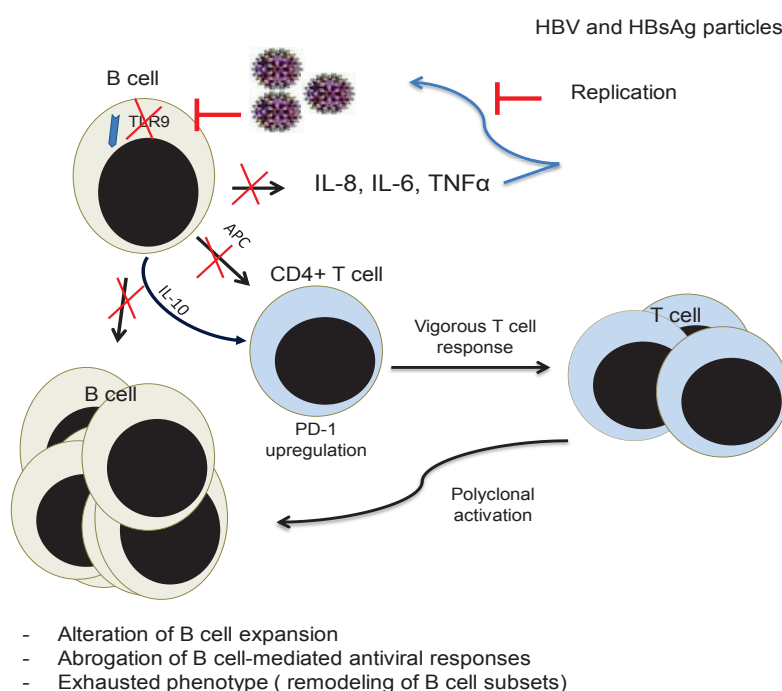


Figure 1. HBV virions and HBsAg particles abrogate TLR9-mediated B cell responses: chronic HBV infection leads to a general B cell exhausted phenotype where B cell subsets are remodeled, and thus their functions are impaired. TLR9 impairment by HBV will lead to an abrogated cytokine secretion, a reduced B cell proliferation and this will impact B cell-mediated antiviral responses (antibodies production) negatively and consequently T cell responses (activation of CD8+ cytotoxic T cells).

Despite these data, another group has suggested that TLR9 stimulation may induce liver damage (inflammation, fibrosis, steatosis), involving non-parenchymal liver components [91]. Thus HBV-mediated TLR9 inhibition may reduce liver inflammation thus facilitating its persistence within the liver. Therefore, understanding TLR9-HBV interactions holds future promise not only for the fundamental aspects of HBV persistence but also for the development of novel immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B infection.

8. Conclusion

While the central role of adaptive immunity in controlling HBV infection is well established, the contribution of innate immunity in this regard has been appreciated only in recent years. HBV and its viral components are associated with the inhibition of TLR signaling pathways that lead to

impaired IFN production but also a disturbance in B cell homeostasis. Whether the innate immune responses could control HBV infection if initiated in the early phase of HBV infection must be determined. It is documented that the activation of TLR mediated signaling pathways not only exhibits direct inhibition of HBV replication but also enhances HBV specific T-cell and B-cell responses and could partially restore TLR expression in patients. C Asford et al. [50] show that Peg-IFN- α may trigger modulations of the B-cell compartment either directly by influencing B-cell differentiation and antibody production or indirectly by activating other immune cells such as dendritic cells and T cells that can subsequently modulate B cell differentiation and function.

In summary, a treatment strategy with a combination of viral suppression [50,86], activation of TLR-mediated innate immunity and consequently restoration of HBV-specific immune responses are needed to achieve effective long term control of chronic HBV infection. This would also restore impaired B cell subsets distribution and restore HBV specific B cell responses even if it is non-persistent and not correlated with an HBsAg seroconversion.

Acknowledgments

This study was funded by the “National Agency for AIDS and Viral Hepatitis Research (ANRS)”, “La Ligue Contre le Cancer” du Rhone, Lyon, France and the Lebanese Ministry of Education, Lebanon. We thank the Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444 and the French Blood agency (EFS) for their contribution in the clinical studies.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest in this paper.

References

1. Hepatitis B (2017) Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204_Jul2014/en/.
2. Lavanchy D (2005) Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 34: S1–S3.
3. McMahon BJ (2005) Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 25: 3–8.
4. Bertoletti A, Gehring AJ (2006) The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Viro* 187: 1439–1449.
5. Dienstag JL (2008) Hepatitis B virus infection. *New Engl J Med* 359: 1486–1500.
6. Mason WS, Aldrich C, Summers J, et al. (1982) Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3997–4001.
7. Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403–415.
8. Ganem D (2001) Virology. The X files--one step closer to closure. *Science* 294: 2299–2300.
9. European Association For The Study Of The Liver (2012) EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 57: 167–185.
10. Bertoletti A, Kennedy PT (2015) The immune tolerant phase of chronic HBV infection: new perspectives on an old concept. *Cell Mol Immunol* 12: 258–263.

11. Bertoletti A, Ferrari C (2013) Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Postgrad Med J* 89: 294–304.
12. Guidotti LG, Chisari FV (2006) Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1: 23–61.
13. McMahon BJ (2009) The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatology Int* 3: 334–342.
14. Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, et al. (2005) Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol* 34: S79–S82.
15. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Zeuzem S, et al. (2012) Presence of precore and core promoter mutants limits the probability of response to peginterferon in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 56: 67–75.
16. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, et al. (2004) Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol* 78: 8524–8535.
17. Alberti A, Diana S, Sculard GH, et al. (1978) Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection. *BMJ-Brit Med J* 2: 1056–1058.
18. Loggi E, Gamal N, Bihl F, et al. (2014) Adaptive response in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepatitis* 21: 305–313.
19. Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H (2006) Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6: 231–243.
20. Seeger C, Mason WS (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol R* 64: 51–68.
21. Weber B (2005) Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 32: 102–112.
22. Sayan M, Sentürk O, Akhan SÇ, et al. (2010) Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 14: e136–e141.
23. Mitchison NA (2004) T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol* 4: 308–312.
24. Garraud O, Borhis G, Badr G, et al. (2012) Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. *BMC Immunol* 13: 63.
25. LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112: 1570–1580.
26. Das A, Ellis G, Pallant C, et al. (2012) IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 189: 3925–3935.
27. Xu X, Shang Q, Chen X, et al. (2015) Reversal of B-cell hyperactivation and functional impairment is associated with HBsAg seroconversion in chronic hepatitis B patients. *Cell Mol Immunol* 12: 309–316.
28. Liu Y, Cheng LS, Wu S, et al. (2016) IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin Sci* 130: 907–919.
29. Farci P, Diaz G, Chen Z, et al. (2010) B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-associated acute liver failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8766–8771.

30. Moir S, Ho J, Malaspina A, et al. (2008) Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205: 1797–1805.
31. Weiss GE, Crompton PD, Li S, et al. (2009) Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J Immunol* 183: 2176–2182.
32. Oliviero B, Cerino A, Varchetta S, et al. (2011) Enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in chronic hepatitis C and chronic hepatitis B virus infections. *J Hepatol* 55: 53–60.
33. Moir S, Fauci AS (2009) B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 235–245.
34. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, et al. (2006) Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 107: 3034–3044.
35. Maruyama T, McLachlan A, Iino S, et al. (1993) The serology of chronic hepatitis B infection revisited. *J Clin Invest* 91: 2586–2595.
36. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Herr W, et al. (1996) Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 105: 52–58.
37. Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Cooksley WG, et al. (1983) Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest* 71: 1104–1113.
38. Barnaba V, Valesini G, Levrero M, et al. (1985) Immunoregulation of the in vitro anti-HBs antibody synthesis in chronic HBsAg carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol* 60: 259–266.
39. Barnaba V, Levrero M, Ruberti G, et al. (1987) In vitro anti-HBs antibody synthesis from anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol* 70: 283–288.
40. Amu S, Ruffin N, Rethi B, et al. (2013) Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *Aids* 27: 2323–2334.
41. Pensiero S, Galli L, Nozza S, et al. (2013) B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *Aids* 27: 1209–1217.
42. Ni J, Hembrador E, Di BA, et al. (2003) Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 170: 3429–3439.
43. Racanelli V, Frassanito MA, Leone P, et al. (2006) Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* 80: 3923–3934.
44. Rosa D, Saletti G, Gregorio ED, et al. (2005) Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18544–18549.
45. Wang XD, Wang L, Ji FJ, et al. (2012) Decreased CD27 on B lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *J Int Med Res* 40: 307–316.
46. Li WY, Jiang YF, Jin QL, et al. (2010) Immunologic characterization of posthepatitis cirrhosis caused by HBV and HCV infection. *J Biomed Biotechnol* 2010: 138237.
47. Lund FE (2008) Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol* 20: 332–338.

48. Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. (1995) Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181: 839–844.
49. Kakumu S, Shinagawa T, Ishikawa T, et al. (1991) Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 86: 1804–1808.
50. Asporid C, Bruder CJ, Jacob MC, et al. (2016) Remodeling of B-cell subsets in blood during pegylated IFN α -2a therapy in patients with chronic Hepatitis B infection. *PLoS One* 11: e0156200.
51. Chang JJ, Wightman F, Bartholomeusz A, et al. (2005) Reduced hepatitis B virus (HBV)-specific CD4⁺ T-cell responses in human immunodeficiency virus type 1-HBV-coinfected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *J Virol* 79: 3038–3051.
52. Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. (2000) The role of virus-specific CD8 (+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 191: 1269–1280.
53. Boni C, Penna A, Ogg GS, et al. (2001) Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 33: 963–971.
54. Chen L, Zhang Z, Chen W, et al. (2007) B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 178: 6634–6641.
55. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820.
56. Hua Z, Hou B (2013) TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol* 10: 103–106.
57. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A (2003) A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101: 4500–4504.
58. Ruprecht CR, Lanzavecchia A (2006) Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 36: 810–816.
59. Hirsch I, Caux C, Hasan U, et al. (2010) Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* 31: 391–397.
60. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, et al. (2008) Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 128: 400–408.
61. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, et al. (2010) EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol* 185: 6439–6447.
62. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, et al. (2013) The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 210: 1369–1387.
63. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, et al. (2004) Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6669–6674.
64. Dunn C, Peppas D, Khanna P, et al. (2009) Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137: 1289–1300.
65. Cheng J, Imanishi H, Morisaki H, et al. (2005) Recombinant HBsAg inhibits LPS-induced COX-2 expression and IL-18 production by interfering with the NF κ B pathway in a human monocytic cell line, THP-1. *J Hepatol* 43: 465–471.

66. Müller C, Zielinski CC (1990) Impaired lipopolysaccharide-inducible tumor necrosis factor production in vitro by peripheral blood monocytes of patients with viral hepatitis. *Hepatology* 12: 1118–1124.
67. Wang S, Chen Z, Hu C, et al. (2013) Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J Immunol* 190: 5142–5151.
68. Ml ODB, Binda RS, van Roosmalen MH, et al. (2009) Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* 126: 280–289.
69. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, et al. (2011) Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 6: e26315.
70. Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. (2009) HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 46: 2640–2646.
71. Han Q, Zhang C, Zhang J, et al. (2013) The role of innate immunity in HBV infection. *Semin Immunopathol* 35: 23–38.
72. Lang T, Lo C, Skinner N, et al. (2011) The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol* 55: 762–769.
73. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, et al. (2007) Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 45: 102–110.
74. Wu J, Meng Z, Jiang M, et al. (2009) Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 49: 1132–1140.
75. Luangsay S, Gruffaz M, Isorce N, et al. (2015) Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol* 63: 1314–1322.
76. Jegaskanda S, Ahn SH, Skinner N, et al. (2014) Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon gamma expression by the hepatitis B virus e antigen. *J Virol* 88: 10412–10420.
77. Yu S, Chen J, Wu M, et al. (2010) Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J Gen Virol* 91: 2080–2090.
78. Hepatitis B virus polymerase suppresses NF- κ B signaling by inhibiting the activity of IKKs via interaction with Hsp90 β . Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hepatitis%20B%20virus%20polymerase%20suppresses%20NF-kappaB%20signaling%20by%20inhibiting%20the%20activity%20of%20IKKs%20via%20interaction%20with%20Hsp90beta%5BTtitle%5D>.
79. Wang H, Ryu WS (2010) Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS Pathog* 6: e1000986.
80. Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder CJ, et al. (2012) Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology* 143: 1586–1596.
81. Xu N, Yao HP, Lv GC, et al. (2012) Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN- α from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm Res* 61: 997–1004.

82. Ratnam DT, Sievert W, Visvanathan K (2012) Natural killer cells display impaired responses to toll like receptor 9 that support viral persistence in chronic hepatitis B. *Cell Immunol* 279: 109–115.
83. Wang K, Liu H, He Y, et al. (2010) Correlation of TLR1-10 expression in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis B and chronic hepatitis B-related liver failure. *Hum Immunol* 71: 950–956.
84. Zhou J, Huang Y, Tian D, et al. (2009) Expression of toll-like receptor 9 in peripheral blood mononuclear cells from patients with different hepatitis B and C viral loads. *J Huazhong University Sci Technol Med Sci* 29: 313–317.
85. Xie Q, Shen HC, Jia NN, et al. (2009) Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect* 11: 515–523.
86. Huang YW, Hsu CK, Lin SC, et al. (2014) Reduced toll-like receptor 9 expression on peripheral CD14+ monocytes of chronic hepatitis B patients and its restoration by effective therapy. *Antivir Ther* 19: 637–643.
87. Xu N, Yao H, Sun Z, et al. (2008) Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin* 29: 239–244.
88. Zhao PW, Ma L, Ji HF, et al. (2015) The expression of TLR-9, CD86, and CD95 phenotypes in circulating B cells of patients with chronic viral hepatitis B or C before and after antiviral therapy. *Mediat Inflamm* 2015: 762709.
89. Wang G, Liu Y, Huang R, et al. (2017) Characteristics of regulatory B cells in patients with chronic hepatitis B virus infection in different immune phases. *Discov Med* 23: 295–304.
90. Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, et al. (2004) Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J Immunol* 173: 2552–2561.
91. Aoyama T, Paik YH, Seki E (2010) Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract* 2010: E1–E8.



AIMS Press

© 2017 Uzma Hasan, et al., licensee AIMS Press. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Environ 20% des cancers humains dans le monde sont attribués à des virus (401,402), ce qui représente une proportion importante du fléau mondial du cancer. HBV figure parmi les virus à ADN qui peuvent causer un cancer. En effet, dès 1970, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) était associée au développement du carcinome hépatocellulaire (HCC) (403).

Aujourd'hui, on sait que l'infection par le HBV peut entraîner une fibrose hépatique, avec la forme la sévère et étendue, la cirrhose qui met les patients en haut risque de développer le carcinome hépatocellulaire (HCC). En outre, HBV lui-même est connu pour être cancérigène à travers de multiples mécanismes d'intégration virale dans le génome de l'hôte, des actions directes des particules virales sur les cellules hôtes et des mécanismes d'inflammation indirects entraînant des dommages génétiques au fil du temps. Tous ces processus peuvent conduire à l'oncogenèse chez les patients atteints de HBV, même s'ils n'ont pas de cirrhose (404).

De nombreux oncovirus ont développé des stratégies pour échapper au système immunitaire notamment par la dérégulation de l'expression des récepteurs de l'immunité innée. Parmi les récepteurs à ADN connus pour être dérégulé par les oncovirus et au cours des infections chroniques est le TLR9. En effet, plusieurs oncovirus peuvent échapper à la reconnaissance immunitaire entraînant une perte spécifique d'expression et de fonction de TLR9. La capacité de chaque virus à utiliser une stratégie unique pour cibler les facteurs de transcription qui régulent le promoteur TLR9, ou la stabilité de son ARNm a été largement documenté (393–395,405). La protéine LMP-1 d'EBV ainsi que l'oncoprotéine E7 de HPV16 activent la voie NF- κ B conduisant à la suppression de la transcription de TLR9 dans les cellules B et les kératinocytes respectivement. EBV peut aussi via la protéine BGLF5 (EBV-lytic phase protein) diminuer les taux d'expression de TLR9 par dégradation de son mRNA (406). Le T antigen locus of Merkel cell polyomavirus peut bloquer le C/EBP β transactivator ce qui entraîne également la régulation de la transcription de TLR9 (394). De plus, les SNPs du promoteur de TLR9 sont associés à la clairance naturelle de l'infection par le HCV et ont montré des activités transcriptionnelles plus élevées (407). La capacité de HBV à déréguler l'expression et la fonction de TLR9 dans les pDCs a été décrite par Vincent et al. (388). Ces auteurs ont montré aussi que l'activité transcriptionnelle du promoteur TLR9 est dérégulée dans une lignée de cellules B, les RPMI 8226. De nombreuses études ont montré que l'expression et la fonction de TLR9 sont modifiées chez les patients atteints de CHB. Martinet et al. ont constaté que les pDCs provenant de patients CHB avaient des réponses défectueuses à la stimulation avec des ligands TLR9 et étaient incapables d'induire une activité cytolytique des cellules NK (378). Ce résultat a été soutenu dans une étude de Xu et ses collègues, qui ont introduit des ligands TLR9 dans les pDCs et ont constaté des réponses d'interféron de type I altérées (377).

Nos données suggèrent un nouveau mécanisme par lequel HBV peut bloquer la transcription de TLR9 ainsi que les fonctions médiées par ce dernier dans les cellules B humaines. Nous avons montré que le composant viral HBsAg peut réduire les niveaux de phosphorylation de PKA et donc du facteur de transcription CREB, réduisant ainsi sa capacité à se lier au site CRE situé sur le promoteur de TLR9. En outre, HBsAg ne pouvait plus affecter l'activité du promoteur TLR9 lorsque nous avons introduit une mutation sur le site CRE ce qui montre clairement que c'est par l'intermédiaire de cette région CRE dans le promoteur que se fait l'altération du promoteur de TLR9. CREB a un rôle bien documenté dans la plasticité neuronale et la formation de la mémoire à long terme (408), bien que des données émergentes aient révélé des fonctions spécifiques du CREB dans les réponses immunitaires, y compris l'inhibition de l'activation du NF- κ B, l'augmentation de la survie des macrophages et la prolifération, la survie et régulation des cellules T et B (378,409). Nous avons également montré que HBsAg peut abroger les niveaux de ^pPKA en amont de CREB ce qui conduit à la diminution de la phosphorylation et l'activation de CREB donc son incapacité à se lier au site CRE pour activer la transcription de TLR9. Néanmoins, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour élucider le mécanisme précis par lequel HBsAg peut affecter la phosphorylation PKA-CREB dans les cellules B humaines. Ces études doivent démontrer si l'effet de HBsAg est physique (liaison physique à PKA) ou bien si HBsAg peut déréguler d'autres éléments de la voie CRE/CREB. D'autre part, il a été montré que HBV utilisait les voies de transduction du signal CREB / PKA dans les hépatocytes pour augmenter l'expression de HBsAg pendant l'homéostasie et l'inflammation hépatique (410,411). Cependant, à notre connaissance, ces données obtenues montrent pour la première fois que l'abrogation de la signalisation CRE/CREB dans les cellules B humaines conduit à la diminution de l'expression de TLR9 ce qui favorise l'invasion immunitaire par HBV. Par conséquent, HBV peut utiliser la voie CRE/CREB pour 1. Augmenter son infection dans les hépatocytes et favoriser la réplication virale et 2. abroger les fonctions des cellules B médiées par TLR9 pour échapper au contrôle du système immunitaire.

BCL-2, un des gènes cibles de CREB (412), joue un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules B (413). Cette étude a montré que les niveaux d'ARNm de BCL-2 dans les cellules B ont été réduits par HBV, ce qui indique que la perte de la fonction CREB pourrait également contribuer à une diminution de la prolifération des cellules B, un effet que nous avons observé à la fois *in vitro* et chez les patients atteints de CHB.

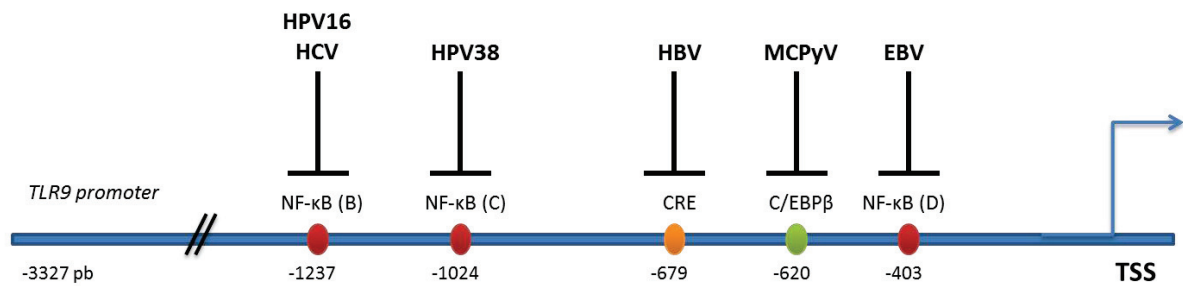


Figure 16: Effets répresseurs des oncovirus sur le promoteur TLR9.

Par ailleurs, nous avons montré que HBeAg peut aussi réduire l'expression protéique de TLR9 en plus de HBsAg. Ce même effet similaire à HBsAg a été démontré aussi dans les tests reporteur de luciférase sur le promoteur de TLR9. Dans cette expérience, HBeAg et HBsAg peuvent déréguler l'activité du promoteur TLR9 mais il semble que l'effet de HBeAg n'est pas médié par la région CRE du promoteur vu qu'il conserve son effet même si CRE est muté. Il a été montré que HBeAg peut réprimer certaines voies de TLRs notamment TLR2 (390). On peut imaginer que HBeAg affecte la stabilité de la protéine TLR9 dans notre système et peut aussi éventuellement réguler son promoteur via un autre site de la région régulatrice du promoteur située à -800 pb du site d'initiation de la transcription : un candidat peut être le site de recrutement de NF-κB qui est utilisé par d'autres oncovirus pour diminuer l'expression de TLR9 via son promoteur (393,395). Des données non publiées de notre laboratoire suggèrent que ce site peut médier certains effets sur le promoteur de TLR9 en réponse à d'autres protéines virales.

Plusieurs études montrent que HBV peut diminuer la sécrétion de cytokines en interférant avec les voies de signalisation TLR dans les monocytes/macrophages ce qui peut contribuer à l'établissement d'infections chroniques (212,414,415). Dans cette étude, on a observé que le niveau d'IL-6 sécrété par les cellules B suite à la stimulation de la voie TLR9 par CpG2006 *in vitro* diminue en présence de HBV. Cette diminution a été observée également dans les PBMCs issus de patients CHB que ce soit au niveau basal ou suite à une stimulation de TLR9. Ces résultats montrent l'incapacité des cellules B dans les patients CHB à produire de l'IL-6 médié par TLR9 et donc représente une stratégie virale du HBV à contrer la réponse immunitaire. D'autre part, on connaît que les niveaux d'IL-6 dans le sérum des patients CHB sont augmentés suivant la sévérité des atteintes hépatiques et sont positivement corrélés avec l'inflammation hépatique (219,416). Cela peut donc suggérer que le niveau sérique d'IL-6 est variable pendant les différentes phases de l'infection chronique ce qui explique nos résultats de baisse d'IL-6 dans notre cohorte de patients CHB qui sont des porteurs inactifs en majorité. Une autre possibilité est le fait que la sécrétion d'IL-6 pendant l'infection chronique n'est pas majoritairement médiée par TLR9 et les cellules B mais par de nombreuses autres populations cellulaires qui participent à

l'atteinte hépatique. L'équilibre des cytokines sécrétées pendant l'hépatite chronique reste compliqué à comprendre et demande donc plus d'études cliniques pour identifier les populations cellulaires sécrétrices et les fluctuations des cytokines pro vs anti inflammatoires.

Nous avons également remarqué que HBV n'affecte pas la production globale d'immunoglobulines médiée par l'activation de TLR9. En effet, dans nos conditions expérimentales, ni la sécrétion d'IgG ni la production d'IgA ou d'IgM n'a été affectée par la présence de HBV. Au contraire, on observe une hausse du nombre de plasmocytes sécrétant IgG et IgA suite à une stimulation TLR9 en présence du virus. Ces résultats ont été mis en évidence par Oliviero et al. qui ont montré une différenciation améliorée des lymphocytes B et une capacité proliférative réduite dans une cohorte de patients chroniquement infectés par l'hépatite B et l'hépatite C (188). En outre, Lin et al. ont rapporté que les réponses IgA sont augmentées chez les patients atteints de cirrhose du foie et, par conséquent, suggèrent que l'IgA pourrait être utilisé comme biomarqueur pour la cirrhose (417). D'autre part, la stimulation TLR augmente la magnitude des plasmocytes B pour générer des réponses IgG anti-virales spécifiques à haute affinité (418). En se basant sur ces données, on peut suggérer que HBV n'affecte pas les réponses globales d'Ig médiées par la stimulation TLR9 dans les cellules B mais peut spécifiquement atténuer les réponses Ig anti-virales via la répression de TLR9 dans les cellules B.

De nombreuses études montrent que l'ADN viral, ses formes répliquatives, l'ADNccc y compris, ainsi que des transcrits viraux ont été retrouvés dans les PBMCs de porteurs chroniques du virus (419,420). Dans cette étude, nous montrons, par microscopie électronique, que les virions HBV ainsi que les particules HBsAg peuvent être internalisées dans les cellules B primaires. De plus, nous montrons par Image Stream flow cytometry que les particules virales peuvent être internalisées au bout de 24h dans le cytoplasme des cellules B primaires et cela est confirmé par le shift dans l'indice d'internalisation entre la condition 0h vs 24h de traitement avec HBsAg ou HBV. La nature du site cellulaire d'attachement impliqué dans la liaison des virus HBV aux cellules B est en cours d'investigation. Alors que le sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) est un candidat potentiel, comme déjà démontré pour les hépatocytes (97), des données non publiées indiquent que les cellules B n'expriment pas ce récepteur et, par conséquent, un autre récepteur cellulaire pourrait être impliqué dans cette liaison. Nous avons constaté aussi que la sécrétion d'IL-6 médiée par TLR7 n'est pas affectée par la présence de HBV comme on le voit dans les cellules B stimulées avec TLR9. Ce qui suggère que HBV cible TLR9 d'une façon spécifique. En fait, plusieurs études ont montré que l'expression de TLR7 n'est pas affectée par l'infection avec le HBV ou le HCV. Woltman et al. montrent que HBV et HBsAg étaient incapables de supprimer les réponses immunitaires induites par Loxoribine (ligand de TLR7) tandis qu'ils affectaient les réponses induites par TLR9 (Stimulation par CpG-A) (421). Vincent et al. ont

également montré que l'internalisation des particules de HBV par des pDCs n'entraînait pas la suppression de la sécrétion de l'IFN- α (388) médiée par le TLR7.

Dans notre étude clinique composée d'une cohorte de patients CHB majoritairement dans la phase de porteurs inactifs, nous avons étudié l'impact de l'infection chronique sur l'expression de TLR9 dans les différentes sous-populations de cellules B du sang périphérique ainsi que sur les fonctions médiées par TLR9. Similairement aux données obtenues *in vitro*, l'expression de TLR9 a été diminuée dans les cellules B naïves, mémoire et les cellules B plasmiques et cet effet était plus prononcé dans les cellules B mémoire. Ce résultat montre que l'inhibition de TLR9 n'est pas spécifique à une sous-population de cellules B périphériques et est un effet général sur les cellules B exprimant TLR9. De manière surprenante, dans cette étude, l'infection chronique par HBV n'a pas affecté les pourcentages de ces trois sous-populations de cellules B ce qui a été montré dans d'autres études cliniques (188,422). Il serait intéressant d'étudier l'expression de TLR9 sur d'autres sous-populations de cellules B, notamment les cellules B transitionnelles pour essayer de comprendre les altérations fonctionnelles des cellules B durant les infections chroniques. De manière générale, les infections chroniques induisent une hyperactivation des cellules B qui ont parfois un phénotype « épuisé », et par conséquent ne sont pas fonctionnelles vu qu'elles ont été exposées à une grande quantité d'antigènes viraux, comme dans les cas de l'infection à HIV (186,423). En effet, une stimulation antigénique prolongée peut entraîner une hyperactivation des cellules B et une prolifération polyclonale incontrôlée, entraînant potentiellement une auto-immunité et des troubles lymphoprolifératifs (424). On peut suggérer qu'un phénotype non-fonctionnel hyperactivé de certaines sous-populations de cellules B conduisant à une perturbation dans la distribution des cellules B (188) peut être responsable du manque de réponse humorale à l'HBsAg chez les patients atteints de CHB. Oliviero et al. ont trouvé une fréquence élevée de cellules B activées, à la fois chez les patients atteints d'une infection chronique par HBV ou HCV, et à la fois dans le compartiment de cellules B naïves et mémoires. Lors d'une stimulation par l'engagement des TLRs, la réponse proliférative des cellules B naïves et mémoires provenant de patients CHB était inférieure à celle des donneurs sains (188). Ces résultats semblent indiquer que l'activation polyclonale des cellules B peut être une caractéristique de l'infection chronique HCV, ainsi que de l'infection chronique par HBV. Dans l'ensemble, les données concernant les dysfonctions des cellules B chez les patients atteints de CHB et l'impact de stratégies thérapeutiques possibles sur le compartiment des cellules B sont encore limitées (422,425–428). Le manque de séroconversion appropriée parallèle à l'évolution vers la chronicité démontre néanmoins une altération dramatique des réponses des cellules B. Asford et al. montrent que ces altérations ont été inversés chez les sujets capables de séroconversion HBsAg, ce qui signifie qu'il existe une restauration de la distribution et de la fonction des cellules B chez les patients qui ont résolu l'infection (422). Dans l'ensemble, les mécanismes de l'hyperactivation générale des cellules B, l'abondance de cellules plasmiques non spécifiques hyperactives mises en

évidence par les niveaux plasmatiques d'IgG et d'IgM et la sécrétion accrue d'IgG et d'IgM lors de la stimulation *in vitro*, dans l'infection chronique par HBV, restent inconnues demanderaient plus de recherche pour bien comprendre et identifier les acteurs de cette « exhaustion » comme pour les cellules T (148,398,399). La figure X présente un schéma du modèle proposé pour l'effet de l'infection chronique de HBV sur les fonctionnalités du TLR9 et des cellules B.

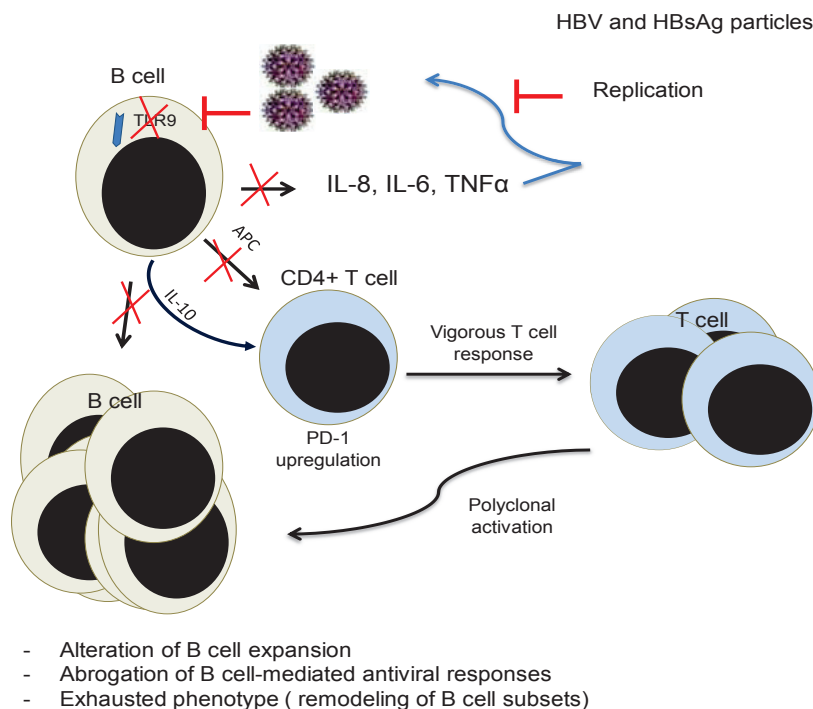


Figure 17: HBV et les particules HBsAg altèrent les réponses des lymphocytes B médiées par TLR9. L'infection chronique par HBV conduit à un phénotype épuisé suractivé de cellules B où les sous-populations de lymphocytes B sont remodelées et, par conséquent, leurs fonctions sont altérées. L'altération de TLR9 par HBV entraînera une sécrétion de cytokines abrogée, une réduction de la capacité proliférative de cellules B et cela aura une incidence sur les réponses antivirales médiées par les cellules B (production d'anticorps) et par conséquent sur les réponses des lymphocytes T (activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8 +).

Toutes ces données suggèrent un rôle de TLR9 dans l'induction des réponses immunitaires humorales et cellulaires contre l'hépatite B. Les traitements futurs pourraient se concentrer sur des stratégies qui peuvent augmenter l'expression de TLR9 et ses molécules de signalisation comme moyen de réactiver les réponses immunitaires et de faciliter l'éradication du HBV chez les patients CHB. Ces stratégies peuvent d'un côté, augmenter la réponse immunitaire antivirale, et de l'autre côté, compléter les traitements actuels réduisant la réplication virale. En outre, les résultats suggèrent aussi que les ligands TLR9 peuvent être considérés

comme une cible puissante pour les adjuvants à utiliser dans la vaccination contre HBV, en particulier chez les patients qui ne répondent pas à la vaccination conventionnelle. En parallèle avec les traitements antiviraux, des études futures peuvent être conduites pour découvrir de nouveaux ligands ou pour améliorer les ligands actuels de TLR9 pour améliorer les réponses immunitaires contre HBV surtout chez les patients souffrant d'une infection chronique prolongée.

REFERENCES

1. Rous P. A TRANSMISSIBLE AVIAN NEOPLASM. (SARCOMA OF THE COMMON FOWL.). *J Exp Med.* 1910 Sep 1;12(5):696–705.
2. Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *Conn Med.* 1973 Oct;37(10):526.
3. Rous P. Landmark article (JAMA 1911;56:198). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous. *JAMA.* 1983 Sep 16;250(11):1445–9.
4. Gross L. “Spontaneous” leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1951 Jan;76(1):27–32.
5. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1953 Jun;83(2):414–21.
6. Temin HM, Rubin H. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology.* 1958 Dec;6(3):669–88.
7. McKinnell RG, Zambarnard J. Virus particles in renal tumors obtained from spring Rana pipiens of known geographic origin. *Cancer Res.* 1968 Apr;28(4):684–8.
8. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT’S LYMPHOMA. *Lancet Lond Engl.* 1964 Mar 28;1(7335):702–3.
9. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT’S LYMPHOMA. *J Exp Med.* 1965 May 1;121:761–70.
10. Blumberg BS, Larouzé B, London WT, Werner B, Hesser JE, Millman I, et al. The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1975 Dec;81(3):669–82.
11. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974 May 15;13(5):650–6.
12. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* 1977 Sep;50(3):481–92.
13. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989 Apr 21;244(4902):359–62.
14. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi’s sarcoma. *Science.* 1994 Dec 16;266(5192):1865–9.
15. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Dec;77(12):7415–9.
16. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet Lond Engl.* 1981 Nov 21;2(8256):1129–33.
17. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008 Feb 22;319(5866):1096–100.
18. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012 Jun;13(6):607–15.
19. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* 2010 Dec;10(12):878–89.
20. Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology Baltim Md.* 2009 May;49(5 Suppl):S56–60.

21. de Martel C, Maucort-Boulch D, Plummer M, Franceschi S. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* Baltim Md. 2015 Oct;62(4):1190–200.
22. Lurman A. Eine icterus epidemic. *Berl Klin Wochenschr.* 1885;(22):20–23.
23. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2014 Feb;34 Suppl 1:29–37.
24. Havens WP. PERIOD OF INFECTIVITY OF PATIENTS WITH HOMOLOGOUS SERUM JAUNDICE AND ROUTES OF INFECTION IN THIS DISEASE. *J Exp Med.* 1946 May 31;83(6):441–7.
25. Maccallum FO. Homologous Serum Hepatitis. *Proc R Soc Med.* 1946 Aug;39(10):655–7.
26. Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W. Mortality and morbidity among military personnel and civilians during the 1930s and World War II from transmission of hepatitis during yellow fever vaccination: systematic review. *Am J Public Health.* 2013 Mar;103(3):e16-29.
27. Neefe JR, Gellis SS, Stokes J. Homologous serum hepatitis and infectious (epidemic) hepatitis; studies in volunteers bearing on immunological and other characteristics of the etiological agents. *Am J Med.* 1946 Jul;1:3–22.
28. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “NEW” ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA.* 1965 Feb 15;191:541–6.
29. Blumberg BS. The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Dec;17 Suppl:S502-503.
30. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967 May;66(5):924–31.
31. Gocke DJ, Kavey NB. Hepatitis antigen. Correlation with disease and infectivity of blood-donors. *Lancet Lond Engl.* 1969 May 31;1(7605):1055–9.
32. Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW, Krugman S. Relation of Australia-SH antigen to the willowbrook MS-2 strain. *N Engl J Med.* 1969 Jul 17;281(3):119–22.
33. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968 Jul;60(3):814–21.
34. London WT, Sutnick AI, Blumberg BS. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann Intern Med.* 1969 Jan;70(1):55–9.
35. Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down’s Syndrome and hepatitis. *Nature.* 1968 Jun 15;218(5146):1057–9.
36. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet Lond Engl.* 1970 Apr 4;1(7649):695–8.
37. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet Lond Engl.* 1971 Dec 4;2(7736):1225–7.
38. Magnus LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol.* 1972;80(2):335–7.
39. Magnus LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1972 Nov;109(5):1017–21.
40. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol.* 1973 Nov;12(5):995–1005.
41. Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol.* 1974 Jun;13(6):1231–6.
42. Summers J, O’Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Nov;72(11):4597–601.

43. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. 1979 Oct 25;281(5733):646–50.
44. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P. Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet Lond Engl*. 1976 Jun 26;1(7974):1367–70.
45. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P, Baudin S, et al. Vaccine against hepatitis B--18 months prevention in a high risk setting. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1978 Nov 17;166(1–4):109–18.
46. Desmyter J, De Groote J, Desmet VJ, Billiau A, Ray MB, Bradburne AF, et al. Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis-B infection. *Lancet Lond Engl*. 1976 Sep 25;2(7987):645–7.
47. Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med*. 1976 Sep 2;295(10):517–22.
48. Purcell RH, London WT, McAuliffe VJ, Palmer AE, Kaplan PM, Gerin JL, et al. Modification of chronic hepatitis-B virus infection in chimpanzees by administration of an interferon inducer. *Lancet Lond Engl*. 1976 Oct 9;2(7989):757–61.
49. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 1982 Jun;29(2):403–15.
50. Chen G-F, Wang C, Lau G. Treatment of chronic hepatitis B infection-2017. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2017 Jan;37 Suppl 1:59–66.
51. Liu B, Wen X, Huang C, Wei Y. Unraveling the complexity of hepatitis B virus: from molecular understanding to therapeutic strategy in 50 years. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Sep;45(9):1987–96.
52. Korba BE, Wells F, Tennant BC, Yoakum GH, Purcell RH, Gerin JL. Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. *J Virol*. 1986 Apr;58(1):1–8.
53. Korba BE, Cote PJ, Wells FV, Baldwin B, Popper H, Purcell RH, et al. Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1360–70.
54. Korba BE, Brown TL, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Steinberg H, et al. Natural history of experimental woodchuck hepatitis virus infection: molecular virologic features of the pancreas, kidney, ovary, and testis. *J Virol*. 1990 Sep;64(9):4499–506.
55. Lew YY, Michalak TI. In vitro and in vivo infectivity and pathogenicity of the lymphoid cell-derived woodchuck hepatitis virus. *J Virol*. 2001 Feb;75(4):1770–82.
56. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):14–21.
57. Albin C, Robinson WS. Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol*. 1980 Apr;34(1):297–302.
58. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):65–73.
59. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2000 Mar;64(1):51–68.
60. Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol*. 2009 Feb;11(2):249–60.
61. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984 Nov;52(2):396–402.
62. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974 Aug;14(2):384–91.
63. Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol*. 1979 Oct;32(1):226–33.

64. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*. 1980 Oct;21(3):801–9.
65. Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology*. 1988 Oct;166(2):475–85.
66. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*. 1986 Apr 25;232(4749):477–84.
67. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*. 1987 Mar;61(3):904–11.
68. Gish RG, Given BD, Lai C-L, Locarnini SA, Lau JYN, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Res*. 2015 Sep;121:47–58.
69. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):267–72.
70. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2000 Mar;64(1):51–68.
71. Patient R, Hourieux C, Sizaret P-Y, Trassard S, Sureau C, Roingard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):3842–51.
72. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):258–66.
73. Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol*. 1998 Feb;72(2):1462–8.
74. Sheu SY, Lo SJ. Preferential ribosomal scanning is involved in the differential synthesis of the hepatitis B viral surface antigens from subgenomic transcripts. *Virology*. 1992 May;188(1):353–7.
75. Birnbaum F, Nassal M. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol*. 1990 Jul;64(7):3319–30.
76. Steven AC, Conway JF, Cheng N, Watts NR, Belnap DM, Harris A, et al. Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins. *Adv Virus Res*. 2005;64:125–64.
77. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 1997 Dec 11;337(24):1733–45.
78. Walsh R, Locarnini S. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. *Yonsei Med J*. 2012 Sep;53(5):875–85.
79. Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012 May;61 Suppl 1:i6-17.
80. Lanford RE, Notvall L, Lee H, Beames B. Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Virol*. 1997 Apr;71(4):2996–3004.
81. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol*. 1994 Jan;68(1):6–13.
82. Chen P, Gan Y, Han N, Fang W, Li J, Zhao F, et al. Computational evolutionary analysis of the overlapped surface (S) and polymerase (P) region in hepatitis B virus indicates the spacer domain in P is crucial for survival. *PLoS One*. 2013;8(4):e60098.
83. Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*. 1990 Feb;64(2):613–20.
84. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):996–1003.

85. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*. 1994 Mar;68(3):2026–30.
86. Decorsière A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*. 2016 Mar 17;531(7594):386–9.
87. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):19975–9.
88. Benhenda S, Cougot D, Buendia M-A, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;103:75–109.
89. Ciesek S, Helfritz FA, Lehmann U, Becker T, Strassburg CP, Neipp M, et al. Persistence of occult hepatitis B after removal of the hepatitis B virus-infected liver. *J Infect Dis*. 2008 Feb 1;197(3):355–60.
90. Loustaud-Ratti V, Wagner A, Carrier P, Marczuk V, Chemin I, Lunel F, et al. Distribution of total DNA and cccDNA in serum and PBMCs may reflect the HBV immune status in HBsAg+ and HBsAg- patients coinfecting or not with HIV or HCV. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Sep;37(4):373–83.
91. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanou T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol*. 2004 Feb;72(2):203–14.
92. Lamelin JP, Zoulim F, Trépo C. Lymphotropism of hepatitis B and C viruses: an update and a newcomer. *Int J Clin Lab Res*. 1995;25(1):1–6.
93. Datta S. Compartmentalization of hepatitis B virus: Looking beyond the liver. *World J Hepatol*. 2015 Sep 18;7(20):2241–4.
94. Michalak TI, Lin B. Molecular species of hepadnavirus core and envelope polypeptides in hepatocyte plasma membrane of woodchucks with acute and chronic viral hepatitis. *Hepatology*. 1994 Aug;20(2):275–86.
95. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23–61.
96. Xie Y, Zhai J, Deng Q, Tiollais P, Wang Y, Zhao M. Entry of hepatitis B virus: mechanism and new therapeutic target. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):301–7.
97. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 2012;1:e00049.
98. Huang H-C, Chen C-C, Chang W-C, Tao M-H, Huang C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol*. 2012 Sep;86(17):9443–53.
99. Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, et al. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6730–4.
100. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2010 Feb;52(2):282–4.
101. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. 1986 Nov 7;47(3):451–60.
102. Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol*. 1996 Jul;70(7):4269–74.
103. Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol*. 2009 Nov;11(11):1561–70.
104. Valaydon ZS, Locarnini SA. The virological aspects of hepatitis B. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Jun;31(3):257–64.
105. Prange R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2012 Nov;201(4):449–61.

106. Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2012 Feb;105(2):109–13.
107. Dawson AJ. An ethical argument in favour of routine hepatitis B vaccination in very low-incidence countries. *Lancet Infect Dis*. 2005 Feb;5(2):120–5.
108. De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology*. 2007 Aug 15;365(1):113–24.
109. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 May 14;20(18):5427–34.
110. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2010 Jan;40(1):14–30.
111. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet Lond Engl*. 2014 Dec 6;384(9959):2053–63.
112. WHO | Hepatitis B [Internet]. WHO. [cited 2017 Jun 20]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204_Jul2014/en/
113. de Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, et al. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J Hepatol*. 2003;39 Suppl 1:S3-25.
114. Allain J-P. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2006 May;36 Suppl 1:S12-17.
115. Liaw Y-F, Brunetto MR, Hadziyannis S. The natural history of chronic HBV infection and geographical differences. *Antivir Ther*. 2010;15 Suppl 3:25–33.
116. Dény P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):245–53.
117. Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2129–34.
118. Meyer RA, Duffy MC. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B infection leading to fulminant hepatic failure. Report of two cases and review of the literature. *J Clin Gastroenterol*. 1993 Oct;17(3):231–4.
119. Trepo CG, Robert D, Motin J, Trepo D, Sepetjian M, Prince AM. Hepatitis B antigen (HBSAg) and/or antibodies (anti-HBS and anti-HBC) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut*. 1976 Jan;17(1):10–3.
120. O’Shea. Hepatitis B [Internet]. [cited 2017 Nov 20]. Available from: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitis-B/>
121. Lok AS, McMahon BJ, Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. *Hepatol Baltim Md*. 2001 Dec;34(6):1225–41.
122. Bertoletti A, Kennedy PT. The immune tolerant phase of chronic HBV infection: new perspectives on an old concept. *Cell Mol Immunol*. 2015 May;12(3):258–63.
123. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008 Feb;48(2):335–52.
124. Lai CL, Ratziu V, Yuen M-F, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet Lond Engl*. 2003 Dec 20;362(9401):2089–94.
125. Tran TT. Immune Tolerant Hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug;7(8):511–6.
126. McMahon BJ. Natural History of Chronic Hepatitis B – Clinical Implications. *Medscape J Med*. 2008 Apr 16;10(4):91.
127. Vanwolleghem T, Hou J, van Oord G, Andeweg AC, Osterhaus ADME, Pas SD, et al. Re-evaluation of hepatitis B virus clinical phases by systems biology identifies unappreciated roles for the innate immune response and B cells. *Hepatol Baltim Md*. 2015 Jul;62(1):87–100.

128. Croagh CM, Lubel JS. Natural history of chronic hepatitis B: Phases in a complex relationship. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Aug 14;20(30):10395–404.
129. Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol WJG*. 2011 Jan 21;17(3):283–9.
130. Ngo Y, Benhamou Y, Thibault V, Ingiliz P, Munteanu M, Lebray P, et al. An accurate definition of the status of inactive hepatitis B virus carrier by a combination of biomarkers (FibroTest-ActiTest) and viral load. *PLoS One*. 2008 Jul 2;3(7):e2573.
131. Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B Virus: Inactive carriers. *Virology*. 2005 Sep 28;2:82.
132. Yapali S, Talaat N, Lok AS. Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2014 Jan;12(1):16–26.
133. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):39–52.
134. McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2005;25 Suppl 1:3–8.
135. Wu HC, Santella R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon*. 2012 Oct;12(10 HCC):e7238.
136. Guerrieri F, Belloni L, Pediconi N, Levrero M. Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 2013 May;33(2):147–56.
137. Tian Y, Yang W, Song J, Wu Y, Ni B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol Cell Biol*. 2013 Aug;33(15):2810–6.
138. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*. 2012 May 27;44(7):760–4.
139. Locarnini SA, Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir Ther*. 2010;15(3 Pt B):451–61.
140. Zuckerman AJ. Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *Lancet Lond Engl*. 2000 Apr 22;355(9213):1382–4.
141. Zoulim F. Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res*. 2012 Nov;96(2):256–9.
142. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1593-1608.e1-2.
143. Volz T, Allweiss L, Ben MBarek M, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, et al. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):861–7.
144. Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4277–88.
145. Billioud G, Pichoud C, Puerstinger G, Neyts J, Zoulim F. The main hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. *Antiviral Res*. 2011 Nov;92(2):271–6.
146. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*. 2006 Jun;87(Pt 6):1439–49.
147. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Postgrad Med J*. 2013 May;89(1051):294–304.
148. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*. 2009 Jul;58(7):974–82.

149. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*. 2003 Jan;77(1):68–76.
150. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004 Mar 11;350(11):1118–29.
151. Bertoletti A, Ferrari C. Adaptive immunity in HBV infection. *J Hepatol*. 2016 Apr;64(1 Suppl):S71-83.
152. Loggi E, Gamal N, Bihl F, Bernardi M, Andreone P. Adaptive response in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2014 May;21(5):305–13.
153. Bertoletti A, Tan AT, Gehring AJ. HBV-Specific Adaptive Immunity. *Viruses*. 2009 Jul 27;1(2):91–103.
154. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Nov 15;145(10):3442–9.
155. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology*. 1999 Dec;117(6):1386–96.
156. Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, et al. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol*. 2003 May;23(3):223–32.
157. Webster G, Bertoletti A. Quantity and quality of virus-specific CD8 cell response: relevance to the design of a therapeutic vaccine for chronic HBV infection. *Mol Immunol*. 2001 Dec;38(6):467–73.
158. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jan 1;184(1):287–95.
159. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1996 Jan;4(1):25–36.
160. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):258–66.
161. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23–61.
162. Balkow S, Kersten A, Tran TT, Stehle T, Grosse P, Museteanu C, et al. Concerted action of the FasL/Fas and perforin/granzyme A and B pathways is mandatory for the development of early viral hepatitis but not for recovery from viral infection. *J Virol*. 2001 Sep;75(18):8781–91.
163. Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4215–25.
164. Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zchoval R, Eisenburg J, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1991 Nov;13(3):310–7.
165. Webster GJM, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, et al. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol*. 2004 Jun;78(11):5707–19.
166. Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1835–45.
167. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):682–93, 693.e1-4.
168. Dunn C, Peppia D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, et al. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2009 Oct;137(4):1289–300.

169. Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong HZ, et al. Increased levels of arginase in patients with acute hepatitis B suppress antiviral T cells. *Gastroenterology*. 2012 Jul;143(1):78–87.e3.
170. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology*. 2013 Jul 20;10:239.
171. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. Antibody to hepatitis-B-virus core in man. *Lancet Lond Engl*. 1973 Oct 20;2(7834):869–73.
172. Farci P, Diaz G, Chen Z, Govindarajan S, Tice A, Agulto L, et al. B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-associated acute liver failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8766–71.
173. Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*. 2012 Dec;61(12):1754–64.
174. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014 Apr;146(4):1070–83.
175. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014 Jul;147(1):48–64.
176. Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH. Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*. 2003 Sep;77(17):9511–21.
177. Ryu CJ, Gripon P, Park HR, Park SS, Kim YK, Guguen-Guillouzo C, et al. In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen. *J Med Virol*. 1997 Jun;52(2):226–33.
178. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol*. 1998 Jul;72(7):5573–8.
179. Matsue K, Kimura S, Takanashi Y, Iwama K, Fujiwara H, Yamakura M, et al. Reactivation of hepatitis B virus after rituximab-containing treatment in patients with CD20-positive B-cell lymphoma. *Cancer*. 2010 Oct 15;116(20):4769–76.
180. Mitchison NA. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol*. 2004 Apr;4(4):308–12.
181. Mitchison NA. The discovery of T cell-B cell cooperation. *Front Immunol*. 2014;5:377.
182. Ferrari C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Valli A, Missale G, et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest*. 1991 Jul;88(1):214–22.
183. Loggi E, Bihl FK, Cursaro C, Granieri C, Galli S, Brodosi L, et al. Virus-specific immune response in HBeAg-negative chronic hepatitis B: relationship with clinical profile and HBsAg serum levels. *PLoS One*. 2013;8(6):e65327.
184. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Oct 15;189(8):3925–35.
185. Liu Y, Cheng L-S, Wu S, Wang S-Q, Li L, She W-M, et al. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2016 01;130(11):907–19.
186. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea MA, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1797–805.
187. Weiss GE, Crompton PD, Li S, Walsh LA, Moir S, Traore B, et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Aug 1;183(3):2176–82.
188. Oliviero B, Cerino A, Varchetta S, Paudice E, Pai S, Ludovisi S, et al. Enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in chronic hepatitis C and chronic hepatitis B virus infections. *J Hepatol*. 2011 Jul;55(1):53–60.
189. Xu X, Shang Q, Chen X, Nie W, Zou Z, Huang A, et al. Reversal of B-cell hyperactivation and functional impairment is associated with HBsAg seroconversion in chronic hepatitis B patients. *Cell Mol Immunol*. 2015 May;12(3):309–16.

190. Guo H, Jiang D, Ma D, Chang J, Dougherty AM, Cuconati A, et al. Activation of pattern recognition receptor-mediated innate immunity inhibits the replication of hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *J Virol*. 2009 Jan;83(2):847–58.
191. Han Q, Zhang C, Zhang J, Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):23–38.
192. Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther*. 2010;15 Suppl 3:15–24.
193. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Canie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15655–60.
194. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*. 2009 Jan;90(Pt 1):127–35.
195. Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol*. 2009 Apr;83(8):3719–33.
196. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*. 2009 Jul;58(7):974–82.
197. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 27;101(17):6669–74.
198. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15669–74.
199. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol*. 2005 Aug;79(15):9369–80.
200. Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology*. 2010 Jan;51(1):63–72.
201. Unterholzner L, Bowie AG. Innate DNA sensing moves to the nucleus. *Cell Host Microbe*. 2011 May 19;9(5):351–3.
202. Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):7269–72.
203. Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, et al. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1773–82.
204. Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW, et al. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology*. 2010 Jul;52(1):16–24.
205. Cooper A, Tal G, Lider O, Shaul Y. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3165–76.
206. Lu H-L, Liao F. Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):3264–76.
207. Luangsay S, Gruffaz M, Isorce N, Testoni B, Michelet M, Faure-Dupuy S, et al. Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2015 Dec;63(6):1314–22.
208. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol*. 2008 Sep;128(3):400–8.
209. Cheng J, Imanishi H, Morisaki H, Liu W, Nakamura H, Morisaki T, et al. Recombinant HBsAg inhibits LPS-induced COX-2 expression and IL-18 production by interfering with the NF-kappaB pathway in a human monocytic cell line, THP-1. *J Hepatol*. 2005 Sep;43(3):465–71.

210. Müller C, Zielinski CC. Impaired lipopolysaccharide-inducible tumor necrosis factor production in vitro by peripheral blood monocytes of patients with viral hepatitis. *Hepatology*. 1990 Nov;12(5):1118–24.
211. Wang H, Ryu W-S. Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 15;6(7):e1000986.
212. Wang S, Chen Z, Hu C, Qian F, Cheng Y, Wu M, et al. Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J Immunol*. 2013 May 15;190(10):5142–51.
213. Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, Protzer U, Janssen HLA, van der Molen RG, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*. 2009 Feb;126(2):280–9.
214. Foster GR, Ackrill AM, Goldin RD, Kerr IM, Thomas HC, Stark GR. Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 1;88(7):2888–92.
215. Chen J, Wu M, Zhang X, Zhang W, Zhang Z, Chen L, et al. Hepatitis B virus polymerase impairs interferon- α -induced STAT activation through inhibition of importin- $\alpha 5$ and protein kinase C- δ . *Hepatology*. 2013 Feb;57(2):470–82.
216. Isorce N, Testoni B, Locatelli M, Fresquet J, Rivoire M, Luangsay S, et al. Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral Res*. 2016 Jun;130:36–45.
217. Xia Y, Protzer U. Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses* [Internet]. 2017 Jan 20;9(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294987/>
218. Pagliaccetti NE, Robek MD. Interferon-lambda in the immune response to hepatitis B virus and hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2010 Aug;30(8):585–90.
219. Lan T, Chang L, Wu L, Yuan Y-F. IL-6 Plays a Crucial Role in HBV Infection. *J Clin Transl Hepatol*. 2015 Dec 28;3(4):271–6.
220. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors Oxf Engl*. 2009 Feb;35(1):14–20.
221. Bauer T, Sprinzl M, Protzer U. Immune control of hepatitis B virus. *Dig Dis Basel Switz*. 2011;29(4):423–33.
222. McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol*. 2000 Mar;74(5):2255–64.
223. Nawa T, Ishida H, Tatsumi T, Li W, Shimizu S, Kodama T, et al. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology*. 2012 Oct 25;432(2):452–9.
224. Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, et al. The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology*. 1988 Dec;167(2):630–3.
225. Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 10;101(6):1743–7.
226. Zhang Q, Wang Y, Wei L, Jiang D, Wang JH, Rao HY, et al. Role of ISGF3 in modulating the anti-hepatitis B virus activity of interferon-alpha in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov;23(11):1747–61.
227. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3764–8.
228. Kan QC, Li DL, Yu ZJ. Vector-mediated expression of interferon gamma inhibits replication of hepatitis B virus in vitro. *Acta Virol*. 2013;57(4):421–8.
229. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2548–56.

230. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010 May;22(5):347–52.
231. Kakumu S, Fukatsu A, Shinagawa T, Kurokawa S, Kusakabe A. Localisation of intrahepatic interleukin 6 in patients with acute and chronic liver disease. *J Clin Pathol.* 1992 May;45(5):408–11.
232. Buke AC, Buke M, Altuglu IE, Ciceklioglu M, Kamcioglu S, Karakartal G, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 productions in response to platelet-activating factor in chronic hepatitis B virus infection. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2004 Oct;13(5):273–6.
233. Kuo T-M, Hu C-P, Chen Y-L, Hong M-H, Jeng K-S, Liang C-CT, et al. HBV replication is significantly reduced by IL-6. *J Biomed Sci.* 2009 Apr 20;16:41.
234. Rossol S, Marinou G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest.* 1997 Jun 15;99(12):3025–33.
235. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):3236–43.
236. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol.* 2002 Nov;76(21):10702–7.
237. Yin W, Xu L, Sun R, Wei H, Tian Z. Interleukin-15 suppresses hepatitis B virus replication via IFN- β production in a C57BL/6 mouse model. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2012 Sep;32(8):1306–14.
238. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol Chem.* 2013 Nov 1;288(44):31715–27.
239. Thompson AJ, Colledge D, Rodgers S, Wilson R, Reville P, Desmond P, et al. Stimulation of the interleukin-1 receptor and Toll-like receptor 2 inhibits hepatitis B virus replication in hepatoma cell lines in vitro. *Antivir Ther.* 2009;14(6):797–808.
240. Biermer M, Puro R, Schneider RJ. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF- κ B. *J Virol.* 2003 Apr;77(7):4033–42.
241. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):819–26.
242. Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000 Oct;8(10):452–6.
243. Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira MLS, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 2011 Jun;44(6):500–13.
244. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 2006 Feb;7(2):131–7.
245. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):317–37.
246. Liu P, Jamaluddin M, Li K, Garofalo RP, Casola A, Brasier AR. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol.* 2007 Feb;81(3):1401–11.
247. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):523–7.
248. Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J.* 2006 Sep 20;25(18):4207–14.
249. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006 May 4;441(7089):101–5.
250. Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzózka K, Lammens A, Lammens K, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell.* 2008 Feb 1;29(2):169–79.

251. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):994–7.
252. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):997–1001.
253. Plumet S, Herschke F, Bourhis J-M, Valentin H, Longhi S, Gerlier D. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One*. 2007 Mar 14;2(3):e279.
254. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008 Jul 7;205(7):1601–10.
255. Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009 Jul 17;31(1):25–34.
256. Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, et al. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell*. 2008 Feb 29;29(4):428–40.
257. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004 Jul;5(7):730–7.
258. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 2005 Oct;6(10):981–8.
259. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1167–72.
260. Xu L-G, Wang Y-Y, Han K-J, Li L-Y, Zhai Z, Shu H-B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 2005 Sep 16;19(6):727–40.
261. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 2005 Sep 9;122(5):669–82.
262. Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):6072–83.
263. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*. 2009 Oct;10(10):1065–72.
264. Chiu Y-H, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 2009 Aug 7;138(3):576–91.
265. Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, et al. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17870–5.
266. Hou Z, Zhang J, Han Q, Su C, Qu J, Xu D, et al. Hepatitis B virus inhibits intrinsic RIG-I and RIG-G immune signaling via inducing miR146a. *Sci Rep*. 2016 May 23;6:26150.
267. Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J Gen Virol*. 2010 Aug;91(Pt 8):2080–90.
268. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869–72.
269. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509–12.

270. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003 Jul;4(7):702–7.
271. Dziarski R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2003 Sep;60(9):1793–804.
272. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731–4.
273. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004 Nov;5(11):1166–74.
274. Yu HB, Finlay BB. The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe.* 2008 Sep 11;4(3):198–208.
275. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Feb;4(2):95–104.
276. Kumar M, Jung SY, Hodgson AJ, Madden CR, Qin J, Slagle BL. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *J Virol.* 2011 Jan;85(2):987–95.
277. Negash AA, Gale M. Hepatitis regulation by the inflammasome signaling pathway. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):143–55.
278. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):501–5.
279. Takaoka A, Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Apr 29;60(7):847–57.
280. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, et al. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 8;105(14):5477–82.
281. Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet M-C, Schroder K, Hofmann K, et al. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep.* 2009 Aug;10(8):916–22.
282. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 2009 Mar 26;458(7237):514–8.
283. Rathinam VAK, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):395–402.
284. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 2010 Nov;11(11):997–1004.
285. Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe.* 2011 May 19;9(5):363–75.
286. Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, et al. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Sep 15;179(6):3463–71.
287. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):593–601.
288. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005 Dec;272(24):6179–217.
289. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jul;9(7):465–79.
290. Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 1985 Oct;42(3):779–89.

291. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973–83.
292. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355–6.
293. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394–7.
294. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*. 2007 May 21;8:124.
295. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*. 2005 Jul 22;309(5734):581–5.
296. Peter ME, Kubarenko AV, Weber ANR, Dalpke AH. Identification of an N-terminal recognition site in TLR9 that contributes to CpG-DNA-mediated receptor activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jun 15;182(12):7690–7.
297. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik S-G, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1071–82.
298. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*. 2013 Mar 22;339(6126):1426–9.
299. Ohto U, Shibata T, Tanji H, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. 2015 Apr 30;520(7549):702–5.
300. Kubarenko A, Frank M, Weber ANR. Structure-function relationships of Toll-like receptor domains through homology modelling and molecular dynamics. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1515–8.
301. Kubarenko AV, Ranjan S, Colak E, George J, Frank M, Weber ANR. Comprehensive modeling and functional analysis of Toll-like receptor ligand-recognition domains. *Protein Sci Publ Protein Soc*. 2010 Mar;19(3):558–69.
302. O’Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353–64.
303. Pålsson-McDermott EM, O’Neill L a. J. Building an immune system from nine domains. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1437–44.
304. Akira S. [Bacterial infections and toll-like receptors]. *Kekkaku*. 2001 Aug;76(8):593–600.
305. Ringwood L, Li L. The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine*. 2008 Apr;42(1):1–7.
306. Gay NJ, Gangloff M, Weber ANR. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(9):693–8.
307. Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2001 Nov 9;276(45):41661–7.
308. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680–4.
309. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):749–59.
310. Hayden MS, West AP, Ghosh S. SnapShot: NF-kappaB signaling pathways. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1286–7.
311. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6758–80.
312. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816–25.
313. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I-kappaBzeta. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):218–22.

314. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):772–7.
315. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):324–9.
316. Fitzgerald KA, Chen ZJ. Sorting out Toll signals. *Cell*. 2006 Jun 2;125(5):834–6.
317. O’Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453–60.
318. Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DCG, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*. 2007 Jul;8(7):772–9.
319. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):546–58.
320. Tohmé M, Manoury B. Intracellular Toll-like receptor recruitment and cleavage in endosomal/lysosomal organelles. *Methods Enzymol*. 2014;535:141–7.
321. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober H-J, Okamoto K, et al. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):624–7.
322. Matsumoto F, Saitoh S-I, Fukui R, Kobayashi T, Tanimura N, Konno K, et al. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 14;367(3):693–9.
323. Desnues B, Macedo AB, Roussel-Queval A, Bonnardel J, Henri S, Demaria O, et al. TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 28;111(4):1497–502.
324. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Apr;72(4):955–62.
325. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):546–9.
326. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740–5.
327. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Oct 1;167(7):3555–8.
328. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006 Jan;7(1):49–56.
329. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh S, et al. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat Commun*. 2015 Jan 20;6:5853.
330. Török H-P, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn’s disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):365–6.
331. Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C, et al. Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Transl Med*. 2010 May 25;8:49.
332. Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep*. 2012 Aug;39(8):8425–30.
333. McKelvey KJ, Highton J, Hessian PA. Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. *J Autoimmun*. 2011 Feb;36(1):76–86.
334. Collins B, Wilson IA. Crystal structure of the C-terminal domain of mouse TLR9. *Proteins*. 2014 Oct;82(10):2874–8.
335. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol*. 2014 Jun;24(6):360–9.

336. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):643–51.
337. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2541–50.
338. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science*. 2010 Sep 17;329(5998):1530–4.
339. Babdor J, Descamps D, Adiko AC, Tohmé M, Maschalidi S, Evnouchidou I, et al. IRAP+ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol*. 2017 May;18(5):509–18.
340. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660–9.
341. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 May 1;168(9):4531–7.
342. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*. 2013 Mar;10(2):103–6.
343. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):956–63.
344. Kastenmüller W, Kastenmüller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):705–11.
345. Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, et al. TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 May 15;174(10):6137–43.
346. Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2006 Dec 1;72(3):384–93.
347. Ji Y, Zhou Y, Pan J, Li X, Wang H, Wang Y. Temporal pattern of Toll-like receptor 9 upregulation in neurons and glial cells following cerebral ischemia reperfusion in mice. *Int J Neurosci*. 2016;126(3):269–77.
348. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1715–24.
349. Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson J-J, Muraille E. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Apr 15;178(8):5182–91.
350. Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol*. 2007 Feb;245(2):103–10.
351. Anderson AE, Worku ML, Khamri W, Bamford KB, Walker MM, Thursz MR. TLR9 polymorphisms determine murine lymphocyte responses to *Helicobacter*: results from a genome-wide scan. *Eur J Immunol*. 2007 Jun;37(6):1548–61.
352. Guggemoos S, Hangel D, Hamm S, Heit A, Bauer S, Adler H. TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Jan 1;180(1):438–43.
353. Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JAA, Dzionek A, Pingel JT, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):107–19.
354. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Mar 1;178(5):3186–97.

355. Triantafyllou K, Eryilmazlar D, Triantafyllou M. Herpes simplex virus 2-induced activation in vaginal cells involves Toll-like receptors 2 and 9 and DNA sensors DAI and IFI16. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Feb;210(2):122.e1-122.e10.
356. Marshak-Rothstein A. Tolling for autoimmunity-prime time for 7. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):397–9.
357. Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):11–23.
358. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):535–42.
359. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Sep 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=UNC93B1+mediates+differential+trafficking+of+endosomal+TLRs>
360. Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol*. 2009 Apr;87(3):209–17.
361. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim Y-M. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. 2007 Apr 23;177(2):265–75.
362. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, et al. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 May 15;174(10):6129–36.
363. Kawai T, Akira S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem (Tokyo)*. 2007 Feb;141(2):137–45.
364. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1061–8.
365. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 26;101(43):15416–21.
366. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 2003 Jan 22;85(2):85–95.
367. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar 15;170(6):3059–64.
368. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*. 2004 Apr;4(4):249–58.
369. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*. 2004 Jan;34(1):251–62.
370. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):158–75.
371. Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol*. 2002 May;3(5):423–4.
372. Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2010 Jun 17;115(24):5041–52.
373. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245–52.
374. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4500–4.
375. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*. 2006 Apr;36(4):810–6.

376. Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Rodriguez B, Mohner RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol*. 2007 Aug;37(8):2205–13.
377. Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, Ishii N, Klinman DM, Ishii KJ. Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Aug 15;173(4):2552–61.
378. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Dec 1;185(11):6413–9.
379. Zannetti C, Parroche P, Panaye M, Roblot G, Gruffat H, Manet E, et al. TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Oct 1;193(7):3398–408.
380. Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses*. 2010 Jul;2(7):1394–410.
381. Broering R, Lu M, Schlaak JF. Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2011 Nov;121(10):415–26.
382. Chang J, Block TM, Guo J-T. The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2012 Dec;96(3):405–13.
383. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology Baltim Md*. 2007 Jan;45(1):102–10.
384. Liu D, Wu A, Cui L, Hao R, Wang Y, He J, et al. Hepatitis B virus polymerase suppresses NF- κ B signaling by inhibiting the activity of IKKs via interaction with Hsp90 β . *PLoS One*. 2014;9(3):e91658.
385. Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, et al. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology Baltim Md*. 2009 Apr;49(4):1132–40.
386. Jiang M, Broering R, Trippler M, Poggenpohl L, Fiedler M, Gerken G, et al. Toll-like receptor-mediated immune responses are attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen. *J Viral Hepat*. 2014 Dec;21(12):860–72.
387. Wang S, Chen Z, Hu C, Qian F, Cheng Y, Wu M, et al. Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 May 15;190(10):5142–51.
388. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26315.
389. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol*. 2009 Aug;46(13):2640–6.
390. Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol*. 2011 Oct;55(4):762–9.
391. Jegaskanda S, Ahn SH, Skinner N, Thompson AJ, Ngyuen T, Holmes J, et al. Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon gamma expression by the hepatitis B virus e antigen. *J Virol*. 2014 Sep;88(18):10412–20.
392. Hirsch I, Caux C, Hasan U, Bendriss-Vermare N, Olive D. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol*. 2010 Oct;31(10):391–7.
393. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med*. 2013 Jul 1;210(7):1369–87.
394. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *J Virol*. 2013 Dec;87(23):13009–19.
395. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Dec 1;185(11):6439–47.

396. Xie Q, Shen H-C, Jia N-N, Wang H, Lin L-Y, An B-Y, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect.* 2009 Apr;11(4):515–23.
397. Xu N, Yao H-P, Lv G-C, Chen Z. Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN- α from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2012 Sep;61(9):997–1004.
398. Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, Larrat S, Marlu A, Leroy V, et al. Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology.* 2012 Dec;143(6):1586–1596.e8.
399. Ratnam DT, Sievert W, Visvanathan K. Natural killer cells display impaired responses to toll like receptor 9 that support viral persistence in chronic hepatitis B. *Cell Immunol.* 2012 Sep;279(1):109–15.
400. Huang Y-W, Hsu C-K, Lin S-C, Wei S-C, Hu J-T, Chang H-Y, et al. Reduced toll-like receptor 9 expression on peripheral CD14+ monocytes of chronic hepatitis B patients and its restoration by effective therapy. *Antivir Ther.* 2014;19(7):637–43.
401. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science.* 1991 Nov 22;254(5035):1167–73.
402. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology.* 2009 Sep 15;392(1):1–10.
403. Sherlock S, Fox RA, Niazi SP, Scheuer PJ. Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. *Lancet Lond Engl.* 1970 Jun 13;1(7659):1243–7.
404. Kohli A. The Relationship Between Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B and C Virus. *Gastroenterol Hepatol.* 2016 Feb;12(2):116–8.
405. van Gent M, Braem SGE, de Jong A, Delagic N, Peeters JGC, Boer IGJ, et al. Epstein-Barr virus large tegument protein BPLF1 contributes to innate immune evasion through interference with toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog.* 2014 Feb;10(2):e1003960.
406. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IGJ, Buisson M, et al. EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Feb 1;186(3):1694–702.
407. Fischer J, Weber ANR, Böhm S, Dickhöfer S, El Maadidi S, Deichsel D, et al. Sex-specific effects of TLR9 promoter variants on spontaneous clearance of HCV infection. *Gut.* 2017 Oct;66(10):1829–37.
408. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem.* 2011 Jan;116(1):1–9.
409. Persengiev SP, Green MR. The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2003 Jun;8(3):225–8.
410. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol.* 2004 Aug;78(16):8524–35.
411. Xiang A, Ren F, Lei X, Zhang J, Guo R, Lu Z, et al. The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway. *Antiviral Res.* 2015 Aug;120:7–15.
412. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):599–609.
413. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8590–607.
414. Boltjes A, Groothuisink ZM, van Oord GW, Janssen HLA, Woltman AM, Boonstra A. Monocytes from chronic HBV patients react in vitro to HBsAg and TLR by producing cytokines irrespective of stage of disease. *PLoS One.* 2014;9(5):e97006.

415. Zannetti C, Roblot G, Charrier E, Ainouze M, Tout I, Briat F, et al. Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 Jul 1;197(1):356–67.
416. Tangkijvanich P, Vimolket T, Theamboonlers A, Kullavanijaya P, Suwangool P, Poovorawan Y. Serum interleukin-6 and interferon-gamma levels in patients with hepatitis B-associated chronic liver disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2000 Jun;18(2):109–14.
417. Lin S, Sun Q, Mao W, Chen Y. Serum Immunoglobulin A (IgA) Level Is a Potential Biomarker Indicating Cirrhosis during Chronic Hepatitis B Infection. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:2495073.
418. DeFranco AL, Rookhuizen DC, Hou B. Contribution of Toll-like receptor signaling to germinal center antibody responses. *Immunol Rev*. 2012 May;247(1):64–72.
419. Zoulim F, Trépo C. [Effects and risks of prolonged antiviral treatments: the example of chronic hepatitis B]. *Gastroenterol Clin Biol*. 1997;21(11):843–7.
420. Chemin I, Vermot-Desroches C, Baginski I, Saurin JC, Laurent F, Zoulim F, et al. Selective detection of human hepatitis B virus surface and core antigens in some peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry. *J Clin Lab Immunol*. 1992;38(2):63–71.
421. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HLA. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PloS One*. 2011 Jan 5;6(1):e15324.
422. Aspod C, Bruder Costa J, Jacob M-C, Dufeu-Duchesne T, Bertucci I, Pouget N, et al. Remodeling of B-Cell Subsets in Blood during Pegylated IFN α -2a Therapy in Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *PloS One*. 2016;11(6):e0156200.
423. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):235–45.
424. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3034–44.
425. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Herr W, Heermann K, Gerken G, Meyer Zum Büschenfelde KH, et al. Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 1996 Jul;105(1):52–8.
426. Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Cooksley WG, James SP, Jones EA. Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest*. 1983 May;71(5):1104–13.
427. Barnaba V, Valesini G, Levrero M, Zaccari C, Van Dyke A, Falco M, et al. Immunoregulation of the in vitro anti-HBs antibody synthesis in chronic HBsAg carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol*. 1985 May;60(2):259–66.
428. Barnaba V, Levrero M, Ruberti G, van Dyke A, Perrone A, Musca A, et al. In vitro anti-HBs antibody synthesis from anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol*. 1987 Nov;70(2):283–8.
429. Wherry EJ, Ha S-J, Kaeche SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):670–84.
430. Mueller SN, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8623–8.

PUBLICATIONS ANNEXES

Article 1: Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens

Objectif de l'article 1

Le foie est la plus grande glande du corps humain et fonctionne comme un organe immunitaire inné. Les macrophages du foie appelés cellules de Kupffer (KC) constituent le plus grand groupe de macrophages dans le corps humain. Les réponses immunitaires innées impliquant les KC représentent la première ligne de défense contre les agents pathogènes dans le foie. Les macrophages dérivés de monocytes humains ont été utilisés pour caractériser les réponses de l'inflammasome qui conduisent à la libération des cytokines proinflammatoires IL-1 β et IL-18, mais il n'a pas encore été déterminé si les KC humains contiennent des inflammasomes fonctionnels. Cette étude a pour but de déterminer si les KC humains contiennent des gènes ou des protéines pouvant former des complexes d'inflammasome fonctionnels. En outre, il s'agit de déterminer le type d'inflammasome activé en réponse à plusieurs bactéries et virus. De plus, on veut déterminer la réponse enclenchée face au virus de l'hépatite B (HBV) et si ce virus peut altérer l'expression des inflammasomes dans les KCs de façon similaire à ce qu'on observe chez d'autres types cellulaires et par suite déterminer si la dérégulation des réponses à l'inflammasome est une stratégie de HBV pour échapper au système immunitaire. Nos résultats pourraient aider à favoriser les approches thérapeutiques contre les maladies chroniques du foie activant l'inflammasome.

Dans cet article, j'ai contribué aux études *in vitro* dans le but d'analyser si HBV peut altérer l'expression des inflammasomes dans les KCs.

Muse® cell Analyzer

Simple, Accurate Cell-by-cell Analysis

Learn More



MILLIPORE
SIGMA



Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens

This information is current as of October 11, 2017.

Claudia Zannetti, Guillaume Roblot, Emily Charrier, Michelle Ainouze, Issam Tout, François Briat, Nathalie Isorce, Suzanne Faure-Dupuy, Maud Michelet, Marie Marotel, Semra Kati, Thomas F. Schulz, Michel Rivoire, Alexandra Traverse-Glehen, Souphalone Luangsay, Omran Alatiff, Thomas Henry, Thierry Walzer, David Durantel and Uzma Hasan

J Immunol 2016; 197:356-367; Prepublished online 25 May 2016;

doi: 10.4049/jimmunol.1502301

<http://www.jimmunol.org/content/197/1/356>

-
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2016/05/25/jimmunol.1502301.DCSupplemental>
- References** This article **cites 45 articles**, 15 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/197/1/356.full#ref-list-1>
- Subscription** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2016 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens

Claudia Zannetti,* Guillaume Roblot,* Emily Charrier,* Michelle Ainouze,*
 Issam Tout,* François Briat,* Nathalie Isorce,[†] Suzanne Faure-Dupuy,[†] Maud Michelet,[†]
 Marie Marotel,* Semra Kati,[‡] Thomas F. Schulz,[‡] Michel Rivoire,[†]
 Alexandra Traverse-Glehen,[§] Souphalone Luangsay,[†] Omran Alatiff,* Thomas Henry,*
 Thierry Walzer,* David Durantel,[†] and Uzma Hasan*

The liver is the largest gland in the human body and functions as an innate immune organ. Liver macrophages called Kupffer cells (KC) constitute the largest group of macrophages in the human body. Innate immune responses involving KC represent the first line of defense against pathogens in the liver. Human monocyte-derived macrophages have been used to characterize inflammasome responses that lead to the release of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, but it has not yet been determined whether human KC contain functional inflammasomes. We show, to our knowledge for the first time, that KC express genes and proteins that make up several different inflammasome complexes. Moreover, activation of KC in response to the absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasome led to the production of IL-1 β and IL-18, which activated IL-8 transcription and hepatic NK cell activity, respectively. Other inflammasome responses were also activated in response to selected bacteria and viruses. However, hepatitis B virus inhibited the AIM2 inflammasome by reducing the mRNA stability of IFN regulatory factor 7, which regulated AIM2 transcription. These data demonstrate the production of IL-1 β and IL-18 in KC, suggesting that KC contain functional inflammasomes that could be important players in the innate immune response following certain infections of the liver. We think our findings could potentially aid therapeutic approaches against chronic liver diseases that activate the inflammasome. *The Journal of Immunology*, 2016, 197: 356–367.

The inflammasome is an innate immune pathway by which inflammasome receptors detect pathogens and danger signals, leading to the recruitment of the apoptosis-associated, speck-like protein ASC, which contains a carboxyl-terminal CARD. ASC provides a link between inflammasome receptors and the proform of caspase-1 through its PYD domain at the N-terminal and

its CARD domain, respectively. This signaling cascade is known as the inflammasome complex. The activation of caspase-1 is associated with two events: 1) pyroptosis, a form of programmed cell death distinct from apoptosis, and 2) the production of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, produced by prior stimulation from TLR ligands. Once released, mature IL-1 β and IL-18 signal their target cells, thus allowing the expansion of innate and adaptive immune responses.

Some of the best characterized inflammasomes are the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat caspase recruitment domain 4 (NLR4) inflammasome and the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome. The NLR4 inflammasome is activated primarily by bacteria, including *Salmonella typhimurium*, via cytosolic flagellin or the type 3 secretion system. However, there is evidence showing that some inflammasomes are also able to detect viruses. Indeed, the NLRP3 inflammasome can detect adenovirus (1), vaccinia virus (2), and hepatitis C virus (HCV) (3). In 2009, the protein absent in melanoma 2 (AIM2) was identified as a cytosolic dsDNA sensor, capable of activating the inflammasome via ASC (4–6). Moreover, this AIM2 inflammasome has been shown to detect vaccinia virus (5) and murine CMV (7). These studies suggest that the AIM2 inflammasome is a surveillance system that can monitor the host cytosol for infection with DNA viruses. Finally, IFI16, another DNA innate sensor belonging to the same family as AIM2, was reported to activate a functional inflammasome in response to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in the nucleus (8).

Inflammasome activation in response to the liver-borne pathogens *Francisella tularensis* and *S. typhimurium* has been well described in myeloid cells such as human monocyte-derived macrophages (9–12). However, the characterization of the inflammasome in

*Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure, Université de Lyon, CNRS-UMR5308, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69000, France; [†]Centre de Recherche en Cancérologie–Lyon, UMR INSERM 1052–CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon 69008, France; [‡]Institute of Virology, Hannover Medical School, Hannover 30625, Germany; and [§]Hospices Civils Lyon Sud, Pierre-Bénite 69310, France

ORCID: 0000-0002-6928-932X (M.A.); 0000-0002-1019-3489 (I.T.); 0000-0002-6053-7139 (N.L.); 0000-0002-1618-7602 (M.M.); 0000-0003-4606-8441 (S.K.); 0000-0002-8570-1679 (S.L.); 0000-0002-2539-972X (O.A.); 0000-0002-0687-8565 (T.H.); 0000-0002-9226-3419 (D.D.).

Received for publication November 2, 2015. Accepted for publication April 27, 2016.

This work was supported by La Ligue Contre le Cancer and the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Uzma Hasan, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon 69007, France. E-mail address: uzma.hasan@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AIM2, absent in melanoma 2; CHIP, chromatin immunoprecipitation; *F. novicida*, *Francisella tularensis* subspecies *novicida*; HBc, hepatitis B core protein; HBe, hepatitis B early Ag; HBs, hepatitis B surface Ag; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; IRF, IFN regulatory factor; KC, Kupffer cell; KSHV, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus; LMNC, liver mononuclear cell; MOI, multiplicity of infection; NLR4, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat caspase recruitment domain 4; NLRP3, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin domain 3; PCHH, primary cultured human hepatocyte; PI, propidium iodide; poly(dA:dT), poly(deoxyadenylic-thymidylic) acid; PVL, Panton–Valentine leukocidin; qPCR, quantitative PCR; WT, wild-type.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/\$30.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1502301

resident liver macrophages, that is, Kupffer cells (KC), has not yet been investigated. The liver is constantly exposed to a large variety of Ags from the gastrointestinal tract, including dietary Ags, pathogens, and toxins. KC constitute the largest group of macrophages in humans and play a key, diverse role in the phagocytosis of pathogens, apoptotic cells, food Ags, and toxins that enter the portal vein after crossing the intestinal epithelium, as well as in TLR innate immune activation (13). We sought to characterize the inflammasome and inflammasome response in purified primary KC from liver donors. In this study, we aimed to determine, define, and discuss the level of inflammasome gene expression, as well as NLRP3, AIM2, NLRC4, and IFI16 function, in response to several live and synthetic pathogens in KC.

Materials and Methods

Ethics statement

Primary cultured human hepatocytes (PCHH) and liver mononuclear cells (LMNC) were obtained from surgically resected anatomically normal human liver tissue from patients diagnosed with hepatic metastases from colon cancer, thanks to Prof. Michel Rivoire (INSERM U1032, Centre Léon Bérard), and under the ministerial agreement numbers DC-2008-99 and AC-2008-1001 approved by the Hospital Civil Review Board. As resected tissue is considered waste, no patient written or oral consent was required for this study.

Cell culture

Surgically removed samples from liver donors were perfused with collagenase as previously reported (14), and the resultant cell suspension was centrifuged at 800 rpm for 4 min with no break at room temperature. Pelleted cells constituted the PCHH, composed of $\geq 85\%$ hepatocytes and 3–15% nonparenchymal cells, mainly KC and liver sinusoidal endothelium. Culturing PCHH for 24 h in serum-free medium resulted in the elimination of most liver sinusoidal endothelium (data not shown). The suspension cells underwent Ficoll (PAA Laboratories) density gradient centrifugation and three washes. The retrieved cells constituted LMNC. KC were prepared by negative selection (Miltenyi Biotec). PCHH and HepaRG cells were cultured with Williams medium (Life Technologies), supplemented as described (14). PBMC were obtained from the “Établissement Français du Sang” as buffy coats and purified as previously reported (15). THP-1 cells were differentiated into macrophages by adding PMA (Sigma-Aldrich) for 3 h at 0.5 μM . LMNC, KC, PBMC, and THP-1 were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1 mM L-glutamine, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cyproxin. HEK293 cells were maintained as previously described (15).

