



Effets antiviraux de l'agonisation des Toll-like Récepteurs dans les cellules du foie, une nouvelle stratégie immunothérapeutique dans la lutte contre HBV

Ludovic Aillot

► To cite this version:

Ludovic Aillot. Effets antiviraux de l'agonisation des Toll-like Récepteurs dans les cellules du foie, une nouvelle stratégie immunothérapeutique dans la lutte contre HBV. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1139 . tel-01911181

HAL Id: tel-01911181

<https://theses.hal.science/tel-01911181>

Submitted on 2 Nov 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 :
2018LYSE1139



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Immunologie et virologie
Discipline : Infectiologie

Soutenue publiquement le 07/09/2018, par :
Ludovic AILLOT

Effets antiviraux de l'agonisation des Toll-like Récepteurs dans les cellules du foie, une nouvelle stratégie immuno- thérapeutique dans la lutte contre HBV.

Devant le jury composé de :

Mr Pr Mathias FAURE, PU CIRI/UCLBL1

Président du jury

Mme Dr Lena ALEXOPOULOU, DR2 CNRS CIML, Marseille
Mr Dr Ivan HIRSCH, PA Université Charles de Prague, Rép. Tchèque

Rapporteuse
Rapporteur

Mme Dr Caroline ASPORD, CR EMR EFS-UGA-INSERM U1209- CNRS
, Grenoble

Examinatrice

Mr Dr David DURANTEL, DR2 Inserm U1052/CRCL, Lyon

Directeur de thèse

N°d'ordre NNT :
2018LYSE1139



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Immunologie et virologie
Discipline : Infectiologie

Soutenue publiquement le 07/09/2018, par :
Ludovic AILLOT

Effets antiviraux de l'agonisation des Toll-like Récepteurs dans les cellules du foie, une nouvelle stratégie immuno- thérapeutique dans la lutte contre HBV.

Devant le jury composé de :

Mr Pr Mathias FAURE, PU CIRI/UCLBL1

Président du jury

Mme Dr Lena ALEXOPOULOU, DR2 CNRS CIML, Marseille
Mr Dr Ivan HIRSCH, PA Université Charles de Prague, Rép. Tchèque

Rapporteuse
Rapporteur

Mme Dr Caroline ASPORD, CR EMR EFS-UGA-INSERM U1209- CNRS
, Grenoble

Examinatrice

Mr Dr David DURANTEL, DR2 Inserm U1052/CRCL, Lyon

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

« Nous agissons dans l'ombre pour éclairer le monde » Altaïr Ibn-La'Ahad

A mes grands-parents...

Résumé

Effets antiviraux de l'agonisation des Toll-like Récepteurs dans les cellules du foie, une nouvelle stratégie immuno-thérapeutique dans la lutte contre HBV.

Le virus de l'hépatite B (HBV) infecte chroniquement près de 240 millions d'individus dans le monde. L'infection chronique par HBV est un souci de santé publique majeur puisque l'infection peut évoluer au cours du temps vers la cirrhose et/ou l'hépatocarcinome (CHC). Malgré l'existence de traitements efficaces à base d'analogues de nucléos(t)ides permettant de diminuer la charge virale chez les patients, ceux-ci nécessitent une prise médicamenteuse à vie. En effet, malgré la diminution importante du risque de développer un cancer du foie, ces traitements ne permettent pas l'élimination définitive du virus. Les cellules infectées par HBV sont les hépatocytes du foie, qui remplissent la majorité des rôles vitaux de cet organe. La formation d'un minichromosome viral au sein de ces cellules infectées appelés ADNccc (pour ADN circulaire-covalamment-clos), est majoritairement responsable de la persistance du HBV. Les traitements actuels utilisés sont principalement des analogues de nucléos(t)ides et ceux-ci n'ont pas ou peu d'effets sur l'ADNccc. La nécessité de développer de nouvelles stratégies antivirales visant à éliminer définitivement HBV a donc conduit de nombreux laboratoires, dont le nôtre, à étudier l'utilisation de stratégies immuno-thérapeutiques incluant des stimulateurs de l'immunité innée (agonistes de TLR7, TLR8, RIG-I...) dans le cadre d'infections chroniques. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation de ligands stimulant les récepteurs de l'immunité innée promouvait un fort effet antiviral, médié par la production endogène et locale de cytokines pro-inflammatoires et l'induction de gènes régulés par l'interféron (ISG).

Dans ce but, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux potentiels effets antiviraux de l'agonisation des senseurs de l'immunité innée les plus connus, les Toll-like récepteurs (TLR), dans le cadre de l'infection par HBV dans les cellules hépatiques. La stratégie immuno-thérapeutique envisagée, vise à stimuler aussi bien les cellules immunitaires que les hépatocytes infectés.

La caractérisation de l'expression de différents senseurs de l'immunité innée, d'une part dans les cellules primaires isolées du foie et d'autre part dans certaines lignées cellulaires correspondantes, nous a permis d'avoir une vue d'ensemble 1) des récepteurs exprimés par les différentes cellules du foie notamment dans les hépatocytes (TLR2/TLR3/TLR4/TLR5) ; 2) d'évaluer la fonctionnalité de ceux-ci pour la production de cytokines (IL-6 ; IP-10) lors de leur agonisation 3) d'évaluer les modèles disponibles parmi les lignées cellulaires les plus proches

immunologiquement des cellules hépatiques. Les cellules HepaRG et une nouvelle lignée dérivée des macrophages du foie les iKC par exemple sont plus proches respectivement des hépatocytes et des macrophages primaires hépatiques et sont donc des modèles relevant pour les études immuno-thérapeutiques. L'utilisation de ligands de TLR2 et TLR3 sur des hépatocytes infectés chroniquement par HBV, a montré le plus fort effet antiviral (incluant une médiation par la sécrétion de cytokines et l'induction d'ISG) aussi bien sur la réplication d'HBV que sur l'ADNccc. De plus, cet effet semble stable au cours du temps sans résurgence massive de productions virales. Cette stratégie cible non seulement les hépatocytes infectés, mais également les cellules immunitaires dont les productions cytokiniques ont également un fort effet antiviral. Bien que l'effet *in vivo*, dans un modèle murin, ait été plus modeste, un ajustement des doses d'agonistes utilisées ainsi qu'un meilleur moyen de délivrance au foie de ligands de TLR2 ou TLR3 pourraient être une stratégie immuno-thérapeutique intéressante. Enfin nous nous sommes intéressés au cas particulier de l'agonisation du TLR9 en présence d'HBV. Nous avons mis en évidence une interaction entre les ligands de type ADN synthétique, comme les CpG ODN, ou non et les particules HBV complètes. Cette interaction a pour effet d'une part d'inhiber l'entrée du virus dans les hépatocytes et d'autre part d'empêcher le ligand d'atteindre son récepteur dans les pDC, le TLR9. Ces deux mécanismes sont responsables respectivement d'une diminution de l'infection virale lors de son établissement en cellules naïves et d'une diminution de synthèse d'IFN- α , qui n'est pas due à une inhibition de la voie TLR9, mais à un défaut d'accès du ligand sur son récepteur. Une diminution de la synthèse de l'IFN- α , en lien avec la voie de signalisation de TLR9, a cependant pu être observée en présence des particules subviraux HBsAg et en absence de toute interaction avec le ligand de TLR9 de ces dernières.

Il semblerait donc que l'utilisation d'agonistes de TLR représente une méthode intéressante dans la mise en place de nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques anti-HBV. Cependant, leur perfectionnement dépendra de l'évaluation de mécanismes inhibiteurs viro-induits ainsi que de meilleures voies d'administrations hépato-spécifiques de ces ligands.

Mots clefs : HBV, Toll-like récepteurs, Antiviraux, Immunité innée

Abstract

Antiviral effects by Toll-like receptors agonisation in liver cells, a new immuno-therapeutic strategy in the fight against HBV.

HBV chronically infects 240 million peoples around the world. HBV chronic infection is a major public health problem and can lead to cirrhosis or/and hepatocarcinoma (HCC). Even if some efficient treatments are already available, based in particular on the use of nucleos(t)ides analogues that induce a decrease of viral load in patients, these drugs do not lead to a definitive HBV cure. They enable an important decrease of liver cancer risk but need to be taken life-long. HBV infects hepatocytes the major liver cells which are involved in many vital mechanisms into the organism. The HBV minichromosome, which is formed into infected cells also called cccDNA (i.e., covalently-closed-circular DNA), is not affected by nucleos(t)ides treatments and thus is responsible for HBV persistence. The use of immune receptors (e.g. Toll-like receptors/TLR) agonists can lead to 1) an important cytokines/interferon (IFN) secretion; 2) promote immune cells activation/recruitment and 3) induction of many Interferon-Stimulated Genes (ISG). These mechanisms could lead to a greater viral clearance by cccDNA degradation or silencing. The need for new strategies to permanently eliminate HBV infection led many laboratories, including ours, to explore the use of immunotherapeutic treatments in a context of chronic infection, including innate immune stimulators (e.g. TLR7, TLR8 or RIG-I agonist are under clinical trials).

To this end, we got interested on the potential anti-HBV effects of many TLR agonists in liver cells. Our strategy is to stimulate both infected hepatocytes and immune cells.

We first characterized the expression of innate immune sensors in primary liver cells as well as in some liver cell lines. This allowed us to: 1) identify which sensors are expressed by liver cells, especially in hepatocytes (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5); 2) evaluate their ability to produce cytokines (IL-6, IP-10) upon agonisation; 3) evaluation of cell lines model which are immunologically closed to the primary liver cells. HepaRG and a new liver macrophage cell line call iKC are immunologically close to their primary cells and appear to be relevant models for immune-therapeutics studies.

The use of TLR2 and TLR3 agonists on HBV chronically infected hepatocytes showed a strong antiviral effect (i.e., decrease of HBV replication and cccDNA level) mediated directly by NF-

kB-inducible and ISG genes activation and indirectly by cytokines secretion. Furthermore, this effect was shown stable over time without any viral replication rebound. This strategy targets not only infected hepatocytes but also immune cells, whose cytokines production also has a strong antiviral effect. Despite a weak *in vivo* effect in mice, a tuning in agonist doses used and better liver delivery could be an interesting immune-therapeutic strategy. Finally, we were investigated the particular case of TLR9 agonisation in presence of HBV. We showed an interaction between synthetic or not DNA ligands such as CpG ODN and HBV particles. This interaction leads in one hand, to HBV entry inhibition in hepatocytes, on the other hand, to a blockage of ligand delivery to TLR9 in pDC, which is not due to an inhibition of the TLR9 pathway, but to a lack of access of the ligand to its receptor. These two mechanisms are responsible for a decrease of viral infection during its establishment and a decrease in IFN synthesis by pDC, respectively. A decrease in IFN production, which this time was linked to a *bona fide* inhibition of the TLR9 pathway, in the presence of the sub-viral particles HBsAg was still observed, without retention of TLR9 ligand of the latter.

It would seem, therefore, that use of TLR agonists represent an interesting strategy in setting up new anti-HBV immune-therapeutic approaches. However, their improvement will depend on the evaluation of viro-induced inhibitory mechanisms as well as better ways of *in vivo* delivering these ligands.

Key words : HBV, Toll-like receptors, Antivirals, Innate immunity

Table des matières

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1.....	5
Résumé.....	7
Abstract.....	9
Table des matières.....	11
Figures.....	14
Abréviation.....	16
I- Introduction.....	20
A-Immunologie du foie.....	20
1-Généralités sur le foie et ses fonctions biologiques.....	20
2-Les cellules impliquées dans l'immunologie du foie.....	20
a- Les cellules de l'immunité innée.....	23
a.1-Cellules de Kupffer/Macrophages.....	24
a.2-Granulocytes.....	25
a.3-NK (Natural Killer).....	26
a.4-Les cellules Dendritiques.....	28
b- Les cellules de l'immunité adaptative.....	35
b.1-Lymphocytes T CD4+.....	36
b.2-Lymphocytes TCD8+.....	37
b.3-NKT et MAIT.....	38
b.4-Lymphocytes B.....	38
c- Les cellules spécifiques du foie.....	40
c.1-Hépatocytes.....	40
c.2-LSEC.....	41
c.3-Cellules étoilées.....	41
3-Senseurs de l'immunité innée dans le foie.....	42
a-Les Toll-Like Receptors (TLR).....	44
b-Les RIG-I-Like Receptors (RLR).....	46
c-Les senseurs cytoplasmiques à ADN (CDS).....	47
d-Les NOD-Like Receptors (NLR).....	48
e-Les C-type-Lectine Receptors (CLR) et récepteurs ITAM/ITIM.....	50
f- Inhibition via les récepteurs CLR/ITAM/ITIM de l'activation des TLR, le cas de la voie de l'interféron dans les pDC.....	52
4-Cytokines.....	53
B-Le virus de l'hépatite B (HBV).....	57

1-Généralités sur le virus de l'hépatite B	58
a-Le Virus	58
a.1- Classification	58
a.2-Génome et capacité codante	59
a.3-Particules virales et particules subvirales.	63
a.4-Cycle viral et ADNccc	65
2-Pathogénèse du HBV et interaction avec l'immunité	67
a-Pathogénèse	67
a.1- Mode de transmission	67
a.2-Evolution de l'infection	67
a.3-Cirrhose et Hépatocarcinome.....	69
b-Infection et hépatite chronique B et immunité	70
b.1-Les senseurs immunitaires innées impliqués dans la reconnaissance d'HBV	70
b.2-Inhibition de la réponse immunitaire innée par HBV.....	73
b.3-Inhibition de la réponse immunitaire adaptative par HBV	76
3-Prise en charge de l'infection chronique par HBV	77
a-Traitements actuels et recommandations.....	77
a.1-Marqueurs de suivi et vaccination	77
a.2-IFN- α et PegIFN	78
a.3-NUC	80
b-Nouveaux Traitements directs.....	82
b.1-Nouveaux marqueurs de suivi	83
b.2-Myrcludex.....	84
b.3-CpAM	84
b.4-NAP	85
c-Nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques	86
c.1- Agonistes de PRR	86
c.2- Crispr-Cas9 et cellules CAR-T	88
c.3- Combinaison DAA/Immunothérapies	90
II- Objectifs et hypothèses de travail.....	93
Méthodes d'isolation des cellules primaires :	97
III- Résultats	99
Etude 1 : Characterisation of Pattern Recognition Receptors (PRR) expression and functionality in liver primary cells and derived cell lines	99

Etude 2 : Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immuno-competent hepatocytes	116
Etude 3 : Interaction between Toll-Like Receptor 9-CpG Oligodeoxynucleotides and Hepatitis B Virus Virions Leads to Entry Inhibition in Hepatocytes and Reduction of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells	139
IV- Discussion/perspectives	165
Références	180
REMERCIEMENTS	192
Annexe	197
Annexe 1 : Interference of Hepatitis B Virus (HBV) with liver macrophage function promotes hepatocyte infection	197
Annexe 2 : Sensor expression primary cells and cell lines. Derived from Study 1 Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018 (page 99).	250

Figures

Figure 1 : Répartition des populations immunitaires au niveau du foie humain (adaptée de Gruffaz et al en préparation)	21
Figure 2 : Répartition des cellules immunitaires innées et adaptatives et caractéristiques des deux réponses. (adaptée de Dranoff G 2004; Faure-Dupuy S non publié)	21
Figure 3 : Organisation schématique du foie (adaptée de Faure--Dupuy S non publié).....	22
Figure 4 : Comparaison entre la répartition des DC au sein des LMNC et des PBMC (adaptée de Gruffaz et al en préparation).....	28
Figure 5 : Classification des principales DC : A) origines et B) caractéristiques (adaptée de Durand M et Segura E 2015 ; Villani A-C et al 2017 ; Alculumbre S et al 2017 ; See P et al 2017).....	35
Figure 6 : Activation des TLR, NLR et signalisations induites (adaptée de Faure--Dupuy S; Invivogen)	43
Figure 7 : Activation des CLR, RLR et CDS et signalisation induite (adaptée de Faure--Dupuy S; Invivogen)	49
Figure 8 : Activation de la voie interféron sous contrôle de récepteurs inhibiteurs (adaptée de Cao W et Bover L 2010 ;Bao M et Liu Y-J 2013 ; Hirsch I et al 2017)	52
Figure 9 : Expression des TLR de différentes cellules immunitaires innées et adaptatives	54
Figure 10 : Répartition des cytokines pro et anti inflammatoires	54
Figure 11 : Immunologie du foie simplifié (adaptée de Schmidt SV et al 2012; Rehmann B 2013; Heymann F et al 2015.) voir page ci-après.	55
Figure 12 : Répartition géographiques des personnes infectées chroniquement par HBV dans le monde (Global Hepatitis Report WHO 2017 PDF online).	57
Figure 13 : Génome de HBV et ses différents transcrits (adaptée de Liang et al 2009)	59
Figure 14 : Particules virales et sub-virales retrouvées lors de l'infection par HBV	62
Figure 15 : Cycle viral du HBV (adaptée de Testoni B et al 2017)	64
Figure 16 : Evolution, variabilité et nouvelle nomenclature des phases d'infections chroniques par HBV (adaptée de EASL CPG HBV 2017 ; Lok A et al 2017)	67
Figure 17 : Reconnaissance des particules d'HBV par l'hépatocytes et signalisations engendrées (adaptée de Faure--Dupuy et al 2017).....	71
Figure 18 : Mécanisme inhibiteurs décrit sur les cellules immunitaires du foie et leurs senseurs par HBV (adaptée de Faure--Dupuy et al 2017).....	74

Figure 19 : Principaux variants d'HBV résistant aux NUC (adaptée de Lampertico P et al 2017) R : résistant ; I : Intermédiaire/ faible sensibilité ; S : sensible.....	80
Figure 20 : Efficacité des traitements actuels 6 mois après la thérapie de 48 à 52 semaines (Lampertico P et al 2017).....	81
Figure 21 : Cibles thérapeutiques virales à l'étude ou en développement pour HBV. (Testoni et al 2017).....	82
Figure 22 : Stratégies envisagées utilisant les DAA et l'immunothérapie dans la lutte contre l'infection chronique HBV (Ferrari C 2015; Testoni B et al 2017; Durantel D 2017; Soriano V et al 2017).....	92
Figure 23 : Effet antiviral sur la sécrétion d'HBsAg des agonistes de PRR dans le modèle HepaRG chroniquement infecté par le HBV.....	95
Figure 24 : Purification des différentes cellules du foie.....	97
Figure 25 : Purification des cellules du sang périphérique	98
Figure 26 : Résumé de l'expression des PRR, des adaptateurs et des récepteurs inhibiteurs dans les cellules hépatiques. (Faure-Dupuy S et al 2018).....	168
Figure 27 : Effet antiviral direct des ligands de TLR2 et TLR3 dans les hépatocytes infectés par HBV (adaptée de Lucifora J et al 2018).....	171
Figure 28 : Résumé graphique de l'interaction entre le CpG ODN et la particules virales HBV.	175

Abréviation

AAV	Virus Adéno-Associé
ADNccc	ADN covalent clos circulaire
ADNrc	ADN circulaire relâché
ADNsb/db/dbl	Acide désoxyribonucléique simple brin/double brin/double brin linéaire
ALAT	Alamine amino-transférase
AP-1	Activator Protein-1
ARNm/pg	Acide Ribonucléique messenger/ pré-génomique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
Bcl-10	B-cell lymphoma/leukemia 10
BCR	B cell receptor
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domains
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T cell
Cas9	Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats Associated protein 9
CCL19/21	C-C motif Chemokine 19 et 21
CCR7	C-C Chemokine Receptor type 7
CD	Cluster de différenciation
cDC	DC conventionnel
CMH	Complexe Majeur D'histocompatibilité
CNK	Connector eNhancer of KSR
CRE	Cys-Regulatory Elements
DAMP	Danger associated molecular pattern
DDX3	DEAD box RNA helicase 3
DC	Cellule Dendritique
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAS/FASL	First Apoptosis Signal receptor/ligand
HBcAg	Antigène de capside du HBV
HBcr	Hepatitis B core-related antigen
HBeAg	Antigène e du HBV

HBsAg	Antigène de surface du HBV
HBSP	Hepatitis B Spliced Protein
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HIV	Virus de l'immunodéficience Humaine
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HSV	Virus de l'herpès simplex
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
iE-DAP	γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukine
iMATE	intrahepatic Myeloid-cell Aggregates for T cell population Expansion
IRAK	Interleukine-1-Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISG	Gène stimulé par l'Interféron
ISRE	Interferon-sensitive response element
KC	cellules de Kupffer
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors
KSR1	Kinase Suppressor of Ras 1
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LMNC	Liver Mononuclear cell
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cell
LSEctin	Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin
LSP1	Lymphocyte-Specific Protein 1
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MAVS	Mitochondrial Antiviral-Signaling protein

MDA-5	Melanoma Differentiated gene 5
MDP	Muramyl DiPeptide
MR1	MHC-Related molecule-1
MVB	MultiVesicular Body
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein
NBD	Nucleotide-Binding Domain
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NK/NKT/iNKT	Natural Killer/ T récepteur/invariant T récepteur NK
NLRP	NOD-like receptor pyrin domain containing
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like
NTCP	sodium-tauchlorate cotransporting polypeptide
CpG ODN	Oligodésoxynucléotides riches en motifs CpG
ORF	Opening Reading Frames
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1/PD-L1	Programmed cell Death protein 1/Programmed Death Ligand 1
pDC	Plasmacytoïd Dendritic cell
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PYD	Pyrin Domain
RIG-I	Retinoic acid-inductible gene I
RIP2	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2
RLR	RIG-I like receptor
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TANK	TRAF family member associated NF κ B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCR	T cell receptor
TIRAP	TIR-domain containing adapter protein
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL/TRAILR	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand/Receptor

TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WNV	West Nile Virus
ZDHHC1	Zinc finger DHHC-Type Containing 1

I- Introduction

A-Immunologie du foie

1-Généralités sur le foie et ses fonctions biologiques

Le foie est impliqué dans de nombreux domaines indispensables au bon fonctionnement et à la viabilité de l'organisme. Parmi ses fonctions, on retrouve les fonctions digestives permettant la fabrication, le stockage et la libération du glucose ainsi que des lipides dans le corps. La détoxification de l'organisme est une autre fonction primordiale du foie, permettant d'éliminer ou de neutraliser de nombreux toxiques/déchets provenant du métabolisme des cellules ou de leurs ingestions. Celui-ci participe également à la destruction et au recyclage des cellules composant le sang circulant lorsque celles-ci sont arrivées en fin de vie. Il joue également un rôle dans la synthèse de nombreuses protéines impliquées dans le transport ou l'osmose, tel que la transferrine ou l'albumine, dans la coagulation (facteurs de coagulation), ou dans l'immunité par la synthèse des protéines du complément. Le foie, de par sa localisation dans le système digestif et ses nombreuses fonctions vitales, a besoin de se défendre contre les infections par divers pathogènes pouvant l'altérer. Pour prévenir et détecter les potentielles intrusions, le foie est équipé de nombreuses cellules impliquées dans l'immunité, lui permettant de lutter efficacement, mais également d'établir une tolérance pour les pathogènes et/ou leurs dérivés provenant de la veine porte. Nous commencerons donc par décrire les cellules impliquées dans l'immunité hépatique, qu'elles soient professionnelles ou non, puis nous aborderons les senseurs présents au niveau du foie et les réponses immunitaires découlant de leur activation.

2-Les cellules impliquées dans l'immunologie du foie

Le foie est un organe à l'immunité complexe. Sa proximité avec le système digestif et son irrigation importante (notamment via la veine porte), entraînent une exposition constante des cellules hépatiques avec les antigènes provenant de l'alimentation et de la flore intestinale^{1,2}. Ainsi, afin d'éviter un état constant d'inflammation, l'environnement hépatique est particulièrement tolérogène en condition saine. Cependant, l'accumulation de trop grandes quantités de toxines, PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) et/ou DAMP (Danger Associated Molecular Patterns) peut conduire à une inflammation trop importante entraînant

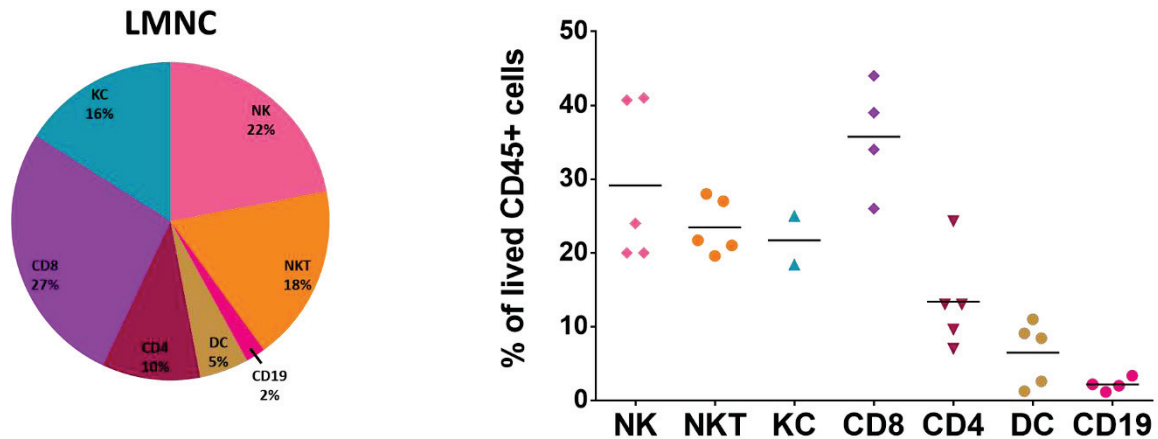


Figure 1 : Répartition des populations immunitaires au niveau du foie humain. (adaptée de Gruffaz *et al* en préparation) Résultats obtenus à partir du phénotypage de 15 explants de foies humains. NK/NKT : Natural Killer/ récepteur T ; KC : cellules de Kupffer ; CD8/CD4 : Lymphocytes T CD8/CD4 ; DC : cellules Dendritiques ; CD19 : Lymphocytes B ;

des dommages à l'organe. Pourtant, grâce à son importante capacité de régénération, il est capable d'assurer un retour à la normale de ses fonctions. Les cellules le composant sont impliquées aussi bien dans les fonctions vitales du foie que dans le maintien d'un environnement immunitaire majoritairement tolérogène, mais pouvant tout de même entrer

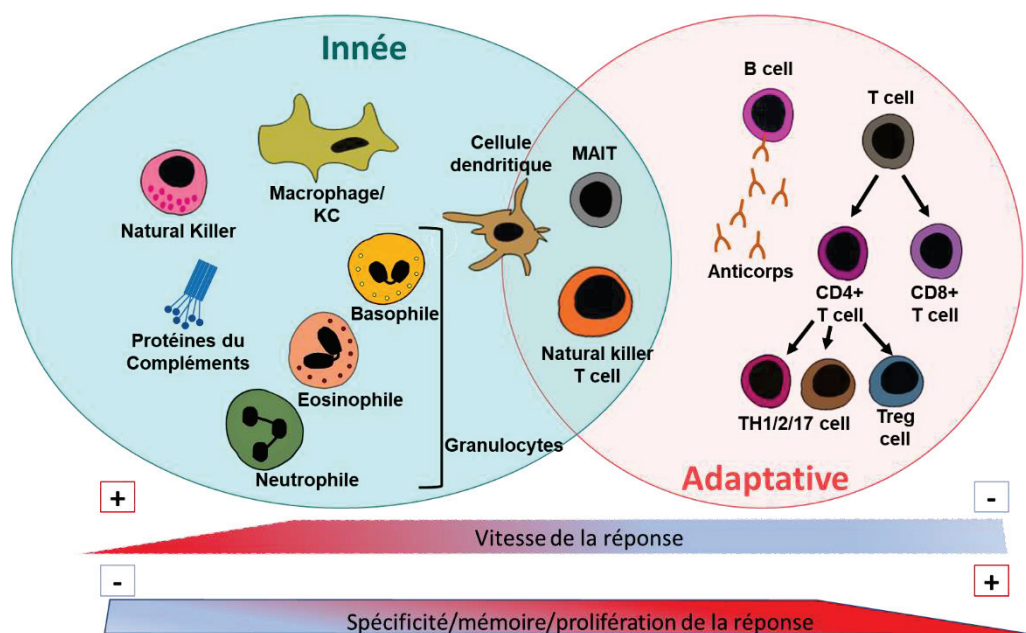


Figure 2 : Répartition des cellules immunitaires innées et adaptatives et caractéristiques des deux réponses. (adaptée de Dranoff G 2004³; Faure-Dupuy S non publié) Représentation schématique des populations leucocytaires majoritaires en fonction de leur vitesse d'activation (+ immunité innée ; - adaptative) et de la spécificité de la réponse (- immunité innée ; + adaptative).

dans un état inflammatoire face au danger. Les cellules immunitaires retrouvées au niveau du foie ont deux origines. Soit, elles proviennent des cellules souches hématopoïétiques et du sang

circulant, soit elles ont pour origine le foie fœtal comme c'est le cas des cellules de Kupffer (KC : cellules macrophagiques) que nous allons décrire ci-après.

De plus, parmi ces cellules, on peut distinguer les cellules de l'immunité innée participant à la première réponse immunitaire en cas d'infection par des pathogènes et les cellules du système immunitaire adaptatif recrutées et activées par l'immunité innée.

L'interaction et la régulation, entre immunité innée et immunité adaptative, sont importantes pour assurer une bonne défense de l'organisme ainsi que pour le maintien de l'homéostasie. Ces mécanismes passent par un dialogue important médié par la sécrétion de cytokines ainsi que par des contacts cellulaires via des récepteurs spécifiques. Bien que l'on sache quelles cytokines ou récepteurs sont impliqués dans des contextes pro- ou anti-inflammatoires, les variations de sécrétions et d'expressions, peuvent potentiellement changer

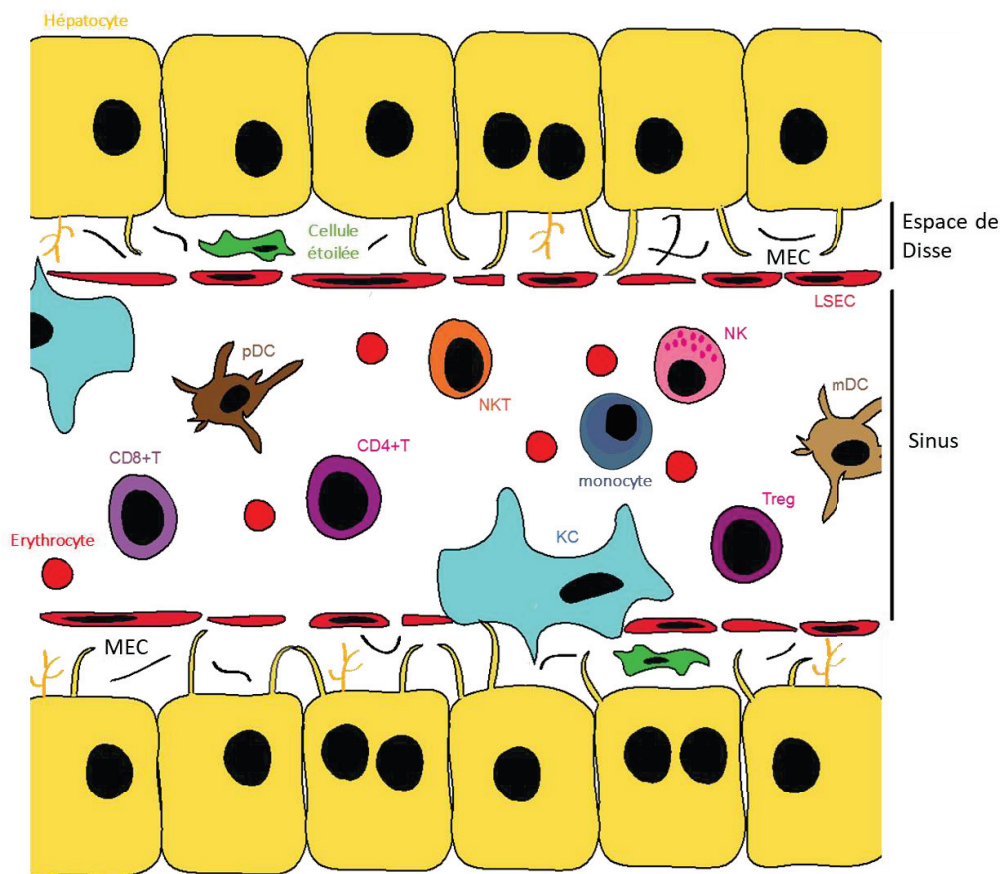


Figure 3 : Organisation schématique du foie. (adaptée de Faure--Dupuy S non publié) Répartition schématiques des cellules d'une travée hépatique. Cellules spécifiques du foie en contact avec l'espace de Disse comprenant les hépatocytes, les cellules étoilées et les cellules endothéliales sinusoides (LSEC) et la matrice extracellulaire (MEC). Les cellules immunitaires, présentes dans le foie au niveau des sinus sanguins, comprenant les macrophages résidant du foie ou cellule de Kupffer (KC), les monocytes circulants, les cellules dendritiques myéloïdes ou plasmacytoïdes (mDC et pDC), les NK ou NKT (Natural killer ou NK récepteur T) et les différents lymphocytes T (CD4+ et CD8+T, Treg).

profondément la nature de la réponse engagée par la suite. Ainsi, le contenu de ce dialogue nécessite encore beaucoup de travail pour être entièrement élucidé. Ces mécanismes sont dépendants principalement des cellules, en réponse à un danger donné et à l'environnement (inflammatoire ou tolérogène), dont la modulation décide du devenir de la réponse immunitaire. La composante en cellules immunitaires au niveau d'un tissu joue donc un rôle important dans ce dialogue du fait de leur spécialisation. Au niveau du foie, les cellules immunitaires résidentes isolées sont appelées LMNC (Liver MonoNuclear Cell). On les différencie des cellules immunitaires isolées du sang périphérique appelées PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) du fait des composantes différentes en cellules immunitaires représentées (Figure 1).