Stimuli and inhibitors

LPS (100 ng/ml) and Pam2CSK4 (4 nM) ligands were purchased by Cayla-In VivoGen and were used for 4 h unless indicated otherwise. ATP (5 mM) and poly(deoxyadenylic-thymidylic) acid [poly(dA:dT); 1 $\mu\text{g}/\text{well}$] were provided by Cayla-In VivoGen. Nigericin was from Sigma-Aldrich. IFN- β (Avonex, Biogenidec, France) was used at 1000 U/ml. Recombinant LukS-PV and LukF-PV (16) were mixed together to obtain Pantón–Valentine leukocidin (PVL) and used at 100 ng/ml for 4 h. Recombinant human IL-18 BP α (R&D Systems) was used at 50 ng/ml. Anakinra (Amgen) was used at 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. The amounts of ligands used have been established to be optimal in our *in vitro* experiments and have been previously described (17). Recombinant human IL-12 was provided by PeproTech. Small interfering RNA and its control were purchased from Life Technologies and used according to the manufacturer's instructions. Actinomycin D was purchased from Sigma-Aldrich.

Constructs

The human IL-8 promoter luciferase plasmid was transfected and tested with PCHH and KC supernatants as previously described (18). AIM2 promoter linked to luciferase was purchased from Switchgear, and the mutated form was provided by the laboratory of Ruben Tooze (University of Leeds, Leeds, U.K.) (19).

Cell death assay

Quantification of cell death was performed by analysis of propidium iodide (PI) incorporation. Briefly, primary KC ($2 \times 10^5/\text{well}$) were seeded in black, flat-bottom 96-well plates in phenol red minus medium and infected

with *F. tularensis* subspecies *novicida* (*F. novicida*) and *S. typhimurium* strains. One hour postinfection, PI (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the cells. PI incorporation was measured during a 24-h period using a microplate fluorometer (Tecan).

Hepatitis B virus production and components

The hepatitis B virus (HBV) is routinely produced in large quantities from HepG2215 cells (20), but it may also be purified from the plasma of patients with chronic HBV infection. The virus is concentrated by polyethylene glycol precipitation or ultracentrifugation as needed, and the various components of the viral inoculum (i.e., hepatitis B surface Ag [HBs], hepatitis B early Ag [HBe], Dane particle nucleocapsids, hepatitis B core protein [HBc]) can be purified after separation on an iodixanol gradient.

KSHV was supplied by the laboratory of Thomas Schulz (Institute of Virology, Hannover Medical School, Hannover, Germany).

Bacteria

F. novicida strain U112 and a mutant lacking the whole FPI were cultured in tryptic soy broth supplemented with 0.1% cysteine. *S. typhimurium* wild-type (WT; 12023 strain) and the mutant lacking SIPB (ΔSIPB) were grown in Luria–Bertani medium.

Immunoblotting

Protein extracts were obtained by lysing the cells with a protein/RNA extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Abs used for immunoblotting were ASC, caspase-1 p10 (Santa Cruz Biotechnologies), IL-1 β (3ZED, NCI), IFN regulatory factor (IRF)7 (Santa Cruz H-246), and β -actin (MP Biomedicals). Western blots were developed using the intelligent dark box (Fuji film).

Chromatin immunoprecipitation assay

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed using the Shearing Optimization kit and the OneDay ChIP kit (Diagenode) as described previously (21). Abs for IRF7 (Santa Cruz H-246) and IRF1 (Santa Cruz F-2) were used.

ELISA

Supernatants from cultured cells were harvested and diluted up to 40 times to perform ELISA on IL-1 β (BioLegend), IL-18 (MBL International), and IL-6 (R&D Systems).

Transfection and luciferase assay

Poly(dA:dT) transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. One microgram poly(dA:dT) and 2 μl Lipofectamine 2000 were used for each well in a 24-well plate. Transfection of HEK293 cells or THP-1 cells was performed in triplicate with FuGENE (Promega), and luciferase assay was performed as previously described (15, 21).

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cells using the protein/RNA extraction kit from Macherey-Nagel. cDNA synthesis was performed with 1 μg total RNA with a first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific). Quantitative PCR (qPCR) was performed using the Mx3000P real-time PCR system (Agilent Technologies) with Mesa Green qPCR MasterMix Plus (Eurogentec).

Primers

The following primers were used: NLRP3, forward, 5'-CAGA-CTTCTGTGTGGGACTGA-3', reverse, 5'-TCCTGACAACATGCT-GATGTGA-3'; AIM2, forward, 5'-ATGCAGCAGGACTCATTTCA-3', reverse, 5'-CGTCTTCAGGAGGAGAAGGA-3'; ASC, forward, 5'-CGC-GAGGGTCAAAACGT-3', reverse, 5'-TGCTCATCCGTCAGGACCTT-3'; IFI16, forward, 5'-ACTGCGTACAACAAAGCCATTTGA-3', reverse, 5'-TTGTGACATTGCTCTGTCACCAAC-3'; caspase-1, forward, 5'-AAAATCT-CACTGCTTCGGACATG-3', reverse, 5'-GGAACGTGCTGTCAGAGGTC-TT-3'; IL-1 β , forward, 5'-AATCTGTACCTGTCTGCGTGT-3', reverse, 5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACACTCT-3'; IL-18, forward, 5'-ATCGTCTTCTTCGCAACA-3', reverse, 5'-CTTCTACTGGTTCAGCAGCCATCT-3'; GAPDH, forward, 5'-GCCAAAAGGGTCAT-CATC-3', reverse, 5'-TGCCAGTAGCTTCCCTC-3'; β_2 -microglobulin, forward, 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGTATCT-3', reverse, 5'-TCTCTGCTCCCACTCTAAGT-3'; and AIM2 ChIP primers, forward, 5'-TACCTTCATTGTGCTTATTC-3', reverse, 5'-ACTGATCT-CAGAGGGTATCA-3'.

FACS staining

To phenotype KC, 5×10^5 harvested PCHH or KC were resuspended in staining buffer (0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS) and preincubated with FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec) for 10 min at 4°C to prevent any nonspecific binding. Cells then underwent surface and live/dead cell staining with the Live/Dead fixable dead cell stain kit (Life Technologies) and intracellular staining. For surface staining, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD11b (BioLegend), FITC-conjugated anti-C5aR (AbD Serotec) Abs, and the respective isotype controls were used. PE-conjugated anti-CD68 and the isotype control (Miltenyi Biotec) were used for intracellular staining. Cells were analyzed using an LSR II flow cytometer (Becton Dickinson). Data were processed using FlowJo software (Tree Star). For intracellular staining in coculture experiments, PBMC or LMNC were incubated for 5 h with monensin. Cells were stained with the following Abs: allophycocyanin-Alexa Fluor 750-conjugated anti-CD3 (Beckman Coulter), electron-coupled dye-conjugated anti-CD3, anti-CD14, and anti-CD19 (Beckman Coulter), allophycocyanin-conjugated anti-CD56 (Beckman Coulter), and PE-conjugated anti-IFN- γ (eBioscience). Cells were analyzed using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter), and data were processed using Kaluza software (Beckman Coulter).

Results

Expression and function of the inflammasome pathway in KC

Two subsets of macrophages have been reported to populate the liver: resident CD68⁺/CD11b⁻ KC with high phagocytic activity, and CD68⁺/CD11b⁺-infiltrating macrophages (22). FACS analysis revealed that our purified primary KC were CD68⁺/CD11b⁻ and thereby corresponded to the resident KC population. Using >15 donors, we obtained between 85 and 95% purity of CD68⁺/CD11b⁻ KC (Fig. 1A). Accordingly, 90–95% of KC were able to phagocytose unopsonized FITC-conjugated zymosan A (Supplemental Fig. 1A, 1B). The NLRP3 gene was expressed at basal levels and this expression rose in response to LPS (TLR4 ligand), and the AIM2 ligand poly(dA:dT) led to the production of pro-IL-1 β and AIM2, whereas procaspase-1, ASC, and pro-IL-18 displayed constitutive expression (Fig. 1B, 1C). As expected, KC primed with LPS plus AIM2 or NLRP3 activators triggered the production of mature IL-1 β and IL-18 (Fig. 1D). KC that were primed with LPS followed by ATP (another NLRP3 ligand) or nigericin (data not shown) also led to the production of mature IL-1 β , as confirmed by immunoblotting (Fig. 1E). We validated our findings using PVL, a pore-forming toxin that mediates cytotoxic effects after binding to the C5a receptor (C5aR/CD88) expressed in KC. PVL treatment killed all CD68⁺/CD11b⁻ KC (data not shown) and led to the loss of inflammasome activation via AIM2 and NLRP3 (Supplemental Fig. 1C). Taken together, we show the expression of several inflammasome genes and that functional NLRP3 and AIM2 inflammasomes are present in KC.

KC AIM2-mediated inflammasome activation of IL-8 transcription and NK cell IFN- γ production

IL-1 β -induced IL-8 transcription in immune cells promotes chemotaxis and positively regulates the synthesis of proangiogenic factors. The bioactivity of the supernatant from AIM2-activated KC led to the induction of the IL-8 promoter, which was blocked by the IL-1R antagonist anakinra (Fig. 2A). ATP and nigericin were toxic to KC transfected with the IL-8 promoter, meaning that luciferase activity could not be measured (data not shown). In response to IL-18 and IL-12 costimulation, NK cells produce IFN- γ , which plays an important role in antiviral immunity. Thus, we cocultured inflammasome-activated KC and PBMC to compare the percentage of intracellular IFN- γ -producing NK cells. FACS analysis showed that the percentage of IFN- γ -producing NK cells in PBMC increased from 3% in nontreated cells to 24% in inflammasome-activated cells. The addition of IL-18 binding protein α reduced the percentage of inflammasome-activated NK cells, showing that IFN- γ production was mostly dependent on IL-18

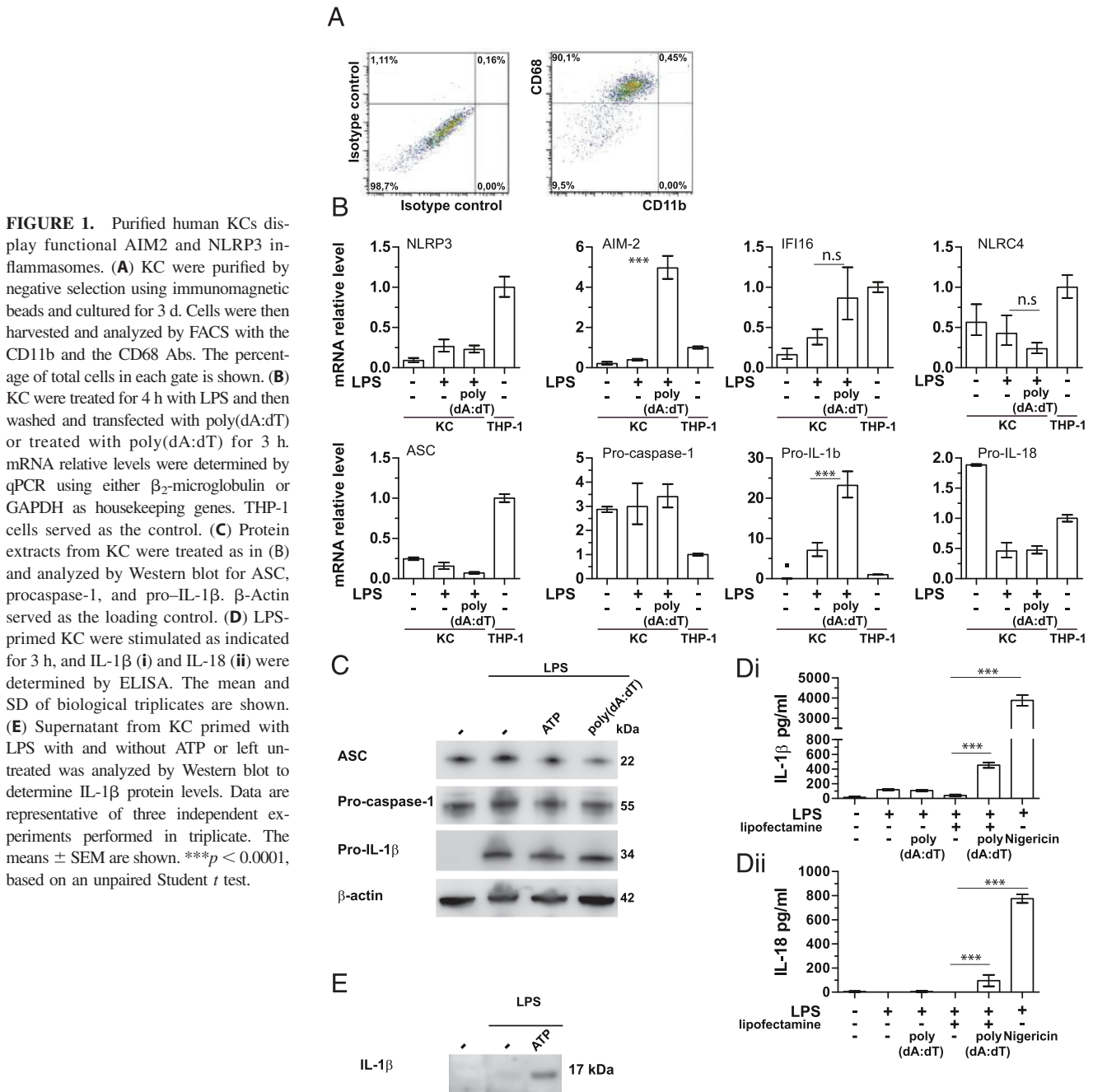
(Fig. 2B). Similar results were obtained from liver NK cells (Fig. 2C). These results show that human KC have functional AIM2 and NLRP3 inflammasomes and that AIM2 production of IL-1 β and IL-18 is essential for IL-8 transcription as well as activating liver and peripheral blood NK cells, respectively.

KC and not primary cultured human hepatocytes have functional AIM2 and NLRP3 inflammasomes

A functional NLRP3 inflammasome in hepatocytes has been reported by some (23) and excluded by others (24). Therefore, we wanted to determine whether PCHH expressed inflammasome genes. PVL treatment was used to remove KC from PCHH, and this removal was confirmed by FACS (Fig. 3A) or phagocytosis of unopsonized FITC-conjugated zymosan A (data not shown). Pro-IL-1 β mRNA and protein expression induced by LPS was completely abrogated in KC-depleted PCHH (Fig. 3B, 3C) as were AIM2 transcripts detected upon LPS plus poly(dA:dT) treatment. In contrast, transcript levels of ASC, procaspase-1, pro-IL-18, and protein levels of ASC or procaspase-1 did not change in KC-depleted PCHH (Fig. 3C, 3D). Thus, PVL-mediated KC depletion led to the complete loss of mature IL-1 β and IL-18 production upon activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes in PCHH (Fig. 3D). To determine whether PVL treatment had any toxic effect on hepatocytes, we primed KC-depleted and undepleted PCHH with TLR2-L (Pam3CSK4) and TLR4-L (LPS) (20). Both receptors remained functional following PVL treatment, as determined by IL-6 secretion (Supplemental Fig. 2A). The lack of functional AIM2 and NLRP3 inflammasomes in hepatocytes was further confirmed in HepaRG cells devoid of contaminating immune cells (25). As observed in KC-depleted PCHH, neither IL-1 β nor IL-18 production was detected in the HepaRG cells after AIM2 or NLRP3 inflammasome activation (Supplemental Fig. 2B, 2C). These data demonstrate that hepatocytes do not contain functional NLRP3 or AIM2 inflammasomes.

Several pathogens activate the inflammasome response in KC

We addressed whether an inflammasome response could be induced in KC by liver-related bacterias. *F. novicida* primarily infects macrophages and triggers the AIM2 and NLRP3 inflammasome (26). *S. typhimurium* is a flagellated bacterium that activates the NLRP3 inflammasome in response to flagellin secreted into the host cytosol using the SPI-1-encoded type III secretion system (27). Infection of primary KC with *F. novicida* WT strain U112 led to the production of IL-1 β and IL-18 in a multiplicity of infection (MOI)-dependent manner (Fig. 4A). In contrast, the deletion of the *Francisella* pathogen island (28) reduced the ability of *F. novicida* to elicit IL-1 β and IL-18 production in KC. Infection of primary KC with *S. typhimurium* also led to the production of IL-1 β and IL-18. This production was strongly impaired when KC were infected with the *Salmonella* mutant Δ SIPB, which lacks the functional SPI-1-encoded type III secretion system (Fig. 4B). We corroborated our data by detecting the cleaved forms of both caspase-1 and IL-1 β in the supernatant of KC upon infection by WT strains of *F. novicida* and *S. typhimurium* but not upon infection with mutant strains (Fig. 4C). Activation of caspase-1 is known to activate a form of programmed cell death. As assessed by PI incorporation, infection of KC by WT strains of *F. novicida* (Fig. 4D) and *S. typhimurium* (Fig. 4E) resulted in cell death, which was strongly impaired when using mutant strains. It has been reported that KSHV can activate the IFI6 inflammasome (8). Accordingly, 24 h incubation of KSHV in LPS-treated and untreated KC led to a significant production of IL-1 β (Fig. 4Fi) and IL-18 (Fig. 4Fii). Collectively, these results show, in a physiological setting, that the liver-associated pathogens *F. novicida* and *S. typhimurium*, as well as KSHV, activated inflammasome responses in KC.



HBV inhibits the AIM2 inflammasome in KC

HBV infects the human liver. It is considered a stealth virus that has evolved multiple strategies to evade host immunity, but inflammasome activity in response to HBV has not been examined. The addition of HBV for 3 h on PCHH or purified KC did not induce IL-1 β or IL-18 production (Fig. 5A, 5B). Indeed, we observed that HBV virions were able to enter KC as measured by confocal microscopy (Fig. 5C). Moreover, it appeared that HBV inhibited AIM2 inflammasome activation both in PCHH and KC (Fig. 5A, 5B). These results were confirmed in differentiated THP-1 monocyte cells, an established cell line that has been used in previous studies on inflammasomes, using several different batches of HBV (Fig. 5D). The inhibition of IL-1 β led to a reduction in IL-8 bioactivity (Fig. 5D). We then examined how HBV affects AIM2 function. Overexpression of AIM2 and the adapter ASC leads to the formation of an inflammasome complex, which is visible as a speck when observed by fluorescence microscopy

(5). The addition of HBV had no effect on AIM2/ASC speck formation (Fig. 6A), nor did it affect AIM2 protein levels, which are driven by an exogenous promoter (Fig. 6B). However, HBV did decrease AIM2 transcripts in KC (Fig. 6C). These results show that HBV can specifically inhibit the AIM2 inflammasome, but not the NLRP3 inflammasome, in KC and differentiated monocytes.

Hepatitis B surface Ag blocks IRF7 binding to the AIM2 promoter

We wanted to determine which viral component was responsible for blocking the AIM2 inflammasome. HBV is a DNA envelope virus that contains HBc, which encapsulates the viral DNA envelope, and HBs, which forms a complete viral or Dane particle. HBV particles HBs and HBe (a truncated form of HBc) are secreted by infected hepatocytes (29). Dane particles and HBe had no effect (Fig. 7B) on AIM2 function, but HBs was able to block IL-1 β production in a dose-dependent manner (Fig. 7C). AIM2 transcription is induced

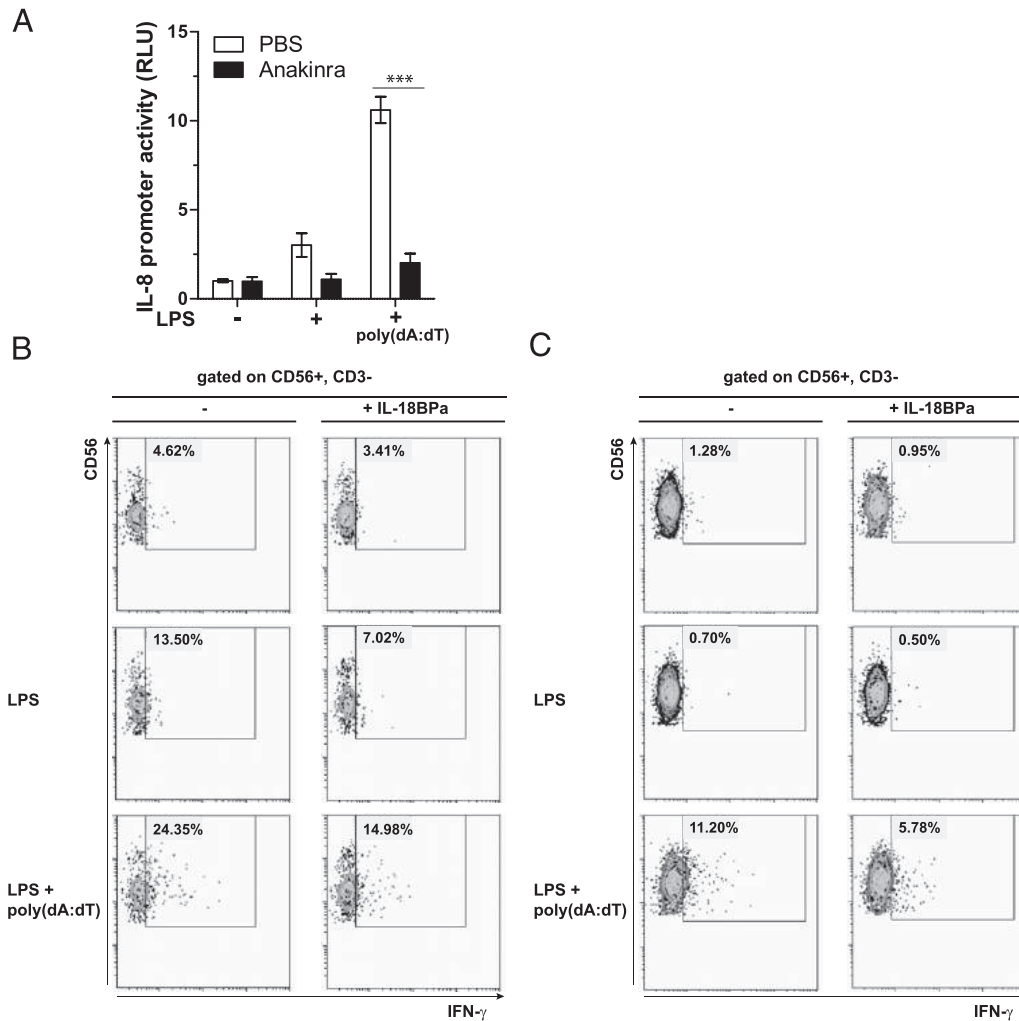


FIGURE 2. AIM2 inflammasome activation in KC leads to production of IL-8 and IL-18 and biological activation of NK cells. **(A)** After 24 h the supernatant from KC primed with LPS with and without poly(dA:dT) or left untreated was incubated with PBS or anakinra and added to HEK293 cells transfected with the IL-8 luciferase promoter. $***p > 0.0001$. **(B)** and **(C)** Freshly purified KC were primed overnight with LPS, washed, and then transfected with poly(dA:dT) or left untreated. After 3 h, PBMC **(B)** or LMNC **(C)** were added to each well with and without recombinant IL-18 binding protein α (IL-18BP α) and 6 h later were analyzed by FACS following cytokine intracellular staining. FACS plots show cells population following gating on CD4⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD3⁻, CD56⁺ cells. The percentage of IFN- γ ⁺ NK cells is shown. Results shown are from one experiment representative of three independent experiments.

by type I IFNs (30), and HBV has been shown to inhibit IRFs, which are essential for IFN type I production. Indeed, the suppression of AIM2 mRNA by HBV was reversed when additional IFN- β was added (Fig. 8A). HBV may decrease AIM2 by two distinct mechanisms: HBV can affect the stability of AIM2 transcript or it can directly inhibit AIM2 transcription. To discriminate between these two possibilities, we have determined whether HBV could influence the activity of the AIM2 promoter. The isolated AIM2 promoter cloned in front of the luciferase reporter gene was introduced by transient transfection in the THP-1 cell line that expresses endogenous AIM2. High basal luciferase activity was detected in these cells after transient transfection, but HBV as well as HBs inhibited luminescence, indicating that HBV via HBs can block the transcription of the AIM2 gene (Fig. 8B). Furthermore, a mutation at the IRF site that has been shown to regulate AIM2 transcription by IRF1 (19) prevented HBV as well as HBs inhibition of the AIM2 promoter (Fig. 8B). HBe did not inhibit AIM2 promoter activity (data not shown). Indeed, the knockdown of IRF7 reduced the basal levels of AIM2 (Supplemental Fig. 3), indicating that IRF7 in our

system regulates AIM2 expression. We previously reported that HBV can block IRF7 activity (15). We observed that in THP-1 cells treated with IFN- β -induced IRF7 mRNA expression (Fig. 8C), this expression was blocked by HBs but was restored when additional IFN- β was added (Fig. 8C). ChIP assays in THP-1 cells revealed that IRF7, and not IRF1 (19), was bound to the IRF site on the AIM2 promoter; however, HBs reduced IRF7 binding on the IRF site (Fig. 8D). We also noted that bound IRF7 on the AIM2 promoter was further increased in the presence of IFN- β but was abrogated by HBs (Fig. 8E). Additional IFN- β treatment overcame IRF7 inhibition by HBs (Fig. 8E). We next corroborated our findings in KC. As seen in THP-1 cells, IRF7 mRNA levels were reduced in KC when exposed to HBs (Fig. 8F). We next hypothesized that HBs may affect the stability of IRF7 mRNA, which influences AIM2 levels. KC were treated with actinomycin D for 24 h and then treated for 3 h with HBs. We observed that the half-life of IRF7 mRNA was reduced by HBs in KC (Fig. 8G). Additionally, IRF7 protein levels were abrogated by HBs, which was correlated with a reduction in IRF7 binding to the AIM2 promoter (Fig. 8H). We show, to our

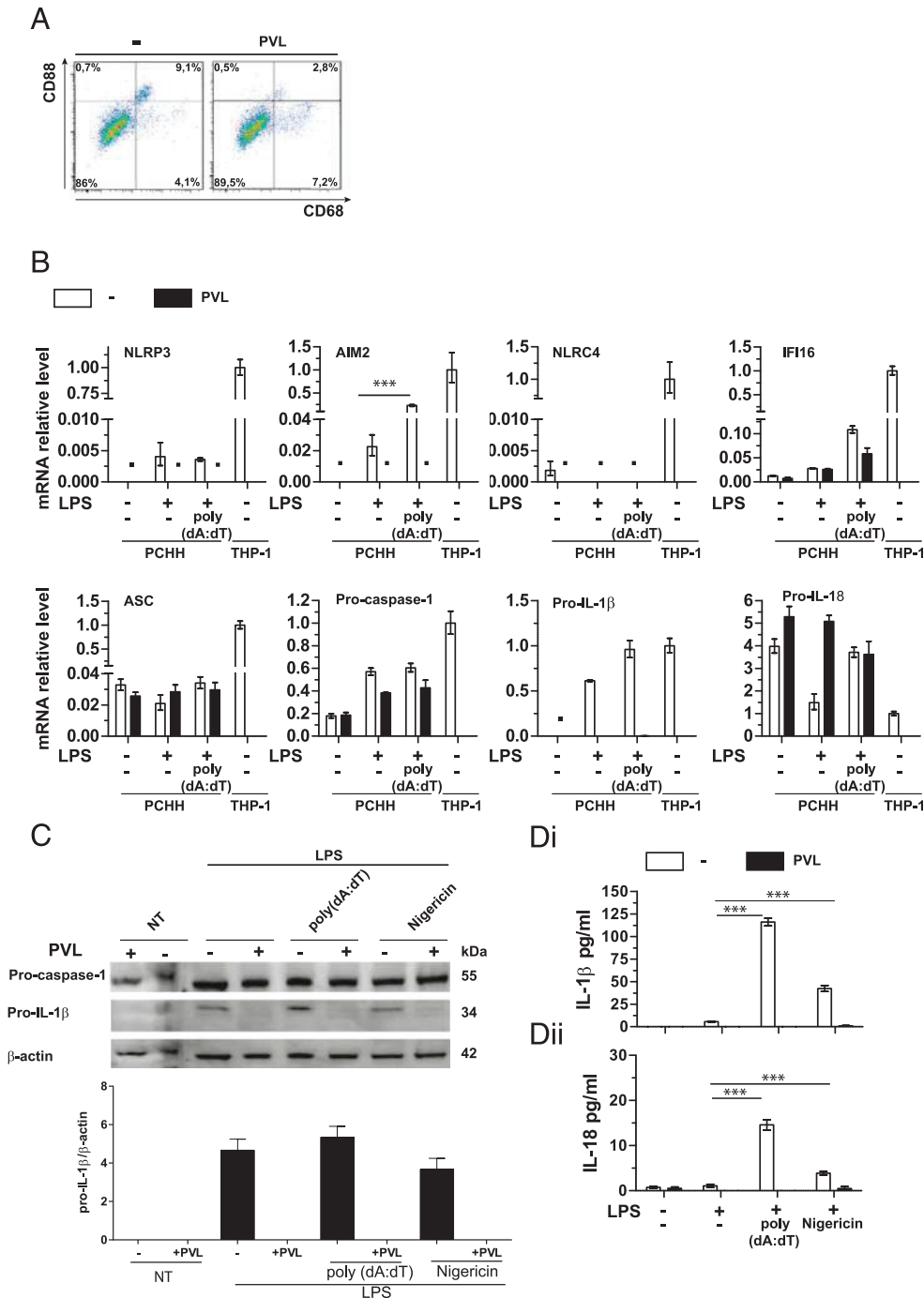


FIGURE 3. KC, not hepatocytes, represent the primary source of NLRP3, AIM2, and IL-1β production and display inflammasome functionality. **(A)** KC populations in PCHH cultures were analyzed by FACS using CD68 and CD88 Abs. **(B)** PCHH with and without PVL and/or LPS were treated for 4 h, and cells were transfected with poly(dA:dT) or left untreated for a further 3 h. The mRNA levels of NLRP3, AIM2, NLRC4, IFI16, ASC, procaspase-1, pro-IL-1β, and pro-IL-18 were determined by qPCR and normalized to GAPDH. PMA-differentiated THP-1 served as control. **(C)** PCHH primed with LPS with and without PVL as in (A) were primed with the AIM2 and NLRP3 inflammasome activators for 3 h and harvested and protein extracts were used for monitoring procaspase-1, pro-IL-1β, and β-actin protein levels; β-actin served as the loading control. One out of three experiments is represented (Western blot); densitometry was performed for IL-1β levels on all three experiments and is represented in graph form. **(D)** The supernatant of PCHH treated as in (C) was harvested, and IL-1β (i) and IL-18 (ii) levels were assessed by ELISA. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The means ± SEM are shown. ****p* < 0.0001, based on an unpaired Student *t* test.

knowledge for the first time, that different pathogens behave differentially on the same cell type. We demonstrated that human KC have active inflammasomes that respond to liver-borne bacterial infections as well as to KSHV. However, HBV can abrogate AIM2 responses by deregulating IRF7 expression and binding on the AIM2 promoter.

Discussion

Many different microbial and viral signals activate innate immunity in the presence of liver disease. The inflammasome response may inhibit or contribute to several of these pathologies. This balance was extensively discussed in the review by Szabo and Csak (31), and several recent findings speculate on the role of different liver

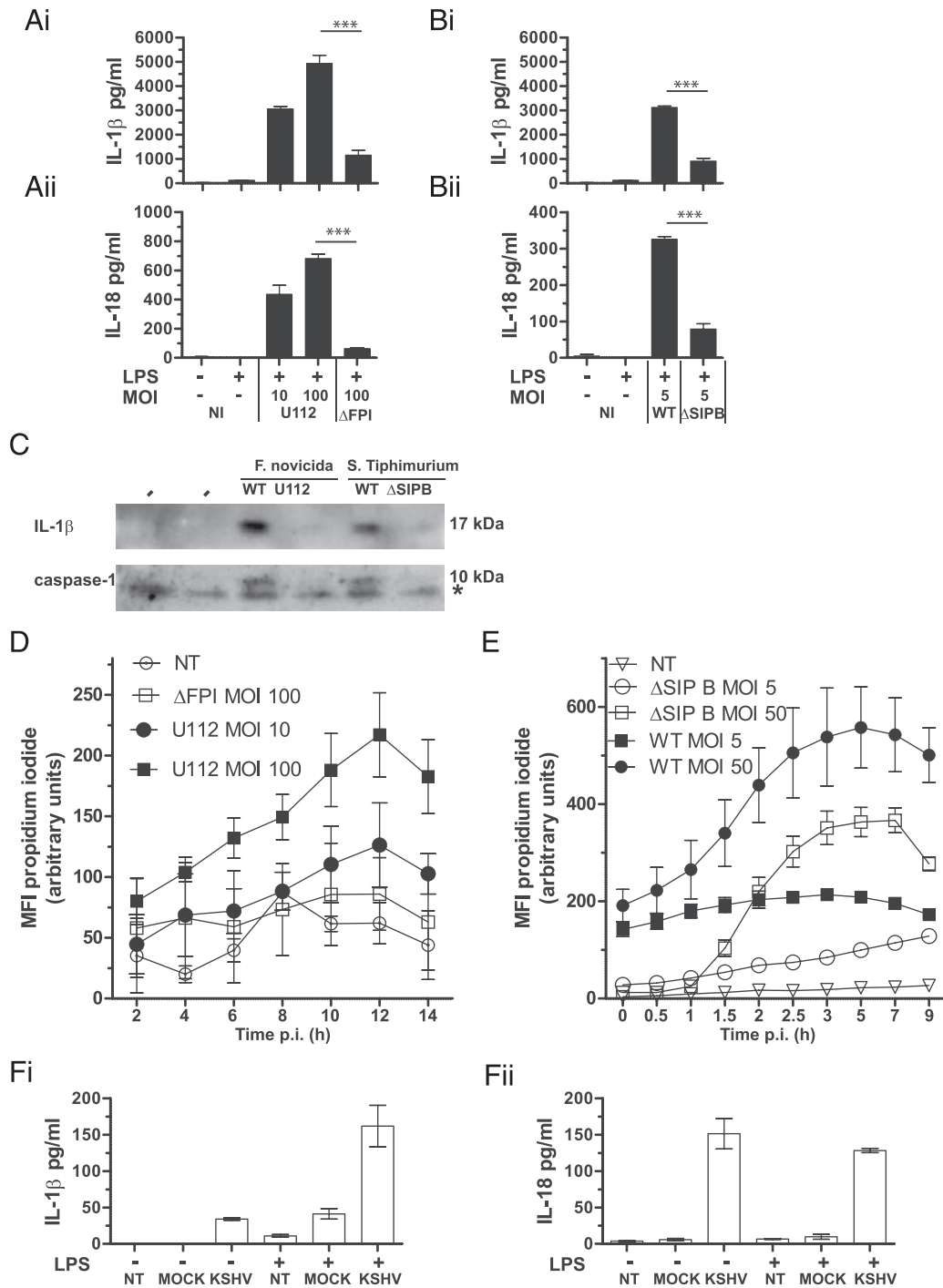


FIGURE 4. Induction of the inflammasome pathway in purified KC in response to live pathogens. **(A)** KC were infected with *F. novicida* WT or Δ FPI mutant strains at the indicated MOI. Eight hours after infection, supernatant was harvested and analyzed for IL-1 β **(Ai)** and IL-18 **(Aii)** concentration by ELISA. **(B)** The supernatant of KC infected for 3 h at an MOI of 5 with *S. typhimurium* WT and Δ SIPB mutant strains was harvested, and IL-1 β **(Bi)** and IL-18 **(Bii)** concentration was assessed by ELISA. **(C)** The supernatant from KC treated as in **(A)** and **(B)** was analyzed by Western blot to determine IL-1 β and caspase-1 protein levels. **(D)** and **(E)** Cell death of KC infected with *F. novicida* **(D)** and *S. typhimurium* **(E)** at the indicated MOI and time after infection was assessed by measuring PI fluorescence using a 96-well microplate fluorometer. **(F)** KC were primed with LPS for 4 h and then incubated with KSHV or MOCK (MOI of 25). After 24 h, supernatant was harvested and IL-1 β **(Fi)** and IL-18 **(Fii)** concentration was determined by ELISA. The means \pm SEM are shown. *** $p < 0.0001$, based on an unpaired Student *t* test. MFI, mean fluorescence intensity; NT, not treated.

cells in various liver pathologies. However, there is still no clear study on which liver cells contribute to liver inflammasome activity. We deduced that KC would be the major contributor in liver inflammasome responses, as it has been historically characterized in murine bone marrow and human monocyte-derived macrophages. In this study, we characterized the expression of inflammasome

genes and signaling molecules, as well as the inflammasome response to ligands and pathogens in KC. We have shown that IL-1 β and IL-18 are produced in response to AIM2, NLRP3, IFI16, and NLRC4 activators. Moreover, our data show inflammasome activation of human KC in response to *F. tularensis* and *S. typhimurium*. Although PCHH did not show functional NLRP3 or AIM2

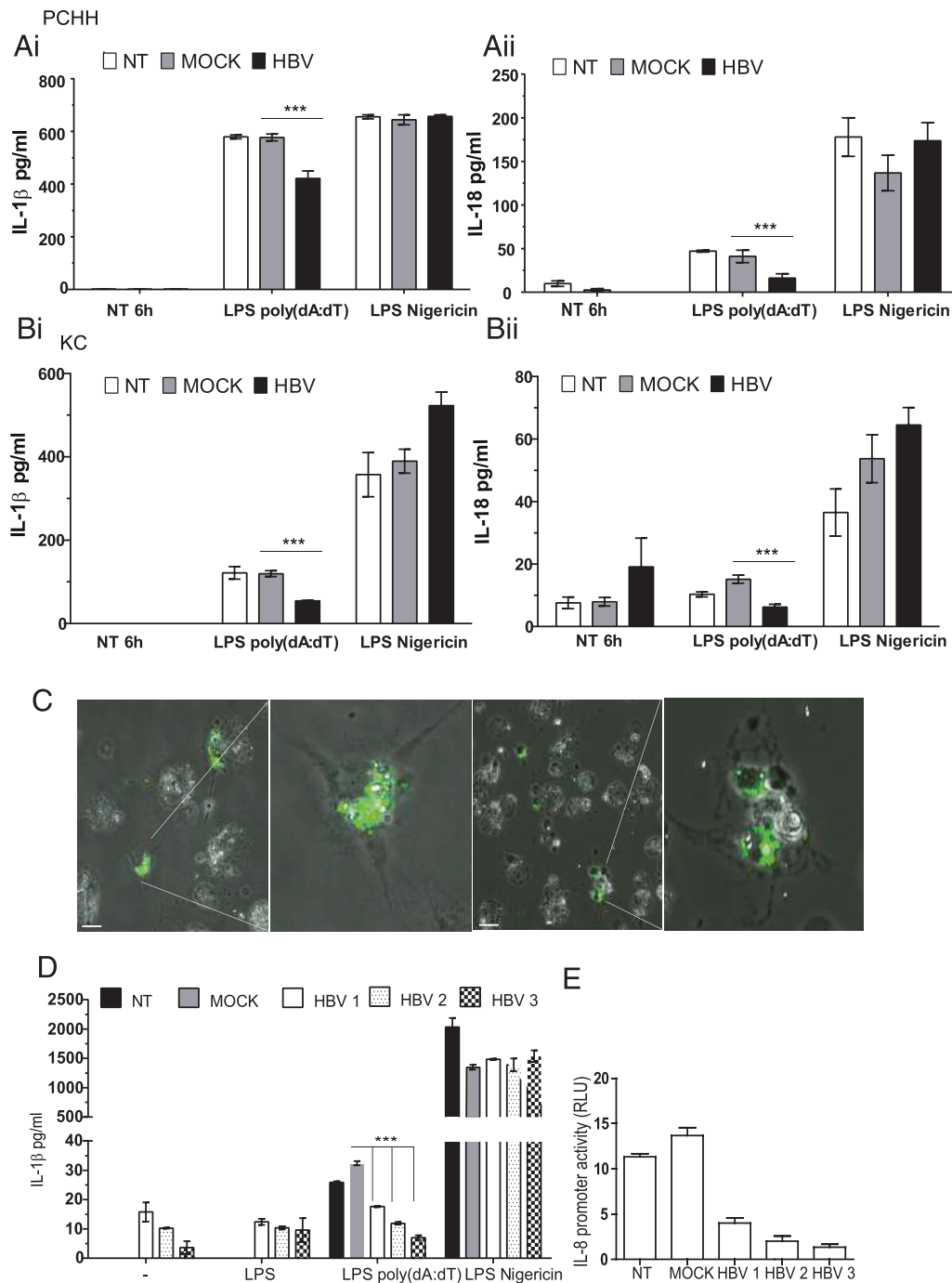


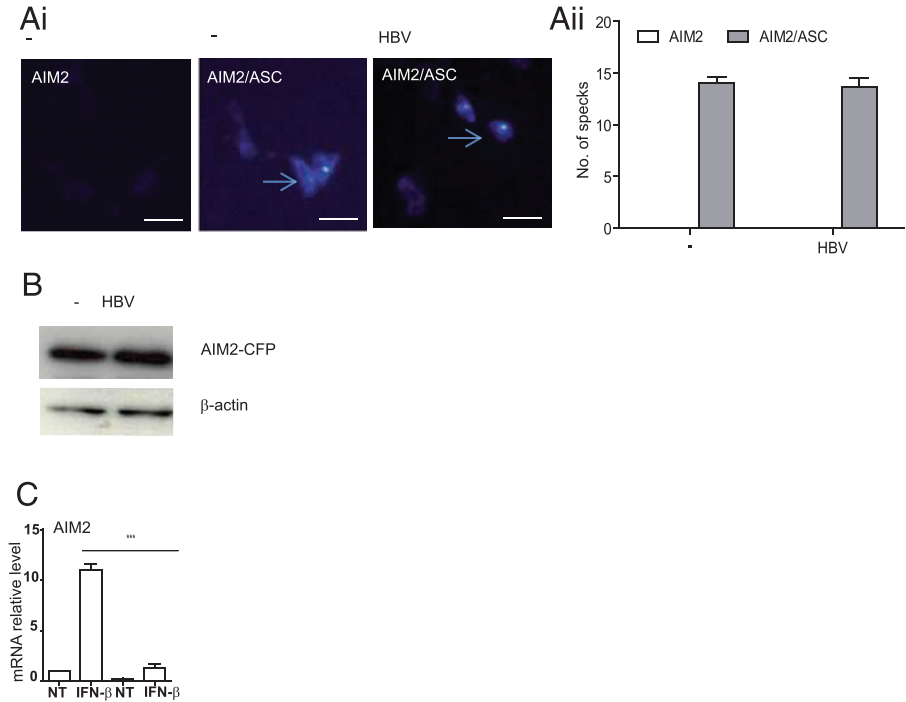
FIGURE 5. The AIM2 inflammasome is blocked by HBV. **(A)** PCHH were primed with LPS for 3 h and then incubated with HBV, MOCK, or left untreated for 3 h. Nigericin (ligand for NLRP3) and poly(dA:dT) (ligand for AIM2) were added for 3 h. IL-1 β (**Ai**) and IL-18 (**Aii**) was measured by ELISA. **(B)** KC were primed with LPS for 3 h. After 3 h of incubation with HBV or MOCK, nigericin and poly(dA:dT) were added for 3 h. IL-1 β (**Bi**) and IL-18 (**Bii**) levels were assessed by ELISA. **(C)** Kupffer cells were purified as described, and 20 μ l 2×10^{10} Alexa Fluor 488–labeled HBV virions was added for 2 h. Images were taken 3 h after HBV treatment using the Olympus FV10 confocal microscope. Scale bars, 25 μ m. **(D)** THP-1 cells were differentiated and primed with LPS for 3 h, and then three different viral productions of HBV were added for 3 h. Cells were washed three times with PBS, and nigericin and poly(dA:dT) were added for 3 h. IL-1 β levels were assessed by ELISA. **(E)** Supernatant from cells primed with LPS with and without HBV with and without poly(dA:dT) or left untreated was incubated with PBS or anakinra and added to HEK293 cells transfected with the IL-8 luciferase promoter for 24 h. Data are representative of three independent experiments performed in duplicate. The means \pm SEM are shown. *** $p < 0.0001$, based on an unpaired Student *t* test.

inflammasomes, we cannot exclude the possibility that other functional inflammasomes exist in hepatocytes, and we think that further investigations in this area are warranted.