Parmi ces cellules immunitaires, on peut retrouver comme décrits brièvement précédemment, celles appartenant au système inné et adaptatif. La différence entre immunité innée et adaptative est définie par 1) le temps de mise en place de la réponse immunitaire (innée : quelques minutes/heures, adaptative : plusieurs jours) ; 2) la spécificité/mémoire à un antigène donné (innée : spécifique de motifs microbiens conservés ; adaptative : spécifique d'une structure antigénique) ; 3) la durée de la protection (innée : court termes lors de la réponse (hormis la peau) ; adaptative : plusieurs années (anticorps circulants) (Figure 2)³.

a- Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée font partie de la première vague de défense de l'organisme en cas d'infection. La réponse immunitaire innée et le recrutement de ses effecteurs sont extrêmement rapides (quelques minutes pour le recrutement des granulocytes) en comparaison à la réponse immunitaire adaptative (plusieurs jours). Les réponses engendrées par ces cellules sont décrites comme étant moins spécifique que celles de l'immunité adaptative. Cependant, elles orientent en général cette dernière afin d'aboutir à une réponse immunitaire adaptée. Elles sont donc capables de réagir différemment en fonction d'un stimulus donné et coordonnent dans les temps précoces la réponse immunitaire. Elles sont représentées au niveau du foie par les macrophages résidents du foie que sont les cellules de Kupffer, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les NK/NKT et les cellules dendritiques (Figure 2). Parmi ces cellules on peut également noter que hormis les NK, celles-ci sont capables de présenter l'antigène via les CMH I et II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité I et II). Ces complexes sont nécessaires à l'éducation, au recrutement et à l'activation de l'immunité adaptative. On les définit alors comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

a.1-Cellules de Kupffer/Macrophages

Les KC sont les macrophages résidents du foie. Ils sont localisés au niveau des discontinuités de la barrière formée par les cellules endothéliales sinusoïdales du foie (LSEC ; voir partie I-A-2-c.2-LSEC) et sont capables par ces interstices de communiquer avec les hépatocytes dans l'espace de Disse via des pseudopodes (Figure 3). Ces cellules du fait de leur position privilégiée entre la circulation sanguine et l'espace de Disse jouent le rôle important de sentinelles au niveau du foie ^{1,2,4-7}. Elles ont des facultés spécifiques en comparaison des autres macrophages de l'organisme. Elles joueraient un rôle dans l'élimination de nombreux débris du sang dont notamment les cellules sanguines arrivées en fin de vie. Dans un souci d'homéostasie et du fait de l'exposition continue aux antigènes, elles ont besoin d'un signal d'activation de la réponse inflammatoire, tel que le LPS (voir partie I-A-3-a-Les Toll-Like Receptors) par exemple, plus important pour déclencher une réponse inflammatoire conséquente en comparaison aux autres macrophages ou monocytes. Ce phénomène laisserait à supposer un phénotype tolérogène en condition saine des KC. Les macrophages, de manière générale, sont capables d'exprimer un phénotype pro- ou anti-inflammatoire suivant les conditions environnementales dans lesquels ils se trouvent ainsi que des stimulus rencontrés. Cette plasticité permet d'établir une régulation efficace au sein de la population macrophagique dans la réponse immunitaire inflammatoire (phagocytose, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, présentation de l'antigène...) et la réparation des dommages éventuels (cytokines anti-inflammatoires, élimination des débris cellulaires, sécrétion de facteurs de croissances...). Les macrophages résidents du foie ne seraient cependant pas tous des KC d'origine embryologique, mais certaines proviendraient du recrutement des monocytes différenciés en macrophages provenant de la circulation sanguine ⁸. Chez l'homme, il n'existe cependant aucun marqueur spécifique pour différencier les macrophages du foie de ceux provenant du sang périphérique. De plus, les macrophages recrutés seraient capables de renouveler les réserves de KC en cas de délétion de ceux-ci en acquérant un phénotype similaire de celle-ci et remplissant leur rôle à l'identique et présentant une signature transcriptomique extrêmement similaire ⁸. Les macrophages du foie semblent jouer un rôle important dans l'homéostasie de l'organe. Du fait de leur contrôle des éléments arrivant du sang tout comme leur capacité à communiquer avec les autres cellules hépatiques avec lesquelles ils sont en contact plus ou moins restreint (LSEC, hépatocytes...). L'expression de nombreux PRR, comme par exemple TLR4 permettant de détecter le LPS (voir partie I-A-3-a-Les Toll-Like Receptors) peut générer une réponse inflammatoire s'il est en quantité plus élevée que la normale

au niveau du foie (quantité plus élevée que dans la plupart des autres compartiments de l'organisme comme expliqué précédemment). De plus, les macrophages du foie possèdent des inflammasomes fonctionnels (notamment AIM2 et NLRP3) permettant la sécrétion des IL-1 β et IL-18 qui possèdent un fort effet anti-pathogénique et activateur/recruteur des autres cellules de l'immunité ⁹. En outre, ils peuvent sécréter un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement et l'activation des autres cellules de l'immunité comme l'IL-6, IL-8 (Ce dernier permettant de recruter les autres cellules de l'immunité comme les granulocytes ; voir ci-après) ou encore le TNF- α . A contrario, dans un phénotype anti-inflammatoire, ils peuvent sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou encore le TGF- β participant à la tolérance et à un retour à l'homéostasie. Ils font également parti des cellules présentatrices d'antigènes et sont capables d'induire une réponse immunitaire adaptative via l'expression des CMH I et II. Leur localisation spécifique en contact avec l'espace de Disse et les LSEC peuvent servir de « plateforme » au recrutement des cellules adaptatives pour leur activation et différenciation. Les macrophages au niveau du foie sont donc capables 1) de renouveler leur population ; 2) de maintenir l'homéostasie ; 3) de générer une réponse inflammatoire forte en cas de danger ; 4) de recruter et d'activer l'immunité adaptative par leur rôle de CPA ; 5) de faciliter le retour à l'équilibre suite à un état inflammatoire. Les KC et les macrophages infiltrés au niveau du foie jouent donc un rôle primordial du fait de leur localisation et de leurs fonctions dans la maintenance de l'environnement tolérogène du foie tout comme dans l'élimination des dangers au niveau de celui-ci.

a.2-Granulocytes

Les granulocytes sont des cellules appartenant à la lignée myéloïde retrouvée dans le sang circulant et capable d'infiltrer les tissus lors de processus inflammatoires. Celles-ci sont des cellules phagocytaires, tout comme les macrophages et sont capable de présenter des antigènes en cas de reconnaissance d'un PAMP ou d'un DAMP. Les granulocytes sont capables de sécréter un nombre important d'effecteurs de l'immunité innée. En tant que première ligne de l'immunité innée, elles arrivent au bout de quelques minutes seulement sur le site de l'inflammation et/ou du dommage puis elles recrutent les autres cellules de l'immunité par le biais de la sécrétion de chimiokines (IL-8 par exemple). Les granulocytes sont classés en trois types, en fonction de leur contenu en granules cytoplasmiques : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles font partie des leucocytes les plus nombreux dans le sang circulant et leur présence a été décrite au niveau du foie dans le cadre de certaines pathologies (dommages stériles, sepsis...). Ils luttent contre les pathogènes via plusieurs

mécanismes par phagocytose et par sécrétion de peptides antimicrobiens (la myéloperoxydase, LL-37, ou le lysozyme par exemple). Les granulocytes sont également capables de produire et de relarguer des espèces réactives de l'oxygène ou du nitrogène, permettant la dégradation des pathogènes. Ces composés sont initialement produits et contenu dans les granules cytoplasmiques et leur relargage est appelé dégranulation. Ceux-ci présentent la particularité de pouvoir relâcher de l'ADN chromatinien associé à des protéases à sérine appelé NET (Neutrophil Extracellular Traps). Cette toile d'ADN permet de capturer et de piéger les microorganismes tout en participant à leur dégradation. Cependant, leur effets semblent délétères au niveau du foie et participerait à l'aggravation des pathologies dans certains cas du fait de leurs médiateurs cytotoxiques ^{1,10}. Ils ont été décrits pour pouvoir, via les NET et LL-37 notamment, jouer un rôle dans la lutte antivirale, mais leur rôle est encore mal compris dans ce domaine et semble souvent participer à l'aggravement de la maladie (*Influenza virus*) ¹¹⁻¹⁴.

a.3-NK (Natural Killer)

Les cellules NK sont connues, comme leur nom l'indique, pour leur capacité à tuer les cellules du soi anormale et/ou infectées. Elles font partie de l'immunité innée et sont retrouvées au niveau du foie où elles participent à son homéostasie. Elles sont capables d'identifier les cellules infectées ou tumorales via l'absence ou la diminution d'expression du CMH-I ce en quoi elles jouent un rôle complémentaire avec les T CD8+. Leur activation peut être indépendante d'un signal provenant d'autres cellules ou cytokines et elles joueraient également un rôle dans l'élimination des cellules immunitaire activées lors de processus inflammatoires pour permettre le retour à l'homéostasie. Les NK sont retrouvés en proportion importante au niveau du foie (Figure 1) et sont décrites pour jouer un rôle important dans l'immunosurveillance et l'homéostasie de cet organe ^{1,2}. Il existe deux populations au sein des NK, une population exprimant CD56 fortement, spécialisée dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La population CD56 fort sécrète quant à elle en abondance des cytokines en abondance tel que l'IFN- γ , le TNF- α ou encore l'IL-10 permettant le recrutement, l'activation et la régulation des autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif. L'autre population de NK population exprimant le CD56 plus modestement, est quant à elle spécialisée dans l'activité cytotoxique. Cette dernière sécrète des enzymes ou ligands capables d'induire la mort des cellules infectées ou tumorales par apoptose dont le granzyme B, les perforines ou encore TRAIL (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand). Les NK présentent de nombreux récepteurs à leur surface permettant leur activation ou leur inhibition. Certain de ces récepteurs appartiennent notamment à la famille des CLR (Ly49, NKG2...), à la famille des

immunoglobulines-like ou KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) ou encore des récepteurs Fc (FcγIIIa connu également sous le nom CD16). Ces récepteurs Fc sont capables de reconnaître les parties Fc des anticorps. Lorsque la cellule NK détecte des anticorps fixés à la surface d'une cellule, celle-ci procède donc à son élimination par les mécanismes cytotoxiques préalablement évoqués. Leur activation et leur inhibition sont également régulées par l'environnement cytokinique auquel les NK sont exposés dans lequel l'IFN- α , l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15, qui jouent un rôle activateur prépondérant pour ces cellules. Elles expriment également leurs propres PRR permettant de détecter des pathogènes ou signaux de danger et de participer avec les autres cellules immunitaires à l'activation et la mise en place de la réponse inflammatoire. Au niveau du foie, les NK exprimeraient un phénotype légèrement différent en comparaison à celle retrouvée au niveau du sang périphérique. Elles posséderaient des capacités cytotoxiques plus importantes en réponse à des stimulus cellulaires et cytokiniques, dépendant entre autres des KC, des cellules dendritiques ou encore des hépatocytes ^{1,2,15,16}. Dans certains cas infectieux, du fait de cette cytotoxicité importante elles participeraient à d'importants dommages au niveau du foie comme cela est décrit dans certains cas d'hépatite fulminante ¹⁵. Leur rôle au niveau du foie, semble donc important, mais doit être régulé finement aux vues des capacités destructrices importantes de ces cellules. Les autres cellules de l'immunité jouent fort heureusement ce rôle en condition saine et notamment les cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques que nous allons voir à présent.

a.4-Les cellules Dendritiques

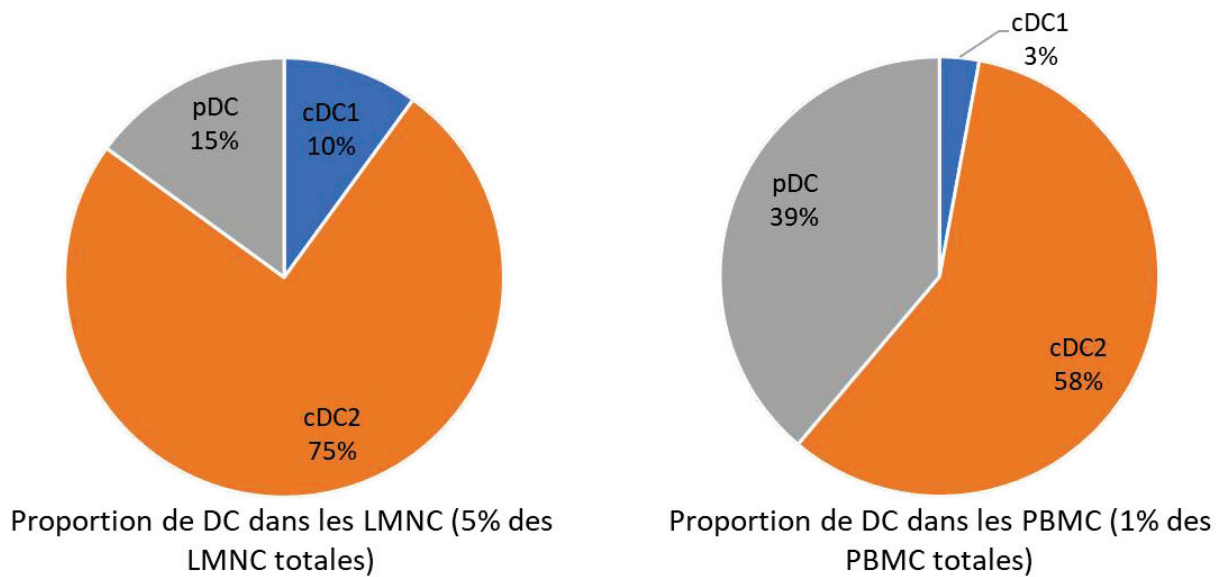


Figure 4 : Comparaison entre la répartition des DC au sein des LMNC et des PBMC (adaptée de Gruffaz *et al* en préparation) Répartition des différentes populations de cellules dendritiques (myéoïdes : cDC1 et cDC2 ;plasmacytoïdes : pDC) retrouvées au niveau du foie (LMNC : cellules mononucléées du foie) et du sang périphérique (PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique).

Les cellules dendritiques (DC pour « Dendritic Cell ») du fait de leur rôle central dans l'immunité et le maintien de l'homéostasie dans l'organisme présentent un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes anti-infectieux, de l'installation des maladies chroniques ou cancéreuses et enfin de leur potentielle utilisation en thérapie. La population de cellules dendritiques reste difficilement étudiable du fait de leur faible survie *ex vivo* et de leur nombre restreint dans les échantillons permettant de les isoler. Elles sont cependant bien représentées au niveau du foie et sont présentes en plus grand nombre au sein des LMNC en comparaison au PBMC (Figure 4).

Les DC sont définies à l'origine par leur faible nombre et leur morphologie bien particulière du fait de leurs prolongements cytoplasmiques en forme de dendrites^{17,18}. Elles appartiennent à la première vague immunitaire innée en participant activement à la reconnaissance de l'antigène et au recrutement des autres cellules immunitaires. Ce recrutement est possible par deux mécanismes complémentaires que sont la communication par contact cellulaire direct, via l'expression de nombreux récepteurs de stimulation et costimulation à leur surface et par communication à distance, via la sécrétion importante de cytokines et chimiokines. Elles jouent un rôle prépondérant dans l'induction de l'immunité adaptative grâce à leur capacité d'apprêtement et de présentation de l'antigène, décrite comme le plus efficace des CPA, via les

CMH de classe II et I (CMH II et I). L'expression de cette molécule importante chez les DC est nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ qui orchestre la réponse adaptative que nous verrons plus en détail par la suite (I-A-2-b.1-Lymphocytes T CD4⁺). De plus, les DC sont capables d'orienter la réponse engendrée par ces T CD4⁺ via l'expression de différentes cytokines, mais également de récepteurs de costimulations exprimés à sa surface dont les plus connus sont ceux de la famille B7. La population de DC est complexe et présente une importante hétérogénéité au sein d'une même sous-population. Bien que les mécanismes brièvement décrits précédemment soient communs à presque toutes les DC, certaines populations sont plus spécialisées dans certains domaines et présentent de plus des particularités qui leur sont propres¹⁹. Depuis leur découverte, les différents caractères permettant d'identifier une cellule comme appartenant à la famille des cellules dendritiques se sont complexifiés. On peut énumérer trois types de DC principales retrouvées au niveau du sang circulant et du foie que nous allons détailler ici, les cDC1, cDC2 (conventional DC 1 et 2) et les pDC (plasmacytoid DC) (Figure 5). Du fait de leur importante hétérogénéité, celles-ci sont capables de reconnaître de nombreux signaux DAMP, PAMP ou encore d'antigènes du soi normaux ou anormaux. Cette reconnaissance est possible par l'expression d'un grand nombre de PRR : TLR, RLR, CLR, ou senseur cytoplasmique à ADN. Leur activation entraîne un processus de maturation modifiant leur forme (dendrites) et facilitant la communication via les récepteurs et corécepteurs de stimulation avec les autres cellules immunitaires notamment du système adaptatif. Cette caractéristique fait des DC les parfaites sentinelles de l'organisme. Le rôle d'une sentinelle est également de prévenir le reste de l'immunité d'un potentiel danger. Ce en quoi les DC sont parfaitement habiles du fait de leur importante capacité 1) à présenter l'antigène simultanément aux autres cellules du système immunitaire via les CMH II et I ; 2) à éduquer, recruter et à l'activer les cellules T CD4⁺ et les cellules effectrices comme les T CD8⁺ (voir parti I-A-2-b- Les cellules de l'immunité adaptative). Cette alerte passe également par la sécrétion importante de cytokines et de chimiokines permettant une action directe par l'activation des gènes stimulé par l'IFN ou ISG (Interferon Stimulated Gene) et le recrutement et la polarisation des cellules de l'immunité adaptative par l'interleukine 12 (IL-12). De plus, ces cellules sont capables de recruter et de stimuler les autres cellules de l'immunité innée (macrophage, granulocytes, Natural Killer...). La présentation et le recrutement des autres cellules immunitaires passent également par la migration des DC aux niveaux des organes lymphoïdes. L'activation des DC est décrite pour induire l'expression du récepteur CCR7 (C-C Chemiokine Receptor type 7) qui, par l'interaction avec les chimiokines CCL19 et CCL21 (C-C motif Chemiokine 19 et 21), conduit à la migration des DC vers les ganglions lymphatiques pour la présentation de

l'antigène et l'activation des populations lymphocytaires. Une autre capacité importante chez les DC réside dans leur capacité à cross-présenter l'antigène. La cross-présentation consiste à présenter un antigène exogène via le CMH I par le biais d'une internalisation et de l'apprêtement de cet antigène ²⁰⁻²². Ce mécanisme est important pour l'activation des lymphocytes T CD8+ pour leur capacité cytotoxique (voir partie b-2-Lymphocytes T CD8+).

Comme dit précédemment, il existe trois sous types de DC retrouvées majoritairement dans le sang circulant et le foie que nous allons détailler ¹⁹. Les cDC1 ont été décrite initialement pour exprimer le marqueur BDCA3/CD141, cependant ce marqueur n'étant pas exclusif à cette population, d'autre marqueurs plus spécifiques servent désormais à leur identification. Ces marqueurs sont entre autres le TLR3, le CLR CLEC9A ainsi que le corécepteur XCR1. Les deux premiers récepteurs permettent respectivement la reconnaissance des ARN doubles brins et des antigènes associés aux cellules mortes (voir partie Senseur de l'immunité innée TLR et CLR). L'activation du TLR3 dans ces cellules conduit à la sécrétion importante d'IFN de type III (ou IFN- λ) ayant un fort potentiel antiviral/antitumoral direct et d'activation des autres cellules immunitaires innées et adaptatives. Le récepteur XCR1 quant à lui joue un rôle important dans l'activation, la prolifération et la survie des cellules T CD8+ du fait de son interaction avec le récepteur XCL1 présent à leur surface. Les cDC1 semblent être de ce fait les cellules les plus efficaces dans la mise en place d'une réponse antivirale et antitumorale grâce à leur capacité à reconnaître les antigènes associés aux cellules mortes via CLEC9A et sa collaboration avec le TLR3 permettant de reconnaître les ARN double brins (viraux notamment ; voir parti I-A-3-a-Les Toll-likes Receptors). Cette activation collaborative entraine alors l'activation des T CD8+ par le biais de la cross-présentation de l'antigène. De plus cette interaction cDC1/T CD8+ est optimisée grâce au récepteur XCR1 et à la sécrétion d'IFN- λ ^{19,23-25}. Les cDC2 sont identifiables via les marqueurs CD1c, SIRP- α , CD11c et CD11b (Figure 5). Elles semblent plus spécialisées dans la reconnaissance de pathogènes extracellulaires (bactéries, parasites...) du fait de l'expression privilégié de PRR à leurs surfaces (TLR2/6, TLR4 et TLR5 et de nombreux CLR comme CLEC4A/DCIR ou encore CLEC10A) mais également de récepteurs cytoplasmiques (NLR comme NOD2 ou encore NLRP3 des RLR et des senseurs cytosoliques à ADN) ^{19,26,27} (voir partie I-A-3-Senseurs de l'immunité innée dans le foie) ainsi que le CMH II élevé à l'état immature. Les cDC2 sont spécialisées dans la sécrétion d'IL-12 en plus grande quantité que les cDC1 sous certaines conditions (dépendantes de la stimulation initiale : un seul PRR ou plusieurs), permettant un recrutement et une activation plus importante des cellules de l'immunité adaptative (T CD4+/T

CD8+)²⁸. Elles sécrètent également l'IL-23, connu pour sa capacité à induire la différenciation des T CD4+ en Th17. Cependant, cette cytokine et ce sous-type de T CD4+ sont connus pour jouer un rôle dans l'induction de pathologie auto-immune²⁹. Les cDC2 sécrètent également d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , IL-8 (importante pour le chimiotactisme des neutrophiles, macrophages...) ou encore l'IL-1 β (celles-ci disposent donc d'un inflammasome fonctionnel (voir partie I-A-3-NOD-Like-Recepteurs))^{28,30}. Elles sont également capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 permettant potentiellement l'induction des Treg si celle-ci est concomitante de l'expression du corécepteur inhibiteur PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) (voir partie I-A-2-b-1-Lymphocytes T CD4+)^{25,28,29}. À la vue de leur capacité sécrétoire, les cDC2 semblent capables d'induire efficacement l'activation et la différenciation des T CD4+ sous leurs différentes formes en fonction de la réponse au stimulus engendrée. Elles semblent donc jouer un rôle aussi bien dans la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire qu'humorale. Il a été également récemment démontré que les cDC2 pouvaient être séparées en deux sous-types. L'un exprimant fortement les gènes de CMH II et la seconde des gènes de l'inflammation. Dans la proposition de reclassification des DC grâce à la révélation d'une importante hétérogénéité du point de vue transcriptomique, différentes sous-populations ont pu être identifiées^{30,31}.

L'une de ces populations présente des caractéristiques bien particulières la définissant comme un précurseur des cDC1 et cDC2 présent dans la circulation sanguine : les pré-DC ou AS DC (AXL, SIGLEC6 DC). En effet, une population présentant des marqueurs communs aux pDC tel que CD123, CD303, CD304, mais possédant des caractéristiques les excluant des dites pDC, car plus proche transcriptionnellement des cDC. Ces marqueurs tels que AXL, SIGLEC6, CD2, CX3CR1 et CD45RA ont permis de les caractériser et de les différencier des pDC. De plus, au niveau du spectre de l'expression ARN, ces pré-DC semblent différentes du spectre des pDC, mais également des cDC1 et 2^{26,31}. Dans le cadre d'un stimulus, ces cellules seraient capables de se différencier en cDC1 ou/et 2 en perdant au fur et à mesure les marqueurs pré-DC pour acquérir les marqueurs de ces deux sous-ensembles (pré-cDC1 et 2). La présence d'un TLR9 fonctionnel ainsi que les nombreux marqueurs en commun avec les pDC ont amené les groupes travaillant sur les DC à se poser de nombreuses questions sur l'impact potentiel de cette population dans les études sur les dites pDC. En effet, cette population pourrait être la source des discordes sur les capacités des pDC en termes de sécrétion et de présentation de l'antigène pour l'activation des lymphocytes T. Selon les méthodes d'isolation des pDC, au vu des nombreux marqueurs communs avec les pré-DC, une population pouvant se différencier en

cDC1 et 2, semble être une source suffisante de contamination en termes de sécrétion (IL-12 notamment) et d'activation fonctionnelle des lymphocytes T. Les auteurs proposent donc de reclasser les pDC comme les cellules productrices d'IFN de type I professionnelles ³⁰. Cependant, un autre groupe a récemment démontré que les pDC sont bien des DC à part entière, qu'elles sont bien plus que des productrices d'IFN de type I et qu'elles adaptent leur réponse en fonction de la nature du stimulus rencontré.

La population de pDC bien que peu nombreuses, présente de nombreux intérêts en termes de thérapies antivirales ou anticancéreuses ³². Celles-ci ont pour spécialité la reconnaissance des pathogènes intracellulaire et en particulier de leurs acides nucléiques (ARN ou ADN). Cette reconnaissance est possible par l'expression de TLR intracellulaires (TLR7 et TLR9 voir partie I-A-3-a Les Toll-like Receptors) dont l'activation entraîne la synthèse d'IFN via la voie IRF7 (Figure 6). En effet, la sécrétion des IFN de type I, dont elles sont les principales productrices, est connue pour avoir des effets importants contre les agents pathogènes et les cellules tumorales. Les IFN permettent un effet direct sur les cellules anormales ou infectées du fait de l'activation des ISG (Interferon Stimulated Genes), ainsi qu'un effet indirect de par l'activation des autres cellules immunitaires. Ces cellules ont ainsi dans le domaine de l'immuno-thérapie un intérêt tout particulier au vu de cette production d'IFN. La présence de ces cytokines également retrouvées anormalement élevée dans les cas de maladies auto-immunes résultent souvent d'une réponse à des antigènes du soi entraînant de grave pathologie tel que le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) ou autres interféronopathies. La stimulation ou l'inhibition des pDC représente un sujet majeur d'étude dans le traitement des maladies chroniques infectieuses, cancéreuses et auto-immunes. Dans une récente publication ³³, en analysant les différents profils de pDC lors d'une seule stimulation en utilisant le virus de la grippe, les auteurs ont mis en évidence une importante hétérogénéité au sein de cette population. En criblant différents marqueurs résultants de l'activation des pDC, deux d'entre eux ont particulièrement présenté une différence importante d'expression permettant d'isoler trois populations de pDC post-activation. Le marqueur CD80 d'une part, permettant en association avec le marqueur CD86 d'activer les lymphocytes T lors de la présentation de l'antigène et d'autre part le marqueur PD-L1 qui est lui connus pour son effet immunosuppresseur en se liant au récepteur PD-1. La première population nommée P1, est négative pour CD80 et positive pour PD-L1 (CD80⁻PD-L1⁺) tandis que la population P3 est au contraire positive pour CD80 et négative pour PD-L1 (CD80⁺PD-L1⁻). La dernière population P2, quant à elle, exprime ces deux marqueurs (CD80⁺PD-L1⁺) (Figure 5). Le point le plus notable sur l'expression des différents marqueurs

d'activation entre ces trois sous-population, est que la population P3 semble exprimer plus abondamment des corécepteurs médians l'activation par contact cellulaire (CD80, CD86, CD70...) alors qu'en comparaison la sous-population P1 présente plutôt un profil plus riche en marqueurs inhibiteurs (PD-L1 et PD-L2). La population P2, quant à elle, présente un profil d'expression intermédiaire entre les marqueurs activateurs et inhibiteurs en comparaison aux deux autres. L'existence de trois sous-populations de pDC en réponse à un seul stimulus laisse à penser à un potentiel mécanisme de coopération, de spécialisation et/ou de régulation de celles-ci lors de la réponse immunitaire. La nature des marqueurs discriminants appuie fortement cette hypothèse du fait de l'interaction inhibitrice décrite dans la littérature entre CD80 et PD-L1 ³⁴⁻³⁶. Cette différenciation lors de l'activation des pDC semble être stable au cours du temps et les cellules alors engagées dans une population semblent perdurer sous cette forme malgré une seconde stimulation. La particularité de cette différenciation est que contrairement aux populations lymphocytaires, celle-ci n'implique pas une prolifération cellulaire. De plus, la répartition des différentes sous-populations semble dépendante du signal inducteur. La proportion en P1, P2 et P3 diffère en fonction de la stimulation utilisée (Virus de la grippe ou un ligand de TLR-9 le CpG ODN A). La différenciation dans les populations P2 et P3 des pDC, semble être médiée par la sécrétion et la stimulation par le TNF- α , sans quoi les cellules semblent pouvoir s'engager seulement dans la population P1. Cette cytokine, particulièrement importante dans un contexte inflammatoire, a de nombreux effets sur le recrutement, l'activation des cellules immunitaires et la synthèse de peptides/molécules antimicrobiennes/antitumorales. Chacune de ces populations semble présenter des caractéristiques autres que la simple expression différentielle de marqueurs de surfaces. En effet la population P1 dont la morphologie est plus plasmacytoïde, semble être responsable de la production d'IFN de type I ainsi que certaines cytokines inflammatoires. En étudiant les populations de pDC provenant de donneurs présentant un LED, les auteurs ont pu mettre en évidence la présence anormale du phénotype P1. Ce résultat a également été obtenu dans les échantillons de biopsies de peaux de patients atteints de psoriasis. La présence anormale de cette population à l'état basal, en absence de différenciation induite par la présence de PAMP ou DAMP, responsable de la sécrétion des IFN et les maladies auto-immunes présentant un taux anormal d'IFN semblent donc être corrélées. En termes de cinétiques, elle est également la première à apparaître lors de la différenciation des pDC en réponse à un stimulus. Cette dernière semble également capable d'induire la prolifération et l'activation des T CD4⁺ vers un profil proche des Th1 par le biais de la sécrétion d'IFN- γ . Elle semble également capable d'induire une population Th1/reg intermédiaire du fait de l'expression par les T CD4⁺ stimulés

du marqueur inhibiteur PD-1. La population P3, quant à elle, présente une morphologie plutôt dendritique et polarisée, plus proche des cDC matures. Cet aspect morphologique coïncide avec une expression plus importante de CCR7 et de son importante capacité migratoire sous un gradient de CCL21. Ce mécanisme, induit lors de la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires permet le recrutement des populations lymphocytaires adaptatives. De plus, elles orientent l'induction des cellules T CD4⁺ vers un profil Th2. La population P2 quant à elle plus proche morphologiquement de la population P3 présente un profil intermédiaire, notamment au niveau transcriptomique, entre les deux autres populations. Elle semble capable d'induire une prolifération des T CD4⁺ vers un profil proche des Th2 (voir partie I-A-2-b.1 Lymphocytes T CD4⁺).

La différenciation des pDC semble jouer un rôle important dans la réponse immunitaire orchestrée par la suite ainsi que dans le maintien de l'homéostasie. Cette différenciation doit donc différer en fonction du stimulus responsable de leur activation.

L'identification de cette capacité à réguler ces trois sous-populations en fonction du stimulus utilisé ouvre la voie vers l'orientation artificielle d'une sous-population ou une autre principalement pour utiliser les capacités des pDC dans des domaines thérapeutiques ou vaccinaux. L'utilisation en parallèle de modulateurs de l'activation pourrait servir dans les cas de maladies auto-immunes à diminuer également la voie de l'interféron. Ces récepteurs modulateurs seront détaillés dans la partie (I-A-3-f-Inhibition via les récepteurs CLR/ITAM/ITIM de l'activation des TLR, le cas de la voie de l'interféron dans les pDC).

Les DC sont donc indispensables à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace en recrutant aussi bien le système adaptatif que les autres cellules du système inné. Cette place particulière à la frontière entre les deux systèmes immuns, permet l'orientation et l'équilibre entre la réponse cellulaire, humorale ou tolérogène, et est renforcée par l'importante

hétérogénéité de cette population. Nous allons donc voir à présent les cellules composant cette réponse immunitaire adaptative.