KC tightly adhere to sinusoidal endothelial cells and are often in contact with NK cells. This cross-talk between KC and NK cells is essential for immune activation. We demonstrated that stimulation

of AIM2 with poly(dA:dT) led to IL-18 production in KC, and coculture with NK cells led to IFN- γ production. A recent study linked inflammasome activation to NK cell–mediated tumor attack to suppress metastasis in the liver, demonstrating the importance of the innate immune system in this organ (32). Mice with colorectal cancer who were deficient in NLRP3 inflammasome components

FIGURE 6. AIM2/ASC speck formation was not affected by HBV. **(A)** (i) AIM2-CFP and ASC-YFP plasmids were transfected in HEK293 cells for 36 h. HBV was added at a viral genome equivalent of 2000 and speck formation was observed. Scale bars, 20 μ m. (ii) Specks were counted in five different fields and are represented as a graph. Data are representative of three independent experiments performed in duplicate. **(B)** As in (A), after HBV addition, HEK293 cells were lysed and immunoblotting was performed using a GFP Ab to detect AIM2 protein levels. **(C)** PMA-differentiated THP-1 were primed with IFN- β with and without HBV for 6 h and AIM2 mRNA was measured by qPCR and normalized to housekeeping gene expression GAPDH. *** $p > 0.0001$.



had exacerbated metastatic growth in the liver, which was mediated when the inflammasome production of IL-18 in KC was impaired, reducing the maturation of hepatic NK cells, the surface expression of the death ligand FasL, and the capacity to kill FasL-sensitive tumors. Indeed, the inflammasome might have a crucial role in mediating multiple immune response signals in the liver, which can

vary in their timing, cellular location, and intensity, and can determine the pathological outcome. Recent works described the role of IL-1 β in the pathogenesis of several different chronic liver diseases (33–36). Jo et al. (37) revealed a link between hepatic inflammation and disease in patients with chronic HCV, which was attributed to IL-1 β secretion following activation of the NLRP3 inflammasome

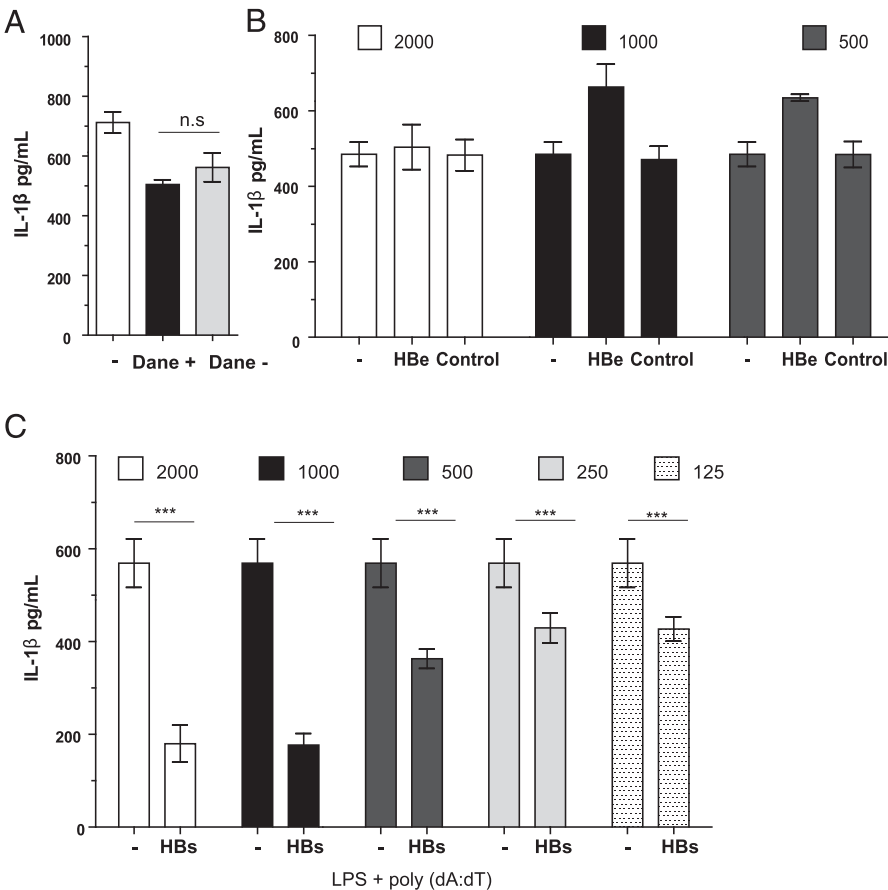
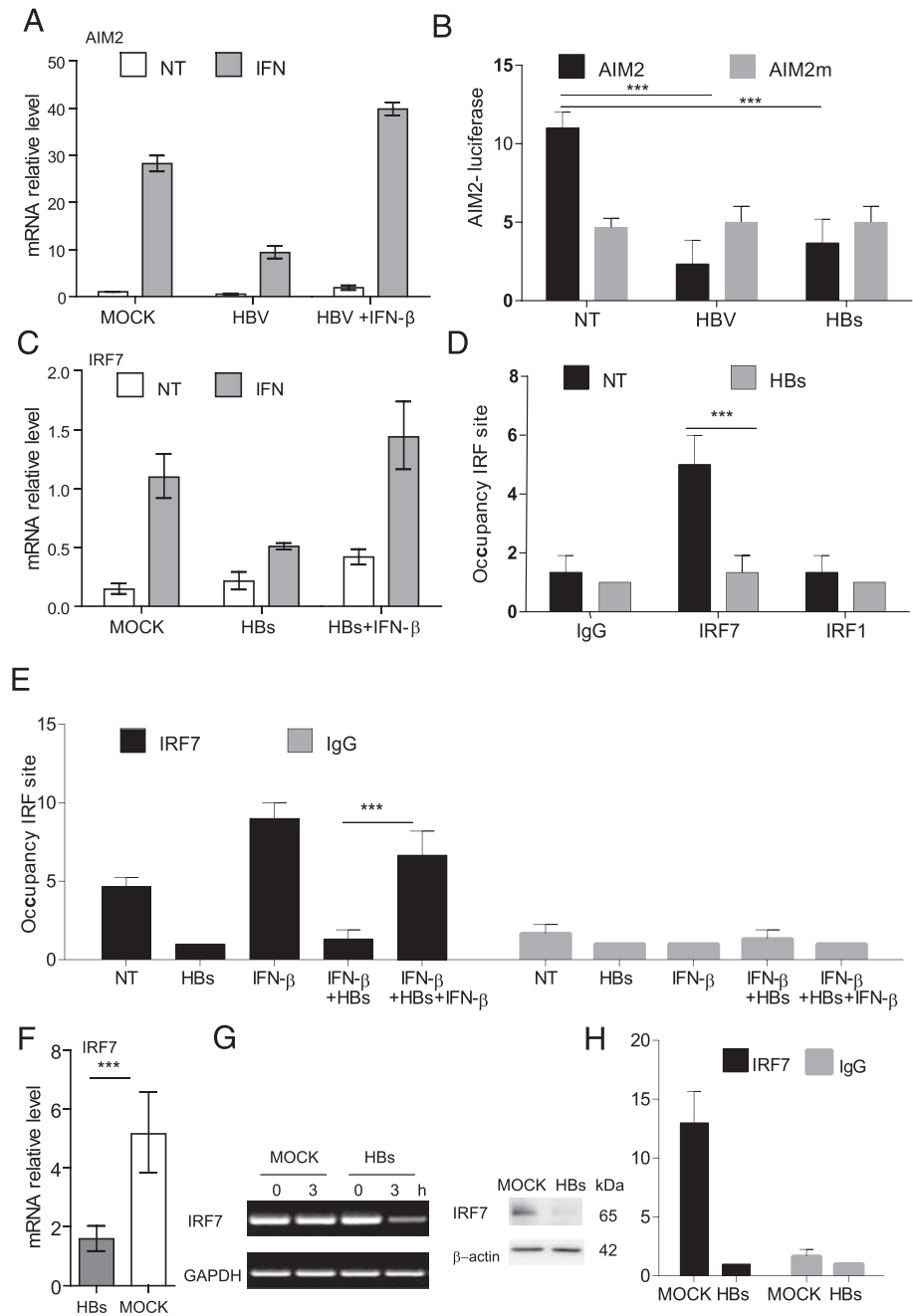


FIGURE 7. HBs inhibits AIM2 mRNA expression. **(A)** THP-1 cells were differentiated and primed with LPS for 3 h, and then Dane particles or a control (ranging from 2000 to 500 viral genome equivalents) at a viral genome equivalent of 1000 were added for 3 h. Cells were washed three times with PBS, and poly(dA:dT) was added for 3 h. IL-1 β levels were assessed by ELISA. **(B)** THP-1 cells were differentiated and primed with LPS for 3 h and then exposed to a decreasing concentration of HBe particles or control. After 3 washes with PBS, poly(dA:dT) was added for 3 h. IL-1 β levels were assessed by ELISA. **(C)** THP-1 cells were differentiated and primed with LPS for 3 h and then exposed to a decreasing concentration of HBs particles or control. Cells were washed three times with PBS and poly(dA:dT) was added for 3 h. IL-1 β levels were assessed by ELISA. *** $p > 0.0001$.

FIGURE 8. IRF7 expression is abrogated by HBV, which prevents AIM2 expression. **(A)** THP-1 cells were differentiated and treated with MOCK or HBV at a viral genome equivalent of 400 for 3 h with and without IFN- β (200 ng/ml). Cells were washed three times with PBS and IFN- β was added for another 3 h. The mRNA levels of AIM2 were determined by qPCR using GAPDH and/or β_2 -microglobulin as the housekeeping gene. **(B)** THP-1 cells were transfected with the AIM2 WT or mutated promoter linked to luciferase gene and processed as previously described (15, 20). **(C)** As in (A), IRF7 mRNA expression was examined by qPCR. **(D)** ChIP assay using anti IRF1, IRF7, or IgG was performed on the IRF site using THP-1 cells treated with HBs at 400 viral genome equivalent for 3 h. **(E)** THP-1 cells were treated as in (A) and ChIP assay performed for IRF7. **(F)** KC were treated with HBs or MOCK for 3 h and mRNA levels for IRF7 were examined by qPCR using GAPDH and/or β_2 -microglobulin as the housekeeping gene. **(G)** KC were treated with actinomycin D for 24 h and then treated for 3 h with HBs or MOCK at 200 viral genome equivalent, and an RT-PCR was performed for IRF7 and GAPDH. Immunoblot analysis for IRF7 and β -actin was performed on THP-1 cells treated with Hbs or MOCK for 3 h. **(H)** ChIP assay for IRF7 binding to the IRF site on the AIM2 promoter was performed on KC treated for 3 h with HBs or MOCK. The means \pm SEM are shown. *** p < 0.0001, based on an unpaired Student t test. Data are representative of three independent experiments performed in duplicate.



in liver macrophages (CD68⁺/CD14⁺). TLR8 induction of IL-18 and IL-12 was reported in infiltrating liver macrophages and MAIT cells in normal and in HBV- and HCV-infected livers (25).

However, certain works have highlighted the role of IL-1 β and other innate cytokines in controlling HBV infection in liver cells. Watashi et al. (38) found that priming with IL-1 β and TNF- α remarkably reduced host cell susceptibility to HBV infection. Furthermore, Hoesel et al. showed that HBV particles and HBs induce IL-1 β , IL-6, CXCL8, and TNF production by human CD68⁺ cell-enriched nonparenchymal cells via NF- κ B activation (14) and subsequently inhibit HBV replication in primary hepatocytes. This inhibitory effect was mainly ascribed to IL-6, but also to TNF-inhibited HBV replication in a noncytopathic manner. More recently, Boltjes et al. (39) showed that HBs is internalized by KC, leading to NK activity. In contrast, Li et al. (40) demonstrated that rat ED1⁺-adherent KC exposed to HBV virions hardly expressed IL-1 β , IL-6, or TNF, but produced the immunoregulatory

cytokine TGF- β . Our data suggest that targeting AIM2 prevents the recognition of dsDNA expressed by the HBV, and that the limited innate response observed upon HBV infection may be due to viral-mediated immune evasion. There are several studies that support this hypothesis. HBe has been implicated in the downregulation of TLR2 functionality (41) and expression in hepatocytes, KC, and PBMC. HBs has been reported to inhibit TLR9 functionality and expression in plasmacytoid dendritic cells and PBMC (15). The nonstructural HBx protein encoded by HBV has been shown to affect RIG-I-MDA5 signaling in vitro (42). Furthermore, a previous study showed diminished IL-18 responses and reduced IFN- γ of NK cells in differentiated monocytes from PBMC (43). HBV polymerase and HBs have been shown to affect the signaling of transcription factors associated with IFN transcription, such as IRF3 and IRF7 (15, 44, 45). In the present study, we showed that HBV via HBs can block IRF7 mRNA stability, which in turn affects AIM2 expression. These novel findings demonstrate another strategy used

by HBV to evade innate immune responses. Therefore, understanding inflammasome–pathogen interactions in the liver holds promise not only for our understanding of the fundamental aspects of HBV persistence, but also for our understanding of resolving other liver pathologies.

Acknowledgments

We thank Drs. Nadege Goutagny (INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie–Lyon, Lyon, France) and Peggy Parroche (INSERM U1111, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France) for technical support, as well as Viet Hornung (University of Bonn) and Reuben Toozee (University of Leeds) for reagents.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Muruve, D. A., V. Pétrilli, A. K. Zaiss, L. R. White, S. A. Clark, P. J. Ross, R. J. Parks, and J. Tschopp. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452: 103–107.
- Delaloye, J., T. Roger, Q. G. Steiner-Tardivel, D. Le Roy, M. Knaup Reymond, S. Akira, V. Petrilli, C. E. Gomez, B. Perdiguero, J. Tschopp, et al. 2009. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 5: e1000480.
- Burdette, D., A. Haskett, L. Presser, S. McRae, J. Iqbal, and G. Waris. 2012. Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. *J. Gen. Virol.* 93: 235–246.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu, and E. S. Alnemri. 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458: 509–513.
- Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz, and K. A. Fitzgerald. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458: 514–518.
- Roberts, T. L., A. Idris, J. A. Dunn, G. M. Kelly, C. M. Burnton, S. Hodgson, L. L. Hardy, V. Garceau, M. J. Sweet, I. L. Ross, et al. 2009. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323: 1057–1060.
- Rathinam, V. A., Z. Jiang, S. N. Waggoner, S. Sharma, L. E. Cole, L. Waggoner, S. K. Vanaja, B. G. Monks, S. Ganesan, E. Latz, et al. 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11: 395–402.
- Kerur, N., M. V. Veettil, N. Sharma-Walia, V. Bottero, S. Sadagopan, P. Otageri, and B. Chandran. 2011. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9: 363–375.
- Henry, T., A. Brotcke, D. S. Weiss, L. J. Thompson, and D. M. Monack. 2007. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J. Exp. Med.* 204: 987–994.
- Jones, J. W., N. Kayagaki, P. Broz, T. Henry, K. Newton, K. O'Rourke, S. Chan, J. Dong, Y. Qu, M. Roose-Girma, et al. 2010. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 9771–9776.
- Deiwick, J., S. P. Salcedo, E. Boucrot, S. M. Gilliland, T. Henry, N. Petermann, S. R. Waterman, J. P. Gorvel, D. W. Holden, and S. Méresse. 2006. The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect. Immun.* 74: 6965–6972.
- Henry, T., C. Couillault, P. Rockenfeller, E. Boucrot, A. Dumont, N. Schroeder, A. Hermant, L. A. Knodler, P. Lecine, O. Steele-Mortimer, et al. 2006. The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13497–13502.
- Benacerraf, B., M. M. Sebastyen, and S. Schlossman. 1959. A quantitative study of the kinetics of blood clearance of P32-labelled *Escherichia coli* and staphylococci by the reticuloendothelial system. *J. Exp. Med.* 110: 27–48.
- Hösel, M., M. Quasdorff, K. Wiegmann, D. Webb, U. Zedler, M. Broxtermann, R. Tedjokusumo, K. Esser, S. Arzberger, C. J. Kirschning, et al. 2009. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 50: 1773–1782.
- Vincent, I. E., C. Zannetti, J. Lucifora, H. Norder, U. Protzer, P. Hainaut, F. Zoulim, M. Tommasino, C. Trépo, U. Hasan, and I. Chemin. 2011. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 6: e26315.
- Perret, M., C. Badiou, G. Lina, S. Burbaud, Y. Benito, M. Bes, V. Cottin, F. Couzon, C. Juruj, O. Dauwalder, et al. 2012. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell. Microbiol.* 14: 1019–1036.
- Ghoniem, M. G., O. R. Shamaa, S. Das, R. A. Eldomany, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri, M. A. Gavrilin, and M. D. Wewers. 2014. Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J. Immunol.* 192: 3881–3888.
- Hasan, U. A., S. Dollet, and J. Vlach. 2004. Differential induction of gene promoter constructs by constitutively active human TLRs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321: 124–131.
- Doody, G. M., S. Stephenson, C. McManamy, and R. M. Toozee. 2007. PRDM1/BLIMP-1 modulates IFN- γ -dependent control of the MHC class I antigen-processing and peptide-loading pathway. *J. Immunol.* 179: 7614–7623.
- Gao, B., W. I. Jeong, and Z. Tian. 2008. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47: 729–736.
- Zannetti, C., F. Bonnay, F. Takeshita, P. Parroche, C. Ménétrier-Caux, M. Tommasino, and U. A. Hasan. 2010. C/EBP β and STAT-1 are required for TLR8 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 285: 34773–34780.
- Ikarashi, M., H. Nakashima, M. Kinoshita, A. Sato, M. Nakashima, H. Miyazaki, K. Nishiyama, J. Yamamoto, and S. Seki. 2013. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 94: 1325–1336.
- Wree, A., A. Eguchi, M. D. McGeough, C. A. Pena, C. D. Johnson, A. Canbay, H. M. Hoffman, and A. E. Feldstein. 2014. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59: 898–910.
- Negash, A. A., H. J. Ramos, N. Crochet, D. T. Lau, B. Doehle, N. Papic, D. A. Delker, J. Jo, A. Bertolotti, C. H. Hagedorn, and M. Gale, Jr. 2013. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* 9: e1003330.
- Marion, M. J., O. Hantz, and D. Durantel. 2010. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol. Biol.* 640: 261–272.
- Atianand, M. K., E. B. Duffy, A. Shah, S. Kar, M. Malik, and J. A. Harton. 2011. *Francisella tularensis* reveals a disparity between human and mouse NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 286: 39033–39042.
- Zhao, Y., J. Yang, J. Shi, Y. N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu, and F. Shao. 2011. The NLRP4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477: 596–600.
- Mariathasan, S., D. S. Weiss, V. M. Dixit, and D. M. Monack. 2005. Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J. Exp. Med.* 202: 1043–1049.
- Dienstag, J. L. 2008. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 359: 1486–1500.
- Meunier, E., P. Wallet, R. F. Dreier, S. Costanzo, L. Anton, S. Rühl, S. Dussurgey, M. S. Dick, A. Kistner, M. Rigard, et al. 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat. Immunol.* 16: 476–484.
- Szabo, G., and T. Csak. 2012. Inflammasomes in liver diseases. *J. Hepatol.* 57: 642–654.
- Dupaul-Chicoine, J., A. Arabzadeh, M. Dagenais, T. Douglas, C. Champagne, A. Morizot, I. G. Rodrigue-Gervais, V. Breton, S. L. Colpitts, N. Beauchemin, and M. Saleh. 2015. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. *Immunity* 43: 751–763.
- Guo, S., C. Yang, B. Diao, X. Huang, M. Jin, L. Chen, W. Yan, Q. Ning, L. Zheng, Y. Wu, and Y. Chen. 2015. The NLRP3 inflammasome and IL-1 β accelerate immunologically mediated pathology in experimental viral fulminant hepatitis. *PLoS Pathog.* 11: e1005155.
- Han, Y., Z. Chen, R. Hou, D. Yan, C. Liu, S. Chen, X. Li, and W. Du. 2015. Expression of AIM2 is correlated with increased inflammation in chronic hepatitis B patients. *Virol. J.* 12: 129.
- Ilyas, G., E. Zhao, K. Liu, Y. Lin, L. Tesfa, K. E. Tanaka, and M. J. Czaja. 2016. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β . *J. Hepatol.* 64: 118–127.
- Iracheta-Vellve, A., J. Petrasek, A. Satishchandra, B. Gyongyosi, B. Saha, K. Kodys, K. A. Fitzgerald, E. A. Kurt-Jones, and G. Szabo. 2015. Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.* 63: 1147–1155.
- Jo, J., A. T. Tan, J. E. Ussher, E. Sandalova, X. Z. Tang, A. Tan-Garcia, N. To, M. Hong, A. Chia, U. S. Gill, et al. 2014. Toll-like receptor 8 agonist and bacteria trigger potent activation of innate immune cells in human liver. *PLoS Pathog.* 10: e1004210.
- Wataishi, K., G. Liang, M. Iwamoto, H. Marusawa, N. Uchida, T. Daito, K. Kitamura, M. Muramatsu, H. Ohashi, T. Kiyohara, et al. 2013. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J. Biol. Chem.* 288: 31715–31727.
- Boltjes, A., N. van Montfoort, P. J. Biesta, M. L. Op den Brouw, J. Kwekkeboom, L. J. van der Laan, H. L. Janssen, A. Boonstra, and A. M. Woltman. 2015. Kupffer cells interact with hepatitis B surface antigen in vivo and in vitro, leading to proinflammatory cytokine production and natural killer cell function. *J. Infect. Dis.* 211: 1268–1278.
- Li, H., H. W. Zheng, H. Chen, Z. Z. Xing, H. You, M. Cong, and J. D. Jia. 2012. Hepatitis B virus particles preferably induce Kupffer cells to produce TGF- β 1 over pro-inflammatory cytokines. *Dig. Liver Dis.* 44: 328–333.
- Lang, T., C. Lo, N. Skinner, S. Locarnini, K. Visvanathan, and A. Mansell. 2011. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the Toll-like receptor signaling pathway. *J. Hepatol.* 55: 762–769.

42. Kumar, M., S. Y. Jung, A. J. Hodgson, C. R. Madden, J. Qin, and B. L. Slagle. 2011. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *J. Virol.* 85: 987–995.
43. Jegaskanda, S., S. H. Ahn, N. Skinner, A. J. Thompson, T. Ngyuen, J. Holmes, R. De Rose, M. Navis, W. R. Winnall, M. Kramski, et al. 2014. Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon γ expression by the hepatitis B virus e antigen. *J. Virol.* 88: 10412–10420.
44. Wang, X., Y. Li, A. Mao, C. Li, Y. Li, and P. Tien. 2010. Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN- β induction by disrupting the VISA-associated complex. *Cell. Mol. Immunol.* 7: 341–348.
45. Xu, Y., Y. Hu, B. Shi, X. Zhang, J. Wang, Z. Zhang, F. Shen, Q. Zhang, S. Sun, and Z. Yuan. 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* 46: 2640–2646.

Article 2: TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16 (INK4a) protein expression

Objectif de l'article 2

Le récepteur Toll-like 9 (TLR9) reconnaît l'ADN bactérien, viral et celui associé aux lésions cellulaires, ce qui déclenche des réponses immunitaires innées. Les résultats précédents ont indiqué que la régulation négative de l'expression de TLR9 est impliquée dans la perte de l'immunité innée antivirale ce qui va permettre une réplication virale efficace. Ici, nous avons étudié le rôle du TLR9 dans l'altération de la croissance des cellules épithéliales transformées. Dans les cellules dérivées de patients atteints de cancer cervical et de cancer du cou, on veut savoir si la réintroduction de TLR9 conduira à une modification de la prolifération cellulaire. On voudra savoir aussi si cette régulation est spécifique de TLR9 ou si d'autres récepteurs sont impliqués tels que TLR3 et TLR7. Par ailleurs, on aimera savoir si cette réduction de la croissance cellulaire n'est due à l'apoptose ou la nécrose, et déterminer le mécanisme de cette régulation et les protéines impliquées. Cette étude souligne le rôle de TLR9 dans les événements conduisant à la carcinogenèse.

Dans cet article, j'ai contribué aux manipulations pour identifier la spécificité de cette régulation à TLR9 et non pas à TLR7 ou TLR3. De plus, j'ai aidé à comprendre le mécanisme de cette régulation et les protéines impliquées.

ORIGINAL ARTICLE

TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16^{INK4a} protein expression

P Parroche¹, G Roblot¹, F Le Calvez-Kelm², I Tout¹, M Marotel¹, M Malfroy³, G Durand², J McKay², M Ainouze¹, C Carreira², O Allatif¹, A Traverse-Glehen⁴, M Mendiola⁵, JJ Pozo-Kreiling⁶, C Caux³, M Tommasino², N Goutagny^{3,7} and UA Hasan^{1,7}

Toll-like receptor 9 (TLR9) recognizes bacterial, viral or cell damage-associated DNA, which initiates innate immune responses. We have previously shown that TLR9 expression is downregulated in several viral induced cancers including HPV16-induced cervical neoplasia. Findings supported that downregulation of TLR9 expression is involved in loss of anti-viral innate immunity allowing an efficient viral replication. Here we investigated the role of TLR9 in altering the growth of transformed epithelial cells. Re-introducing TLR9 under the control of an exogenous promoter in cervical or head and neck cancer patient-derived cells reduced cell proliferation, colony formation and prevented independent growth of cells under soft agar. Neither TLR3, 7, nor the TLR adapter protein MyD88 expression had any effect on cell proliferation, indicating that TLR9 has a unique role in controlling cell growth. The reduction of cell growth was not due to apoptosis or necrosis, yet we observed that cells expressing TLR9 were slower in entering the S-phase of the cell cycle. Microarray-based gene expression profiling analysis highlighted a strong interferon (IFN) signature in TLR9-expressing head and neck cancer cells, with an increase in IFN-type I and IL-29 expression (IFN-type III), yet neither IFN-type I nor IL-29 production was responsible for the block in cell growth. We observed that the protein half-life of p16^{INK4a} was increased in TLR9-expressing cells. Taken together, these data show for the first time that TLR9 affects the cell cycle by regulating p16^{INK4a} post-translational modifications and highlights the role of TLR9 in the events that lead to carcinogenesis.

Oncogenesis (2016) 5, e244; doi:10.1038/oncsis.2016.49; published online 25 July 2016

INTRODUCTION

Normal tissues carefully control the production and release of growth-promoting signals. These signals will allow entry and progression through the cell development and division cycle, thereby ensuring cell numbers and thus maintenance of normal tissue architecture and function. Cancer cells, by deregulating these signals, permit chronic proliferation. The G1/S checkpoint controls progression of cells through the restriction point into the DNA synthesis S-phase. The p16^{INK4a} and Kip/Cip family inhibitors control CDK activity and prevent entry into S-phase. p16^{INK4a} acts as a tumor suppressor through multiple biological functions, including the inhibition of cell cycle progression,¹ the induction of senescence² and differentiation,³ and its involvement in apoptosis⁴ and DNA repair.⁵ Overexpression of the p16^{INK4a} gene induced the inhibition of cell proliferation, which has mainly been considered to result from arrest in G1 phase of the cell cycle⁶ as well as the lengthening of S-phase.⁷

Toll-like receptors (TLRs) are expressed in many hematopoietic cell types, and their role in immune responses has been well documented.⁸ However, TLRs are also expressed in non-hematopoietic cells and have an important role in tissue homeostasis as well as cell proliferation.^{9–13} In certain cell types, TLR-dependent signaling results in apoptosis with a mechanism that, in part, depends on the production of type I interferon (IFN).^{14–16} The link between TLR signaling and cell cycle control

has been addressed in our previous studies in which we found that flagellin, a TLR5 agonist, can induce cell cycle entry by overcoming p27-induced cell cycle arrest fibroblasts. Our findings also suggested that the differential capacity of TLR3 and TLR4 ligands to induce cell cycle progression is dependent on the ability of these ligands to produce IFN.^{14,17} TLR9 was the first innate immune receptor identified to recognize unmethylated double-stranded DNA CpG motifs expressed in the genome of viruses and bacteria. TLR9 can become activated in response to endogenous double-stranded DNA motifs released as danger-associated molecular patterns (DAMPs).¹⁸ We and others have observed that oncoviruses such as human papillomavirus 16 and 38 (HPV16 and 38), Epstein Barr virus, Hepatitis B virus and Merkel cell virus impair the expression and function of the innate immune receptor TLR9 (1, 2, 14, 27). Furthermore, overexpression of TLR9 (with an exogenous promoter) in human keratinocytes transduced with HPV38E6E7 decreased their ability to grow.¹⁹ Thus, in addition to its role in innate immunity, TLR9 could control events that promote transformation of epithelial cells or cell growth by itself. Here, we describe a role for TLR9 in cell cycle regulation in viral and in non-viral-induced cancers. We observed that as well as in viral induced cancers, we demonstrated in patients with head and neck cancer (that are HPV negative) that TLR9 levels were downregulated. Re-constitution of TLR9 expression in head and neck cancer cells lengthened the S-phase of the cell cycle as well

¹CIRI, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure, Université de Lyon, Lyon, France; ²IARC-International Agency for Research on Cancer 150 Cours Albert Thomas, Lyon, France; ³CRCL, UMR INSERM 1052-CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon France; ⁴Hospices Civils Lyon Sud, Pierre Benite, France; ⁵Molecular Pathology and Therapeutic Targets Group, Research Institute (IdiPAZ), La Paz University Hospital, Madrid, Spain and Molecular Pathology Diagnostics Unit, Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), La Paz University Hospital, Madrid, Spain and ⁶Pathology Department, La Paz University Hospital, Madrid Spain. Correspondence: Dr UA Hasan, CIRI, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure, Université de Lyon, CNRS-UMR5308, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69000, France.

E-mail: uzma.hasan@inserm.fr

⁷Co-last authors.

Received 14 April 2016; accepted 12 June 2016

as increase p16^{INK4a} stability. TLR9 overexpression in head and neck cancer cells also prevented colony formation under soft agar. These data highlight the importance of TLR9 in controlling the events that lead to transformation.

RESULTS

TLR9 expression affects the doubling population of HPV16-transformed cells

We have previously reported the ability of HPV16 viral oncoproteins E6 and E7 (HPV16E6E7) to suppress TLR9 transcription in human primary keratinocytes (HK). To determine the biological significance of HPV16-mediated downregulation of *TLR9* transcription, we re-introduced TLR9 into HK and HPV16E6E7 cells by retroviral transduction (Figure 1a). As previously reported, we observed endogenous TLR9 expression in HK but not in

HPV16E6E7-transduced cells²⁰ (Figure 1a). HK, but not HPV16E6E7 cells, were able to produce IL-8 when stimulated with the oligonucleotide CpG 2006, a TLR9 ligand. Yet re-expression of TLR9 restored HPV16E6E7 cells to produce IL-8 in response to CpG 2006 at levels that were comparable to HK (Figure 1b), indicating that exogenous TLR9 was functional. To determine whether TLR9 expression influenced HK or HPV16E6E7 cell growth we monitored the doubling population over a period of 14 days. HK over-expressing TLR9 failed to grow compared with HK transduced with pbabe alone. Similarly, HPV16E6E7-pbabe-TLR9 cells slowed the growth rate in comparison to HPV16E6E7-pbabe cells from 60 to 20 doublings at day 14 (Figures 1c and d). To corroborate our data, we analyzed the effect of overexpressing TLR9 (using the pbabe retroviral system) in cells derived from cervical cancer patients (SiHa) positive for HPV16. At 4, 9 and 14 days SiHa cells expressing TLR9 doubled at a slower rate than pbabe alone expressing cells

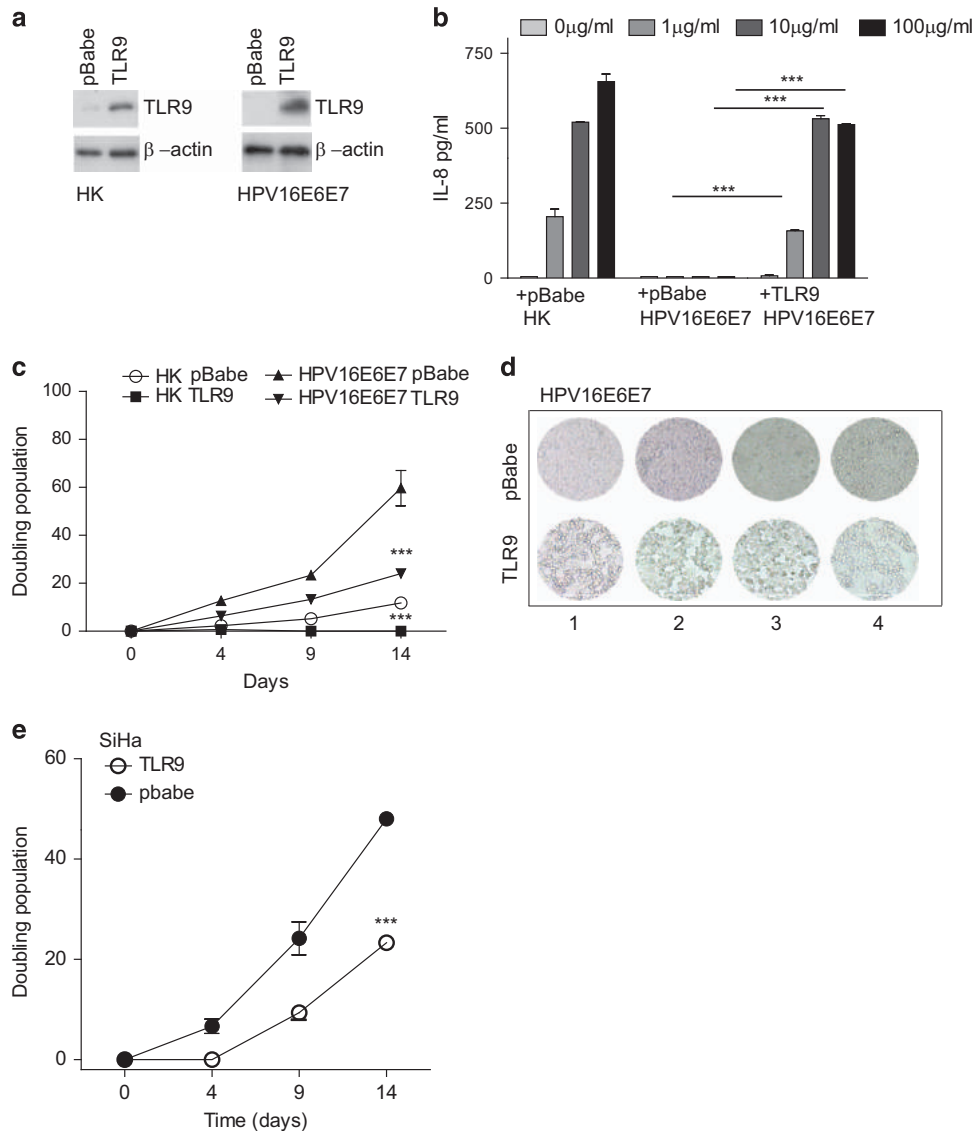


Figure 1. The effect of TLR9 overexpression on cell proliferation. (a) HK-(left panel) or HPV16E6E7-expressing keratinocytes (right panel) were stably transduced with empty or TLR9-expressing pbabe. TLR9 protein levels were determined by western blotting. (b) Cells were stimulated with increasing concentrations of CpG 2006 and IL-8 levels were determined by ELISA. (c) HK expressing or not HPV16E6E7 were stably transduced with pbabe or pbabe-TLR9 and plated for a doubling population assay. The cells were harvested and reseeded every 5 days and the doubling populations were counted. (d) At day 15 cells were visualized by microscopy at four different planes. (e) SiHa cells were stably transduced with pbabe or pbabe-TLR9 and plated for a doubling population assay. The cells were harvested and reseeded every 5 days and the doubling populations were counted. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The mean \pm s.e.m. are shown. *** $P < 0.0001$, based on an unpaired Student's *t*-test.

a

Patient ID	Histology	Normal epithelia	Dysplasia or cancerous tissue
		TLR9 staining	TLR9 staining
3039082	Infiltration/ cancer	+/-	-
3020734	Infiltration/ cancer	+	-
0617480B	Dysplasia	++	+
0307521A1	Carcinoma infiltration	+	+/-
3090024	Infiltration/ cancer	+++	-
0306353Z	Aggressive Infiltration/ cancer	+/-	-
6280423	Micro lesions, not aggressive	++	+
12B08481	Carcinoma infiltration	no epithelia	++
6158032	Dysplasia/ cancer	+	+
0621059 A9	Cancer	++	+
629639	Hyperplasia	no epithelia	+
62765200	Cancer infiltrate	++	+
626570	Cancer differentiated	++	++
0619316B2	Carcinoma infiltrate	++	++
312110	Cancer	no epithelia	+
610835	Cancer carcinoma	no epithelia	++
305118	Cancer	no epithelia	+/-
616534	Cancer	no epithelia	+++
303122	Cancer	no epithelia	+
6294921	Cancer	+	-
Control 1	Normal	+++	N/A
Control 2	Normal	+++	N/A

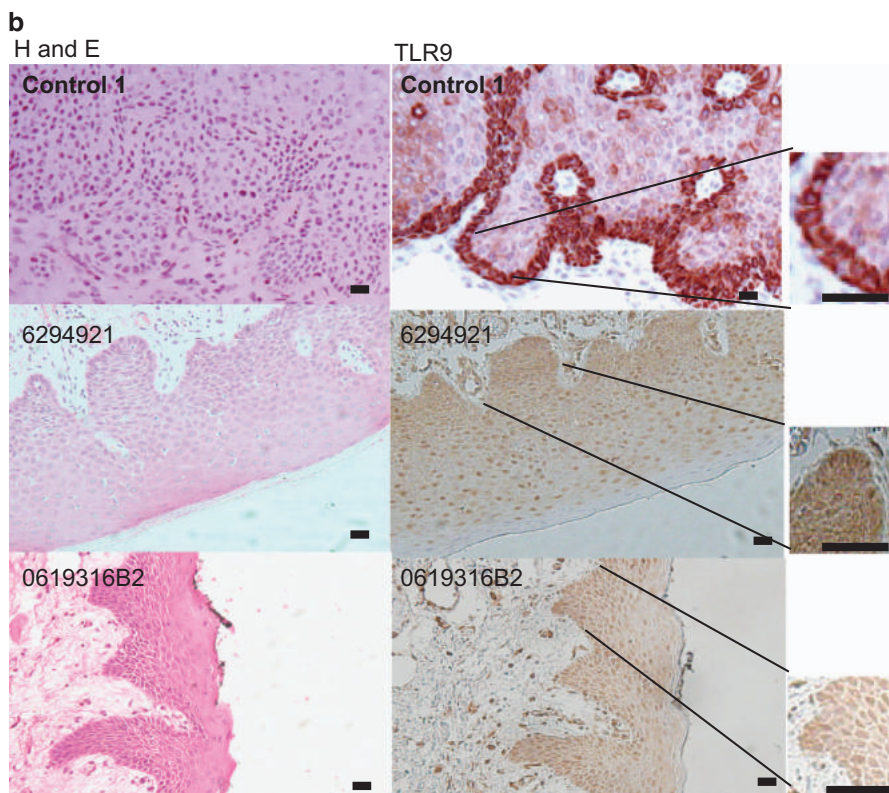


Figure 2. For figure caption please see next page.