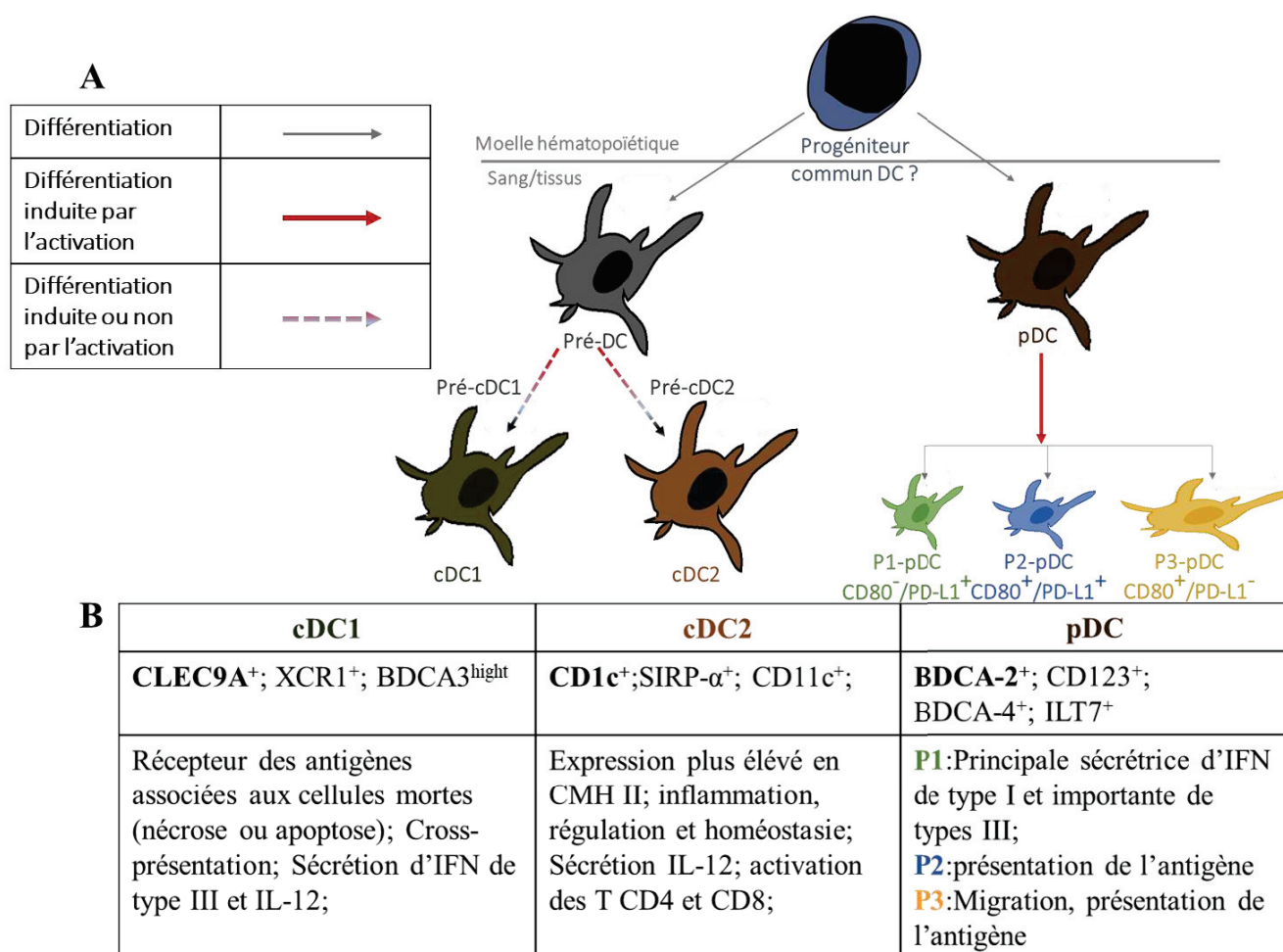


Figure 5 : Classification des principales DC : A) origines et B) caractéristiques (adaptée de Durand M et Segura E 2015¹⁹ ; Villani A-C *et al* 2017²⁶ ; Alculumbre S *et al* 2017³³ ; See P *et al* 2017³¹) Nouvelle classification des principales populations de cellules dendritiques de par leur origines et leurs capacités de différenciation (A) ainsi que par les marqueurs exprimés et leurs caractéristiques fonctionnelle (B). cDC1 et cDC2 : Cellules Dendritiques communes ; P1- P2- et P3- pDC : Population 1- 2- ou 3- Cellules Dendritiques plasmacytoïdes ;

b- Les cellules de l'immunité adaptative

Les cellules de l'immunité dite adaptative, sont les cellules de l'immunité capable de conduire à une réponse spécifique d'un antigène, ou danger donné, mais également de pouvoir conserver une « mémoire » de cette réponse dans le but d'y répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une seconde rencontre. Cette réponse, du fait de sa spécificité est plus longue à se mettre en place par rapport à l'immunité innée (plusieurs jours). Cette spécificité

est due à l'affinité unique pour un antigène donné des récepteurs de ces cellules que nous évoquerons par la suite. De ce fait, la réponse immunitaire adaptative est capable d'être éduquée afin de gagner en efficacité et de mieux protéger l'organisme. Cette réponse peut être régulée notamment au niveau du foie par les cellules coordonnant l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T CD4⁺ qui jouent le rôle de chef d'orchestre de la réponse immunitaire. Lors de leurs activations, ceux-ci sont capables d'orienter d'une part vers une réponse inflammatoire en activant et en recrutant les autres cellules immunitaires comme par exemple les lymphocytes T CD8⁺ ou les lymphocytes B et d'autre part vers le maintien de l'homéostasie en inhibant les cellules immunitaires par une réponse anti-inflammatoire (Figure 2 et Figure 3).

b.1-Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes CD4⁺ ou lymphocytes T auxiliaires (T CD4) jouent comme leur nom l'indique, le rôle de médiateurs et participent à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Elles sont capables de reconnaître les antigènes présentés par le CMH II des CPA, via leur TCR (T Cell antigen Receptor) et leur corécepteur CD4. Leur activation conduit à leur prolifération ainsi qu'à la formation de T mémoires pouvant réagir plus rapidement et plus fortement lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène. Ceux-ci se localisent alors au niveau des organes lymphoïdes secondaire pour l'immunosurveillance. De plus, en fonction du stimulus généré par les CPA ainsi que le contexte inflammatoire, les T CD4⁺ vont proliférer et exprimer un panel cytokinique différent, les définissant en tant que Th1, Th2, Th17 (T helper 1, 2 ou 17) ou encore Treg (T régulateur) (Figure 2). Les trois premières populations jouent un rôle dans la mise en place de l'inflammation. Les Th1 via la sécrétion de cytokines IL-2/IFN- γ vont induire une réponse visant à recruter les cellules cytotoxiques (T CD8⁺ voir partie suivante) et les phagocytes (macrophages, granulocytes, cDC notamment décrits précédemment) tandis que les Th2 vont plutôt sécréter de l'IL-4 et de l'IL-10 conduisant à l'activation et au recrutement de l'immunité humorale principalement (sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B notamment qui seront décrits dans cette partie). Les Th17, quant à eux, sont caractérisés par leur capacité à sécréter les IL-17 et l'IL-22 notamment. Bien que jouant un rôle dans la réponse inflammatoire anti-infectieuse par le recrutement et l'activation du système immunitaire, il semblerait que les Th17 soient impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes visant au dérèglement de ce dernier. Contrairement aux trois premiers T CD4⁺ décrits, les Treg sont anti-inflammatoires et inhibent la réponse immunitaire. Ces derniers ont deux origines possibles, soit il s'agit de Treg naturel soit ceux-ci ont été induits par l'environnement cytokinique anti-inflammatoire riche en TGF- β . Ils sécrètent principalement

du TGF- β et de l'IL-10 connu pour leur capacité immunosuppressive. Ces cytokines permettent le maintien de l'homéostasie, mais sont également impliquées dans la survie de cellules du soi qui dans le cas de cellules tumorales promeut la survenue de cancer dû à l'inactivation des cellules cytotoxiques sensées les éliminer ^{1,2,37}.

b.2-Lymphocytes TCD8+

Les lymphocytes T CD8⁺ ou lymphocytes T cytotoxiques sont les cellules effectrices de l'immunité adaptative. Ils sont capables d'induire la mort cellulaire via la sécrétion de granzymes ainsi que de perforines d'une part, mais également par contact cellulaire direct via l'interaction des récepteurs de mort FAS/FASL (First Apoptosis Signal receptor), ou encore TRAIL/TRAIL-R1/5 (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand/Receptor 1-5) dont la cascade de signalisation conduit à l'activation des caspases et à l'apoptose. Ce mécanisme est médié par plusieurs signaux. Les T CD8⁺, contrairement aux cellules NK, sont dépendants pour leur activation de la reconnaissance d'un antigène présenté via le CMH de classe I dans un premier temps. D'autre part, leur activation et leur expansion sont sous le contrôle des CPA ainsi que des Th1 CD4⁺ qui respectivement présente l'antigène via le CMH de classe I (via notamment des mécanisme de cross-présentation comme présenté dans la partie DC pour les cDC1 par exemple) ainsi que les corécepteurs CD86 ou CD80 et sécrètent des cytokines activatrices comme l'IL-2 et l'IFN- γ ^{4,22,37,38}. La reconnaissance du CMH I nécessite l'interaction avec le TCR et de son corécepteur CD8 du T CD8⁺ tandis que l'activation de ce dernier nécessite l'interaction avec les corécepteurs CD86 ou CD80 du CD28 du T CD8⁺. Cette activation peut avoir lieu également par l'interaction via des Fc récepteurs reconnaissant les anticorps fixés à la surface de cellules. Sans cette dernière interaction, la cellule ne s'active pas contre l'antigène présenté via le CMH I, on dit qu'elle rentre en anergie. Ce mécanisme de régulation permet d'éviter/de limiter les risques d'auto-immunité et des dommages potentiellement générés par une activation excessive de ces cellules. La présence et les sécrétions des Treg permettent également d'inhiber ces cellules contre un antigène spécifique ou dans un contexte particulier (homéostasie, tumeurs...). L'interaction des récepteurs inhibiteurs PD-1/PD-L1 sont aussi capable d'inhiber la réponse des T CD8⁺, PD-1 étant exprimé à leur surface et PD-L1 à la surface des CPA, des Treg et potentiellement des cellules spécifiques du foie (LSEC, hépatocytes, cellules étoilées ; voir partie I-A-2-c-Les cellules spécifiques du foie). Tout comme les T CD4⁺, les T CD8⁺ sont capable de proliférer sous forme de T mémoire et de réagir plus fortement et plus précocement en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène spécifique ³⁸.

b.3-NKT et MAIT

Il existe, au sein du foie notamment, des populations lymphocytaires présentant des caractéristiques communes entre immunité innée et adaptative du fait de l'expression d'un TCR^{1,2,39}. C'est le cas des cellules NKT et des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T) que nous allons décrire dans cette partie^{16,40-42}. Les NKT ont pour particularité d'être des intermédiaires des cellules NK et des lymphocytes T. Ils expriment les marqueurs des cellules NK comme le CD16 et le CD56 et possèdent également leurs capacités cytotoxiques et inflammatoires via la sécrétion de granzymes B ainsi que d'IFN- γ . Ils expriment un TCR ainsi que le CD3 capables de reconnaître des antigènes glycolipidiques présentés via la molécule présentatrice d'antigène semblable au CMH-1, CD1d. Cette molécule est capable de présenter aussi bien des antigènes glycolipidiques étrangers (virus, bactéries...) que du soi, impliquant donc les NKT, tout comme les NK et les T CD8+, dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires et cellules tumorales. Il existe également deux types de NKT : les iNKT (invariant NKT) exprimant un TCR avec la même chaîne alpha (Va24-J α 18) tandis que le second type de NKT exprime un plus large panel de TCR. Il existe également une autre population appelée MAIT qui elle semble plutôt restreinte à la reconnaissance de composés bactériens présenté via la molécule MR1 (MHC-Related molecule-1)⁴³. Cette population présente également les mêmes caractéristiques fonctionnelles en termes de cytotoxicité et de sécrétion cytokinique⁴⁰. Malgré son implication dans la reconnaissance de composés bactérien les MAIT semble pouvoir être activé via les CPA dans le cadre d'infections virales par la sécrétion de cytokines comme l'IL-15 ou l'IL-18^{41,44}. Ces populations étant bien représentées dans le foie (Figure 1), et leurs interactions importantes avec les KC, les DC et les LSEC, laissent à supposer un rôle important dans l'immunorégulation et les phénomènes de cytotoxicités dans le foie. Cependant la dérégulation de ces populations lymphocytaires NKT et MAIT, semble jouer un rôle important dans les phénomènes d'auto-immunité^{16,42}. Contrairement aux autres cellules T, celles-ci sont capables d'engager une réponse rapide par la sécrétion importante de cytokines.

b.4-Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont les cellules responsables de la réponse immunitaire humorale. Ce sont ces cellules qui sont capables en réponse à un antigène spécifique de sécréter les immunoglobulines (Ig). Ceux-ci sont capables de reconnaître les antigènes via leur BCR (B Cell Receptor : complexe d'Ig membranaires semblable au TCR des LT) sous forme libre ou

présenté à la surface des cellules notamment les CPA. La reconnaissance d'un antigène présenté par les CPA semble permettre une meilleure activation des LB du fait de l'amplification du signal par le corécepteur CD19 notamment. À la suite de la reconnaissance de l'antigène la cascade de signalisation va induire plusieurs mécanismes qui sont également dépendant des signaux des autres cellules immunitaires (TH2, Treg, CPA...). Lorsque l'activation est effective, les LB vont alors entrer en prolifération clonale et vont avoir deux destinées possibles. Soit ils se différencient en plasmocytes produisant les Ig dirigées contre l'antigène, soit ils deviennent des LB mémoires permettant lors de la rencontre *de novo* avec l'antigène une réponse et la sécrétion d'Ig spécifiques plus précoce et plus importante ⁴⁵. Les Ig sécrétées ont pour particularité « d'évoluer » au cours de la réponse immunitaire. En effet, il existe plusieurs classe d'Ig et ceux-ci sont différenciés par leur partie constante Fc (celle ne reconnaissant pas l'antigène). Ce mécanisme est appelé commutation isotypique. Cela permet un changement de la classe d'Ig sécrété présentant chacune des fonctions particulières, que nous allons détailler ci-après, en termes de structure, de conformation, d'interaction avec les cellules immunitaires via principalement les récepteurs Fc dans la lutte contre l'antigène tout en conservant son affinité pour ce dernier. Dans un premier temps, les LB activés pour la première fois par leur antigène vont sécréter dans un premier temps des IgM et des IgD. Les IgM ont pour particularité d'être sécrété sous forme pentamérique permettant l'agglutination des antigènes ainsi que l'activation du complément. Ce sont les premiers Ig sécrétés et leur présence permet d'attester d'une infection en cours et/ou récente. Puis, à la suite de la maturation du LB, la classe d'Ig est modifiée pour mieux s'adapter à la nature de l'antigène et participer à l'activation de cellules spécifiques. Par exemple dans le cas d'une infection parasitaire, la classe privilégiée est celle des IgE du fait de leur capacité à être reconnu par les cellules immunitaires effectrices des parasitoses, les granulocytes éosinophiles et basophiles. Il existe également une classe d'anticorps associé aux muqueuses que sont les IgA qui sous forme dimérique permet comme les IgM l'agglutination des antigènes et l'activation du complément. Et enfin, la classe la plus abondante d'Ig circulante, que sont les IgG, atteste de la maturation des LB lors de la réponse immunitaire, mais également de la mise en place d'une mémoire à cellules B. Les IgG sont capables de neutraliser de nombreux types d'antigènes dont les toxines, les bactéries et les virus. Ils permettent non seulement la neutralisation et la précipitation de l'antigène, mais également le recrutement et l'activation du complément ainsi que l'opsonisation augmentant spécifiquement la phagocytose des cellules immunitaires spécialisées dans ce domaine (macrophage, neutrophiles, cDC...) ⁴⁶. Les LB ont pour particularité d'être eux aussi des CPA.

En effet, ils sont capables eux aussi de présenter les antigènes aux autres cellules immunitaires via le CMH II et de participer à l'activation des T CD4+.

c- Les cellules spécifiques du foie

c.1-Hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules majoritairement représentées dans le foie (~80 % des cellules totales du foie). La majorité des fonctions métaboliques et homéostasiques hépatiques sont modulées par ces cellules du fait de leur capacité à produire un grand nombre d'effecteurs de l'osmose comme l'albumine, de réguler les toxiques endogènes ou étrangers comme respectivement le produit de dégradation de l'hémoglobine, la bilirubine libre ou l'alcool. Ils participent également dans le métabolisme des lipides (cholestérol...), des glucides (glycogène...) ainsi que dans la production de facteur de coagulation et du complément. Un dysfonctionnement des hépatocytes peut donc induire un déficit important de tous ces mécanismes et donc de l'organisme (hémophilie, ascite, jaunisse, déficit immunitaire...). Cependant, la capacité importante de régénération hépatique permet de renouveler les hépatocytes en cas de dommage et de restaurer ses fonctions vitales pour le reste de l'organisme. De plus, les hépatocytes, exposés régulièrement à des corps étrangers via la veine porte provenant du système digestif, possèdent un grand nombre de PRR permettant de lutter contre les pathogènes en déclenchant une réponse inflammatoire innée et ainsi le recrutement des cellules du système immunitaire. Ils sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou encore des IFN de type I ainsi que des chimiokines comme l'IP-10 permettant l'enrôlement des cellules professionnelles de l'immunité ^{1,47-49}. Les hépatocytes peuvent également présenter les antigènes aux cellules immunitaires via leurs microvillosités en contact avec le flux sanguin ^{4,50}. Cependant les hépatocytes n'étant pas des cellules immunitaires à part entière, d'autres cellules non-immunitaires et immunitaires, sont présentes de manière foie-spécifique et permettent d'aider efficacement à leur protection. Nous allons détailler les cellules foie-spécifiques non-immunitaires dans les parties ci-après. L'un de ces types cellulaires, les LSEC (Liver Sinusoïdal Endothelial Cell) représente la barrière endothéliale physique séparant le flux sanguin des hépatocytes formant une zone appelée espace de Disse (Figure 3). Cet espace est composé de matrice extracellulaire régulé par un autre type cellulaire apparenté aux fibroblastes, les cellules « étoilées » (ou cellules de ITO).