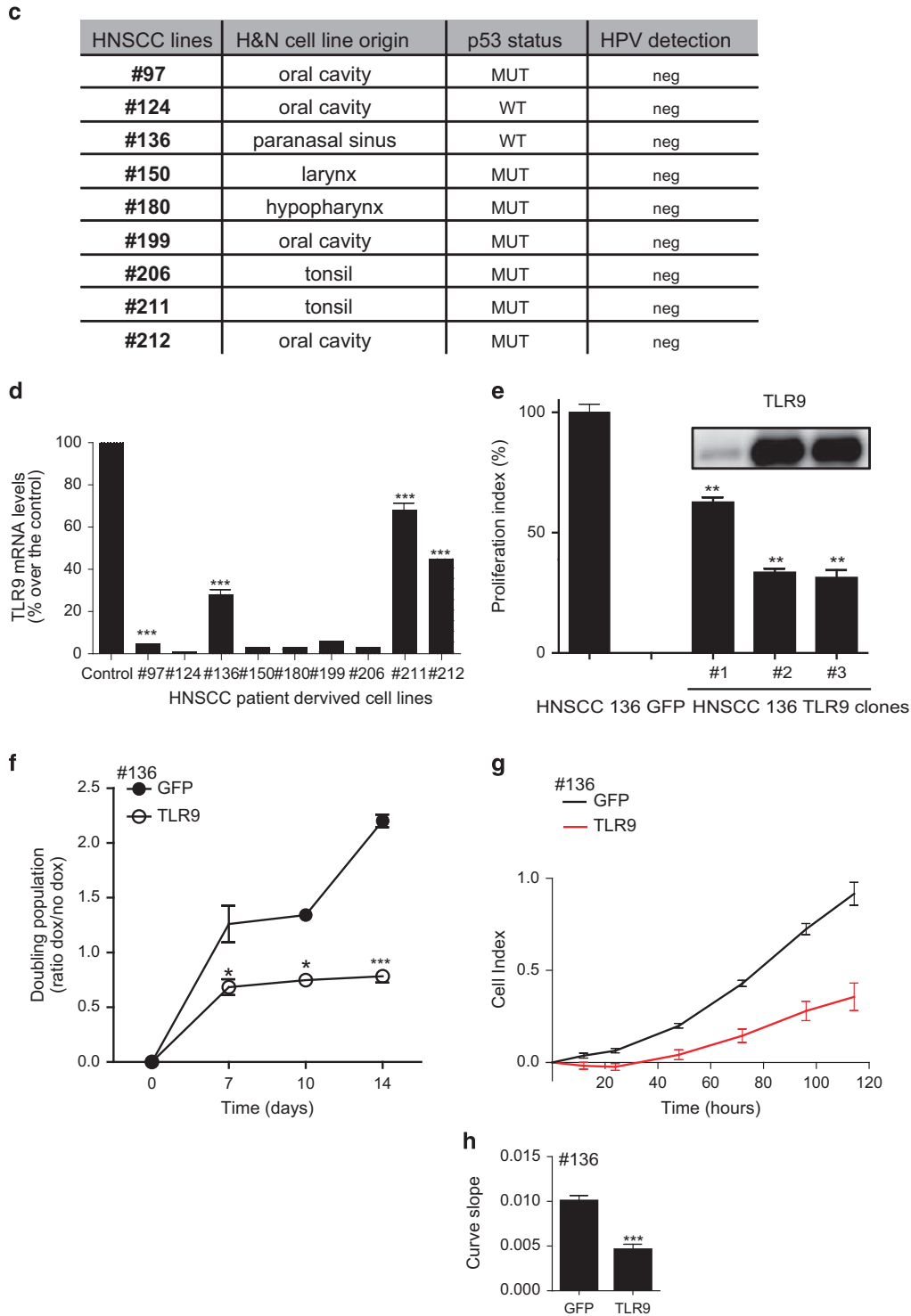


Figure 2. TLR9 expression in HNSCC is suppressed. (a) Tumor tissue biopsies were taken from 20 patients with head and neck cancer (HPV) from the IdiPAZ Biobank, La Pas University Hospital, Spain. Two blind histological analysis was performed by two independent pathologists and classified sections were stained by immunohistochemistry for TLR9. (b) Histology and immunohistological staining (IHC) for TLR9 of normal head and neck tissue vs cancer biopsies. (c) Table listing the origin and p53 status in HNSCC derived cell lines. (d) TLR9 expression mRNA expression in HNSCC patient-derived cell lines vs control by RT-qPCR, using $\beta 2$ -microglobulin as a house keeping gene. The expression of TLR9 was expressed as percentage over the control. (e) HNSCC 136 cells was stably transduced with PLVUT⁻-GFP or PLVUT⁻-TLR9. For PLVUT⁻-TLR9 cells were cloned by limiting dilution. Cells were induced for 3 days and seeded. After 3 days a MTT assay was performed. The proliferation is expressed as a percentage of the HNSCC 136 PLVUT⁻-GFP proliferation. TLR9 protein level was analyzed by western blotting. (f) HNSCC 136 PLVUT⁻-GFP or TLR9 were induced by doxycycline and plated for a doubling population assay. The cells were harvested and reseeded every 5 days and the doubling populations were counted. (g, h) Measurement of cell impedance of HNSCC136GFP or TLR9 treated with doxycycline for 3 days. Cells were then plated in Xcelligence 96-well E-16 plate. Doxycycline were added every 2 days. Impedance was measured every 15 min for 7 days. Both cell index and curve slopes are presented for each condition. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The mean \pm s.e.m. are shown. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.01$, based on an unpaired Student's *t*-test.

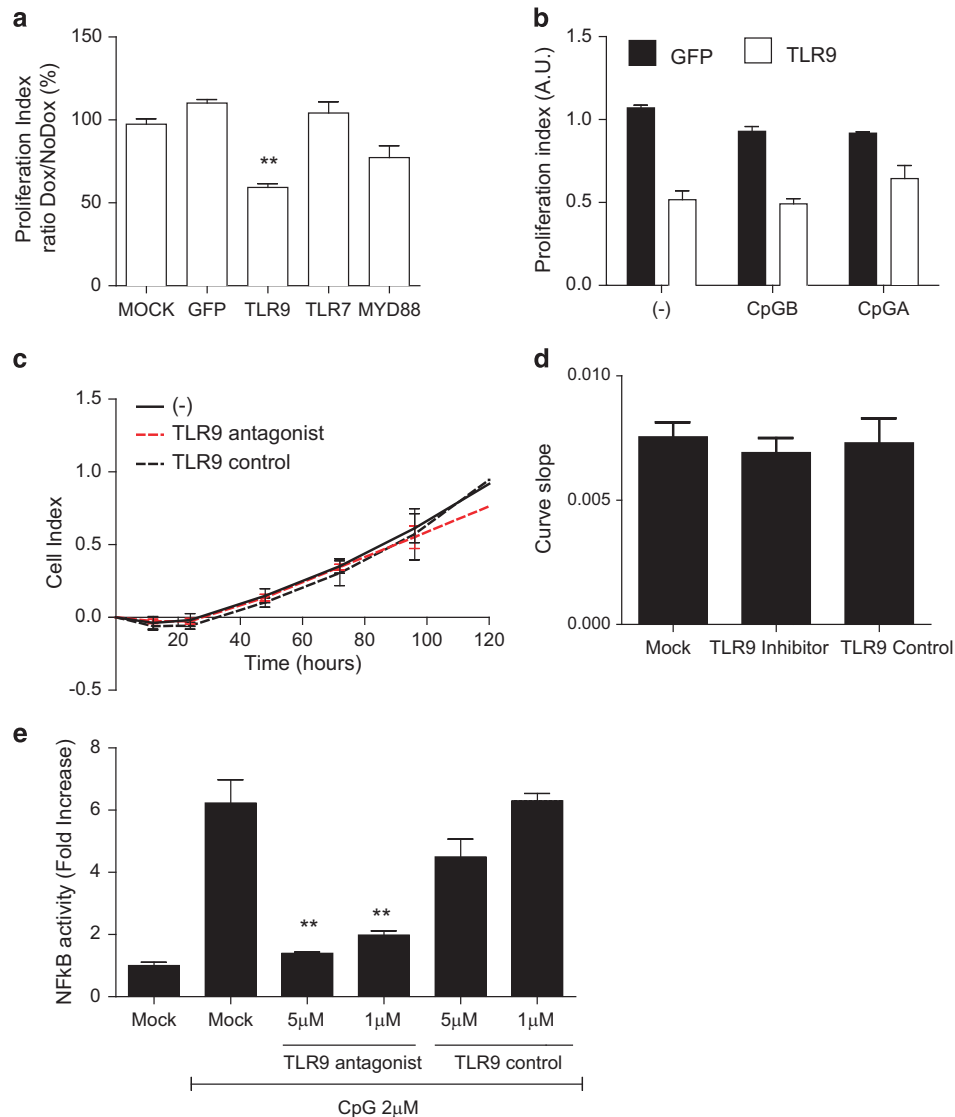


Figure 3. The effect of TLR9 on cell proliferation is not affected by TLR9 engagement. HNSCC 136 were stably transduced with PLVUT'-GFP, PLVUT'-TLR7, PLVUT'-MyD88 and PLVUT'-TLR9 (tet-ON system). Half of the cells were treated with doxycycline during all the experiments. **(a)** After 3 days cells treated with doxycycline or not were seeded and a MTT assay was performed. The proliferation index was calculated as the ratio of the formazan concentration given by the doxycycline condition divided by the one of the no doxycycline condition. **(b)** After 3 days cells treated with doxycycline or not were seeded, stimulated after 24 h for 2 days with CpG A or CpGB, then a MTT assay was performed. The proliferation index was calculated as the ratio of the formazan concentration given by the doxycycline condition divided by the one of the no doxycycline treatment. **(c, d)** Cell impedance \pm TLR9 inhibitor or control. HNSCC 136 TLR9 treated 3 days with doxycycline were plated in Xcelligence 96-well E-16 plate. Doxycycline were added every 2 days and TLR9 inhibitor or control (5 μ M) at day 1. Impedance was measured every 15 min for 7 days. Curve slopes are presented for each condition. **(e)** TLR9 stably expressing ELAM-luc reporter cells was used to test the TLR9 antagonist. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The mean \pm s.e.m. are shown. ****** $P < 0.001$, based on an unpaired Student's *t*-test.

(Figure 1e). Taken together, these data show that TLR9 expression prevents cell growth by reducing the doubling population of normal and HPV16-transformed cells.

TLR9 expression is lost in head and neck cancer patients

We and others have reported the loss of TLR9 expression in several viral induced cancers.^{21–25} Our next aim was to examine if TLR9 levels were also altered in non-viral induced tumors. Tumor tissue biopsies were taken from 20 patients with head and neck cancer (–HPV) from the IdiPAZ Biobank, La Pas University Hospital, Spain. Two blind histological analysis was performed by two independent pathologists and classified (see table in Figure 2a); sections were stained by immunohistochemistry for

TLR9 (Figure 2a). As a positive control for TLR9 staining we selected skin tissues with a normal histological profile (Figure 2b). In agreement with the endoplasmic localization of TLR9, basal cells from the normal epidermis showed strong cytoplasmic staining in control tissues (Figures 2a and b). In head and neck cancer patients weak or no TLR9 staining was observed (Figures 2a and b). We also analyzed normal areas in the patient tissue for TLR9 expression and observed that in most cases TLR9 expression was also reduced (data not shown). Furthermore, in cell lines derived from an independent set of head and neck cancer patients,²⁶ TLR9 mRNA levels were reduced (Figures 2c and d). We next determined whether restoring TLR9 expression would have an effect on cell growth in head and neck cancer cells. As constant TLR9 exogenous expression in certain experiments

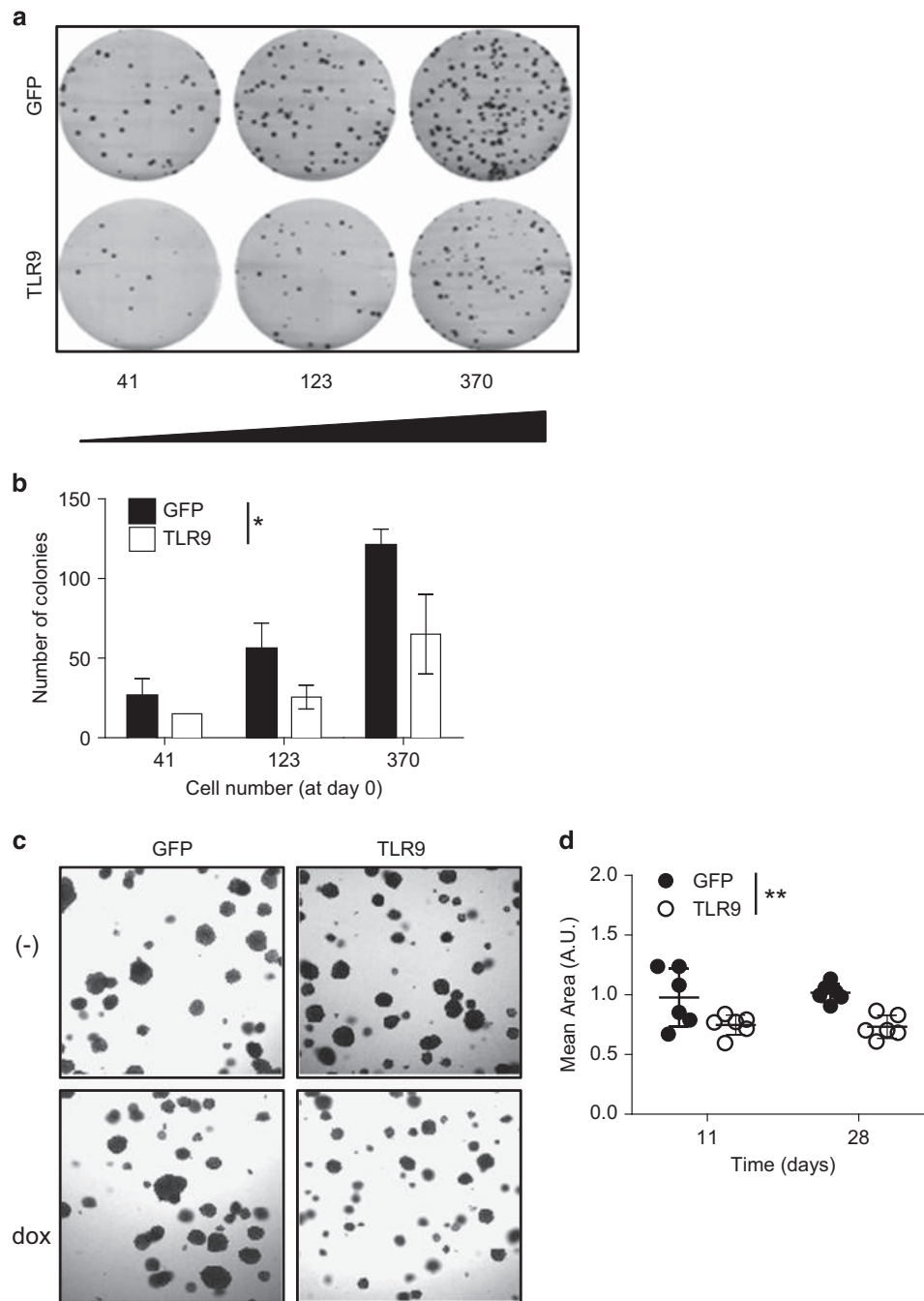


Figure 4. The role of TLR9 on colony formation and transformation. **(a)** HNSCC 136 cells stably transduced with PLVUT'-GFP and PLVUT'-TLR9 and were induced with doxycycline. After 3 days the cells were seeded (41, 123 or 370 cells per well) and 3 weeks after a crystal violet coloration was performed. **(b)** The number of colonies for the HNSCC 136 PLVUT'-GFP (white bars) and the HNSCC 136 PLVUT'-TLR9 (black bars) were counted and reported as noted in the chart. **(c)** PLVUT'-GFP (left panel) and PLVUT'-TLR9 (right panel) HNSCC 136 cells were either induced with doxycycline (lower panel) or left untreated (upper panel). Cells were included in agar and pictures were taken 11 days post inclusion. **(d)** The mean area of the colonies doxycycline+ were counted with the software image from the pictures taken 11 and 28 days post inclusion. The mean area of colonies from cells that expressed GFP are in black and TLR9 are in white. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The mean \pm s.e.m. are shown. ** $P < 0.001$ and $P < 0.01$ based on an unpaired Student's *t*-test.

caused cell death, we decided to generate an inducible TLR9 expression vector under the control of tetracycline (doxycycline) using the lentiviral vector pLVUT'.²⁷ TLR9 expression was optimal between 3–5 days post induction with doxycycline in HEK293 cells (data not shown). We chose the head and neck cancer cell lines (HNSCC) 124 and 136 to generate TLR9-expressing clones.

Induction of TLR9 in the 124 cell line led to immediate cell death. We were able to obtain clones for HNSCC 136 in which we observed optimal TLR9 expression 5 days post induction with doxycycline (Figure 2e and Supplementary Figure 1A,B). We observed calreticulin (an ER marker in red) and TLR9 (in green) were localized and expressed at similar levels HNSCC 136 cells

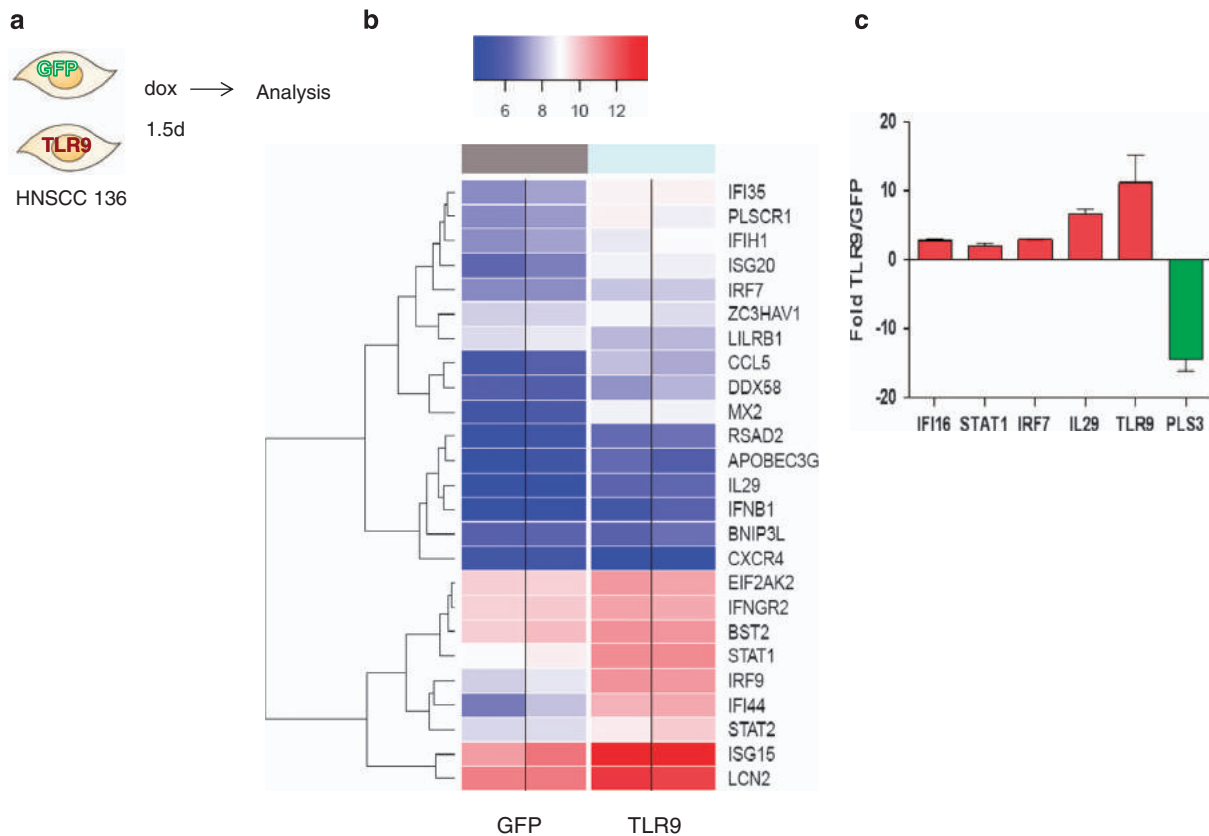


Figure 5. Transcriptome changes induced by TLR9 re-expression. **(a)** Schematic representation of the experiment. HNSCC 136 PLVUT'-GFP and HNSCC 136 PLVUT'-TLR9 were induced for 36 h with doxycycline. The mRNA was extracted and analyzed by microarray. **(b)** 'the true log2 of the quantile normalized expression signals in four samples belonging to two groups, GFP & TLR9 (No ratio and no scaling). In order to enhance data reading, color separation (blue = low and red = high) was based on the 50th theoretical percentile of the expression matrix range' **(c)** cDNA from HNSCC 136 PLVUT'-GFP and HNSCC 136 PLVUT'-TLR9 induced for 36 h was subjected to qPCR to determine the level of expression of IFI16, STAT1, IRF7, IL-29, TLR9 and PLS3. The ratio of expression TLR9 divided by GFP was calculated and plotted on the chart. Data have been disposed on the GEO: number being generated.

compared with a TLR9 naturally expressing cell line (C33A) (Supplementary Figure 1A,B). We also found that TLR9 overexpression in the HNSCC 136 cell line led to a decrease in cell proliferation compared with the green fluorescent protein (GFP) vector control (Figure 2f). These results show that TLR9 is also downregulated in non-viral induced HNSCC and its re-expression influences cell growth.

TLR9 expression and not TLR7 or MyD88 affects cell growth

TLR9 and TLR7 share the same adapter protein MyD88 in their signaling pathway in order to induce immune gene activation.²⁸ We therefore tested if MyD88 or TLR7 would also alter cell growth. We observed that neither TLR7 nor MyD88 affected cell growth (Figure 3a). However, using the same inducible system, we observed that in the presence of doxycycline, MyD88-, TLR9- or TLR7-overexpressing cells that were stimulated with CpG and R848, respectively, were able to induce the transient expression of the nuclear factor-κB reporter gene (Supplementary figure 1C,D). Furthermore, the addition of TLR9 ligands CpG oligo type A (CpG 2216) or type B (CpG 2006) (nuclear factor-κB activation) did not influence further the inhibition of cell growth (Figure 3b). We next hypothesized that the anti-proliferative response was ligand mediated and an endogenous DAMP released due to TLR9 expression. The DAMP released would then activate TLR9 to block cell growth. To test this hypothesis, we treated stable TLR9- or GFP-expressing cells with increasing concentration of different

cell death inducers, that is, cisplatin, H₂O₂ and doxorubicin. No enhanced defect in cell growth was observed as measured by MTT assays (data not shown). Addition of a TLR9 ligand antagonist to block potential TLR9 self-ligands did not alter the effects seen on cell growth (Figures 3c and d) but did inhibit TLR9 CpG activation of the nuclear factor-κB reporter gene (Figure 3e). Therefore, we concluded that TLR9 expression *per se* inhibited cell growth.

Colony formation and transformation of head and neck cancer cells are altered by TLR9 expression

Clonogenic assay or colony-formation assay is an *in vitro* cell survival assay based on the ability of a single cell to grow into a colony. We observed that overexpressing TLR9 abrogated the ability of 136 cells to form colonies (Figures 4a and b). Anchorage independent growth of cells in soft agar is one of the hallmarks of cellular transformation and uncontrolled cell growth, with normal cells typically not capable of growth in semisolid matrices. We tested the ability of our 136 head and neck cancer-derived cells to grow under soft agar (Figures 4c and d). We observed that these cells could grow under soft agar. However, the induction of TLR9 expression led to smaller colony growth under soft agar. Our above findings demonstrate that TLR9 expression alone decreases cancer cell proliferation and colony formation as well as inhibit the events that promote transformation.

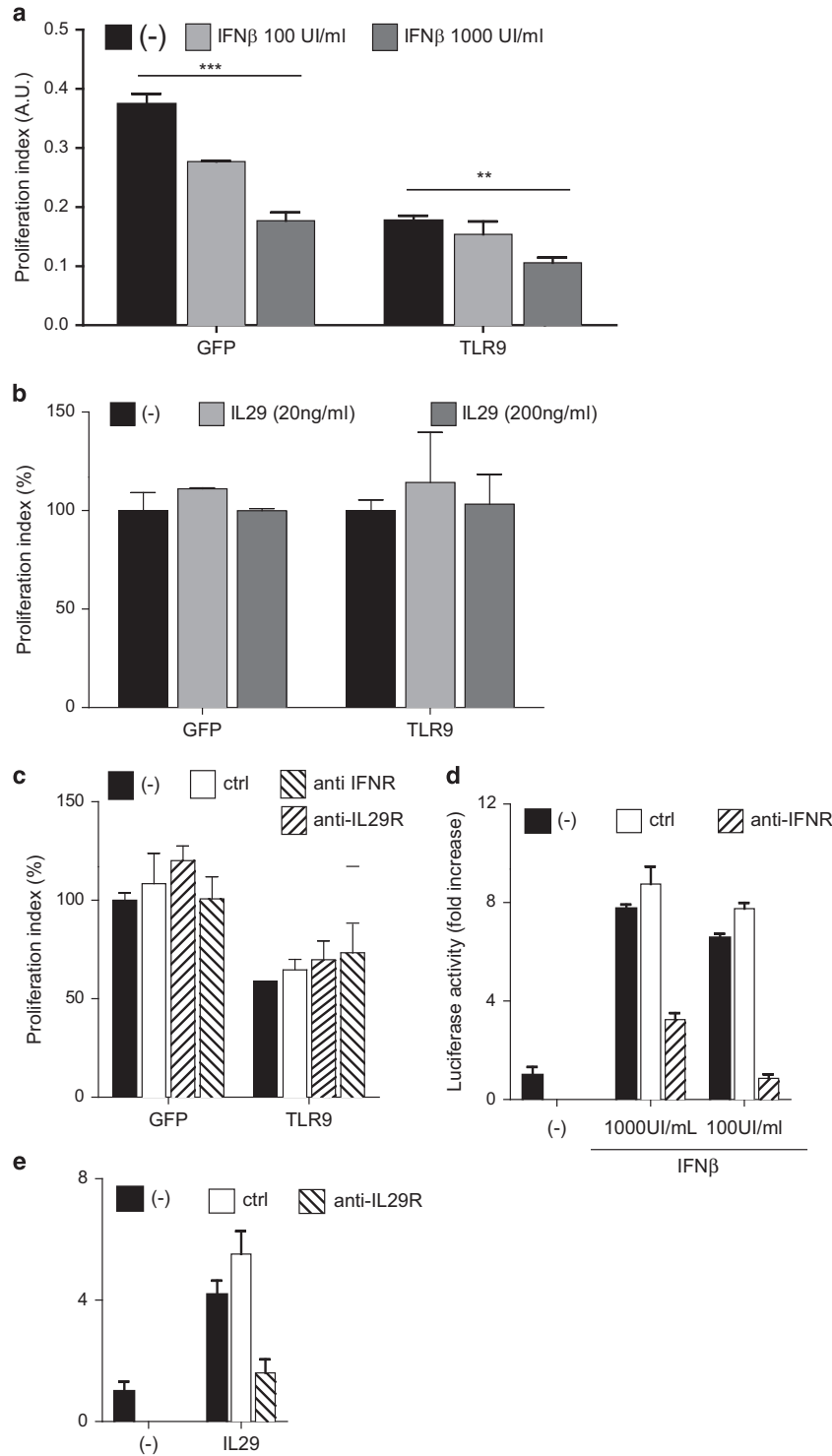


Figure 6. Type I and type III IFN are not involved in TLR9-mediated effects. **(a)** HNSCC 136 PLVUT'-GFP or TLR9 were treated 3 days with doxycycline. Cells were then plated at 10^4 cells/ml in 96-well plate in presence or not of recombinant IFN- β (100–1000 UI/ml) **(a)** or **(b)** IL-29 (20–200 ng/ml). Doxycycline was added every 2 days and proliferation was measured by MTT assay over 4 days. Data are presented as proliferation index of dox conditions only as a percentage over the medium conditioned. **(c)** HNSCC 136 PLVUT -GFP or TLR9 were treated 3 days with doxycycline cells were then plated at 10^4 cells/ml in 96-well plate in presence or not of ctrl antibodies (20 μ g/ml), anti-IL-29 and anti-IL-10Rb (20 μ g/ml) or and IFN- β (1000 or 100 UI/ml) and anti-IFNAR2 (5 μ g/ml). Doxycycline was added every 2 days and proliferation was measured by MTT assay over 4 days. Data are presented as proliferation index of dox conditions only as a percentage over the ctrl antibody condition. **(d,e)** Activation of HEK293-Tcells stably transfected ISRE reporter was measured by luciferase assay. 293T cells were plated in 96-well plate at 10^5 cell/ml. 24 h later the control, anti-IFN- β (10 g/ml), anti-IFNAR2 (5 μ g/ml) or anti-IL-29 (20 μ g/ml) were added for 1 h then IFN- β (100 or 1000 UI/ml), IL-29 (200ng/ml) or medium were added for an additional 24 h. Data are represented as fold over the medium conditions. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. The mean \pm s.e.m. are shown. *** P < 0.0001 and ** P < 0.001 based on an unpaired Student's *t*-test.

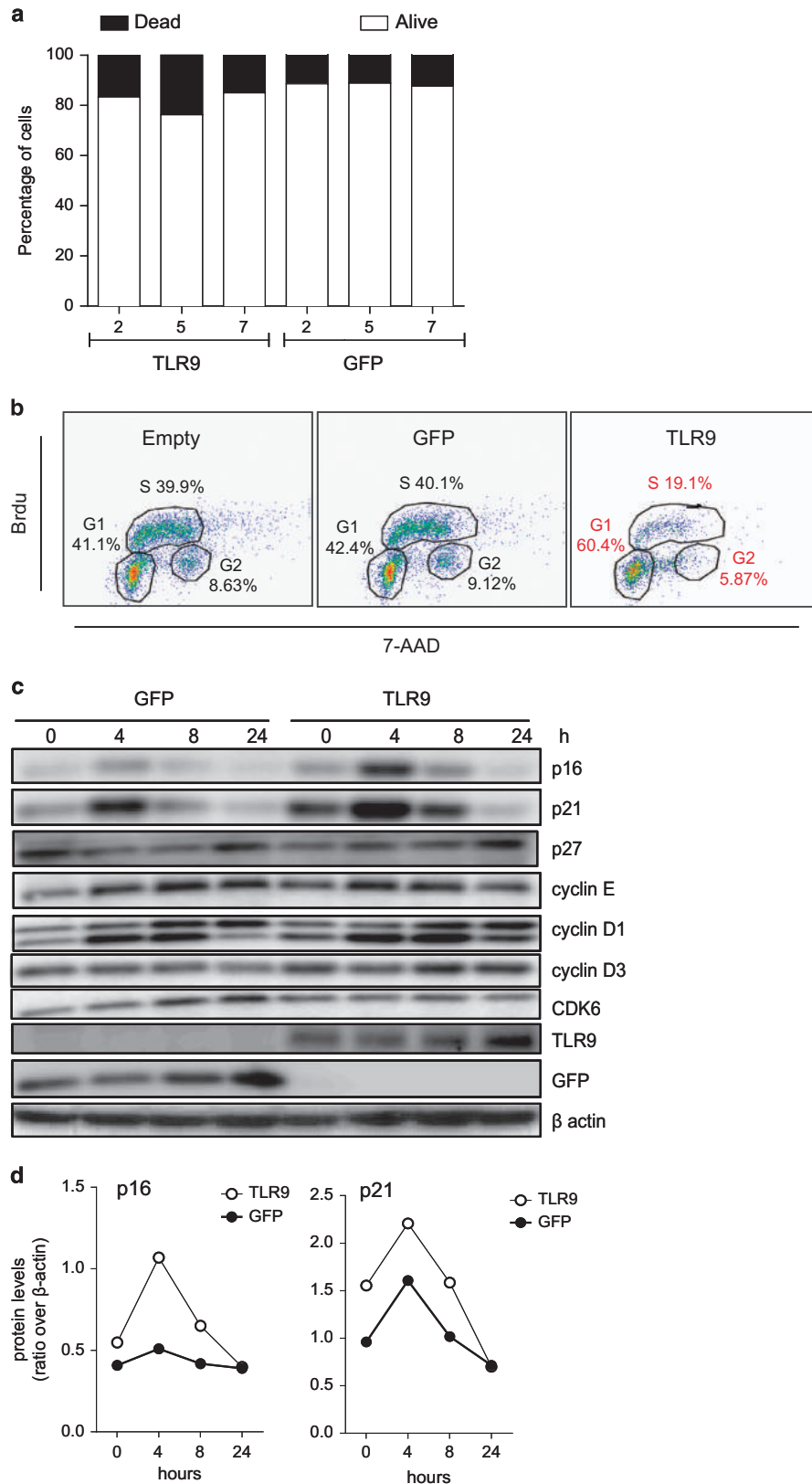


Figure 7. TLR9 expression affected the cell cycle but not apoptosis. **(a)** Caski cells stably transduced with GFP (left panel) or TLR9 (right panel) encoded pbabe were stained with Annexin V and propidium iodide to determine percentage of apoptotic and necrotic cells. **(b)** HNSCC 136 cells were stably transduced with pbabe (left panel), pbabe-GFP (middle panel) or pbabe-TLR9 (right panel). Cells were pulsed with BrdU for 20 min and cell cycle analysis was performed after BrdU and 7-AAD staining by flow cytometry. **(c)** HNSCC 136 PLVUT'-GFP (left panel) and HNSCC 136 PLVUT'-TLR9 (right panel) were induced with doxycycline and serum deprived for 2 days. Cells lysate were collected 0, 4, 8 or 24 h after serum addition. Expression of cell cycle proteins were analyzed by western blotting. **(d)** Densitometry analysis of the western blot band from (c).

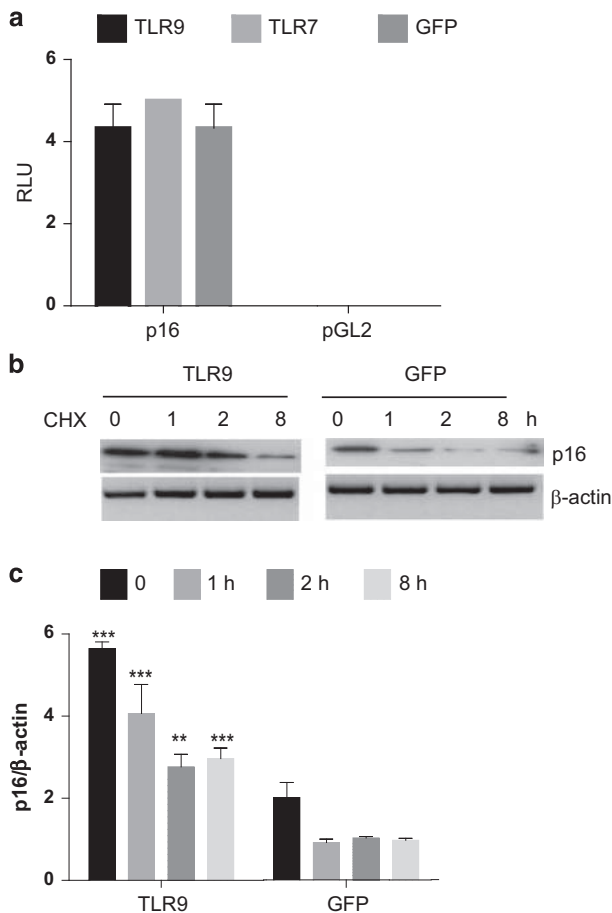


Figure 8. TLR9 increases p16 protein stability. **(a)** HEK293T cells were co-transfected with the p16 promoter linked to the luciferase gene or pGL2 and TLR9, TLR7 or GFP pCDNA plasmids. After 48 h of transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. **(b)** Ability of TLR9 to alter p16 protein levels. The indicated HNSCC cells were cultured in a medium containing cycloheximide. The levels of p16 and β-actin (loading control) were determined by immunoblotting **(c)** and the amount of p16 and β-tubulin was quantified by Multigauge imager in three independent experiments.

TLR9-expressing cells activate an IFN signature

We wanted to determine the molecular processes that might be involved in TLR9 control of cell growth and the events that lead to transformation. We therefore performed microarray-based whole-genome expression profiling analysis on HNSCC 136 cells with inducible TLR9 or GFP control at 36 h post induction with doxycycline (Figure 5a). A microarray-based whole-genome expression profiling analysis on HNSCC 136 cells with inducible TLR9 or GFP control at 36 h post induction with doxycycline (Figure 5a). Using the BRB-ArrayTools Version: 4.2.1 program, we noted that at 36 h post TLR9 induction, 415 genes were significantly up- or downregulated ranging from 2 to 14.6 absolute fold differences (P -value < 0.001 ; false discovery rate < 0.05 ; data not shown). From Gene ontology annotation implemented in the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery program (<https://david.ncifcrf.gov/>), we selected genes that were upregulated and grouped under the 'response to virus' and 'negative effect on cell proliferation' at the 5% false discovery rate level, and used the analysis of variance model to visualize the differentially deregulated genes into a heat map analysis (Figure 5b and Supplementary Figure 2). We selected some IFN

related and others important genes for validation by quantitative PCR (qPCR; Figure 5c).

IFIH1, *IL-29*, *IRF9*, *IFNB1* and *IRF7* were upregulated under the responses to virus classification. IFN genes *IL-29*, *IFNB1* and *STAT1* were upregulated and also grouped under negative effect on proliferation. A panel of selected IFN-regulated genes as well as control genes TLR9 and pLS3 (a gene that was downregulated) were validated by qPCR (Figure 5c). We then postulated that autocrine production of IFN-I or IL-29 by TLR9-expressing HNSCC 136 cells may contribute to the decrease in cell proliferation. We examined if type I (IFN α/β) or type III IFN (IL-29) *per se* affected cell growth. IFN- β decreased cell growth in 136 cells that expressed TLR9 or GFP (Figure 6a); however, addition of IL-29 did not (Figure 6b). Moreover, neither IL-29R nor type I IFN α/β -blocking antibodies altered the inhibitory effect on cell proliferation by TLR9 on 136 cells (Figures 6c–e). Although TLR9 overexpression does induce an IFN-type signature; our data demonstrate that IFN or IL-29 were not responsible for cell growth inhibition.

TLR9 induces a slowdown of the S-phase in head and neck cancer cells mediated by p16^{INK4a}

We next wanted to determine cell growth inhibition observed in TLR9-expressing cells also promoted cell death by late apoptotic or necrotic process using PI or 7-AAD inclusion. TLR9-expressing cells did not induce significant cell death (Figure 7a) as shown by PI or 7-AAD staining. As TLRs have been shown to alter cell proliferation^{11,14,19} we examined if TLR9 affected the cell cycle. Therefore, the cell cycle length in the head and neck cancer cell line 136 post TLR9 induction was analyzed after cell synchronization using thymidine double blockage. Successive labeling BrdU for 15 min demonstrated that TLR9 induced an accumulation of the G1 phase and lengthening of S-phase (Figure 7b). Reported by Chien W *et al.*²⁹ was the ability of p16^{INK4a} in human cancer cells to lengthen the S-phase along with the accumulation G1 phase in the cell cycle. Synchronized cells showed that p16^{INK4a} levels were increased in TLR9-expressing cells (Figures 7c and d). Recently Yu *et al.* showed that DNA damage in mammalian cells can signal cell-autonomously to induce endogenous IFN- β in an IRF3-dependent manner. The expression of endogenous IFN-stimulated genes further activated the p53–p21 axis and increased the levels of p16^{INK4a} concurrent with robustly promoting cell senescence *in vitro*.³⁰ Although TLR9 expression did lead to induce IFN stimulatory factors (Figure 5b) it did not lead to significant changes in p16^{INK4a} mRNA levels (data not shown) or promoter activity (Figure 8a). As p16^{INK4a} levels were already elevated in TLR9-expressing cells at time point 0, we hypothesized that the protein stability of p16^{INK4a} may be affected owing to TLR9 expression. To test our hypothesis, 136 cells were transduced with TLR9 or the GFP control and were cultured in a medium containing cycloheximide to inhibit protein synthesis. p16^{INK4a} half-life was determined by immunoblotting. In TLR9-expressing cells we observed an increase in p16^{INK4a} stability compared with the GFP control (Figures 8b and c). These findings demonstrated the mechanism by which TLR9 expression can mediate cell growth slowdown by increasing p16^{INK4a} stability. Our data highlight a central role for TLR9 in cancer development, therapeutic strategies to reactive its expression should be targeted.

DISCUSSION

The major role of TLRs is to defend the host against pathogens via pathogen-associated molecular pattern recognition, which triggers the innate immune response. We and others share evidences suggesting that loss of TLR9 expression may lead to a poor immune response in viral related cancers. Wu *et al.*,³¹ showed that a SNP on the TLR9 promoter at position –1237, allows increased TLR9 expression that correlated to earlier HBeAg seroconversion.

The -1237 was also identified by our group as being the site of interaction in which nuclear factor- κ Bp65/ER α suppressed TLR9 transcription and thus IFN production.²⁰ Earlier findings from our team revealed that Epstein Barr virus infection of primary B cells led to a decrease in TLR9 mRNA levels, which became increasingly distinct upon immortalization, signifying that the reduction in TLR9 expression may be linked to cellular transformation (19). Indeed, TLRs also has a role in tissue repair, cell proliferation, apoptosis and angiogenesis.^{10,11,14,16,17} The later activities link TLR signaling to cancer. Although there are evidences that demonstrate specifically that TLR9 is altered in cancer cells,^{19,32,33} proving their role in carcinogenesis remains changeling. A recent study by Zambirinis *et al.*,¹³ suggest that TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promoted tumorigenesis. Also in a model of hepatocellular carcinoma; hypoxia induced HMGB1 with released mitochondrial DNA lead to the activation of TLR9-mediated tumor growth.³⁴ On the contrary, TLR9 is downregulated in a several viral and non-induced cancers and that different oncoviruses.^{19,23–25,33,35–37}

Here we have shown that TLR9 expression was reduced in several HNSCC derived from patients. These results were corroborated in tissue biopsies from an independent cohort of head and neck cancer patients. Our new data have showed that the loss of TLR9 expression may also disable its ability to control the cell cycle and events that may control transformation. These results highlight the association of TLR9 in cell cycle control in cancer cells. We show for the first time that TLR9 *per se* in head and neck cancer cells was able to slowdown the cell cycle during the S-phase. p16^{INK4a} can act as a tumor suppressor that is implicated in the prevention of cancers, notably melanoma, oropharyngeal squamous cell carcinoma, cervical cancer and esophageal cancer.²⁹ Chien *et al.*,²⁹ described that p16INK4a overexpression led to an extended S-phase in cancer cells that contained WTp53. We showed that HNSCC 136 cells, which contained p53WT, which TLR9 expression increased p16^{INK4a}, which coincided with an extension in the S-phase. The S-phase has an essential role in that any problems with DNA replication trigger a 'checkpoint'—we hypothesize that TLR9 expression leads to signaling events that puts the S-phase on hold until the problem is resolved. It has recently been shown that TLR9 expression is strongly activated via p53 in primary human blood lymphocytes and alveolar macrophages upon exposure to different types of DNA-damaging insults.²⁷ We speculated that the inhibitory role of TLR9 on cellular proliferation was induced by DAMPs. However, in our experimental setting we were unable to demonstrate that DAMPs released owing to cell death were responsible for TLR9-mediated slowdown in cell growth. Our collaborative work with Pacini *et al.*¹⁹ also showed that re-expression of TLR9 in HPV38 E6/E7 HFK resulted in a strong accumulation of the cell cycle inhibitors p21^{WAF1} and p27^{Kip1} and a clear decrease in cellular proliferation. The increase of p21^{WAF1} due to TLR9 re-expression was also observed in our model of head and neck cancer (also upregulated in our microarray data: Series record GSE78858). Unlike the study from Pacini *et al.*¹⁹ we did not observe increased p-p38 or as our previous work has shown p27^{Kip1} (data not shown). In our experiments we observed that TLR9-expressing cells increased p16^{INK4a} protein, which has been shown to positively control the expression of p21(WAF1).³⁸ We still have to elucidate how TLR9 re-expression allows for p16^{INK4a} stability. p14ARF has been shown to stabilize p16^{INK4a}. p14ARF regulates the stability of p16^{INK4a} protein via REGy-dependent proteasome degradation. Kobayashi *et al.*,³⁹ therefore, it would be interesting to determine whether TLR9 re-expression in our model can induce p14ARF. We cannot exclude that certain IFN regulatory transcription factors may also influence the stability of p16^{INK4a}.^{30,40} In conclusion, in addition to escaping immune recognition, we have shown that the deregulation of TLR9 in viral and non-viral induced cancer may also favor carcinogenesis. Most importantly, our study highlights a novel function of TLR9 in

negatively regulated cellular proliferation by increasing the stability of p16^{INK4a}.