c.2-LSEC

Comme dit précédemment, les LSEC sont les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins au sein du foie. Elles forment une barrière discontinue reposant sur une lame basale entre le flux sanguin et les microvillosités des hépatocytes permettant ainsi l'échange entre les deux milieux, hépatique et sanguin, nécessaire aux fonctions du foie et *in fine* de l'organisme (Figure 3). En plus de ces accès au flux sanguin des microvillosités des hépatocytes, les LSEC sont également capables d'importer le contenu du sang via des voies de transcytoses. Les LSEC, du fait de leur contact direct avec l'afflux sanguin, sont donc en première ligne lors de l'arrivée d'élément PAMPS ou DAMPS. Celles-ci expriment une grande variété de PRR et présente une faculté d'endocytose importante permettant la présentation de l'antigène via les CMH I et II aux cellules du système immunitaire ^{48,50}. Lors des processus inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésions VCAM et ICAM participe à l'ancrage et au recrutement des cellules immunitaires du sang vers le foie. Ce mécanisme permet aux cellules d'intervenir spécifiquement sur le lieu de l'inflammation. Les LSEC sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoire en réponse à un PAMP ou un DAMP, mais également d'induire un signal tolérogène dans lequel le CLR, LSECtin, jouerait un rôle important (voir partie I-A-3-e-Les C-type-Lectine Receptors (CLR) et récepteur ITAM/ITIM). Ce mécanisme participerait à l'environnement immunitaire tolérogène du foie exposé continuellement aux PAMP et aux DAMP provenant du système digestif. De plus en tant que première barrière du foie elle permettrait de réguler l'activation des cellules étoilées (décrites ci-après) dans les mécanismes de modulation de la matrice extracellulaire de l'espace de Disse.

c.3-Cellules étoilées

Les cellules étoilées hépatiques localisées dans l'espace de Disse à l'état quiescent, sont les principales responsables du stockage de la vitamine A, ou rétinol au sein de l'organisme. Cette vitamine pourrait jouer un rôle important dans la régulation, la prolifération, le maintien des barrières épithéliales constituant les muqueuses et les phénomènes d'immunosuppressions de certaines cellules effectrices de l'immunités ^{50,51}. Bien que les effets de la vitamine A ne soit pas clairs, celle-ci semble indispensable à la régulation et au bon fonctionnement du système immunitaire. Les cellules étoilées sont impliquées également dans de nombreux mécanismes à la suite de leur activation et prennent alors la forme de myofibroblaste. Une fois activées, elles sont capables de produire de la matrice extracellulaire composée de collagène et de protéoglycanes permettant le maintien et l'équilibre de la structure du foie. Cependant lors de

dommages importants au foie ou d'infections chroniques ce tissu cicatriciel peut prendre la place des hépatocytes détruits et par défaut d'élimination de ce tissu conduire à la fibrose. Cette fibrose peut par la suite, si elle s'étend, mener à la dérégulation de la structure du foie et de ses fonctions appelé cirrhose. D'autre part l'activation des cellules étoilées médiée par la reconnaissance de PAMP ou DAMP via leur PRR peut conduire à la présentation d'antigène plus ou moins efficacement et à la production de cytokines pro-inflammatoires et également d'IFN- γ permettant, entre autres, le recrutement et l'activation des macrophages du foie et du sang périphérique (décrit dans la partie cellules de Kupffer/Macrophage). D'autre part l'expression du corécepteur PD-L1 ainsi que la sécrétion de TGF- β et d'acide rétinoïques permettrait l'inhibition des cellules immunitaire ⁵¹. Elles seraient également capables de participer à la dégradation de la matrice extracellulaire désuète. Les cellules étoilées activées ont par la suite deux finalités possibles lors de la résolution du dommage au foie, soit elles sont éliminées par apoptose (potentiellement sous l'effet de cellules cytotoxiques), soit elles reviennent à leur état quiescent ^{52,53}. De part ces nombreuses facultés d'immunomodulation les cellules étoilées semblent participer activement au maintien de l'homéostasie du foie par la mise en place de l'inflammation à sa résolution ainsi qu'au maintien d'un environnement tolérogène.

Bien que n'appartenant pas aux systèmes immunitaires, les cellules précédemment citées présentent un impact important en matière d'immunorégulation. Le foie est un organe immunitairement bien équipé en matière de cellules inflammatoires et régulatrices. L'activation ou l'inhibition de ces cellules, sont dues à leur capacité à reconnaître un ou plusieurs signaux de danger provenant de pathogène ou de toxique via les senseurs de l'immunité innée.

3-Senseurs de l'immunité innée dans le foie

Les interactions hôtes-pathogènes ont mené à une compétition entre l'évolution des mécanismes de détection et d'élimination des pathogènes et les stratégies d'échappements des pathogènes à ces mécanismes. La reconnaissance des pathogènes est importante pour la mise en place des mécanismes anti-pathogéniques médiés par la réponse immunitaire. C'est cette reconnaissance qui va permettre à la première ligne effectrice de l'immunité innée de contrôler dans un premier temps l'infection bien avant l'activation de l'immunité adaptative. Les motifs reconnus par les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) sont capables d'identifier les motifs structuraux ou génomiques conservés chez les microorganismes (PAMP). Il existe

de nombreux PRR regroupés en plusieurs familles, les Toll-like, les RIG-I-Like, les senseurs cytoplasmiques à ADN (CDS), les NOD-Like et enfin les C-type-Lectine Receptors. La stimulation de ces PRR entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et/ou d'Interférons (IFN) en général permettant la lutte contre les infections microbiennes de manière directe (peptides antimicrobiens, Interferon Sensitive Genes) et indirecte (recrutement et activation des cellules immunitaires, notamment cytotoxiques). D'autre part, certains motif activateur ou inhibiteur des récepteurs immuns basé sur la tyrosine respectivement ITAM et ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation or Inhibitory motif) participe dans certains cas à générer ou à augmenter la réponse immunitaire engagée ou au contraire à l'inhiber. Ces mécanismes semblent différer en fonction des types cellulaires possédant ces récepteurs.

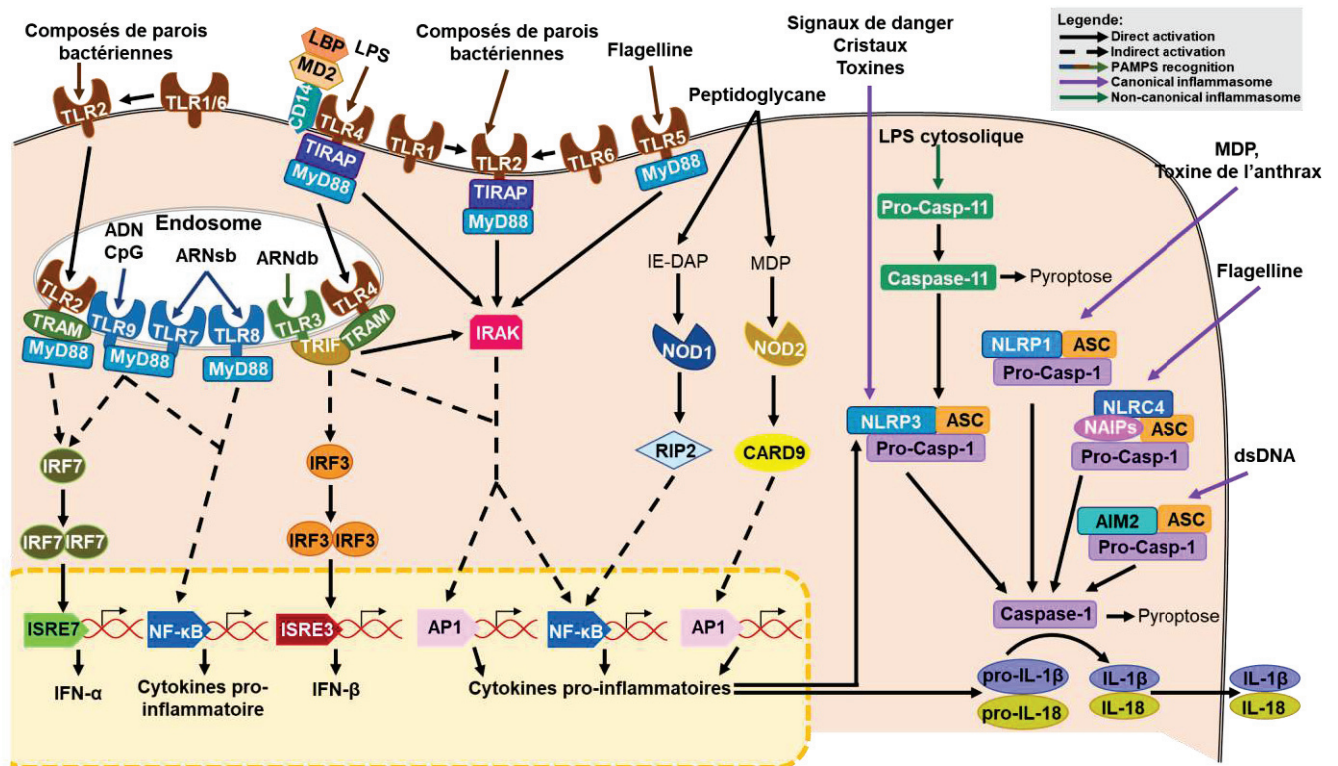


Figure 6 : Activation des TLR, NLR et signalisations induites (adaptée de Faure--Dupuy S; Invivogen) Reconnaissance des composés étranger par les TLR induisant via les protéines adaptatrice (TIRAP, MyD88 ou TRIF) différentes cascades de signalisations permettant le recrutement de facteurs de transcription induisant la synthèse des cytokines. L'activation des NLR NOD1 et NOD2 par des composés peptidoglycans spécifiques permet également via les protéines de signalisation RIP2 et CARD9 le recrutement de facteurs de transcription des gènes des cytokines. L'activation des NLR quant à elle induit le recrutement de l'inflammasome (NLR ou AIM2/+ASC+Pro-Caspase1) permettant le clivage de l'IL-1β et l'IL-18 sous leur forme active.

ADNdb : ADN double brins ; ARNs : ARN simple brin ; ARNdb : ARN double brins

a-Les Toll-Like Receptors (TLR)

Les TLR sont les premiers senseurs de l'immunité innée à avoir été identifiés dans le milieu des années 90 chez la drosophile ⁵⁴. Ils sont de ce fait les PRR les mieux décrits. Il existe actuellement 10 TLR différents caractérisés chez l'Homme. Ceux-ci par leur différence de localisation cellulaire et de reconnaissance des PAMP permettent de reconnaître efficacement un grand nombre de pathogènes intra ou extracellulaires. Les TLR sont composées d'un domaine extra-membranaire riche en leucine (LRR) permettant la reconnaissance des PAMP ainsi que d'un domaine transmembranaire/cytoplasmique TIR (Toll interleukine-1 receptor) permettant l'interaction et la transduction du signal avec les adaptateurs (MyD88, TRIF, TIRAP). Les TLR fonctionnent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et subissent un changement de conformation après interaction avec leurs ligands ⁵⁵.

La distribution intracellulaire des différents TLR joue un rôle important dans l'optimisation de la reconnaissance des différents PAMP. En effet, les TLR reconnaissant des PAMPs provenant de pathogènes extracellulaires sont localisés à la surface des cellules tandis que les TLR reconnaissant les PAMP des pathogènes intracellulaires sont eux localisés au niveau des endosomes (Figure 6) ⁵⁶.

Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 présents à la surface des cellules sont connus pour reconnaître des éléments structuraux des pathogènes (protéines, lipides, lipoprotéines). TLR2 a pour particularité d'être fonctionnel dans une forme hétérodimérique avec TLR1 ou TLR6. Les hétérodimères TLR1/TLR2 et TLR2/TLR6 vont reconnaître respectivement des composés lipopeptidiques diacétylé et triacétylé présents notamment à la surface de certaines bactéries comme par exemple respectivement certains facteurs solubles de *Neisseria meningitidis* et *Mycoplasma salivarium*. TLR4 sous forme d'homodimère dont le ligand le plus connu est le LPS (Lipopolysaccharide) composant les membranes des bactéries à Gram négatif comme par exemple l'*Escherichia coli*, mais également de composés viraux comme les protéines d'enveloppe du RSV (Respiratory Syncytial Virus). Cependant, cette observation a été faite à partir de protéines virales purifiées et non de la particule virale complète ce résultat est discuté ⁵⁷). D'autres molécules ou récepteurs participent au recrutement du TLR4 via les protéine LPB (LPS Binding Protein), MD2 (Myeloïd Differentiation 2) et le corécepteur CD14 permettent l'import du LPS vers son récepteur. Ces protéines joueraient également un rôle dans la reconnaissance des ligands par TLR2. La reconnaissance de leur ligand conduit à la transduction du signal via les adaptateurs TIRAP et MyD88 puis à la cascade de signalisation

permettant le recrutement des facteurs de transcription des cytokines pro-inflammatoires comme AP-1 (Activator Protein-1) et NFκB (Nuclear Factor-kappa B) (Figure 6). Lors de leur activation, les TLR1/2, 2/6 et 4 sont également capables de transloquer dans les endosomes après activation. Le signal alors transduit est différent de celui émis lors de l'activation de ces TLR à la membrane plasmique et conduit à la production d'IFN de type I médiée par l'activation d'une voie TRAM (TRIF-related adaptor molecule) – IRF3 ou 7 dépendante. TLR5 reconnaît quant à lui la flagelline, protéine constitutive des flagelles bactériens permettant leur mobilité et conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via une voie de signalisation MyD88-AP-1/NFκB.

Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont eux présents dans les compartiments cellulaires endosomaux et ont pour particularité de reconnaître les acides nucléiques. Ils sont aptes à reconnaître particulièrement les acides nucléiques provenant de pathogènes, mais dans certains cas pathologiques, ils peuvent également reconnaître et être activés par les acides nucléiques du soi entraînant des maladies auto-immunes. TLR9 est jusqu'à présent le seul TLR caractérisé pour reconnaître les ADN. Ce dernier reconnaît en particulier les ADNs riches en motifs CpG, motifs abondamment retrouvés dans les ADN des pathogènes. Les TLR3, TLR7 et TLR8 reconnaissent respectivement quant à eux les ARN doubles brins⁵⁸ et les ARN simples brin pour TLR7 et TLR8⁵⁹⁻⁶¹. Le TLR8 semble jouer un rôle particulier dans son interaction avec TLR7, en effet, sa présence semble réguler la réponse engendrée par l'activation de ce dernier⁶². De plus, il existe une régulation du TLR9 lors de l'activation du TLR7 et inversement, laissant à penser que les TLR endosomaux sont capables d'interagir de manière directe ou indirecte, pour pallier une activation excessive et pour maintenir une stabilité de la réponse immunitaire tout en facilitant le retour à l'homéostasie⁶³. Ces TLR endosomaux sont régulés par la protéine UNC93B1⁶⁴ qui permet leur translocation du réticulum endoplasmique vers le Golgi puis vers les endolysosomes. Ceux-ci finissent alors leur maturation dans les endolysosomes où la présence des cathepsines et l'acidité plus importante permettent leur clivage dans leur forme active. Au vu de leur capacité à reconnaître les acides nucléiques étrangers ces TLR sont spécialisés dans la reconnaissance des virus comme par exemple TLR7 capable de reconnaître HCV (Hépatite C virus) ou encore TLR3 le WNV (West Nile Virus) ou encore TLR9 avec le HSV (Herpes Simplex Virus). Ils peuvent également reconnaître les acides nucléiques ou leurs intermédiaires réplicatifs de ces virus ou encore d'autres pathogènes intracellulaires tel que les parasites et les bactéries.

b-Les RIG-I-Like Receptors (RLR)

Les Retinoic acid-inductible gene I-Like Receptors sont des senseurs de l'immunité innée présent dans le cytoplasme capable de reconnaître les ARN simples ou doubles brins. RIG-I (Retinoic acid-inductible gene I) et MDA-5 (Melanoma Differentiated gene 5) appartiennent à la famille des DExD/H box hélicase à ARN. Ceux-ci sont constitués de deux domaines CARD (Caspase Activation and Recrutement Domains) en N-terminal ainsi que d'un domaine C-terminal essentiel avec le domaine hélicase pour la fixation et la reconnaissance des ARN étrangers ⁶⁵. RIG-I est plus spécialisé dans la reconnaissance des ARN simples ou doubles brins de petites tailles (<1kbp) contenant un groupement tri- ou diphosphate en 5' tandis que MDA-5 reconnaît préférentiellement les longs ARN doubles brins possédant un groupement phosphate en 5' ou non. Leur activation conduit à la synthèse d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à l'apoptose. L'interaction de plusieurs RIG-I ou MDA-5 avec l'ARN formerait un filament de nucléoprotéine permettant à la fois l'activation de la cascade de signalisation via MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling protein) conduisant à la production d'IFN de type I et à la dégradation des ARN viraux ⁶⁶. La protéine LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) est elle aussi comprise dans cette famille cependant elle ne possède pas les domaines CARD et les effets de son activation sont encore débattus. LGP2 permettrait de renforcer l'interaction entre MDA-5 et les ARN reconnu par celui-ci. En revanche il aurait un effet modulateur de la réponse par RIG-I et permettrait ainsi de diriger spécifiquement la réponse contre les longs ARN via MDA-5. De plus, plusieurs hélicases à ARN appartenant à la famille des senseurs cytoplasmiques à ADN, seraient impliquées dans la reconnaissance des ARN étrangers par les RLR et participeraient à leur activation. DDX3, DDX60, DHX29 ou encore DHX36 participeraient à la reconnaissance et à l'activation par la suite de RIG-I et MDA-5, mais ces mécanismes sont encore mal connus et restent à explorer. De plus, une autre protéine cytoplasmique l'ARN pol (Polymerase) III est capable de convertir les ADN double brins (ADNdb) étrangers en ARN double brins (ARNdb) permettant leur reconnaissance par RIG-I et son activation (Figure 7) ⁶⁷. Le récepteur RIG-I a été démontré pour pouvoir détecter de nombreux virus à ARN comme le virus influenza ou encore le virus de Sendai et MDA-5 serait impliqué dans la reconnaissance de poliovirus. Cependant certains virus sont potentiellement reconnus par ces deux récepteurs du fait de la taille de leur ARN génomique, mais également de leur transcrit servant à la synthèse de leurs protéines de structure par exemple. La coopération entre les RLR est complexe et LGP2 semble jouer un rôle important dans l'orientation d'une réponse médié par MDA-5 plutôt que par RIG-I ^{68,69}.