MATERIALS AND METHODS

Expression plasmids

The human TLR9 sequence was previously cloned and described.⁴¹ Human TLR9 and GFP were cloned in the retroviral vector pBabe-puro.⁴² The pLVUT is a lentiviral vector expressing GFP downstream from the ubiquitin promoter in a doxycycline-inducible manner.²⁷ PLVUT' was created from pLVUT to generate a unique EcoRI site downstream of the GFP gene. The EcoRI site at position 6235 was removed by digestion with BstB1. Human TLR9, MyD88 and TLR7 cDNA were cloned into lentiviral pLVUT' vector. Tetracyclin-inducible PLVUT' vector, TLR9, MyD88 and TLR7 were generated by the ISP (Innate Sensors Platform). The pLXSN, HPV16E6E7, pGL3-NF- κ B luciferase, pGL3-ELAM luciferase, pGL4-TK and Renilla constructs have been previously described.^{20,36} The p16^{INK4a}-luciferase construct was cloned as described by.⁴³

Cell lines

HEK293 and cervical cancer-derived cell lines, SiHa and Caski were obtained from American Type Culture Collection. HNSCC cell lines have been previously described.⁴⁴ Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 10 μ g/ml ciprofloxacin. Primary human foreskin and embryonic keratinocytes were isolated and grown together with NIH 3T3 feeder cells in FAD medium (Cascade) as previously described,³⁶ or when in the absence of feeder cells, keratinocytes were grown in EPI-LIFE medium (Cascade) supplemented with growth factors (Cambrex, New Jersey, NJ, USA) and 10 ng/ml human epidermal growth factor (R&D Systems, Lille, France). Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂. The Caski and HNSCC 136 PLVUT'-GFP and TLR9 were generated after lentiviral transduction and cloned by limited dilution. Ten clones for each cell line positive for WPRE were selected and amplified.

Lentiviral and retroviral infections

Retroviral infections have been previously described.³⁶ Infected cells were selected with puromycin (1 μ g/ml) for 3 days (corresponding to 100% of killing of uninfected cells). Lentiviral particles were produced by the 'plateau technique analyse genetique et vectorologie' (SFR Biosciences UMS3444/US8, Lyon, France). Lentiviral infections were done accordingly to the protocol of the ISP.

RNA extraction, reverse transcriptase-PCR and qPCR

RNA was extracted using Nucleospin RNA/protein kit following the manufacturer protocol (Macherey-Nagel, Germany). Reverse transcriptase reaction was performed using 500–1000ng of RNA. For qPCR, complementary DNA were diluted 1/20 for quantitative PCR (qPCR) reactions using Mesa green qPCR Master Mix (Eurogentec, Angers, France). PCR was conducted using the Mx 3000P real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Two sets of PCR assays were conducted for each sample, the TLR9 and β 2-microglobulin primers have been described.^{35,45} Amplification specificity was assessed for each sample by melting curve analysis, and the size of the amplicon checked by electrophoresis (data not shown). Relative quantification was performed using standard curve analysis. TLR9 mRNA levels were normalized to β 2-microglobulin mRNA levels and are presented as a ratio of gene copy number per 100 copies of β 2-microglobulin in arbitrary units.

Functional analysis

Synthetic phosphodiester oligodeoxynucleotides (CpG 2006 and GpC 2006) were synthesized by InvivoGen (Toulouse, France) and used at indicated concentration. IFN- β was used at 100 or 1000 UI/ml (Avonex, Biogen, Nanterre Cedex, France), anti-IL-29, anti-IFN β (R&D) and anti-IFNAR2 (PBL, New Jersey, NJ, USA). Cells were stimulated overnight and the response was monitored by luciferase assay or enzyme-linked immunosorbent assay. For luciferase assay transient transfection of the reporter plasmid NF- κ B, or ELAM luciferase was performed as previously described.⁴¹ Enzyme-linked immunosorbent assays were done in accordance to manufacturer's instructions (R&D system).

Immunoblot analysis

In brief, harvested cells were lysed in mild lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 0.5 mM and complete protease inhibitor (Roche, Meylan, France). Cellular protein content was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France); used for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel and immunoblotting onto a polyvinylidene difluoride membrane. After incubation with primary antibodies, proteins were detected with secondary peroxidase-conjugated antibodies (Promega, Madison, WI, USA) and ECL. All the primary antibodies for western blotting were from Cell Signaling but the β actin (MP biomedical, Santa Ana, CA, USA).

Proliferation assay

Doubling population assay and clonogenicity assay were previously described.⁴⁶ For MTT assays, cells were plated at 50 000, 100 000 and 150 000 cell/ml in 96-well plate in quadruplicate. After 48 h 10% of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, CA, USA) was added for 4 h then supernatants were removed and the cells resuspended in dimethyl sulphoxide. The 550nm absorbance was read on a plate reader. For the flow cytometry proliferation analysis, the cells were either stain with PKH 26 fluorescent dye (Sigma-Aldrich, France) or CellTrace violet Cell proliferation kit (Life technologies, France) following manufacturer recommendations. Cell Proliferation Assays: for each cell type, the indicated number of cells/well was seeded into 100 μ l of media in 96X microplates (E-Plate). The attachment, spreading and proliferation of the cells were monitored every 30 min using the RT-CES system. Cell proliferation was monitored for 48–72 h, depending on the experiment. Cell-sensor impedance was expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. The rate of cell growth was determined by calculating the slope of the line between two given time points.

Flow cytometry analysis

For synchronization experiments, 200 000 cells/ml were plated in a six-well dish. The next day thymidine (2 mM final) was added to the cells, 18 h later the cells were washed three times with PBS and complete medium was added for 9 h. Then thymidine (2 mM final) was added for 18 h. The cells were then washed three times in PBS and complete medium containing BrdU was added. For BrdU cell cycle analysis of non-synchronized cells, 100 000 cells per well were plated. The next day BrdU was added to the plate for 20–30 min. The cells were harvested and washed in PBS then fixed in 70% ethanol overnight at 4 °C. The cells were treated with 3N HCl that was neutralized with 0.1 M Na₂B₄O₇ pH 8.5. The cells were then blocked and stained with an anti-BrdU (Biolegend, London, UK) and 7-AAD (Life Technologies). For apoptosis experiment, Apoptosis detection kit I (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) was used following manufacturer protocol. For TLR9 intracellular staining, one million cells were fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized in PBS containing 0.25% saponin. After blocking the cells were stained with a rat anti-human TLR9 (eBioscience, Paris, France) and with a secondary goat anti-rat Alexa 633. The staining was analyzed on a BD LSRII using the software Diva and FlowJo (Treestar, Ashland, OR, USA).

Histology

IdiPAZ biobank, La Pas University Hospital, Spain. TLR9 staining was performed as previously described³⁶ and scoring was performed by pathologist Alexandra- Traverse Glehen (Department Laboratoire d'Anatomie et cytologie pathologiques, Hopital Lyon Sud, France).

Soft agar

TLR9 or GFP HNSCC 136 cells were plated (150 000 cell/well) in six-well dish and induced in presence or not of doxycycline for 48 h. Cells were then trypsinized and counted to include in soft agar assay. Soft agar assay consisting of a 2.5 ml lower layer of 0.75% agar in double-strength Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 7.5 g/l NaHCO₃ and 10% fetal bovine serum was placed in a six-well plated and permitted to solidify at room temperature. Cells to be tested for colony formation were suspended (22 500 cell/well) in a plating layer of 0.45% agar in double-strength Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% fetal bovine serum in presence or not of doxycycline. About 100 μ l of double-strength Dulbecco's Modified Eagle Medium containing fetal bovine serum, and doxycycline if indicated, was added to soft agar every 3 days. Pictures were taken 11 days post inclusion.

Isolation of RNA from HNSCC 136 cells

HNSCC 136 cells transduced with pLVUT⁷ TLR9 or GFP where plated with the same number of cells and cells were harvested and RNA extracted post as mentioned above post 36 h treatment with doxycycline. RNA concentration and purity were evaluated with the Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France). RNA integrity and quantification were characterized by measuring the 28 s/18 s rRNA ratio and RIN (RNA Integrity Number) using the Agilent 2100 bioanalyzer instrument and the RNA 6000 Nano kit. The RIN software classifies the integrity of eukaryotic total RNAs on a scale of 1–10, from most to least degraded.

Microarray-based whole-genome expression profiling and data analysis

Genome-wide gene expression profiling analysis was performed on Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips, providing a coverage of >24 000 annotated genes (48 783 probes corresponding to 1–3 probes per gene) including well-characterized genes and splice variants. Candidate probe sequences included on the HumanHT-12 v4 Expression BeadChip derive from the National Center for 8 Biotechnology Information Reference Sequence RefSeq (Build 36.2, Rel22) and the UniGene (Build 199) databases. Using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Thermofisher, Illkirch, France), 500 ng of extracted RNAs were converted to complementary DNAs and subsequent biotin labeled single-stranded cRNAs. The distribution of homogeneous *in vitro* transcription products (cRNAs) was checked with the Agilent 2100 bioanalyzer instrument and the RNA 6000 Nano kit. In total, 750 ng of biotin labeled cRNAs of the four (biological triplicates) samples were hybridized overnight to four HumanHT-12 Expression BeadChips. Subsequent steps included washing, streptavidin-Cy3 staining and scanning of the arrays on an Illumina BeadArray Reader. Fluorescence emission by Cy3 was quantitatively detected for downstream analysis. The Illumina Genome Studio V2010.2 was used to obtain the signal values (AVG-Signal), with no normalization and no background subtraction. Data quality controls were performed using internal controls present on the HumanHT-12 beadchip and were visualized as a control summary plot and for each sample as noise-to-signal ratios calculated by P95/P05 signal intensities. All samples had P95/P05 > 10, defined as sample quality threshold (data not shown).

Differential expression analysis was performed using BRB-ArrayTools software v4.2 developed by Dr Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team.⁴⁷ The raw signal intensities of all samples were log-transformed and quantile normalized with background subtraction with the exclusion of any probe showing excess dispersion (defined by > 85% of individual probe values differing from the median by > 1.5-fold). Class comparison for Microarray Analysis using the *t*-test method was performed for identification of differentially expressed probes. Probes with a *P*-value of < 0.001, with a minimum of twofold change and a false discovery rate of < 0.05 were considered significantly differentially expressed. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v 6.7 was used for classification of the differentially expressed genes.⁴⁸

Heat map generation

Pre-treatment of data and graphics were carried out with the R statistical language-Version 3.2.2. In brief, we used the R limma program to perform background correction & quantile normalization.⁴⁹ After normalization, the intensities were transformed into log₂ and the control probes were removed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ruslan Medzhitov and Giorgio Trinchieri for their scientific discussion and suggestions.

REFERENCES

- 1 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**: 704–707.
- 2 Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 859–867.

- 3 Urashima M, DeCaprio JA, Chauhan D, Teoh G, Ogata A, Treon SP *et al*. p16INK4A promotes differentiation and inhibits apoptosis of JKB acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 1997; **90**: 4106–4115.
- 4 Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, Schumacher G, Roth JA, Cristiano RJ. Down-regulation of bcl-2 is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2000; **19**: 1589–1595.
- 5 Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, Rollins BJ. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 378–387.
- 6 Serrano A, Garcia A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Differential MAGE-1 gene expression in two variants of an erythroleukemic cell line (K562). *Immunobiology* 1995; **194**: 449–456.
- 7 Chien WW, Domenech C, Catalo R, Salles G, Ffrench M. S-phase lengthening induced by p16(INK4a) overexpression in malignant cells with wild-type pRb and p53. *Cell Cycle* 2010b; **9**: 3286–3296.
- 8 O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 453–460.
- 9 Oellerich T, Mohr S, Corso J, Beck J, Dobele C, Braun H *et al*. FLT3-ITD and TLR9 use Bruton tyrosine kinase to activate distinct transcriptional programs mediating AML cell survival and proliferation. *Blood* 2015; **125**: 1936–1947.
- 10 Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008; **73**: 555–561.
- 11 Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 57–63.
- 12 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; **118**: 229–241.
- 13 Zambirinis CP, Levie E, Nguy S, Avanzi A, Barilla R, Xu Y *et al*. TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis. *J Exp Med* 2015; **212**: 2077–2094.
- 14 Hasan UA, Caux C, Perrot I, Doffin AC, Menetrier-Caux C, Trinchieri G *et al*. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007b; **104**: 8047–8052.
- 15 Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* 2007; **85**: 446–457.
- 16 Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; **176**: 4894–4901.
- 17 Hasan UA, Trinchieri G, Vlach J. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem* 2005; **280**: 20620–20627.
- 18 Mouchess ML, Arpaia N, Souza G, Barbalat R, Ewald SE, Lau L *et al*. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* 2011; **35**: 721–732.
- 19 Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA *et al*. Downregulation of toll-like receptor 9 expression by beta human papillomavirus 38 and implications for cell cycle control. *J Virol* 2015b; **89**: 11396–11405.
- 20 Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G *et al*. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 2013; **210**: 1369–1387.
- 21 Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncimmunology* 2014; **3**: e27257.
- 22 Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA *et al*. Down-regulation of toll-like receptor 9 expression by beta human papillomavirus type 38 and implications for cell cycle control. *J Virol*. 2015a; **89**: 11396–11405.
- 23 Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D *et al*. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *J Virol* 2013; **87**: 13009–13019.
- 24 van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IG, Buisson M *et al*. EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *J Immunol* 2011; **186**: 1694–1702.
- 25 Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P *et al*. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26315.
- 26 Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003; **106**: 34–44.
- 27 Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 2006; **3**: 109–116.
- 28 Warner N, Nunez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol* 2013; **190**: 3–4.
- 29 Chien WW, Domenech C, Catalo R, Kaddar T, Magaud JP, Salles G *et al*. Cyclin-dependent kinase 1 expression is inhibited by p16(INK4a) at the post-transcriptional level through the microRNA pathway. *Oncogene* 2010a; **30**: 1880–1891.
- 30 Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, Zhao B, Katlinski KV, Zheng H *et al*. DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Rep* 2015; **11**: 785–797.
- 31 Wu JF, Chen CH, Ni YH, Lin YT, Chen HL, Hsu HY *et al*. Toll-like receptor and hepatitis B virus clearance in chronic infected patients: a long-term prospective cohort study in Taiwan. *J Infect Dis* 2012; **206**: 662–668.
- 32 Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer* 2010; **128**: 879–886.
- 33 Sandholm J, Selander KS. Toll-like receptor 9 in breast cancer. *Front Immunol* 2014; **5**: 330.
- 34 Liu Y, Yan W, Tohme S, Chen M, Fu Y, Tian D *et al*. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J Hepatol* 2015; **63**: 114–121.
- 35 Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J *et al*. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol* 2010; **185**: 6439–6447.
- 36 Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V *et al*. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007a; **178**: 3186–3197.
- 37 Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HL. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS ONE* 2011; **6**: e15324.
- 38 Al-Khalaf HH, Colak D, Al-Saif M, Al-Bakheet A, Hendrayani SF, Al-Yousef N *et al*. p16(INK4a) positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1. *PLoS ONE* 2011; **6**: e21111.
- 39 Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, Abate-Shen C. ARF regulates the stability of p16 protein via REGgamma-dependent proteasome degradation. *Mol Cancer Res* 2013; **11**: 828–833.
- 40 Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M *et al*. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 2013; **494**: 361–365.
- 41 Hasan UA, Dollet S, Vlach J. Differential induction of gene promoter constructs by constitutively active human TLRs. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 124–131.
- 42 Morgenstern JP, Land H. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 1068.
- 43 Meng S, Luo M, Sun H, Yu X, Shen M, Zhang Q *et al*. Identification and characterization of Bmi-1-responder element within the human p16 promoter. *J Biol Chem* 2010; **285**: 33219–33229.
- 44 Saulnier A, Vaissiere T, Yue J, Siouda M, Malfroy M, Accardi R *et al*. Inactivation of the putative suppressor gene DOK1 by promoter hypermethylation in primary human cancers. *Int J Cancer* 2011; **130**: 2484–2494.
- 45 Ablasser A, Poeck H, Anz D, Berger M, Schlee M, Kim S *et al*. Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol* 2009; **182**: 6824–6833.
- 46 Mansour M, Touka M, Hasan U, Bellopede A, Smet A, Accardi R *et al*. E7 properties of mucosal human papillomavirus types 26, 53 and 66 correlate with their intermediate risk for cervical cancer development. *Virology* 2007; **367**: 1–9.
- 47 Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menezes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform* 2007; **3**: 11–17.
- 48 Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**: 44–57.
- 49 Shi W, Oshlack A, Smyth GK. Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: e204.



Oncogenesis is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogenesis website (<http://www.nature.com/oncsis>)

Article 3: The oncovirus Human papillomavirus 1 type 16 antagonizes IRF6 regulation of IL-1 β

Objectif de l'article 3

Les oncovirus bloquent les réponses immunitaires innées afin de persister dans l'hôte. Cependant, pour éviter la persistance des pathogènes, la réponse immunitaire tente d'éliminer l'infection. IL-1 β est une puissante cytokine produite lorsque des motifs viraux sont détectés par les récepteurs innés d'inflammasome. Le fait que les oncovirus tels que le papillomavirus humain puissent activer la voie de l'inflammasome reste inconnu. Dans cette étude, on vise à savoir si l'infection par HPV conduit à la sécrétion d'IL-1 β . D'autre part, on cherche à voir l'effet de l'oncoprotéine E6 sur l'activation de l'inflammasome, la transcription d'IL-1 β et l'expression d'IRF6 qui est essentiel à la transcription d'IL-1 β . En utilisant les cellules issues du cancer cervical ainsi que des tissus de patients, on analyse l'implication de p53 et d'IRF6 sur la transcription d'IL-1 β . Cette étude aidera à mieux comprendre la lutte entre la persistance oncovirale et le système immunitaire, dans le contexte de la régulation d'IL-1 β . Dans cet article, j'ai contribué dans les manipulations *in vitro* pour identifier l'effet de l'oncoprotéine E6 sur l'activation de l'inflammasome, la transcription d'IL-1 β et l'expression d'IRF6.

The oncovirus Human papillomavirus type 16 antagonizes IRF6 regulation of IL-1 β

Ainouze M^{*1-5}, Rochefort P^{*1-5}, Parroche P^{*1-5}, Roblot G¹⁻⁵, Tout I¹⁻⁵, Briat F¹⁻⁵, Zannetti C¹⁻⁵, Marotel M¹⁻⁵, Goutagny N⁶, Auron P⁷, Traverse-Glehen A^{5,6}, Lunel-Potencier A⁵, Golfier F⁵, Masson M⁸, Tommasino M⁹, Walzer T¹⁻⁵, Henry T¹⁻⁵, Zanier K⁸, Trave G⁸, Hasan UA¹⁻⁵

¹ Centre International de recherche en Infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Lyon, France

² Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³ CNRS, UMR5308, Lyon, France

⁴ École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, France

⁵ Hospices Civils de Lyon, France

⁶ Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Lyon, France.

⁷ Duquesne University 600 Forbes Ave. Pittsburgh, PA 15282, USA

⁸ IGBMC, UMR 7104-U964, ILLKIRCH Cedex, France

⁹ IARC, Lyon 69008, France

Abstract:

Oncoviruses block innate immune responses in order to persist in the host. However to avoid persistence the immune response attempts to clear the infection. IL-1 β is a powerful cytokine produced when viral motifs are detected by innate inflammasome receptors. Whether oncoviruses such as human papillomavirus can activate the inflammasome pathway remains unknown. Here, cells infected with HPV16 quasivirions were found to produce IL-1 β . Yet, upon replication and expression of the viral oncoprotein E6, IL-1 β transcription was blocked. Silencing of endogeneous E6 in HPV16-positive cervical cancer cells restored IRF6 expression and IL-1 β transcription. Mutations in E6 altered p53 transcriptional control of IRF6, which we demonstrated was essential for IL-1 β promoter activity. The involvement of p53 and IRF6 in the down-regulation of IL-1 β by HPV16 was fully confirmed in cervical cancer cells and tissues from patients. Our findings reveal a struggle between oncoviral persistence and host immunity; which is centered on IL-1 β regulation.

Introduction

The innate immune system is the first line of defense in response to non-self and danger signals from microbial invasion or tissue injury. Viruses are sensed by several immune receptors that activate signaling pathways leading to cytokine production. Many oncogenic viruses can deregulate several immune-related pathways to guarantee the persistence of the infection. High Risk Human Papilloma Viruses (HR HPV) are the etiological factor of cervical as well as in certain head and neck neoplasia and is responsible for approximately 20% of all human cancers linked to infection ¹. Persistence and progression of the infection can only be achieved by deregulating both cellular and immune defense mechanisms. Among the HR types, HPV16 is the most prevalent type in premalignant and malignant cervical lesions ².

47 E6 and E7 can target many cellular proteins such as binding and degrading the
48 tumor suppressor gene products, p53 and pRb, respectively. In parallel E6 and E7
49 are able to deregulate several innate immune-related pathways. The viral
50 mechanisms of immune evasion range from modulation of cytokines and chemo-
51 attractant expression to alteration of antigen presentation and down-regulation of
52 IFN-pathways and adherence molecules ³. Recently Lau et al showed that E7 binds
53 to innate adapter STING and suppresses the pathway of the DNA sensor cGAS ⁴.
54 Similarly, some antiviral genes inducible by interferon such as IFIT1, MX1 and innate
55 sensors RIG-I, TLR3 and TLR9 are also inhibited by HPV ^{5, 6}. On the flip side, host
56 cells have also evolved strategies to thwart viral immune escape. When HPV infects
57 keratinocytes (host cell) type 1 interferon should be produced as well as pro-
58 inflammatory cytokines such as IL-1 β . IL-1 β is a crucial pro-inflammatory effector
59 molecule that activates the production of chemokines such as IL-8 and CXCL5
60 promoting specific adaptive immune responses against viral infections, yet there are
61 few evidences demonstrating the role of IL-1 β on directly controlling viral replication.

62

63 Our current understanding is that the regulation of IL-1 β is controlled by two
64 checkpoints: transcription of the pro-form and maturation of the active form. The
65 transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) induces the transcription of the pro-IL-
66 1 β gene. Post translation regulation of the pro- form of IL-1 β involves the
67 inflammasome cytosolic multi-protein complex. NLRP3 and AIM2 are the most
68 characterised inflammasome complexes that have been shown to control caspase-1
69 activity and IL-1 β maturation. Activation of NLRP3 and AIM2 will initiate the pro-
70 inflammatory caspases to cleave the precursor pro-IL-1 β into its active form; resulting
71 in a strong inflammatory response. AIM2 is responsible for detecting DNA viruses,
72 while NLRP3 associates with recognition of RNA viruses by cells ⁷⁻⁹. Recent
73 evidences suggest that host protective immunity requires the NLRP3 inflammasome
74 for fighting against various kinds of viruses, including Influenza A virus, modified
75 Vaccinia virus Ankara, Sendai virus, Respiratory Syncytial virus,
76 Encephalomyocarditis viruses, as well as Adenoviruses. Furthermore,
77 inflammasome-mediated innate immune responses were shown to impact the
78 adaptive immune responses to influenza virus ¹⁰. Whether the inflammasome has a
79 protective role in HPV16 infection remains to be investigated.

80

81 Here we strongly demonstrate HPV16-mediated induction of IL-1 β in human primary
82 keratinocytes. IL-1 β production by infected keratinocytes controlled viral replication
83 for several hours. However, this control was lost after 8h due to the ability of the viral
84 oncoprotein HPV16E6 (16E6) to inhibit IL-1 β secretion. We found that the 16E6
85 binding domain essential for p53 degradation played a crucial role in regulating IL-1 β
86 transcription. The 16E6 viral oncoprotein induced a block in the p53 transcriptional
87 regulation of Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6), which we found was essential to

88 bind to and activate the ISRE site on the IL-1 β promoter. The identification of this
89 inhibitory transcriptional loop represents an undiscovered mechanism of oncoviral
90 immune hijacking in the infected host cell. This study demonstrates the balance
91 between host and pathogen immune evasion which is pivotal to viral persistence.

92

93 **Results**

94

95 **HPV16 induces IL-1 β**

96 Most inflammasome studies use human monocyte-derived macrophages or murine
97 bone marrow derived macrophages to measure IL-1 β . We first determined whether
98 inflammasome activation could be achieved in normal primary human keratinocytes,
99 the host of HPV infection. Addition of poly dA:dT (an AIM2 activator) or Nigericin (a
100 NLRP3 activator) led to the production of IL-1 β without the need to pre-stimulate pro-
101 IL-1 β (Sup Figure 1). We next examined whether HPV16 could induce IL-1 β in
102 human keratinocytes. To do this we generated HPV16 virus (called Quasivirions
103 [16QsV]) and control Pseudovirions (PV) ⁶. Infection of primary keratinocytes with
104 16QsV between 2-4 h led to an increase in IL-1 β transcripts (Figure 1A). However,
105 post 8h infection, we observed a decrease in IL-1 β mRNA expression (Figure 1A)
106 while E6 mRNA expression gradually increased (Figure 1B). Viral genes E1 and E7
107 also increased (data not shown). Even at a low v.g.e, 16QsV IL-1 β was detected at
108 4h but was lost at 24h (Figure 1C). Furthermore IL-1 β was secreted when cells were
109 stimulated with 16QsV, but not with non-encapsidated DNA or late proteins L1/L2
110 (Figure 1C).

111

112 **IL-1 β reduces HPV16 replication in the host cell.**

113 IL-1 β has been shown to block directly HBV replication in human hepatocytes ¹¹,
114 therefore we evaluated whether IL-1 β could also affect HPV16 replication.
115 Keratinocytes were infected with 16QsV or PV in the presence of IL-1 β . We observed
116 that recombinant IL-1 β blocked HPV16 viral replication as measured by E6 transcript
117 levels (Figure 1D). HPV16 replication was reversed when blocking the effect of IL-1 β
118 with an antagonist for the IL-1 receptor (Anakinra) (Figure 1E). These initial data
119 indicate that HPV16 activates the production of IL-1 β by keratinocytes as a means to
120 control viral replication. However the decrease of IL-1 β transcripts at >8h suggests
121 the virus has developed an escape mechanism to block host anti-viral immunity.

122

123 **IL-1 β production is blocked by the viral oncoproteins 16E6E7**

124 The viral oncoproteins E6E7 have been shown to block several innate immune
125 pathways such TLR9, STING and IRF signalling ^{4, 6, 12}. We hypothesized that E6
126 and/or E7 were responsible for the inhibition of IL-1 β . To test this, keratinocytes were
127 transduced with recombinant retrovirus expressing HPV16 E6 and E7 (16E6E7) or
128 with the empty vector control (pLXSN). 16E6E7 blocked both AIM2-mediated and
129 NLRP3-mediated secretion of IL-1 β (Figure 2A). Furthermore knock down of the viral
130 oncoproteins using siRNA for 16E6E7 restored the ability of cells to produce IL-1 β
131 (Figure 2B). In the epidermis, keratinocytes are the first cells to be encountered by

132 external stimuli to induce IL-1 β which in turn stimulates IL-8 expression by human
133 dermal fibroblasts¹³. We established an IL-8 bioassay in which addition of IL-1 β
134 induced IL-8 luciferase reporter activity expressed in HEK293 cells (Figure 2C).
135 Specificity of the assay was controlled using IL-1R inhibitor (Anakinra) (Figure 2C).
136 We observed the induction of IL-8 luciferase gene transcription from supernatants
137 that were derived from AIM2 stimulated cells, however supernatants from cells
138 transduced with 16E6E7 failed to induce IL-8 transcription (Figure 2D). Knock down
139 of the viral oncoproteins using siRNA for 16E6E7 restored the ability of HPV16-
140 positive cells (SiHa) to produce IL-1 β in response to Nigericin, poly dA:dT and 16QsV
141 (Figure 2E). To corroborate our findings we took supernatants from cell lines derived
142 from cervical cancer patients infected with HPV16 (CaSki and SiHa) that were
143 stimulated with the NLRP3 ligand. We observed that supernatants from cervical cell
144 line negative for HPV(C33A) induced IL-8 luciferase activity (Figure 2F) whereas
145 luciferase activity was reduced or absent in SiHa and CaSki cells (Figure 2F). In
146 addition Anakinra blocked the ability of IL-8 induction by supernatants derived from
147 C33A cells stimulated with poly dA:dT.

148

149 These data demonstrate the ability of HPV16 E6 and/or E7 to block IL-1 β production
150 and consequent gene transcription of IL-8 in human keratinocytes as well as in
151 HPV16-positive cell lines derived from cervical tumours.

152

153 **HPV16E6E7 abrogates mRNA expression of pro-IL-1 β**

154 We speculated that the loss of IL-1 β production may be due to the ability of 16E6E7
155 to block NLRP3 and AIM2 transcription as we previously reported for TLR9⁶. Neither
156 AIM2 nor NLRP3 transcript levels were altered in human primary keratinocytes
157 transduced with 16E6E7, compared to the pLXSN control (Sup Figure 2A). HPV16 E6
158 and E7 interact with p53 and retinoblastoma (pRb), respectively, and promote their
159 degradation via the proteasome pathway¹⁴. Therefore, we next determined whether
160 a similar mechanism affected NLRP3 or AIM2 protein expression in 16E6E7-
161 expressing keratinocytes. Human NLRP3-CFP, AIM2-CFP or p53 constructs were
162 co-transfected with 16E6E7 or pLXSN in human primary keratinocytes and their
163 expression was examined by immunoblotting. We did not observe any alteration in
164 AIM2 or NLRP3 protein levels. As expected we observed that p53 was degraded
165 (Sup Figure 2B). As we did not detect any alteration at the receptor level, we next
166 focused our attention on the downstream signalling molecules that are shared
167 between NLRP3 and AIM2. Inflammasome activation requires ASC dependent
168 caspase-1 maturation of pro-IL1 β . Neither ASC nor caspase-1 transcript levels were
169 altered in 16E6E7 compared pLXSN transduced cells (Sup Figure 2C). In addition
170 cleavage of pro-caspase-1 was detected in 16E6E7 transduced cells stimulated with
171 NLRP3 or AIM2 ligands (Sup Figure 2D). We next determined if IL-1 β could be
172 affected by 16E6E7. We observed that the levels of the pro-form of IL-1 β were
173 already reduced in 16E6E7 compared to LXSN transduced cells, indicating that the
174 synthesis of IL-1 β was affected by the viral oncoproteins prior to AIM2 or NLRP3
175 stimulation (Figure 3A-C). These data were also demonstrated in cervical cancer cell

176 lines (Figure 3D). All these observations indicate that 16E6E7 exerts an inhibitory
177 effect on the synthesis of the pro-form of IL-1 β . While Niebler et al. previously
178 reported the ability of 16E6 to degrade pro-IL-1 β via the proteasome, under our
179 experimental conditions the addition of a specific proteasome inhibitor on 16E6E7
180 keratinocytes did not restore the pro-IL-1 β protein (Figure 3E). p53 increased in the
181 presence of 16E6 confirming the specificity of the proteasome inhibitor (Figure 3E).
182 Indeed an alternative idea was that 16E6E7 proteins can alter IL-1 β mRNA¹⁵. We
183 observed that 16E6E7 blocked the number of IL-1 β transcripts compared to normal
184 cells (Figure 3F). Little or no IL-1 β mRNA was detected in CaSki or SiHa compared
185 to C33A cells (Figure 3G). These data indicated that 16E6E7 in human keratinocytes
186 as well as in cervical cancer cells block the mRNA expression of IL-1 β .

187

188 **The viral oncoprotein 16E6 as well as E6 from other high-risk HPV types block** 189 **IL-1 β transcription**

190 HPV16 may decrease IL-1 β by two distinct mechanisms; E6 and/or E7 can affect the
191 stability of IL-1 β mRNA or can directly inhibit IL-1 β transcription. To discriminate
192 between these two possibilities, we wanted to determine whether HPV16 E6 and E7
193 proteins influence the activity of the IL-1 β promoter. The isolated IL-1 β promoter
194 fused to luciferase reporter gene was introduced by transient transfection into
195 spontaneously immortalised human keratinocytes (NIKs) that expresses high protein
196 levels of endogenous pro-IL-1 β . High basal luciferase activity was detected in these
197 cells after transient transfection, however 16E6E7 inhibited luminescence even at a
198 low DNA concentration (Figure 4A left), indicating that 16E6E7 can block directly the
199 transcription of the IL-1 β promoter. Subsequently, we checked in transient
200 transfection experiments whether the inhibition of IL-1 β expression could be ascribed
201 to 16E6 or E7. Figure 4A middle and right panels shows that both HPV16 proteins
202 have the ability to inhibit the IL-1 β promoter, although E6 appeared to be more
203 efficient than E7 (Figure 4A-B). Knock down of 16E6 restored pro-IL-1 β expression in
204 primary keratinocytes expressing 16E6 (Figure 4C). We also compared the efficiency
205 of other high-risk human papillomavirus types 18E6, 31E6 and HPV6 (not associated
206 to cancer) in repressing IL-1 β transcriptional activity. Although the HR types 18E6
207 and 31E6 inhibited IL-1 β transcription, they did so less efficiently than 16E6 (Sup
208 Figure 3A). HPV6E6 had no effect on IL-1 β promoter activity (Sup Figure 3A).
209 Transient expression of the transfected constructs was controlled by qPCR for E6
210 expression (data not shown).

211

212 **The inhibition of IL-1 β transcription by 16E6 involves an ISRE *cis* element on** 213 **the IL-1 β promoter**

214 To determine where 16E6 exerts its inhibitory effect on the IL-1 β promoter we cloned
215 four IL-1 β promoter deletions (Figure 4D). WT and IL-1 β deletion constructs were co-
216 transfected with 16E6. We observed that deletion 2 contained an area that was
217 required for 16E6 inhibition of the IL-1 β promoter (Figure 4E)¹⁶. Within the deletion 2
218 an area called LILRE was previously characterised by Unlu and colleagues¹⁷. The
219 LILRE element has a high degree of inter-species conservation and plays and

220 important role in IL-1 β regulation (Figure 4F). Unlu et al., showed the involvement of
221 at least three different protein binding sites¹⁷, an ETS-site that could bind Spi-1; an
222 IRF8 ISRE-binding site and a GAS-like site reported to bind a Stat1-like molecule¹⁷.
223 We decided to test the role of 16E6 on the regulatory LILRE site. Primary human
224 keratinocytes were co-transfected with WT, a LILRE deletion, mutations for ISRE,
225 Spi-1 or GAS IL-1 β promoter \pm 16E6 or pLXSN (control vector). We observed no
226 repressive effect on the LILRE site indicating that 16E6 exerts IL-1 β deregulation on
227 this regulatory region of the promoter (Figure 4G). Luciferase activity was not altered
228 in cells transfected with ETS mutant indicating that this region was not involved in the
229 down regulation of IL-1 β expression by E6 (Figure 4G). Luciferase activity was
230 rescued in cells transfected with the IL-1 β promoter mutant for GAS (from 50% to
231 30%) and complete rescue was observed in cells that were transfected with the IL-1 β
232 promoter mutation for ISRE (from 50% to 0%). These results suggested that IL-1 β
233 down regulation by 16E6 principally involves the ISRE site on the IL-1 β promoter.

234

235 **16E6 expression inhibits the binding of IRF6 and not IRF8 to the IL-1 β promoter**

236 As well as inducing IL-1 β transcription in monocytes, several reports have shown that
237 IRF8 is required for the development of monocytes, macrophages, dendritic cells
238 (DCs), basophils, and eosinophils, while it inhibits the generation of neutrophils¹⁸, yet
239 nothing has been described for its role in keratinocytes. We observed no difference in
240 the level of gene or protein expression of IRF8 in primary human keratinocytes vs
241 16E6 or E7 transduced cells (Sup Figure 3B). Although IRF8 binding on the ISRE
242 element was observed by CHIP experiments using human macrophages, we failed to
243 demonstrate binding using human keratinocytes (Sup Figure 3C). With these data we
244 concluded that IRF8 did not regulate the IL-1 β promoter in human keratinocytes.
245 Therefore we focused our attention on another member of the IRF family. In contrast
246 to most IRFs, IRF6 has no identified function in innate immunity, but is essential for
247 normal keratinocyte epidermal development and differentiation¹⁹. Very little is known
248 about IRF6 function as a transcriptional factor and several studies have failed to
249 characterize this function²⁰. We hypothesized that IRF6 may be involved in IL-1 β
250 transcription in human keratinocytes. We transiently co-transfected HEK293 cells
251 with pUNO (backbone vector control) IRF8 or IRF6 expression vectors with the IL-1 β
252 promoter linked to the luciferase gene. IRF8 over expression was associated with a
253 significant increase in IL-1 β luciferase activity when compared to pUNO transfected
254 cells (Figure 5A). We showed for the first time that IRF6 expression also increased
255 IL-1 β transcription in a dose depended manner (Figure 5A). Oligopull down assays
256 revealed IRF6 as well as IRF8 specific binding to the ISRE site on the IL-1 β promoter
257 (Figure 5B). Having established that IRF6 binds to the IL-1 β promoter and induces
258 IL-1 β transcription, we hypothesized that 16E6 may interfere with IRF6. Indeed, IRF6
259 expression in human keratinocytes was lost in cells expressing 16E6 (Figure 5C and
260 D). Furthermore, immunofluorescence labelling of IRF6 in primary keratinocytes
261 showed that IRF6 was expressed in the nucleus but de-localised into the cytoplasm
262 in 16E6 cells (Figure 5E). We next aimed to corroborate our findings in a human
263 derived cervical cancer cell line positive for HPV16 ie CaSki in comparison to our

264 control cell line (NIKs). Immunoblot analysis of IRF6 as well as mRNA levels revealed
265 that IRF6 expression was lower in CaSki versus NIKs (Figure 5F and G). We also
266 observed that epithelial cells treated with increasing amounts of HPV16 viral particles
267 induced a reduction of IRF6 mRNA and protein levels (Figure 5H and I). Furthermore,
268 ChIP analysis revealed reduced IRF6 binding to the ISRE element in the presence of
269 HPV16 (Figure 5K).

270 Here, we confirmed that IRF8 is involved in IL-1 β expression but not in human
271 keratinocytes. Here we showed for the first time that IRF6 regulates IL-1 β
272 transcription which is blocked by 16E6 in primary human keratinocytes as well as in
273 patient derived cervical cancer cells.

274 **16E6 mutants reveal that E6 binding to p53 is required for the inhibition of** 275 **IL-1 β transcription**

276 The HPV16 oncoprotein E6 recognizes numerous host proteins, in large part by
277 hijacking cellular domain-motif interaction networks. To gain further insight into the
278 mechanistic role of 16E6 on IL-1 β transcription we co-transfected the IL-1 β reporter
279 with a panel of 16E6 constructs that contained point mutations that effect E6 binding
280 to cellular host proteins^{21, 22}. We observed potentially three point mutations on E6
281 which altered p53, E6AP and/or binding to proteins that have a PDZ domain (PBM)
282 (Sup Figure 4A-B and Figure 6A). We then co-transfected increasing amounts of
283 16E6 WT or mutants with the IL-1 β promoter (Figure 6A and B). We observed
284 enhanced luciferase activity with 16E6F47RdelPBM mutant, and partial luciferase
285 activity with delPBM and 4C/4S K11E. These data indicated that the F47R mutation,
286 which fully disrupts the ability of E6 to degrade p53^{23, 24} also suppressed the ability
287 of E6 to block IL-1 β transcription. This suggested that the degradation of p53 was
288 required to block IL-1 β transcription (Figure 6A and B).

289

290 **p53 drives IRF6 transcription which is deregulated by 16E6.**

291 We next investigated the role of p53 on IL-1 β transcription by using the CRISPR
292 technology to block p53 expression in primary human keratinocytes (Figure 6C).
293 Over expression of p53 restored IL-1 β promoter activity in the presence of 16E6
294 (Figure 6D). In addition, p53 or IRF6 expression in primary keratinocytes transduced
295 with 16E6 also reconstituted pro-IL-1 β protein levels (Figure 6E). Taken together
296 these data show that 16E6 domain required for p53 binding alter pro-IL-1 β levels in
297 human keratinocytes.

298 So far we have shown that both IRF6 and/or p53 regulate IL-1 β transcription
299 and that both proteins are blocked by 16E6, but whether both proteins are interlinked
300 to control IL-1 β transcription remained to be determined. Using the 16E6 mutants
301 completely or partly defective for p53 degradation, we observed that IRF6
302 transcription was no longer inhibited (Figure 7A). We hypothesized that p53 regulates
303 IRF6 transcription. Indeed, using the genecard software we identified a p53 binding
304 site on the IRF6 promoter. We therefore performed ChIP experiments in human
305 primary keratinocytes \pm 16E6 to determine if p53 bound to the IRF6 promoter (Figure
306 7B). p53 bound to the predicted site in human keratinocytes (Figure 7C and D).

307 Occupation of this site was reduced in 16E6 expressing cells (Figure 7C-D). In
308 summary we have shown for the first time a specific transcriptional function for IRF6
309 in regulating IL-1 β expression in human keratinocytes. Furthermore we demonstrated
310 the existence of a negative feedback loop leading to degradation of p53 by 16E6
311 prevents the transcription of IRF6 and the subsequent transcription of IL-1 β .

312

313 **IRF6 transcriptional regulation by p53 is lost in cervical neoplasia.**

314 Our next approach was to validate our *in vitro* findings in patients with cervical
315 cancer. Tumor and normal tissue biopsies were taken from 6 patients with cervical
316 cancer and snap frozen. After pathological analysis and HPV typing, sections were
317 stained by immunofluorescence for IL-1 β as well as p53. Basal cells of normal
318 epidermis showed strong cytoplasmic staining for IL-1 β and nuclear staining for p53
319 (Figure 8A). No staining for IL-1 β and p53 was observed in tumour cells
320 (representative staining in Figure 8A). Quantification of the cytoplasmic staining
321 clearly showed that IL-1 β expression was strongly down-regulated in cancerous as
322 compared with normal tissue (Figure 8B). In addition, qPCR of IL-1 β transcripts in
323 tumour tissues were also reduced compared to normal biopsies (Figure 8B).