c-Les senseurs cytoplasmiques à ADN (CDS)

La reconnaissance de l'ADN par l'immunité innée a longtemps été imputée au seul récepteur TLR9. Cependant dans l'utilisation de modèles avec un antagoniste du TLR9 ou KO, il a été observé une production d'IFN en réponse à de l'ADN. Cette réponse est due à une multitude de récepteur cytoplasmique capable de reconnaître l'ADN non seulement étranger, mais également du soi lors de phénomène de dommage à l'ADN. Certains membres de la famille des DExD/H-box hélicase sont identifiés comme étant des senseurs à ADN entraînant une réponse inflammatoire lors de leur activation. DHX9 et DHX36, appartenant à cette famille, conduisent via l'adaptateur MyD88 à la production de cytokines pro-inflammatoire et d'IFN de type I via respectivement NF- κ B et IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7). Un autre membre de cette famille DDX41 quant à lui reconnaît lui aussi les ADNdb mais également des messagers secondaires bactériens bien particuliers les c-di-GMP et les c-di-AMP (cyclique-di-Guanosine ou Adenosine Monophosphate). De plus, son adaptateur STING (Stimulator of Interferon Genes) est un adaptateur commun à de nombreux senseurs cytoplasmique à ADN, mais celui-ci semble être également capable de reconnaître de lui-même les c-di-GMP et les c-di-AMP. De plus STING est capable de reconnaître un produit bien particulier, cGAMP (Cyclique Guanosine Monophosphate–Adenosine Monophosphate), qui lui est produit par un autre senseur à ADN, cGAS (cyclique GMP-AMP synthase) en réponse à de l'ADN. La synthèse de cGAMP par cGAS n'aurait pas pour seul effet d'activer STING endogène, mais activerait également STING dans les cellules néo-infectées de par sa capacité à intégrer les enveloppes des particules virales sécrétées⁷⁰⁻⁷². STING joue un rôle crucial comme adaptateur de nombreux senseurs cytoplasmique permettant ainsi la transduction du signal et la synthèse de cytokines pro-inflammatoire et d'IFN^{55,69}. C'est le cas pour DAI (DNA-dependent Activator of IRFs), IFIX (Interferon Inductible protein X), ainsi que la protéine impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN MRE11. Une autre protéine impliquée dans la réparation de l'ADN Ku70 ainsi que LRRFP1 (Leucine Rich Repeat Flightless-interacting Protein 1) conduisent quant à elle à la synthèse d'IFN de type I et III de manière STING indépendante. IFI16 (IFN- γ -Inductible protein 16) conduirait elle aussi à la production d'IFN de type I via STING, mais pas seulement. En effet IFI16 ainsi qu'un autre récepteur à l'ADN AIM2 (Absent In Melanoma 2) participe également à la mise en place de l'inflammasome par le recrutement de ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) et de la pro-caspase-1. Ce mécanisme est partagé avec certains senseurs de la famille des NLR et participe après un premier signal issu de la stimulation d'un autre PRR (TLR, RLR, CLR) au clivage dans leur

forme active de l'IL-1 β ou l'IL-18 par la caspase 1. Les virus potentiellement reconnus par ces senseurs sont les virus HSV, EBV ou CMV par exemple. Cependant, les mécanismes d'évasions viraux visent à remettre en question l'impact de certains de ces senseurs dans la lutte antivirale ^{73,74}.

d-Les NOD-Like Receptors (NLR)

Les NOD-Like Receptors (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptor) regroupent les protéines partageant une structure commune avec d'une part un domaine riche en LRR et d'autre part un domaine NBD (Nucleotide-Binding Domain). Ils divergent en revanche sur la partie N-terminale ou majoritairement certains comme NOD1, NOD2 et NLRC4 comporte un ou plusieurs domaines CARD permettant le recrutement des caspases tandis que d'autre comme NLRP1 et NLRP3 comportent un domaine PYD (Pyrin Domain) (Figure 6). Comme mentionné précédemment, les NLR jouent un rôle important dans la mise en place de l'inflammasome ^{75,76}. D'une part l'activation de NOD1 ou NOD2 conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dont les cytokines nécessitant le clivage dans leur forme active par la caspase-1 comme l'IL-1 β et l'IL-18. NOD1 et NOD2 reconnaissent principalement des peptidoglycanes composant certains microorganismes notamment des bactéries. NOD1 est spécialisé dans la reconnaissance des peptides iE-DAP (γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid) présent dans les peptidoglycanes des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*...) ainsi que quelques bactéries à Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*...). L'activation de NOD1 permet le recrutement de RIP2, une kinase permettant le recrutement et l'activation du complexe IKK conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires via NF- κ B. NOD2 quant à lui est spécialisé dans la reconnaissance des motifs MDP (Muramyl DiPeptide) retrouvés aussi bien chez les bactéries Gram positif que Gram négatif. L'activation de NOD2 conduit à l'activation de RIP2 puis NF- κ B, mais également par l'activation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) via CARD9 conduisant à l'activation du facteur de transcription AP-1. Dans les deux cas, le recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires. À noter également, que NOD1 et NOD2 ont été décrit pour être capable de détecter des parasites (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*) ainsi que certains virus (Influenza A, Cytomégalo virus...) notamment pour NOD2 qui semble capable de reconnaître l'ARN simple brin cytoplasmique conduisant à la synthèse d'IFN de type I via la

voie MAVS-IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3). Comme décrit précédemment la stimulation de ces récepteurs (TLR, NLR, CDS) conduit à la production de cytokines dépendantes de l'inflammasome pour leur clivage et leur maturation (IL-1 β et IL-18). Ce premier signal conduit également à la production et au recrutement des acteurs de l'inflammasome comme la pro-caspase 1 et les NLR impliqués dont les plus connus NLRP3, NLRC4 ou encore NLRP1. Le recrutement et l'activation de l'inflammasome passe par un second signal dépendant de la détection de DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns) de cristaux (acide urique, alun...) ou encore de toxines microbiennes (par exemple l' α -hémolysine du *Staphylococcus aureus*). Ce recrutement comme précédemment décrit pour AIM2, permet l'assemblage multiprotéique NLR, ASC et pro-caspase-1 conduisant à la forme active de la

Figure 7 : Activation des CLR, RLR et CDS et signalisations induites (adaptée de Faure--Dupuy S; Invivogen) Reconnaissance des composés étranger par les CLR induisant via les protéines adaptatrice (LSP1 ou FcR γ /Syk) différentes cascades de signalisations (PLC γ , CARD9, BCL-10, MALT1, KSR1, CNK, Raf-1) permettant le recrutement de facteurs de transcriptions induisant la synthèse des cytokines pro- ou anti-inflammatoires. La reconnaissance des acides nucléiques étranger de type ARN et ADN via respectivement les RLR (RIG-I, MDA-5 ou LGP2) et les CDS (AIM2, DHX9, Ku70, LRRFIP1, cGAS, IFI16, DAI, STING...) entraîne des cascades de signalisation permettant le recrutement de protéines adaptatrice (MyD88, STING, β -catenin...) permettant le recrutement des activateurs de transcription (IRF3, IRF7...) et de l'activation des gènes codant pour les cytokines via les ISRE ou NF- κ B.

être activée par le biais de la caspase-11 et est appelé inflammasome non-canonique. La mise en place d'une réponse immunitaire innée semble dépendre d'une coopération entre les différents senseurs de l'immunité pour conduire à une réponse spécifique aux stimulus des différents PAMP et DAMP ⁷⁷.

e-Les C-type-Lectine Receptors (CLR) et récepteurs ITAM/ITIM

Les TLR ne sont pas les seuls membres des PRR extracellulaires. Les C-type lectines sont une famille de récepteur complexe intervenant dans de nombreux domaines tel que l'adhésion cellulaire le maintien de l'homéostasie et la reconnaissance de pathogènes. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules ou sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. Il existe en tout 17 groupes classifiés au sein de la superfamille des CLR. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement aux CLR myéloïdes présents à la surface des CPA précédemment décrites ^{78,79}. Ces CLR myéloïdes sont différenciés également par les motifs intracellulaires permettant la transduction du signal après reconnaissance de leur ligand. En effet, ils sont classés en 4 catégories, les récepteurs possédant des motifs hemiTAM (par exemple Dectin-1, CLEC9A...), des motifs ITAM (par exemple Dectin-2, Mincle...), des motifs ITIM (par exemple DCIR...) ou des motifs indépendants des ITAM ou ITIM (par exemple DC-SIGN, LSECtin...) ⁸⁰. Ceux-ci sont capables de reconnaître des composés glycanes sous forme glycolipidiques et/ou glycoprotéiques présents à la surface des pathogènes (bactéries, champignons, parasites et virus) ou des cellules infectées, mais également d'autre composés tel que de protéines des lipides ou des composés non-organiques (DAMP). La fixation des ligands à ces récepteurs est pour la plupart dépendante de la présence du Ca^{2+} . Le signal alors induit n'est pas toujours très clair pour certains récepteurs, il existe encore des zones d'ombre à éclaircir afin de comprendre leur fonctionnement. Par exemple le récepteur DC-SIGN après reconnaissance de son ligand induit un signal capable en fonction de la nature de ce ligand, d'induire ou d'altérer la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans les deux cas, le ligand est internalisé et dégradé et le signal est transduit via l'interaction avec LSP1 (Lymphocyte-Specific Protein 1) puis l'activation de Raf-1 afin d'être d'un part présenté via les molécules du CMH aux cellules de l'immunités adaptatives et d'autre part d'induire une réponse cytokinique adaptée permettant leurs recrutements et leurs activations (Figure 7). Ce CLR est décrit pour être cependant principalement délétère lors d'infections virales et permettrait la prolifération de l'infection comme décrit pour le HIV ou encore HCV ⁸¹. Ils

interviennent pour certain dans le maintien de l'homéostasie du fait de leur capacité à reconnaître des antigènes du soi comme c'est le cas par exemple du récepteur CLEC9A capable de reconnaître les antigènes associés aux débris de cellules mortes associés ou non à des pathogènes. Un autre CLR d'intérêt, la LSECtin présente à la surface des cellules endothéliales sinusoides du foie (les LSEC qui seront décrites dans la partie précédente), des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse. Ce récepteur présente des caractéristiques communes avec DC-SIGN dans la reconnaissance des pathogènes et leur internalisation. Cependant, il aurait pour effet de guider la réponse immunitaire vers un phénotype plus tolérogène. Les récepteurs DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor)^{82,83} et MICL (Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like receptor) possédant tous deux des motifs ITIM semble être capable d'altérer/de contrôler la réponse inflammatoire. Le recrutement des tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Src Homology region 2 domain-containing phosphatase-1 et 2) par l'activation de ces deux récepteurs conduirait à l'inhibition des signaux conduisant à l'activation de NF- κ B ou de certains IRF par un signal TLR dépendant⁸⁴⁻⁸⁶. Ces récepteurs seraient donc fortement impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire afin d'éviter une inflammation excessive pouvant causer d'important dommages à l'organisme. Un autre CLR est capable d'induire une inhibition des voies de signalisation des TLR, BDCA-2 (Blood Dendritic Cell Antigen 2). Ce CLR spécifique des pDC décrites précédemment, comporte le motif ITAM et conduit cependant à l'inhibition de la réponse inflammatoire après son activation⁸⁷. Ces CLR inhibiteurs semblent être ciblés par certains virus HIV notamment ou encore HCV permettant leur maintien par un contrôle de la réponse inflammatoire sensée éliminer ou limiter l'infection. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la reconnaissance des ligands de cette grande famille de récepteur et les mécanismes d'échappement utilisés par les pathogènes pourrait conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques en limitant d'une part l'inflammation comme dans les cas de maladies auto-immunes ou en limitant l'altération des réponses inflammatoires d'autre part lors d'infections chroniques. D'autres récepteurs sont dépendants des motifs ITIM et ITAM tel les LILR (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor) qui respectivement appartiennent à la sous-famille LILRB (inhibiteur/comportant un motif ITIM) ou LILRA (activateur/comportant un motif ITAM). Cependant la dichotomie activateur LILRA/inhibiteur LILRB ne semble pas si claire et semble dépendre du type cellulaire possédant ces récepteurs ainsi que de l'affinité de ce dernier avec son ligand dont beaucoup reste encore inconnue par ailleurs^{88,89}.

f- Inhibition via les récepteurs CLR/ITAM/ITIM de l'activation des TLR, le cas de la voie de l'interféron dans les pDC

Comme décrit précédemment la dichotomie ITIM/inhibiteur et ITAM/activateur est dépendante du type cellulaire et des voies de signalisations induites dans celui-ci. Nous allons parler ici du cas de la voie de l'IFN dans les pDC décrites précédemment. La production d'IFN importante pour la défense contre les pathogènes et les cellules tumorales est également délétère dans les cas de maladies auto-immunes et d'inflammations chroniques.

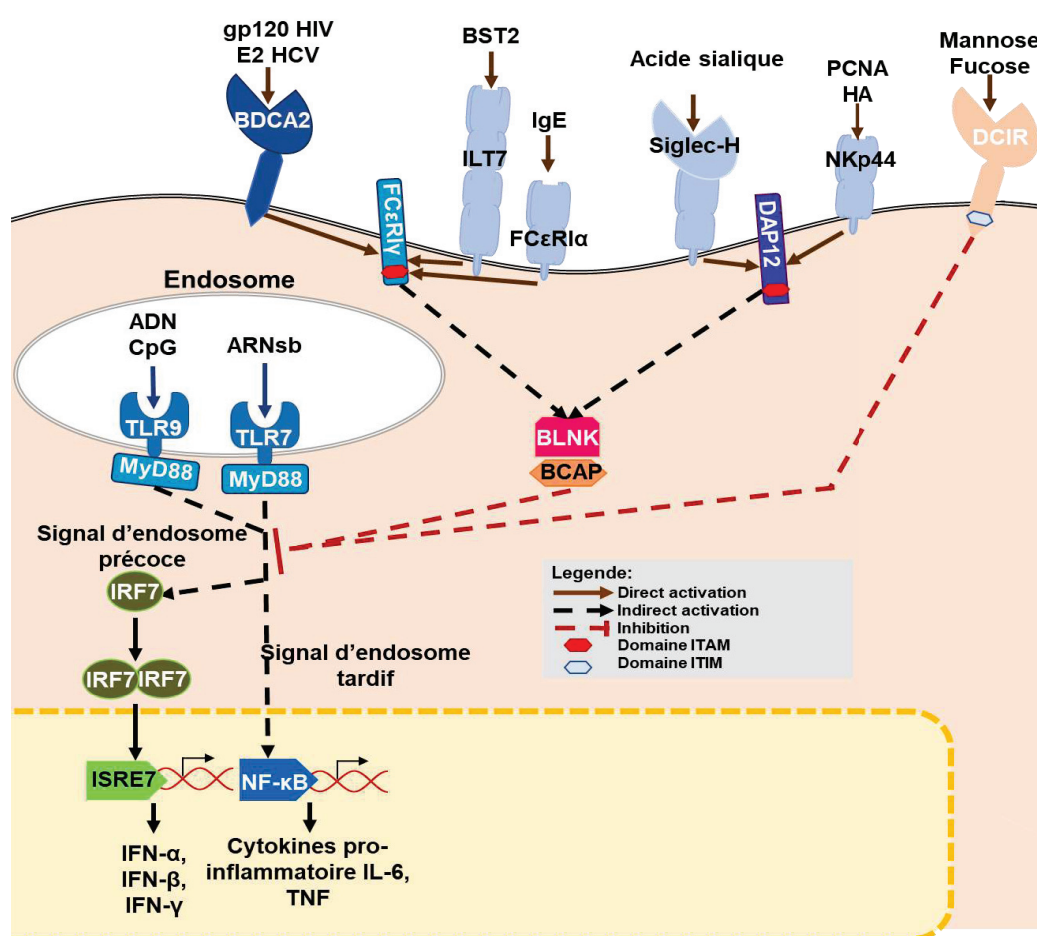


Figure 8 : Activation de la voie interféron sous contrôle de récepteurs inhibiteurs (adaptée de Cao W et Bover L 2010 ; Bao M et Liu Y-J 2013⁹¹ ; Hirsch I *et al* 2017⁸⁸) Les récepteurs inhibiteurs présents à la surface des pDC sont capables, après reconnaissance de leurs ligands ou d'anticorps neutralisants, d'induire des cascades de signalisations interférant avec l'activation de l'IRF7. Les récepteurs inhibiteurs des pDC induisent via un adaptateur (FCεRIγ ou DAP12) et par la suite via d'autres protéines (BLNK, BCAP...) un blocage de la phosphorylation activatrice de IRF7. IRF7 étant activé préalablement par l'activation des TLR7 ou 9, permettant la synthèse de l'IFN de type I et de cytokines inflammatoires. Ainsi, ce mécanisme entraîne une inhibition de la production cytokinique.