324

325 We next explored if IRF6 levels were altered in patients during the progression of
326 cervical intraepithelial neoplasia positive for HPV16. We obtained biopsies from
327 normal cervical tissues (n = 4) as well as HPV16-positive CIN I (n=4), II (n=3) and III
328 (n = 3; Figure 8C). We observed a decrease in both IRF6 and IL-1 β mRNA during
329 disease progression ie: in normal to CIN biopsies (Figure 8C and D).
330 Immunohistochemical staining of normal cervical tissue revealed high nuclear
331 expression of IRF6 in the basal layers; which decreased as CIN status increased
332 (Figure 8E). ChIP experiments using chromatin extracted from patient tissue revealed
333 that IRF6 binding to the ISRE site on the IL-1 β promoter decreased during disease
334 progression (Figure 8F), indicating that loss of IRF6 inversely correlates to cervical
335 neoplasia progression. Furthermore, p53 binding was observed in normal cervical
336 biopsies but binding was reduced in patients with cervical tumors (Figure 8G and H).
337 These data strongly suggest that the p53/IRF6 regulation of IL-1 β transcription is lost
338 during the disease stages that lead to cervical cancer.

339

340 **Discussion**

341

342 We showed that primary human keratinocytes produce levels of IL-1 β at levels
343 comparable to human macrophages; demonstrating strongly the role of non-
344 haemopoietic cells in generating innate immune responses. We also elucidated that
345 IL-1 β has an anti-viral effect on HPV16. Increasing doses of IL-1 β on HPV16 infected
346 keratinocytes led to a block in viral replication. Viral replication was restored in the
347 presence of an antagonist for the IL-1 receptor. We observed an autocrine affect
348 during the early stages of infection that blocked viral replication. These data highlight
349 the role of IL-1 β as an antiviral cytokine and that keratinocytes play a crucial role in

350 the control HPV infection, however at >8h the virus displayed mechanisms to prevent
351 further production of IL-1 β .

352 Several new findings were discovered whilst elucidating the mechanism of IL-1 β
353 down regulation by HPV16. IRF6 has previously been shown to play an important
354 role in embryonal development of craniofacial region. Mutations of this gene have
355 been found in two human syndromes: Van der Woude and Popliteal Pterygium
356 Syndrome, which are characterized by cleft palate and lip pits, skin webbings,
357 syndactyly, genital deformities and oral adhesions²⁵. Other IRF family members
358 have been shown to be hijacked during HPV mediated carcinogenesis, such as IRF1
359 and IRF3^{12, 26}. In contrast to most IRFs shown to be essential in IFN gene regulation,
360 IRF6 had no identified function in innate immune gene activation. We showed that
361 IRF6 has an innate function in controlling IL-1 β transcription in human keratinocytes
362 and that the loss of IL-1 β was mediated by the oncoprotein E6. The expression of
363 HPV16 virions or E6 alone blocked IRF6 nuclear translocation as well as mRNA
364 levels and therefore IL-1 β transcription was abrogated.

365 Previous studies have shown that IRF6 mutations are significantly higher in
366 squamous cell carcinomas (SCC)²⁷. Botti et al demonstrated that IRF6 expression is
367 down-regulated in squamous cell carcinoma compared with noncancerous epithelial
368 tissues²⁸. In vitro invasion assays showed that IRF6 down-regulation promotes
369 invasive behaviour and that reintroduction of IRF6 into SCC cells strongly inhibits cell
370 growth. These studies ascribed IRF6 with a tumour suppressor function in squamous
371 cell carcinomas. In line with our findings a recent study by Rotondo et al, evaluated
372 the gene expression changes involved in neoplastic progression of cervical
373 intraepithelial neoplasia compared to normal keratinocytes. Micro array analysis
374 revealed that IRF6 was one of the 24 genes significantly down-regulated during CIN
375 progression²⁹.

376 Besides its role in keratinocytes differentiation and proliferation, IRF6 has been linked
377 to cell cycle regulators such as p63³⁰. IRF6 and p63 (a member of the p53 family)
378 interact during development of the secondary palate. Knowing that E6 targets p63,
379 supports our findings that IRF6 and p53 are linked. We observed keratinocytes that
380 were knocked out for p53 had less IL-1 β and IRF6 mRNA. Our data was confirmed
381 using E6 mutants that blocked fully or partially p53 degradation. IRF6 mRNA levels
382 were restored in the presence of E6 mutants as well as IL-1 β promoter activity.
383 Indeed p53 occupancy on the IRF6 promoter was lost in the presence of E6. More
384 importantly we have shown that loss of p53/IRF6/IL-1 β levels were inversely
385 proportional to cervical neoplasia progression. Early works revealed that p53 is highly
386 responsive to cellular stress. Upon its activation in the nucleus, p53 binds to
387 numerous promoters and thereby mediates a functionally expansive transcriptional
388 program. Consequently, several DNA tumour viruses have consequently developed
389 oncogenes that target p53. This would favour a preferable environment for viral
390 replication and persistence in the host. p53 has also been shown to amplify the

391 intracellular IFN response. IFN-stimulated genes (ISG) promoters do not generally
392 contain p53 consensus binding sites, however Munoz-Fontela et al. identified IFN
393 regulatory factor 9 (IRF9), a component of the ISG factor 3 (ISGF3) complex, as a
394 p53 target gene. ISGF3 directly induces the expression of ISRE-containing genes,
395 and so could represent a mechanistic link between p53 and ISG induction³¹. Several
396 additional IFN-stimulated mediators of ISG expression, including IFN regulatory
397 factor 5 (IRF5), immune-stimulated gene 15 (ISG15) and the Toll-like receptor 3
398 (TLR3), have been identified as direct p53 target genes. In all, these data highlight
399 the central dual role of p53 in regulating innate immune responses as well as cell
400 growth.

401

402 In summary, our work demonstrates that the oncovirus HPV16 induces a negative
403 transcriptional loop that suppresses IRF6 and IL-1 β transcription. Our data also
404 suggests that IL-1 β plays an important role in blocking HPV16 replication and
405 persistence in the host. As well as being a tumour suppressor, our work revealed that
406 p53 plays a central role in the auto-regulatory feedback via IRF6 on IL-1 β
407 transcription. Thus, interfering with the regulation of IL-1 β with synthetic
408 transcriptional agonists that target p53 and/or IRF6 levels may provide a novel
409 therapeutic strategy for cervical cancers.

410

411 **Methods and Materials**

412 *Cell culture*

413 Cervical cancer cell lines C33A (HPV negative), SiHa (HPV16 positive), CaSki
414 (HPV16 positive), HeLa (HPV18 positive) and Human embryonic kidney 293 (HEK
415 293) cells were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA)
416 and cultured in DMEM medium (Life technologies), supplemented with 10% foetal
417 bovine serum (FBS), L-glutamine, pyruvate and 0.1% ciprofloxacin (Euromedex).
418 Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂. Immortalized near-diploid human
419 keratinocyte cell line (NIKS) and Human Primary Keratinocytes were cultured as
420 previously described⁶. High-titer retroviral supernatants (>5 × 10⁶ IU/ml) were
421 generated as previously described³². The 16QsV and PV production, infection, and
422 viral genome expression quantification of HPV16 have been performed as previously
423 described⁶.

424

425 *Angonists and antagonists.*

426 NLRP3 ligand Nigericin was used at 1 μ g/mL (Sigma), AIM2 ligand poly(dA:dT) was
427 used at 1 μ g/well (Invivogen) and transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen).
428 ANAKINRA (Biovitrum) was used at 200 μ g/ml.

429

430 *Oligopull down*

431 Oligo pulldown was performed as previously described^{33, 34} with cellular extracts as
432 stated in the figure legend and oligo probes as listed in table 1. IRF8 and IRF6
433 antibodies were purchased from cell signaling.

434

435 *ChIP*

436 ChIP assays were performed using the Shearing Optimization kit and the OneDay
437 ChIP kit (Diagenode). For C33A cells or primary keratinocytes, cell sonication cycles
438 last 15s with 5s on and 2 s off at 20% of amplitude and were repeated four times. For
439 tissue, immunoprecipitation was performed overnight on a rotating wheel at 4°C. 2.5
440 µl/reaction of DNA solution was used for qPCR. The primers used to amplify IL-1β or
441 IRF6 binding regions are available on request. ChIP on tissue was performed
442 according to the protocol from Epigenome Network of Excellence for tissue
443 preparation, after the Red ChIP kit from diagenode was used to prepare chromatin
444 and the 1-d ChIP kit for the immunoprecipitation. Immunoprecipitation was performed
445 overnight on a rotating wheel at 4°C. 2.5 µl/reaction of DNA solution was used for
446 qPCR.

447

448 *Plasmid constructs*

449 The constructs pLXSN empty, pLXSN-16E6E7, pLXSN-HPV16E6, pLXSN-HPV16E7
450 and pLXSN-HPV18E6E7 were obtained from M.Tommasino (IARC, Lyon, France)
451 (6). The pGL3 Luc vector was purchased from Promega. The constructs The full
452 length IL-1β-Luc, LILRE (IL-1 response element) and mutants were obtained from
453 Philip E.Auron (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA). IL-1β deletions
454 were cloned using the primers listed in table 1. Nine E6 mutants were obtained from
455 Dr Gilles Trave (CNRS, Illkirch, France); these mutants were cloned into the pX5
456 plasmid. The retroviral pBabe-puro encoding HPV16 and 6 E6 and or E7 have been
457 previously described ³⁵. The constructs pLXSN-HPV16 E6 , HPV18 and HPV38 E6
458 and HPV6 E6 were a gift from D. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research
459 Center, Seattle, WA). The plasmids used for HPV16 structural genes and control PV
460 production, the target HPV16 genome, and GFP (for PV control) were kindly donated
461 from the laboratories of Martin Muller and Angel Alonso (DKFZ, Germany). pUNO,
462 human IRF6 and IRF8 constructs were purchased from Invivogen. p53 plasmid was
463 obtained from Addgene. siRNA for HPV16E6E7 and E6 was purchased from
464 Dharmacon and Sigma respectively. CRISPR for p53 was purchased from Santa
465 Cruz.

466

467 *Immunofluorescence and immunohistochemistry*

468 Keratinocytes transduced with pLXSN or HPV16E6 were fixed as previously
469 described ³⁶. Biopsies of normal and cancer cervical tissues were taken from patients
470 and paraffin embedded (Department Laboratoire d'Anatomie et cytologie
471 pathologiques, Hopital Lyon Sud, France). Approval was obtained according to local
472 ethic committees. Sections of 5-µm thickness were cut and either stained for
473 immunofluorescence using the TSA system (PerkinElmer). p53 antibody was
474 purchased from Cell Signalling and the anti-IL1β 3ZD (kindly provided by Dr
475 Trinchieri, NCI). The IRF6 antibody (F12) was purchased from Santa Cruz. Cells or
476 tissues were washed, the coverslips were mounted onto slides using a 1/10 dilution
477 of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (nuclear stain; Invitrogen) in fluoromount (Southern
478 Biotechnology Associates), and protein expression was detected by direct
479 fluorescence microscopy. Photographs were taken at 40× magnification.

480

481 *ELISA*

482 NIK, primary keratinocytes, HPV16E6 and/or E7 induced keratinocytes were plated in
483 a six well plate at 250 000 cells per well with NIH 3T3 feeders. Two days later the
484 feeders were removed and the medium was replaced. After two hours resting the
485 cells were stimulated either with 20uM of Nigericin (Sigma) or transfected with
486 1ug/mL of poly (dA:dT) (Invivogen) using lipofectamine 2000 (Invitrogen). After the
487 indicated period of time, the supernatant was harvested and quantified for IL-1 β by
488 ELISA (Bender Med System).

489

490 *Luciferase assay*

491 Twenty-four hours before transfection HEK 293 cells were plated at 20% of
492 confluency in 96 well plates with 180 μ l of complete medium per well. Cells were
493 transfected using GeneJuice Transfection Reagent (Novagen) following the
494 manufacturer's instructions. Cells were transiently co-transfected with HPV
495 constructs as indicated with pGL3-LILRE, mutants or pGL3-XTLuc. A Renilla plasmid
496 with a CMV promoter was used to normalise transfection efficiency. Twenty-four
497 hours after transfection cells were lysed at room temperature in passive lysis buffer
498 (Promega) for 20 minutes. Luciferase buffer was composed of MgSO₄ (2,67mM),
499 EDTA pH8 (0,1 mM), DTT (33,3 mM), ATP (0,53 mM), acetyl-coA (207 μ g/ml),
500 luciferin (0,13 mg/ml), Magnesium carbonate hydroxide (0,265 mM) and tricine (20
501 mM). Renilla buffer was made by diluting coelenterazine. Luciferase and renilla
502 activity from transfected cells were measured using a luminoskan Ascent (Thermo). A
503 single read program with an integration time of 1000 ms was used. Firefly luciferase
504 (*Photinuspyralis*) activity of individual cell lysates was normalized against renilla
505 (*Renillareniformis*) activity to correct for transfection efficiency in each reaction.

506

507 *IL-8 Bioassay*

508 Supernatants from stimulated cells were added onto HEK 293 cells transfected with
509 IL-8 luciferase promoter and a Renilla plasmid with a CMV promoter was used to
510 normalise transfection efficiency ³⁷. Twenty four post stimulation cells were
511 processed as listed above.

512

513 *Protein/RNA extraction*

514 Cells were preserved in RP1 lysis buffer complemented with β -mercaptoethanol (1%)
515 until RNA and total proteins extraction using the NucleoSpin® RNA/protein extraction
516 kit (Macherey-Nagel). Supernatants from stimulated cells where concentrated using
517 MeOH/chloroform.

518

519 *Western Blot analysis*

520 Eighteen μ g of total cellular protein were incubated during 5 minutes at 95°C. The
521 protein samples were separated by electrophoresis using Novex® 4-20% Tris-
522 Glycine gels (Life Technologies) for 1 hour at 100V. Proteins then were transferred
523 on a PVDF membrane (PerkinElmer) during 1 hour at 100V. After blocking with PBS

524 0.1% tween and 5% milk for 1 hour, membranes were probed with the following
 525 primary antibodies: anti-caspase1 P10 (SantaCruz Biotechnology), anti-IL1 β 3ZD
 526 (kindly provided by Dr Trinchieri, NCI) and anti-ASC (Santa Cruz Biotechnology) over
 527 night at 4°C. β -tubulin (Sigma) primary antibodies were added for 2h at RT. After
 528 three PBS 0.1% tween washes, secondary antibodies are added for two hours at RT.
 529 Anti-Rabbit and anti-mouse HRP conjugate secondary antibodies were provided by
 530 Promega. Proteins were revealed with Lumiglo chemiluminescent substrate system
 531 (Kpl). Western blots were developed using the intelligent dark box (Fuji film).

532

533 *qPCR*

534 We retro transcribed 1,5 μ g of RNA extracted from cells using first strand RT-PCR kit
 535 with oligodT primers (Fermentas) The reverse transcriptase reaction was diluted
 536 according to detection sensitivity. 1 μ l of the diluted samples was added to a 20 μ l
 537 PCR mixture containing 0.4 μ l of primers forward and reverse (10 μ M) and 10 μ l of
 538 Master Mix. Mx300P real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA) was used to
 539 performed qPCR with Mesa Green qPCR Master Mix Plus (Eurogentec) on CasKi,
 540 C33A and SiHa cells. AIM2, NLRP3, ASC, IL-1 β , β 2-microglubulin and GADPDH
 541 (two housekeeping genes where used for each qPCR) specific primers were used as
 542 previously described³⁸. Primers for IRF6, IRF8 and p53 are listed in table 1.

543

544 Table 1

<i>Deletions IL-1β</i>	<i>OLIGO PULL DOWN IL-1β</i>
FWD 1 CTAGCTAGCTCTAGACCAGGGA	FWD Biotin' TTTGACATAAGAGGTTTCACTTCC
FWD 2 CTAGCTAGCTAAGAGGTTTCACT	REV GGAAGTGAAACCTCTTATGTCAAA
FWD 3 CTAGCTAGCCTCCAGCCTGGGG	<i>IRF6 qPCR</i>
FWD 4 CTAGCTAGCCCTGAATGTACATGCC	FWD GGCATAGCCCTCAACAAGAA
FWD 5 CTAGCTAGCTTAGGCAGAGCTCAT	REV CACCCCTTCCTGGTACTTCC
REV 1 GAAGATCTAAGAGGTTGGTA	<i>IRF8 qPCR</i>
REV 2 GAAGATCTAAGAGGTTTG	FWD ACGAGGTTACGCTGTGCTTT
	REV GACATCTCGGCAGGGCTATG
	<i>p53 qPCR</i>
	FWD GGTGGTGTAAATGCAGGGCTGAGG
	REV GGGTATGGTGGTGTATGCCTGT

545

546

547

548

549

550

551

552 **References.**

- 553 1. de Martel, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and
554 synthetic analysis. *Lancet Oncol* **13**, 607-615 (2012).
- 555 2. Bouvard, V. *et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* **10**,
556 321-322 (2009).
- 557 3. Amador-Molina, A., Hernandez-Valencia, J.F., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A. & Lizano, M.
558 Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of
559 adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses* **5**, 2624-2642 (2013).
- 560 4. Lau, L., Gray, E.E., Brunette, R.L. & Stetson, D.B. DNA tumor virus oncogenes antagonize the
561 cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science* **350**, 568-571 (2015).
- 562 5. Reiser, J. *et al.* High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon
563 transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression.
564 *J Virol* **85**, 11372-11380 (2011).
- 565 6. Hasan, U.A. *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional
566 repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* **210**, 1369-1387 (2013).
- 567 7. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating
568 inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514-518 (2009).
- 569 8. Poeck, H. *et al.* Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and
570 inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* **11**, 63-69 (2009).
- 571 9. Kanneganti, T.D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev*
572 *Immunol* **10**, 688-698 (2010).
- 573 10. Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R. & Iwasaki, A. Inflammasome recognition of
574 influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* **206**, 79-87 (2009).
- 575 11. Watashi, K. *et al.* Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis
576 B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol*
577 *Chem* **288**, 31715-31727 (2013).
- 578 12. Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M. & Howley, P.M. Human papillomavirus 16 E6
579 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity.
580 *Genes Dev* **12**, 2061-2072 (1998).
- 581 13. Boxman, I.L., Ruwhof, C., Boerman, O.C., Lowik, C.W. & Ponc, M. Role of fibroblasts in the
582 regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-
583 derived IL-1. *Arch Dermatol Res* **288**, 391-398 (1996).
- 584 14. Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular
585 pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690-7700 (1999).
- 586 15. Niebler, M. *et al.* Post-translational control of IL-1beta via the human papillomavirus type 16
587 E6 oncoprotein: a novel mechanism of innate immune escape mediated by the E3-ubiquitin
588 ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathog* **9**, e1003536 (2013).
- 589 16. Hiscott, J. *et al.* Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1
590 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* **13**, 6231-6240
591 (1993).
- 592 17. Unlu, S. *et al.* Phosphorylation of IRF8 in a pre-associated complex with Spi-1/PU.1 and non-
593 phosphorylated Stat1 is critical for LPS induction of the IL1B gene. *Mol Immunol* **44**, 3364-
594 3379 (2007).
- 595 18. Scott, C.L. *et al.* The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and
596 plasmacytoid DCs by repressing Id2. *J Exp Med* **213**, 897-911 (2013).
- 597 19. Richardson, R.J. *et al.* Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-
598 differentiation switch. *Nat Genet* **38**, 1329-1334 (2006).
- 599 20. Bailey, C.M. & Hendrix, M.J. IRF6 in development and disease: a mediator of quiescence and
600 differentiation. *Cell Cycle* **7**, 1925-1930 (2008).
- 601 21. Martinez-Zapien, D. *et al.* Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated
602 degradation of p53. *Nature* **529**, 541-545 (2013).

- 603 22. Zanier, K. *et al.* Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6
604 oncoproteins. *Science* **339**, 694-698 (2013).
- 605 23. Martinez-Zapien, D. *et al.* Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated
606 degradation of p53. *Nature* **529**, 541-545 (2016).
- 607 24. Zanier, K. *et al.* Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-
608 association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure* **20**, 604-617
609 (2012).
- 610 25. Kondo, S. *et al.* Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.
611 *Nat Genet* **32**, 285-289 (2002).
- 612 26. Karim, R. *et al.* Human papillomavirus (HPV) upregulates the cellular deubiquitinase UCHL1 to
613 suppress the keratinocyte's innate immune response. *PLoS Pathog* **9**, e1003384 (2013).
- 614 27. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma.
615 *Science* **333**, 1157-1160 (2011).
- 616 28. Botti, E. *et al.* Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell
617 carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13710-13715 (2011).
- 618 29. Rotondo, J.C. *et al.* Gene expression changes in progression of cervical neoplasia revealed by
619 microarray analysis of cervical neoplastic keratinocytes. *J Cell Physiol* **230**, 806-812 (2015).
- 620 30. Thomason, H.A. *et al.* Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is
621 essential to prevent cleft palate in mice. *J Clin Invest* **120**, 1561-1569 (2010).
- 622 31. Munoz-Fontela, C. *et al.* Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral
623 immunity. *J Exp Med* **205**, 1929-1938 (2008).
- 624 32. Mansour, M. *et al.* E7 properties of mucosal human papillomavirus types 26, 53 and 66
625 correlate with their intermediate risk for cervical cancer development. *Virology* **367**, 1-9
626 (2007).
- 627 33. Vinals, F., Lopez-Rovira, T., Rosa, J.L. & Ventura, F. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK
628 cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett* **510**, 99-104
629 (2002).
- 630 34. Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J.L. & Ventura, F. Direct binding of Smad1
631 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific
632 transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* **277**, 3176-3185 (2002).
- 633 35. Hasan, U.A. *et al.* TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated
634 human papillomavirus type 16. *J Immunol* **178**, 3186-3197 (2007).
- 635 36. Hasan, U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncoimmunology*
636 **3**, e27257 (2013).
- 637 37. Hasan, U.A., Dollet, S. & Vlach, J. Differential induction of gene promoter constructs by
638 constitutively active human TLRs. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 124-131 (2004).
- 639 38. Zannetti, C. *et al.* Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response
640 to Synthetic Agonists and Pathogens. *J Immunol* **197**, 356-367 (2016).

641
642 **Figure legends**

643
644 **Figure 1**

645 **HPV16 induces transient IL-1 β secretion by keratinocytes**

646 (A) Human primary keratinocytes were treated as indicated with 16QsV or PV (at 10⁷
647 viral genome equivalents (v.g.e)). IL-1 β transcripts were determined by qPCR relative
648 to the expression using the house keeping gene (RE). n=4.

649 (B) As in A,. E6 transcripts were determined by qPCR. n=4.

650 (C) Human primary keratinocytes were treated with 16QsV with different v.g.e at the
651 indicated times, supernatants were harvested and IL-1 β production was measured by
652 ELISA. HPV16 DNA or L1/L2 fractions were added as controls. n=5.

653 (D) Human primary keratinocytes were treated with 16QsV or PV for 24 h ± IL-1β
654 (200pg/ml). Cells were harvested and E6 transcripts were measured by qPCR. n=5.
655 (E) Human primary keratinocytes were treated with 16QsV or PV for 24 h ± IL-1R
656 inhibitor (Anakinra). Cells were harvested and E6 transcripts were measured by
657 qPCR. n=5. Data are representative of n experiments. Shown are the mean ± SEM
658 with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test

659

660 Figure 2.

661 **16E6E7 block IL-1β production in primary human keratinocytes and in cervical**
662 **cancer derived cells lines.**

663 (A) Analysis of the IL-1β production by ELISA in human keratinocytes (pLXSN) vs
664 16E6E7 expressing cells in response to NLRP3 or AIM2 ligands. n=10

665 (B) Human primary keratinocytes ±16E6E7 were transfected with a siRNA targeting
666 16E6E7 or the scramble control. Cells were stimulated with the NLRP3 ligand
667 nigericin and IL-1β was measured by ELISA. n=4

668 (C) IL-8 bioassay: HEK293T cells transiently expressing the IL-8 were treating with
669 increasing concentrations of recombinant IL-1β. Twenty four hours post treatment
670 cells were harvested and luciferase activity was measured. n= 4

671 (D) IL-8 bioassay using supernatants from human keratinocytes of 16E6E7
672 transduced cells ± AIM2 ligand poly dA:dT. n=4

673 (E) Cervical cancer cells (SiHa) were transfected with a siRNA targeting 16E6E7 or
674 the scramble control. The cells were stimulated with the NLRP3 ligand nigericin,
675 AIM2 ligand poly dA:dT or 16QsV and IL-1β was measured by ELISA. n=4

676 (F) IL-8 bioassay using supernatants from cervical cancer cell lines ± NLRP3 ligand
677 nigericin. n=6.

678 Data are representative of n independent experiments performed in triplicate. Shown
679 are the mean ± SEM with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test.

680

681 Figure 3

682 **HPV16 oncoproteins inhibit pro-IL-1β levels.**

683 (A) Human keratinocytes ± HPV16E6E7 were stimulated with AIM2 and

684 (B) NLRP3 ligands and both pro-IL-1β and IL-1β were analysed in cell lysates or in
685 the supernatant by immunoblotting. β-actin was used as a loading control. n=3

686 (C) Immunoblotting of pro-IL-1β in human keratinocytes ± 16E6E7.

687 (D) Cervical cancer cell lines were lysed and immunoblotting for pro-IL-1β was
688 performed. n=4

689 (E) Human keratinocytes ± 16E6E7 were treated for 24 h with N-CBZ-Leu-Leu-Leu-
690 al. Cells were harvested and p53 as well as pro-IL-1β levels were determined by
691 immunoblotting. Immunoblotting were performed n=4.

692 (F) RNA was extracted from Human keratinocytes ± 16E6E7 and IL-1β transcripts
693 relative expression (RE) was determined by RT-qPCR were normalised to β2-
694 microglpbulin or GAPDH house-keeping genes n=5

695 (G) RNA was extracted from patient derived cervical cancer cell lines and IL-1 β
696 transcripts were determined by RT-qPCR. Results presented for IL-1 β by RT-qPCR
697 were normalised to β 2-microglpbulin or GAPDH house-keeping genes.

698 n=6

699 Data are representative of n independent experiments performed in triplicate. Shown
700 are the mean \pm SEM with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test.

701

702 Figure 4

703 **HPV16 E6 down-regulates the IL-1 β promoter in cervical cells via the ISRE site.**

704 (A) NIKs were co-transfected with the IL-1 β promoter with increasing concentrations
705 of pLXSN HPV16E6E7 or 16E6 or 16E7 as indicated. After 48 h, cells were
706 harvested and luciferase activity was measured. n=5

707 (B) Relative expression of 16E6E7, 16E6 or 16E7 alone were measured by RT-
708 qPCR. n=5

709 (C) Primary human keratinocytes transduced with 16E6 and treated with a scramble
710 or siRNA against 16E6 and protein levels of pro-IL-1 β and loading control β -tubulin
711 were evaluated by immunoblotting. n=4

712 (D) Schematic representation of IL-1 β promoter luciferase deletion mutants.

713 (E) The constructs shown in E were co-transfected in NIKs with empty vector pLXSN
714 or 16 E6. After 48 h, cells were measured for luciferase activity. n=4

715 (F) Schematic representation of the IL-1 β LILRE site.

716 (G) Co-transfection IL-1 β promoter FL or mutated at the LILRE site with pLXSN or
717 16E6, data were plotted as the percentage of inhibition. n=4

718 Data are representative of n independent experiments performed in triplicate. Shown
719 are the mean \pm SEM with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test.

720

721 Figure 5

722 **IRF6 and not IRF8 is recruited to the IL-1 β promoter which is blocked by**
723 **HPV16E6**

724 (A) HEK293 cells were co-transfected with IL-1 β promoter luciferase construct along
725 with the empty vector pUNO, IRF8 or IRF6 plasmid at the indicated concentration.
726 Post 48 h cells were lysed and luciferase activity measured. n=4

727 (B) Oligo pulldown assay for WT or the mutated ISRE site using protein lysates from
728 HEK293 cells transfected with IRF6 or IRF8. Bound proteins were assessed by
729 immunoblotting for IRF8 or IRF6. Input controls (10%). n=4

730 (C) Immunoblot analysis of IRF6 protein levels in in pLXSN and 16E6 transduced
731 human primary keratinocytes. n=4

732 (D) IRF6 relative levels were measured in pLXSN, 16E6 and 16E7 transduced
733 human primary keratinocytes by RT-qPCR and were normalised to β 2-microglpbulin
734 and GAPDH house-keeping genes. n=4

735 (E) Immunofluorescent staining of IRF6 in primary human keratinocytes transduced
736 with pLXSN or HPV16E6. n=4

737 (F) Immunoblot analysis of IRF6 protein levels in C33A and NIKs. n=4

738 (G) IRF6 mRNA levels detected by RT-qPCR and normalised to β 2-microglpbulin
739 and GAPDH house-keeping genes in NIKs and CaSki cells. n=4
740 (H) NIKs and CaSki cells were co-transfected with IL-1 β promoter luciferase
741 construct \pm siRNA for 16E6. Post 48 h cells were lysed and luciferase activity
742 measured.
743 (I) C33A cells were treated with control PV or HPV16 at different v.g.e and IRF6
744 protein levels were examined by immunoblot. n=3
745 (J) C33A cells were treated with control PV or HPV16 at different v.g.e and IRF6
746 mRNA levels were examined by RT-qPCR. Data were normalised to β 2-
747 microglpbulin and GAPDH house-keeping genes. n=3
748 (K), ChIP using IgG, IRF6 or IRF8 antibodies was performed for the ISRE site on
749 C33A cells infected with HPV16 or PV for 24 h. n=3
750 Data are representative of n independent experiments performed in triplicate. Shown
751 are the mean \pm SEM with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test.
752

753 Figure 6

754 **Loss of p53 inhibition by 16E6 restores IRF6 activity.**

755 (A) Table defining the 16E6 mutants that alter p53, E6AP or PDZ binding sites.
756 (B) NIKs were co-transfected with IL-1 β promoter luciferase construct along with the
757 HPV16E6 WT and mutated constructs at the indicated concentration. n=5
758 (C) Human primary keratinocytes were transfected with cas9/sgRNA for p53 or
759 control and 36h later cells were examined for mRNA levels for p53, IL-1 β or IRF6.
760 n=4
761 (D) NIKs were co-transfected with the IL-1 β promoter and pLXSN, E6, p53 or E6 with
762 p53. Luciferase activity was measured 48 h post infection. n=4
763 (E) 16E6 transduced primary keratinocytes were transfected with vector control (-),
764 p53 or IRF6 expression vectors. Twenty-four hours later cells were harvested and
765 pro-IL-1 β , p53 or IRF6 levels were examined by immunoblotting. n=4
766 Data are representative of n independent experiments performed in triplicate. Shown
767 are the mean \pm SEM with ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test
768

768 Figure 7

769 **p53 is a transcription factor required for IRF6 transcription in human**
770 **keratinocytes.**

771 (A) HPV16E6WT or mutants were transfected into NIKs and IRF6 mRNA levels were
772 measured by RT-qPCR. n=4
773 (B) Schematic diagram of the p53 binding site and sequence on the IRF6 promoter.
774 (C, D) ChIP assay of p53 binding on the IRF6 promoter in human primary cells
775 (LXSN) as well as in 16E6 transduced cells. n=4 Data are representative of n
776 independent experiments performed in triplicate. Shown are the mean \pm SEM with
777 ***, P < 0.0001, based on an unpaired Student's t test.
778

778 Figure 8

779 **HPV16-positive cervical cancer lesions contain less IRF6 and IL-1 β .**

780 (A) Immunofluorescence of normal cervical issue and HPV16+ cervical cancer
781 biopsies. IL-1 β (green), p53 (red) with trace indicating the basal layer and nucleus

782 (white). Normal (HPV-) and a neoplastic biopsy (HPV16+) from one representative
783 patient out of eight tested with similar results is shown. Bars represent a scale of 10
784 μm . For each stained biopsy, six fields were examined IL-1 β staining was counted
785 manually and the percentage scored out of 100 cells. n=4. IL-1 β relative mRNA
786 levels were measured by RT-qPCR and were normalised to β 2-microglobulin and
787 GAPDH house-keeping genes. n=4

788 (B) Table of immunohistochemical scoring IRF6 in patients at different stages of
789 cervical neoplasia. Scoring, *** being the strongest and – no staining.

790 (C) IRF6 and IL-1 β relative mRNA levels in controls and patients with cervical
791 neoplasia.

792 (D), Immunohistochemical images of IRF6 in cervical tissue in patients with either
793 CINI, II or III. n=2

794 (E) Dot plot representing the cellular distribution for IRF6 in control (HPV-) and
795 neoplastic and cancerous cervical tissue. For each stained biopsy, six fields were
796 examined and cytoplasmic or nuclear staining of IRF6 was counted manually and the
797 percentage scored out of 100 cells. Data are representative of three independent
798 experiments performed on 16 biopsies (2 normal, 4 CINI, 3 CINII, 3 CINIII and 4
799 cancers biopsies). n=2

800 **p53 can no longer bind to the IRF6 promoter in cervical cancer tissues**

801 (F) ChIP analysis was performed on cervical tissue described for IRF6 binding on
802 ISRE site on the IL-1 β promoter. n=2

803 (G) ChIP analysis was performed on cervical tissue described for p53 binding site on
804 the IRF6 promoter. n=2

805

806 Supplementary figure legends:

807 Figure 1

808 **IL-1 β production by primary human keratinocytes**

809 IL-1 β was measured by ELISA in human keratinocytes (pLXSN) in response to
810 NLRP3 or AIM2 ligands. n=10

811

812 Figure 2

813 **16E6E7 has no effect on the inflammasome activation of caspase-1**

814 (A) RNA was extracted from Human keratinocytes \pm 16E6E7 and NLRP3 or AIM2
815 transcripts relative expression (RE) was determined by RT-qPCR. Results were
816 normalised to β 2-microglobulin or GAPDH house-keeping genes n=5

817 (B) Immunoblot analysis of keratinocytes transduced with LXSN or 16E6E7 where
818 transfected with NLRP3-CFP or AIM2-CFP. Membranes were probed with GFP, p53
819 or β -actin n=5.

820 (C) RNA was extracted from Human keratinocytes ± 16E6E7 and ASC or caspase-1
821 transcripts relative expression (RE) was determined by RT-qPCR. Results were
822 normalised to β2-microglobulin or GAPDH house-keeping genes n=5

823 (D) Human keratinocytes ± HPV16E6E7 were stimulated with AIM2 and
824 NLPR3 ligands and both pro-or mature caspase-1 were analysed in cell lysates or in
825 the supernatant by immunoblotting. β-actin was used as a loading control. n=3
826

827 Figure 3

828 **Other HPV HR types but not LR blocks IL-1β promoter activity**

829 (A) NIKs were co-transfected with the IL-1β promoter with pLXSN, 16E6, 18E6, 31E6
830 or 6E6 as indicated. After 48 h, cells were harvested and luciferase activity was
831 measured. n=5

832 **IRF8 is not involved in IL-1β transcription in human keratinocytes**

833 (B) IRF8 relative levels were measured in pLXSN, 16E6 and 16E7 transduced human
834 primary keratinocytes by RT-qPCR and were normalised to β2-microglobulin and
835 GAPDH house-keeping genes. n=4

836 Immunoblot analysis of IRF8 protein levels in in pLXSN, 16E6 and 16E7 transduced
837 human primary keratinocytes. n=4

838 (C) ChIP assay of IRF8 binding on the IL-1β promoter in human primary cells (LXSN)
839 as well as in human macrophages. n=4

840

841 Figure 4

842 **Mutations in 16E6 restore IL-1β activity**

843 (A) Table describing 16E6 mutants. NIKs were transfected with 16E6Wt and mutants
844 were co-transfected with IL-1β promoter luciferase construct. Forty-eight hours post
845 transfection cells were lysed and luciferase activity measured. n=4

846 (B) NIKs were transfected with 16E6Wt and mutants. Forty-eight hours post
847 transfection proteins were probed using 16E6 antibody. n=3

848 Data are representative of n independent experiments; graphs shown are the mean ±
849 SEM from triplicate values.

850

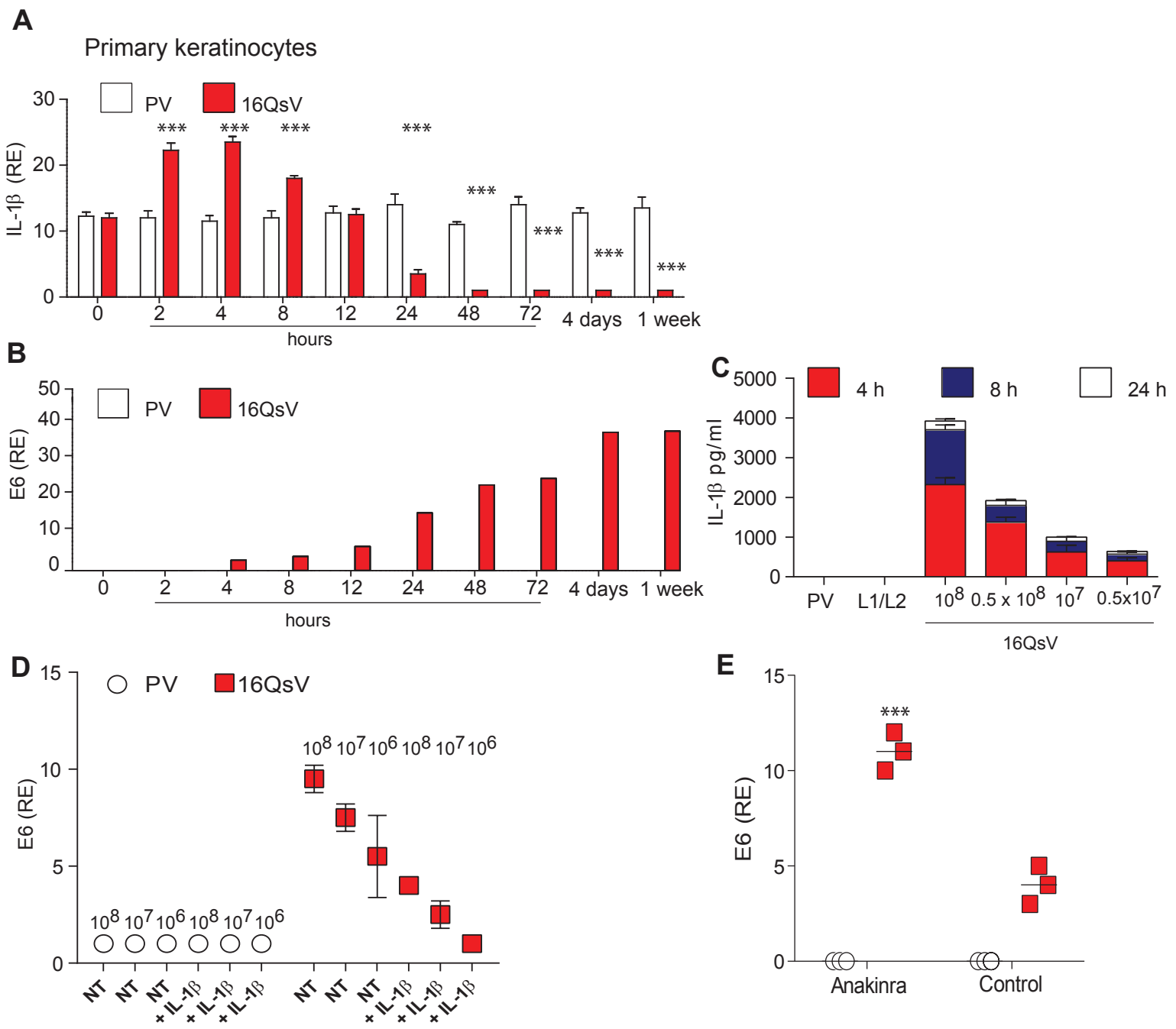


Figure 1

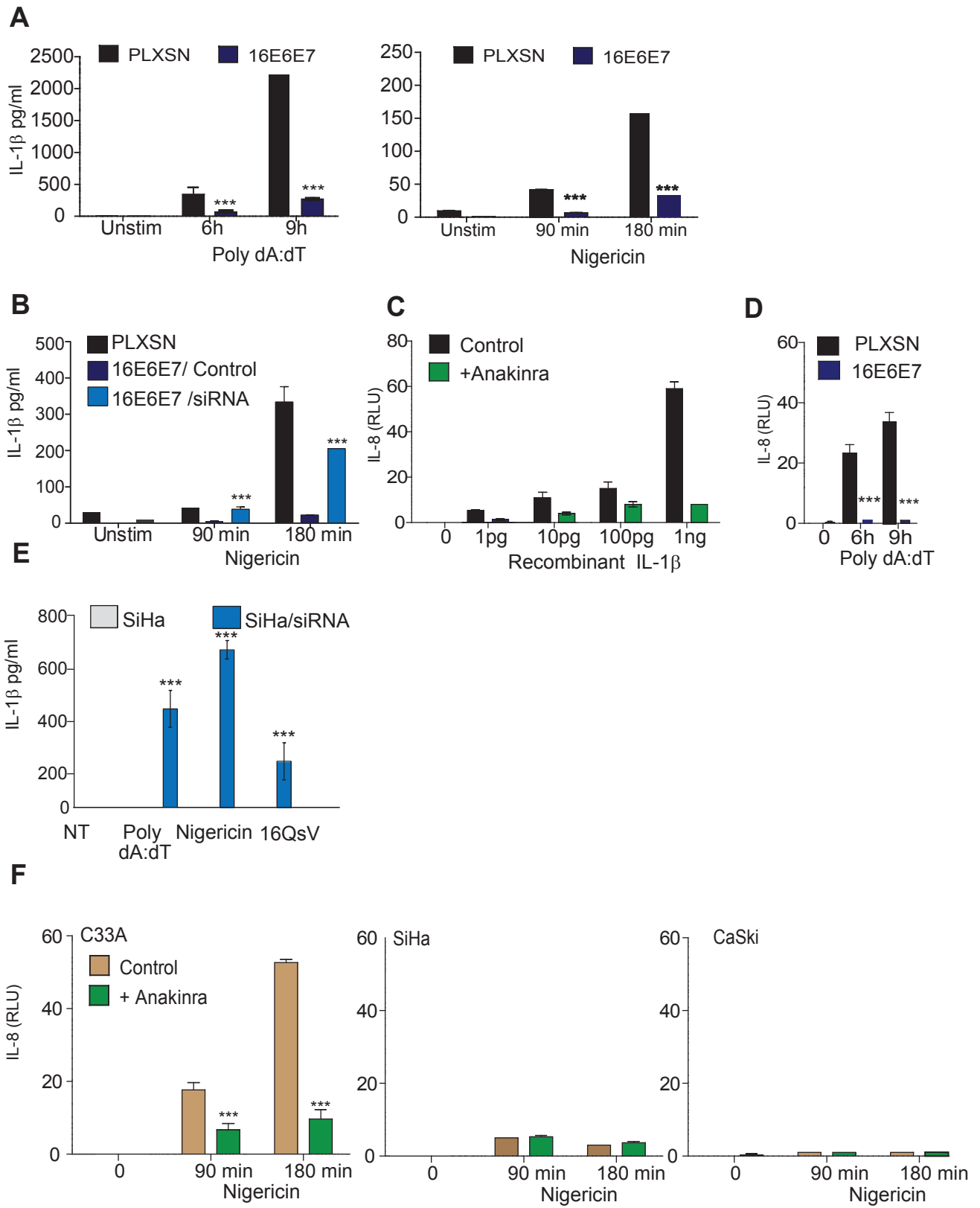


Figure 2

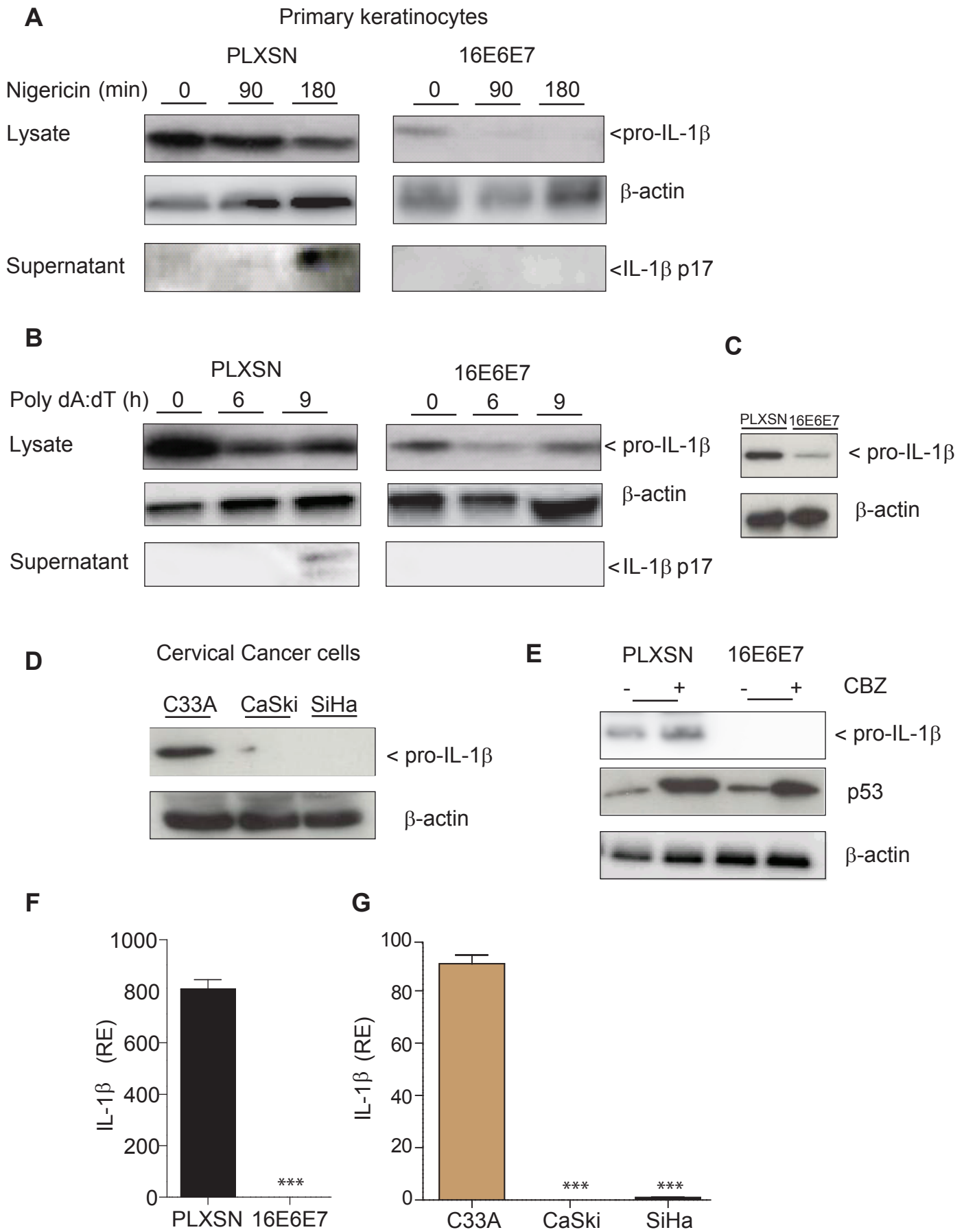


Figure 3

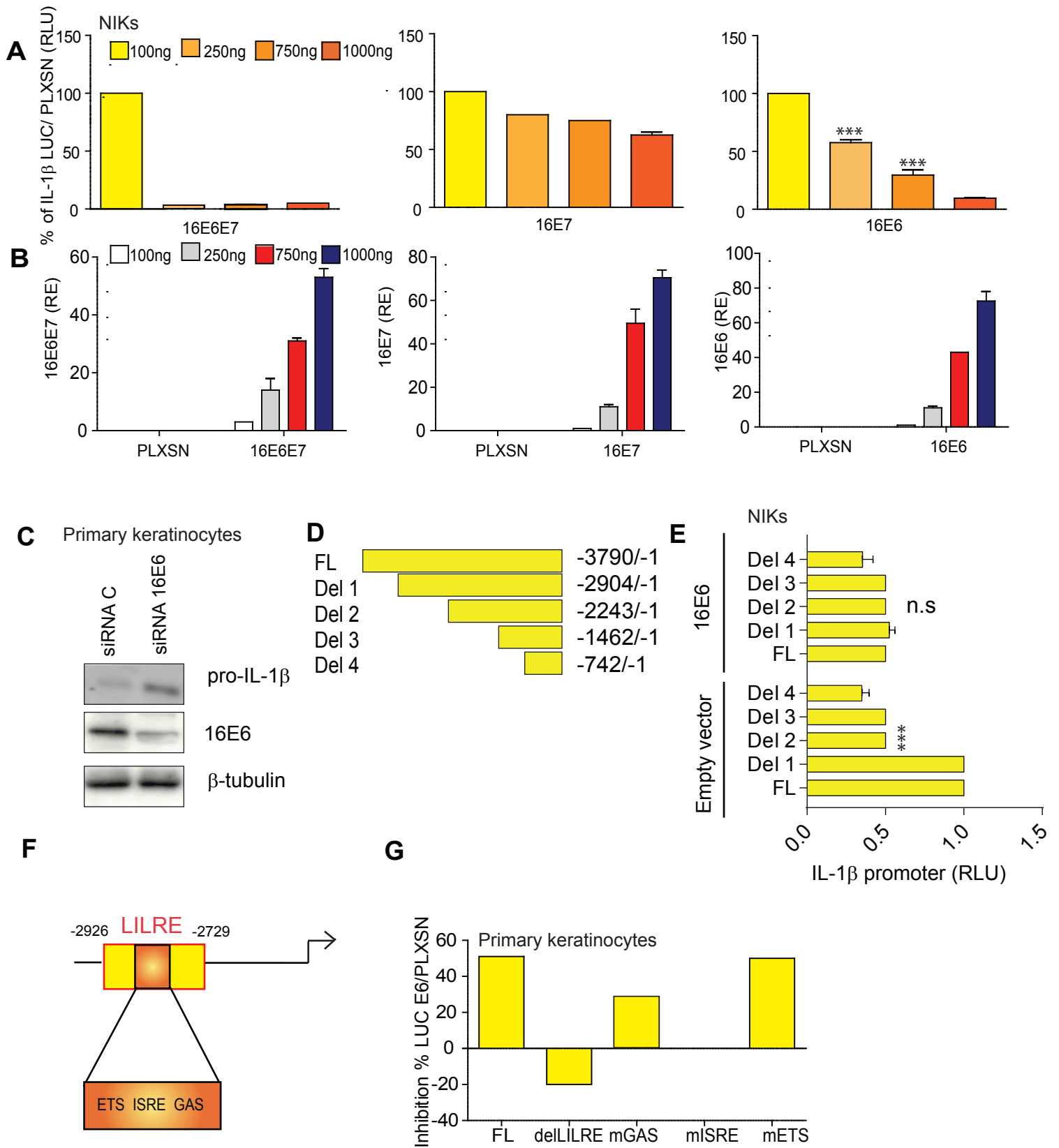


Figure 4

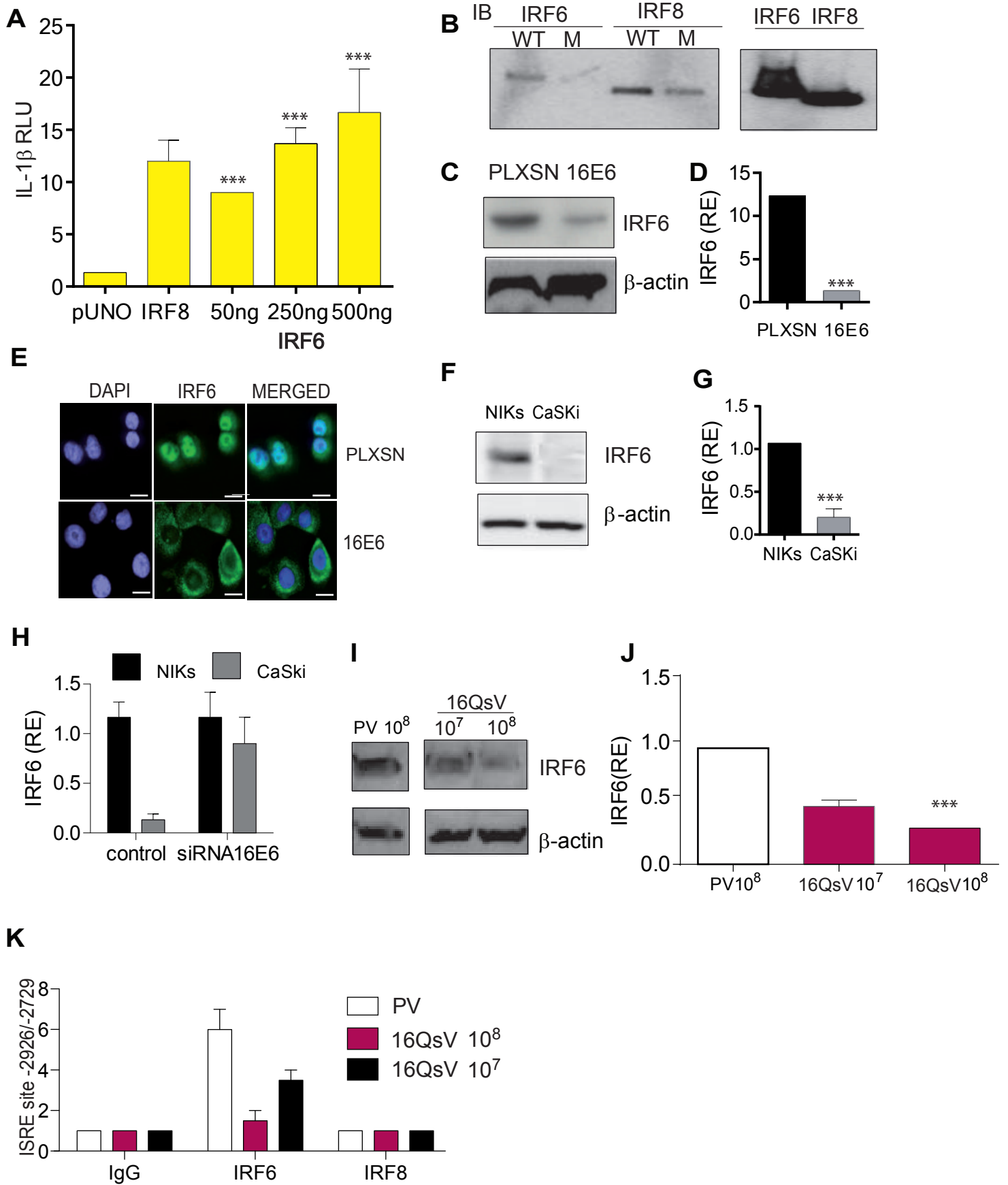


Figure 5

A

	p53	E6AP	PDZ
WT	degrades	binds	binds
F47RdelPBM	cannot bind or degrade	binds	no binding
delPBM	degrades	binds	no binding
4C/4S K11E	impaired binding and degrading	binds	binds

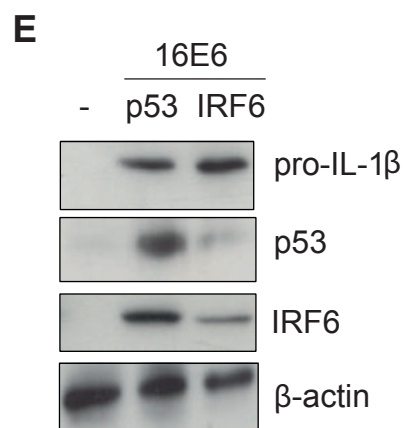
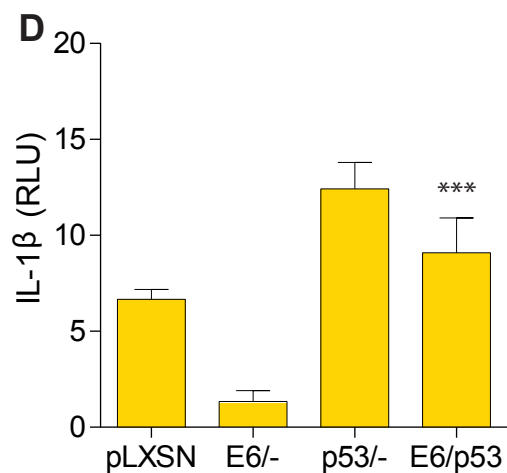
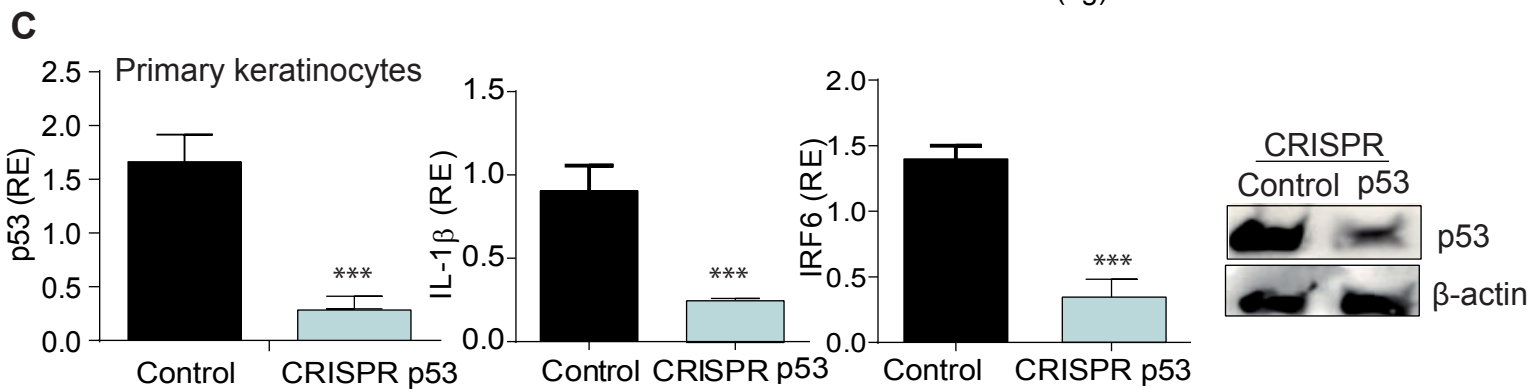
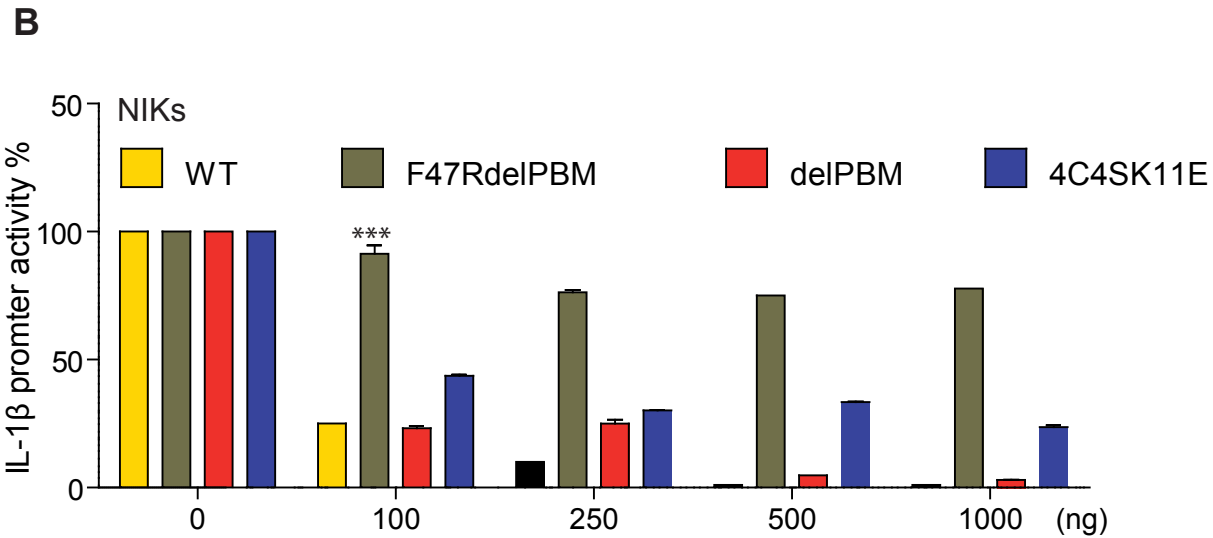


Figure 6

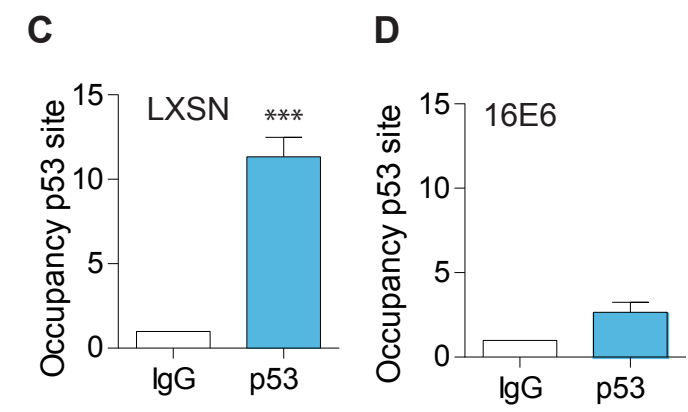
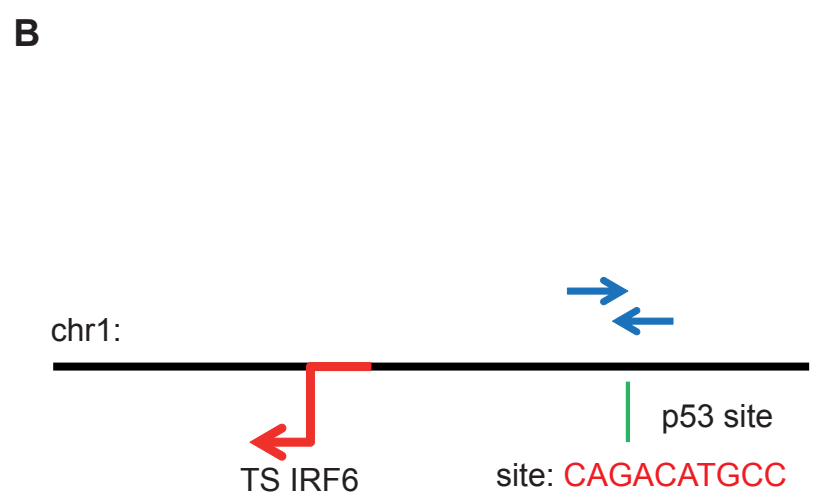
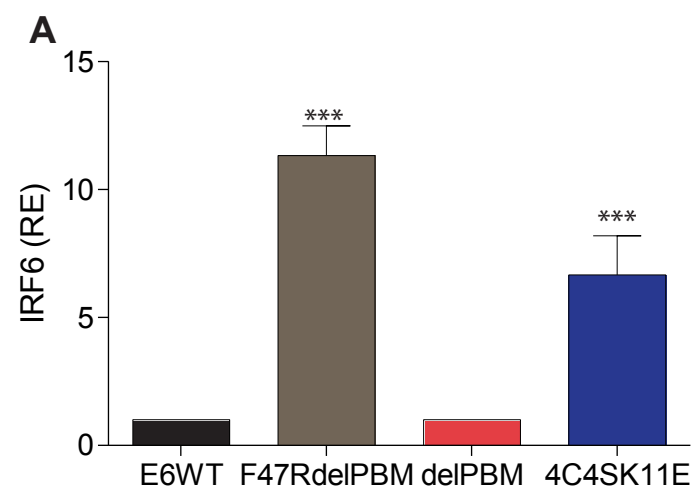
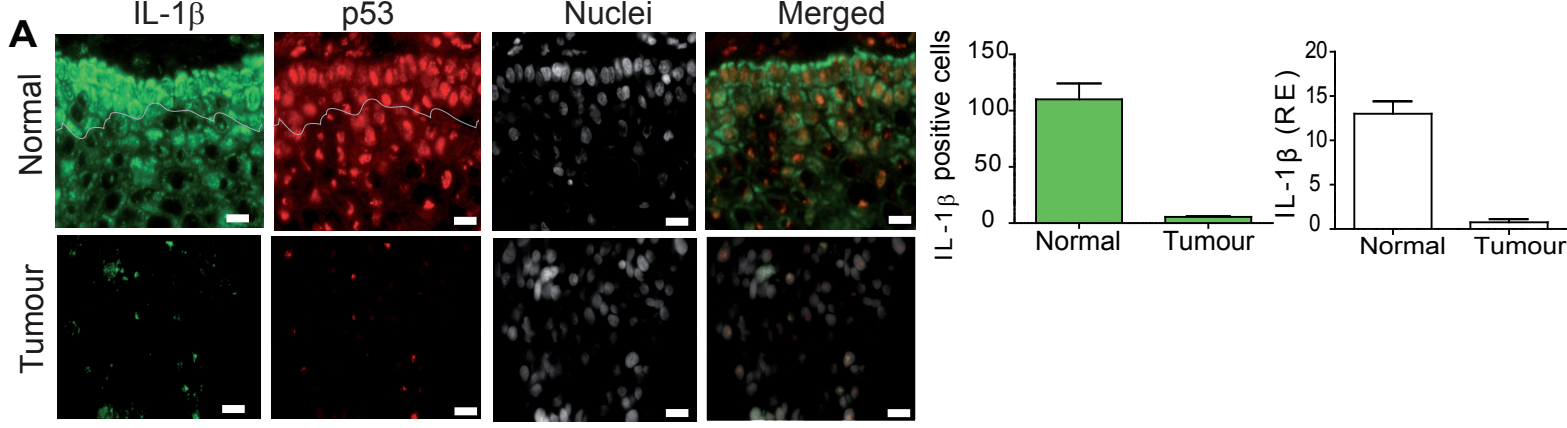
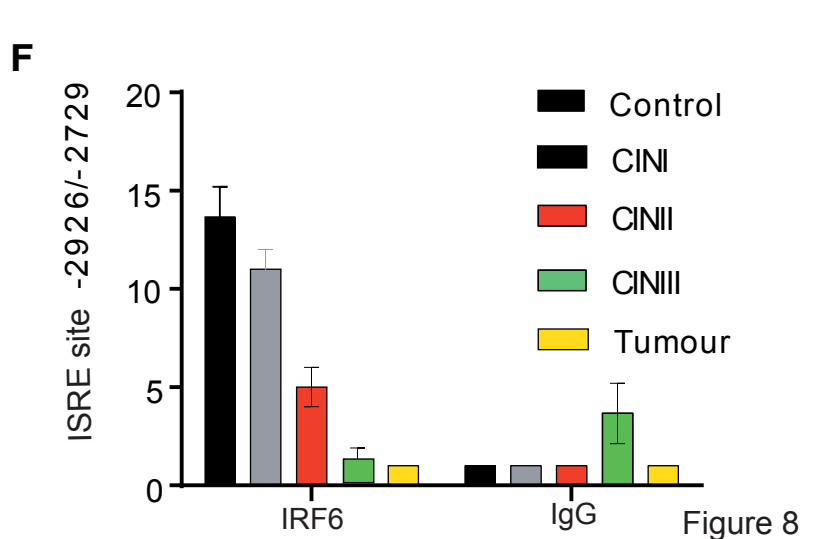
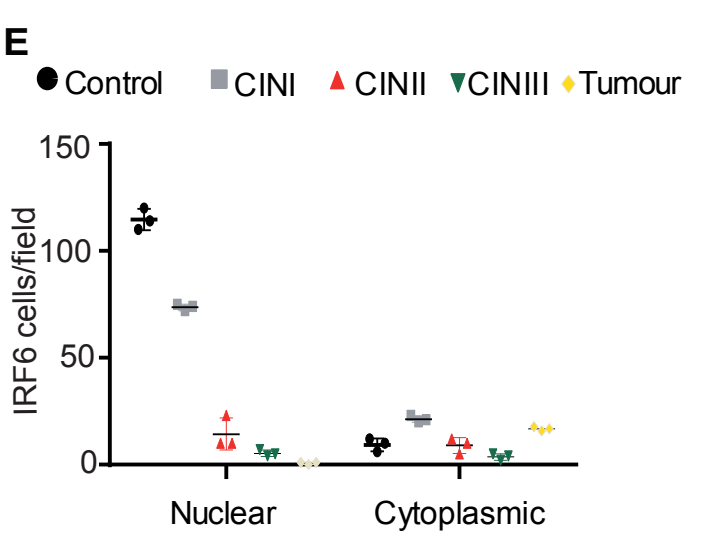
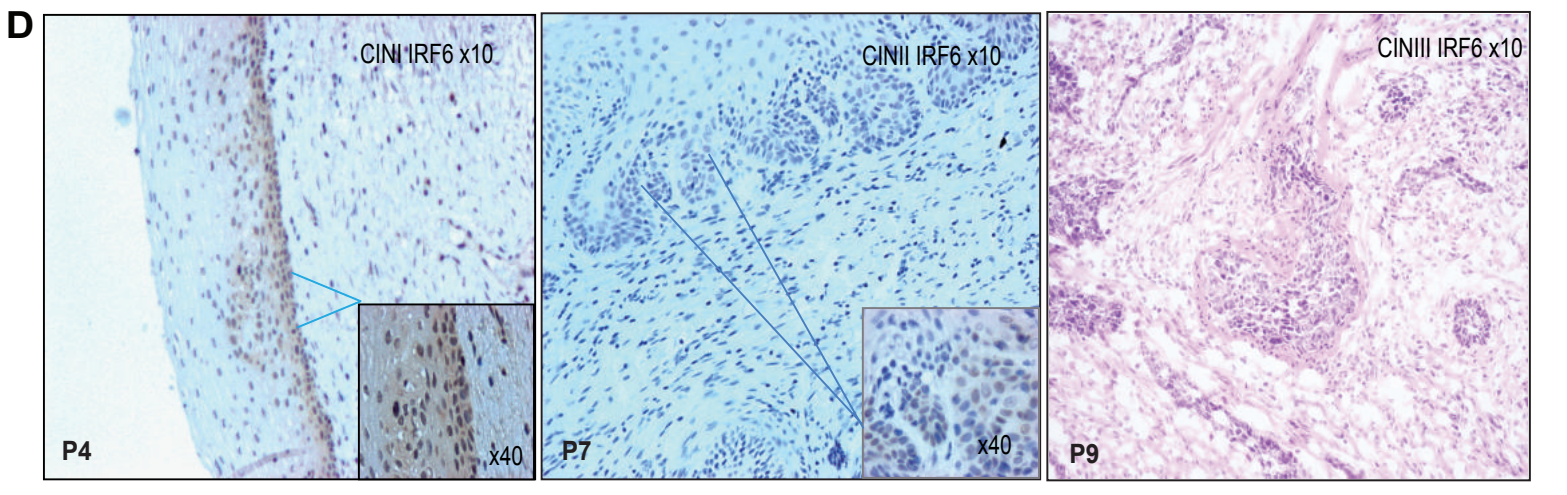
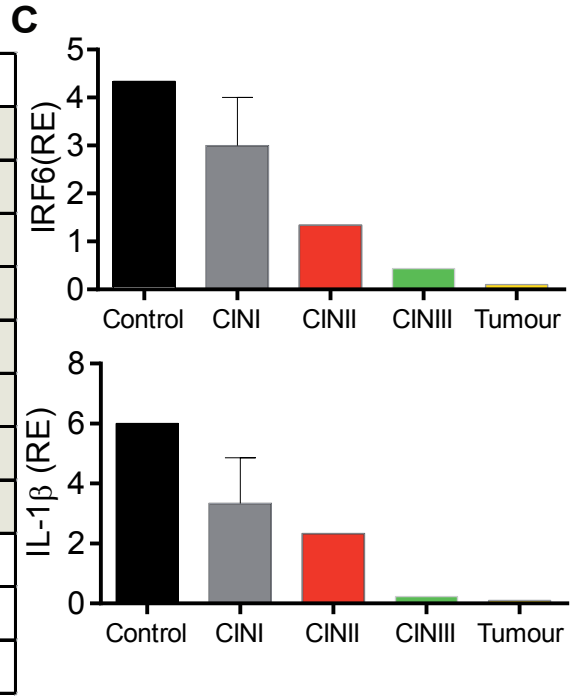


Figure 7



B

	Control	CINI	CINII	CINIII
P0	***			
P1		**		
P2		***		
P3		***		
P4		**		
P5			**	
P6			**	
P7			*	
P8				*
P9				-
P10				-



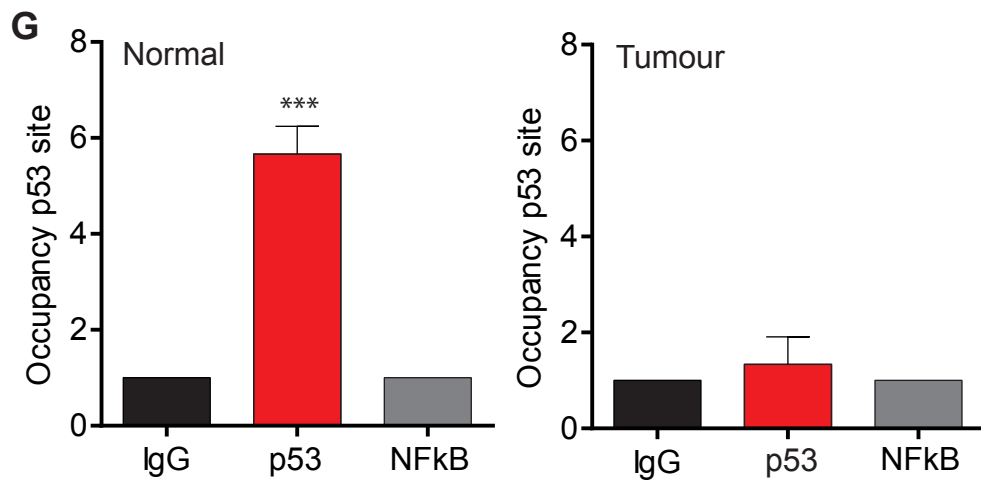
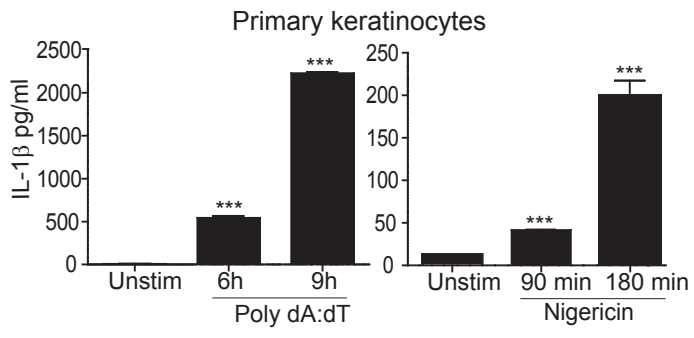
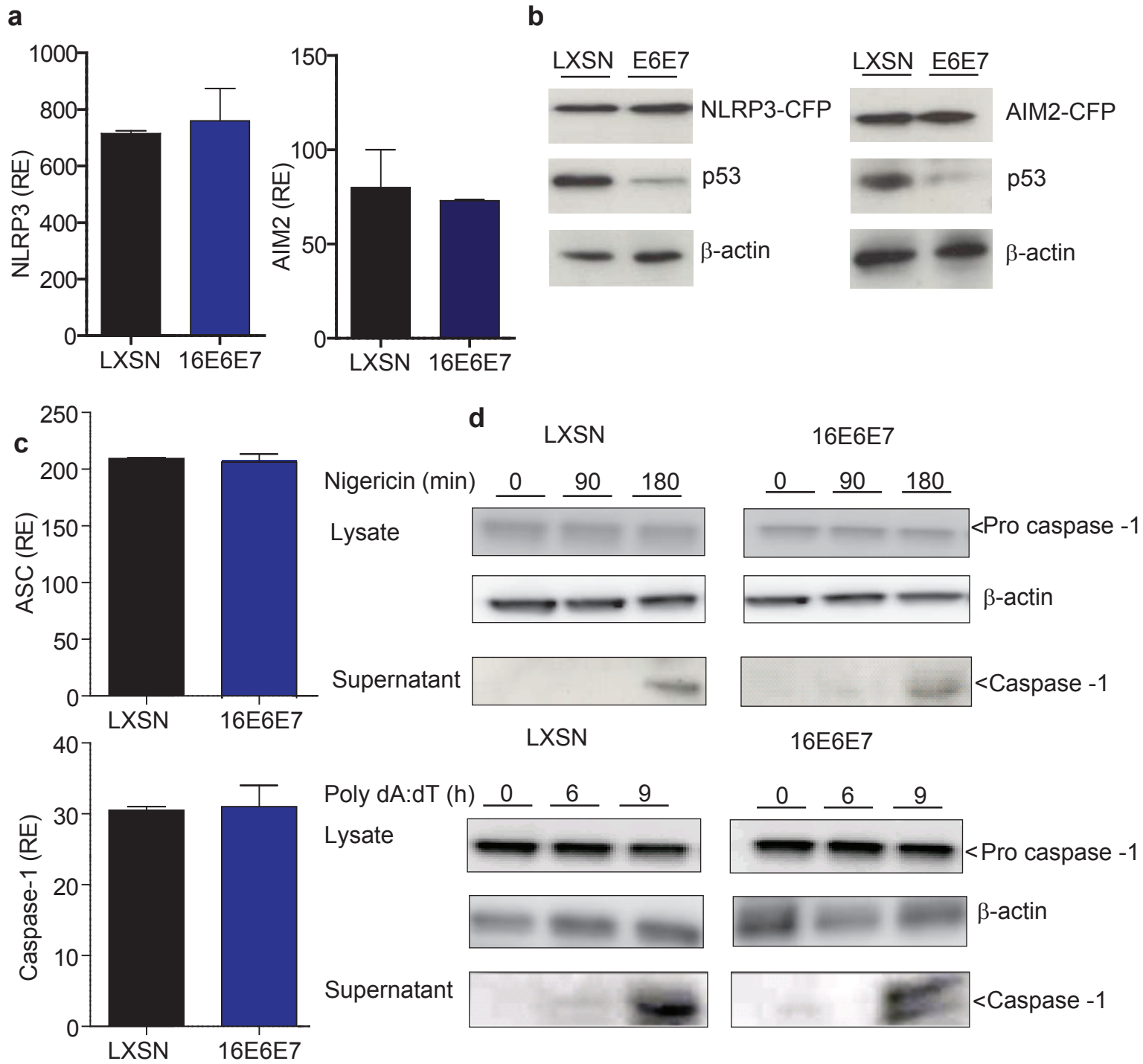
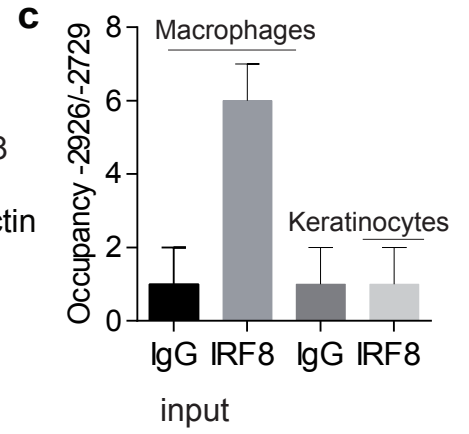
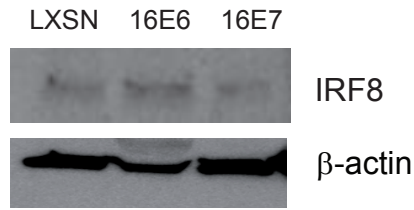
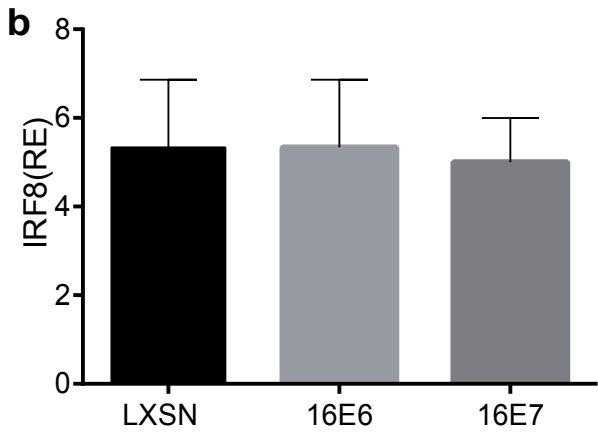
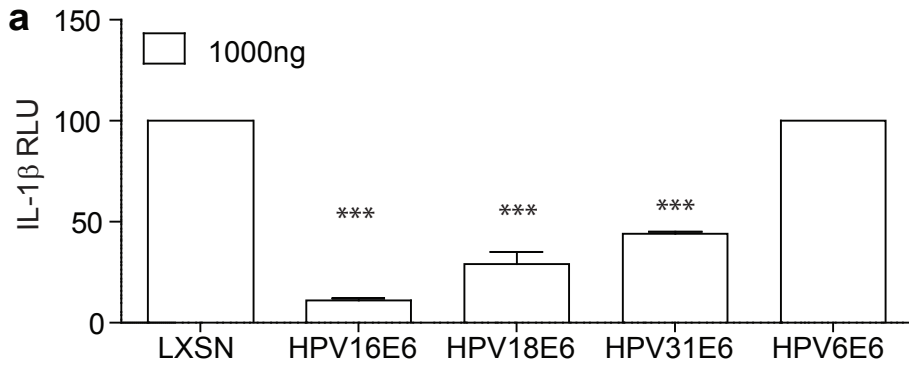


Figure 8

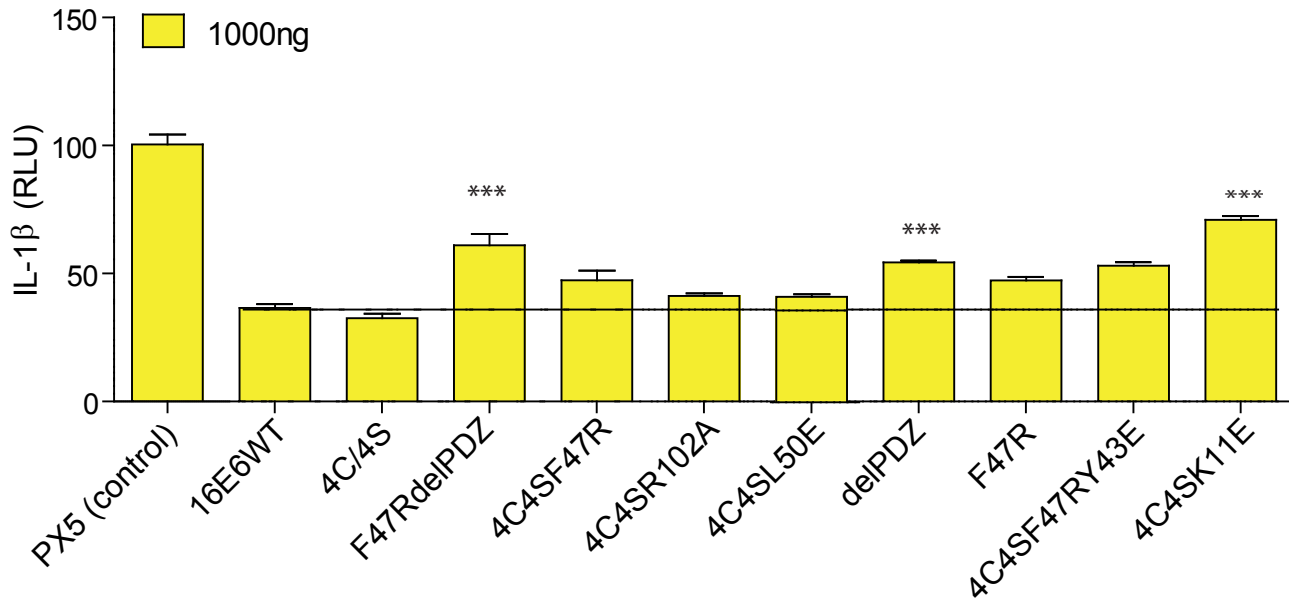






a

	p53	E6AP	PDZ
WT	binds/degrades	binds	binds
4C/4S	binds/degrades	binds	binds
F47R Δ PDZ	cannot bind or degrade	binds	cannot bind
4C4SF47R	cannot bind or degrade	binds	binds
4C4SR102A	cannot bind or degrade	cannot bind	binds
4C4SL50E	cannot bind or degrade	cannot bind	binds
Δ PDZ	binds/degrades	binds	cannot bind
F47R	cannot bind or degrade	binds	binds
4C4SF47RY43E	cannot bind or degrade	binds	binds
4C4SK11E	cannot bind or degrade	binds	binds

**b**