Il existe des récepteurs à la surface des pDC productrices permettant d'inhiber la production d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires (Figure 8). Certains d'entre eux ont été précédemment décrits comme appartenant à la famille des CLR (BDCA2, DCIR) ou encore à la famille des LILRA (ILT7). D'autres récepteurs appartenant à la famille des récepteurs Fc (FcεRIα) et des NCR (Natural Cytotoxicity Receptor ; NKp44 ou NCR2).

La signalisation de la plupart de ces récepteurs est dépendante d'un adaptateur présentant un motif ITAM : FcεRIγ ou DAP12 (pour DNAX Activation Protein 12 (kDa)). Pourtant le signal induit dans les pDC via ces motif ITAM induit une inhibition de la voie de signalisation des TLR7 et 9 dont l'activation a lieu soit dans les endosomes précoces induisant la voie dépendante de IRF7 entraînant la synthèse des IFN, soit dans les endosomes tardifs entraînant la synthèse de cytokines inflammatoire via NFκB. (Figure 8). Certains des ligands de ces récepteurs ont pu être identifiés et sont originaires de l'hôte comme les IgE, la tétherine/BST2, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)⁹⁰ induits lors de réponses immunitaires ou dans le dernier cas est surexprimé à la synapse immunologique de certaines cellules tumorales. Cependant d'autres sont originaires de pathogène comme la gp120 (glycoprotéine 120kDa), la glycoprotéine d'enveloppe E2 de HCV⁸⁷ ou la protéine HA du virus de la grippe (Hémagglutinine)⁹⁰, leur permettant ainsi de contrôler la réponse immunitaire des pDC. Bien que spécialisées dans la lutte anti-cancéreuse et anti-pathogénique, les pDC présentent donc des failles par le biais de ces récepteurs. Ceux-ci ne sont cependant pas les seuls mécanismes réduisant la synthèse d'IFN. Il existe également d'autres voies inhibitrices modifiant les cascades de signalisations intracellulaires^{91,92}. Des stratégies thérapeutiques utilisant ces récepteurs et ces voies de signalisations inhibitrices de l'inflammation médiée par les pDC dans les maladies auto-immunes sont explorées⁹³. Les mécanismes mis à jour lors de l'étude des mécanismes d'échappement des pathogènes à la réponse immunitaire d'une part peuvent devenir une option thérapeutique dans le cadre d'inflammations chroniques et de pathologies auto-immunes.

4-Cytokines

Toutes les cellules de l'immunité ou non n'expriment pas tous ces PRR. Cette limitation d'expression de certains PRR participe d'une certaine manière à l'immunorégulation des réponses inflammatoires. De plus, suivant le type cellulaire exprimant ces PRR la réponse immunitaire peut varier fortement du fait de l'environnement dans lequel elles évoluent ou de la spécialisation de ces cellules. La communication entre les différents PRR joue également un

rôle important dans la réponse engagée par la suite et laisse à penser que bien que considéré

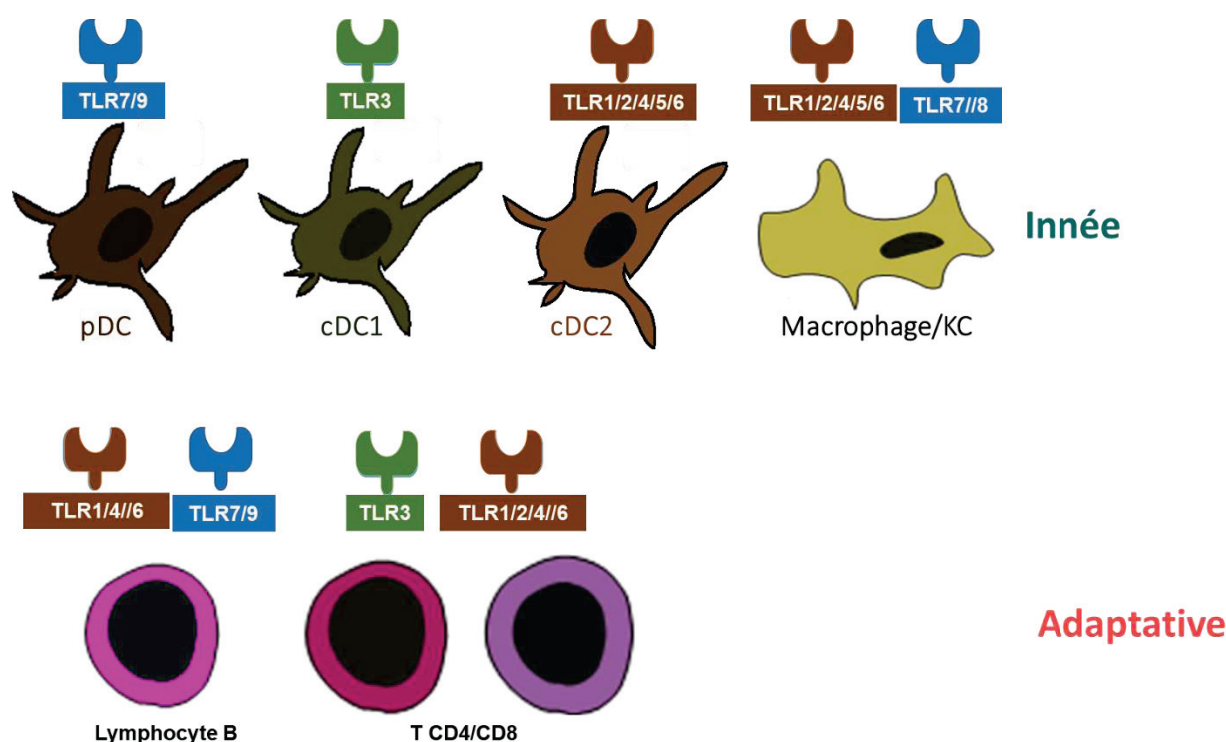


Figure 10 : Expression des TLR de différentes cellules immunitaires innées et adaptatives (adaptée de R&D Systems <https://www.rndsystems.com>) Expression connue des TLR en fonction du type cellulaire de l'immunité innée (pDC, cDC1 et 2, Macrophage) ou adaptative (Lymphocyte T CD4 ou CD8, ou Lymphocyte B). La répartition spécifique des différent TLR à un type cellulaire donnée peut jouer un rôle dans le contrôle, la spécificité et l'efficacité de la réponse immunitaire déclenché ensuite.

Cytokines inflammatoires	Cytokines anti-inflammatoires
IL-1- β ; IL-6; IL-8;	IL-10
TNF- α ; MCP-1	
IFN type I: IFN- α ; IFN- β ;	TGF- β
IFN type II : IFN- γ ;	
IFN type III : IFN- λ 1 à 4	

Figure 9 : Répartition des cytokines pro et anti inflammatoires. Les différentes cytokines produites en cas de réponses immunitaires sont réparties en deux catégories. L'une dite pro-inflammatoire (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN...) visant à stimuler, recruter et induire divers composés (cellulaires, moléculaires) anti-pathogéniques ou anti-cancéreux. La seconde anti-inflammatoire (IL-10, TGF- β) visant plutôt à inhiber les mécanismes immunitaires permettant de maintenir l'homéostasie ou de permettre son retour suite à un processus inflammatoire.

comme un système plus primitif, la réponse immunitaire médié par les senseurs de l'immunité innée présente bien une forme de spécificité. Ces récepteurs sont aussi bien exprimés par les

cellules de l'immunité innée qu'adaptative (voir Figure 9 pour expression TLR connu de différentes cellules immunitaires). Cela s'observe également par la sécrétion des cytokines dont les interleukines (IL), IFN et chimiokine qui varie en fonction du signal induit par différents ligands ^{3,29,94}. Un même récepteur semble capable d'engager différents signaux suivant le type de ligand reconnu et suivant sa quantité détectée ^{55,56}.

La réponse immunitaire présente un équilibre finement régulé entre la réponse inflammatoire et le retour/maintien de l'homéostasie. Les cytokines peuvent être réparties en deux groupes, d'une part les cytokines pro-inflammatoires médians l'inflammation en entraînant une réponse cellulaire et intracellulaire et d'autre part les cytokines anti-inflammatoires inhibant pour leur part les réponses immunitaires en permettant le maintien de l'homéostasie (Figure 10).

Cependant, il est réducteur de définir lors de la sécrétion de cytokine dite pro- ou anti-inflammatoire que l'effet généré entraîne la mise en place d'une inflammation ou non. L'IL-10 et le TGF- β jouent notamment un rôle dans la différenciation des T CD4⁺ et pas uniquement des Treg. Le message transmis par une réponse cytokinique est dépendant non-seulement des cytokines le composant, mais également de leur quantité et du fait de l'environnement inflammatoire ou non.

Le foie du fait de sa localisation et ses fonctions vitales entre autres choses, nécessite une telle régulation et c'est pourquoi les cellules professionnelles ou non, jouent chacune un rôle dans le maintien complexe de cet organe (Figure 11)^{1,95,96}. Cependant, il arrive que ce système échoue provoquant la survenue de complications hépatiques pouvant conduire à la survenue de pathologies aiguës graves ou chroniques lors de la prise trop importante de toxiques, de maladie auto-immune, de l'infection par des pathogènes ou de la prolifération de cellules tumorales. L'atteinte chronique du foie par ailleurs pouvant conduire à la cancérogénèse appelée hépatocarcinome ou HCC. Par le biais de mécanismes co-évolutifs et de l'environnement tolérogène du foie, certains pathogènes ont développé des stratégies permettant l'installation d'infection chronique comme pour le virus de l'hépatite B que nous allons voir dans la partie suivante.

Figure 11 : Immunologie du foie simplifiée (adaptée de Schmidt SV et al 2012⁹⁶; Rehmann B 2013⁹⁵; Heymann F et al 2015¹.) voir page ci-après. Représentation schématique des réponses immunitaires induite au niveau du foie en condition normale inflammatoire ou de tolérance. Ces mécanismes conduisent respectivement à l'élimination de l'agent anormal induisant une réponse immunitaire ou au maintien de l'homéostasie en réponse à un antigène du soi par exemple. En condition pathologique, ces mécanismes sont soit incapable d'éliminer l'agent anormal donnant lieu à une pathologie chronique (Infection chronique cancer...). Dans le second cas une réponse immunitaire non contrôlée contre le soi entraîne une inflammation anormale et des dommages au niveau du tissu hépatique ainsi qu'une fibrose anormale (auto- 55 immunité...).

B-Le virus de l'hépatite B (HBV)

Malgré sa composante immunitaire importante, le foie est la proie de certaines infections. L'environnement tolérogène de celui-ci peut potentiellement faciliter l'acceptation des greffes hépatiques mais également l'installation des pathogènes dont les virus hépatotropes (HCV, HBV...). Nous allons ici discuter du cas particulier d'HBV.

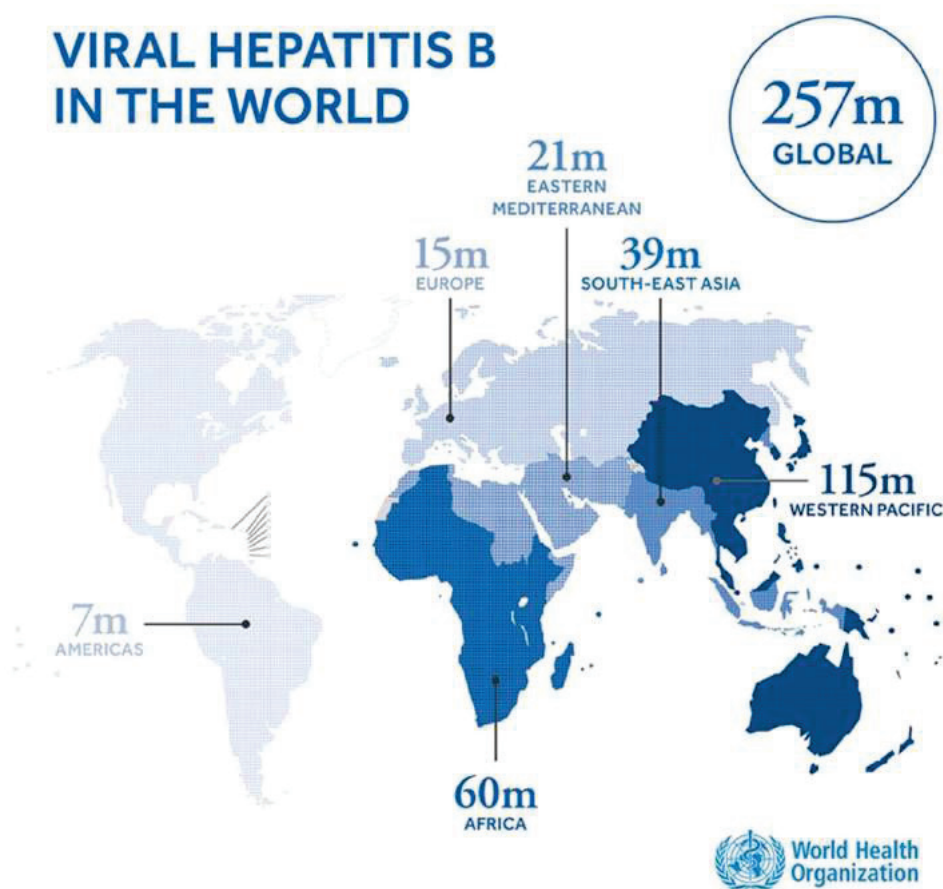


Figure 12 : Répartition géographique des personnes infectées chroniquement par HBV dans le monde ([Global Hepatitis Report WHO 2017 PDF online](#)). 257 millions de personnes sont porteuses chroniques de l'infection par le virus de l'hépatite B à travers le monde selon une estimation de l'OMS de 2017. Les régions endémiques sont principalement l'Asie du Sud-Est (150 millions de personnes infectées) et l'Afrique Sub-saharienne (60 millions de personnes infectées)

1-Généralités sur le virus de l'hépatite B

L'infection par HBV est encore aujourd'hui un problème de santé publique important avec environ 240 millions de personnes chroniquement infectées dans le monde où les plus fortes régions impactées sont l'Asie du Sud-Est et l'Afrique sub-saharienne. Ce virus grâce à ses particularités que nous allons détailler ci-après a su se maintenir à travers les siècles et son existence semble être bien antérieure à sa découverte dans les années 70⁹⁷⁻⁹⁹.

a-Le Virus

a.1- Classification

HBV est un virus appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* regroupant les virus à ADN double brin possédant une étape de la réplication utilisant une reverse-transcriptase et infectant le foie (*Hepa-dna-viridae* : virus à ADN hépatotrope). Il appartient au genre *Orthohepadnavirus* regroupant les *Hepadnaviridae* infectant le foie des mammifères non-humains et humains. Les virus regroupés dans ce genre comportent tous des caractéristiques communes que ce soit au niveau structural (particules virales), réplcatif (matrice ARN reverse-transcrits pour obtenir l'ADN viral des particules infectieuses) ou génomique (entre 75 % à 50 % d'homologie suivant les espèces). Ces homologies importantes ont permis jusqu'à encore aujourd'hui d'étudier les mécanismes viraux et antiviraux impliqués dans l'infection par HBV (comme le WHB et le DHBV pour respectivement Woodchuck et Duck HBV ce dernier appartenant au genre des *Avihepadnavirus*) du fait du manque de modèle infectieux humains *in vitro* relevant jusqu'à la découverte du récepteur d'entrée du virus.

a.2-Génome et capacité codante

Le HBV humain est constitué d'une enveloppe formée des protéines virales et d'une bicouche phospholipidique, d'une capside icosaédrique renfermant le génome à ADN partiellement double brins. Cet ADN partiellement double brins d'environ 3,2kb code pour les différentes protéines virales, que nous décrirons plus en détail par la suite. Le génome viral est constitué de quatre ORF chevauchants (Opening Reading Frames ou cadres ouverts de lecture) nommés région S, région C, région P et région X codant respectivement pour les protéines d'enveloppe (PreS1, preS2 et S (ou HBsAg)), les protéines de capside et HBeAg, la polymérase virale et la protéine X.

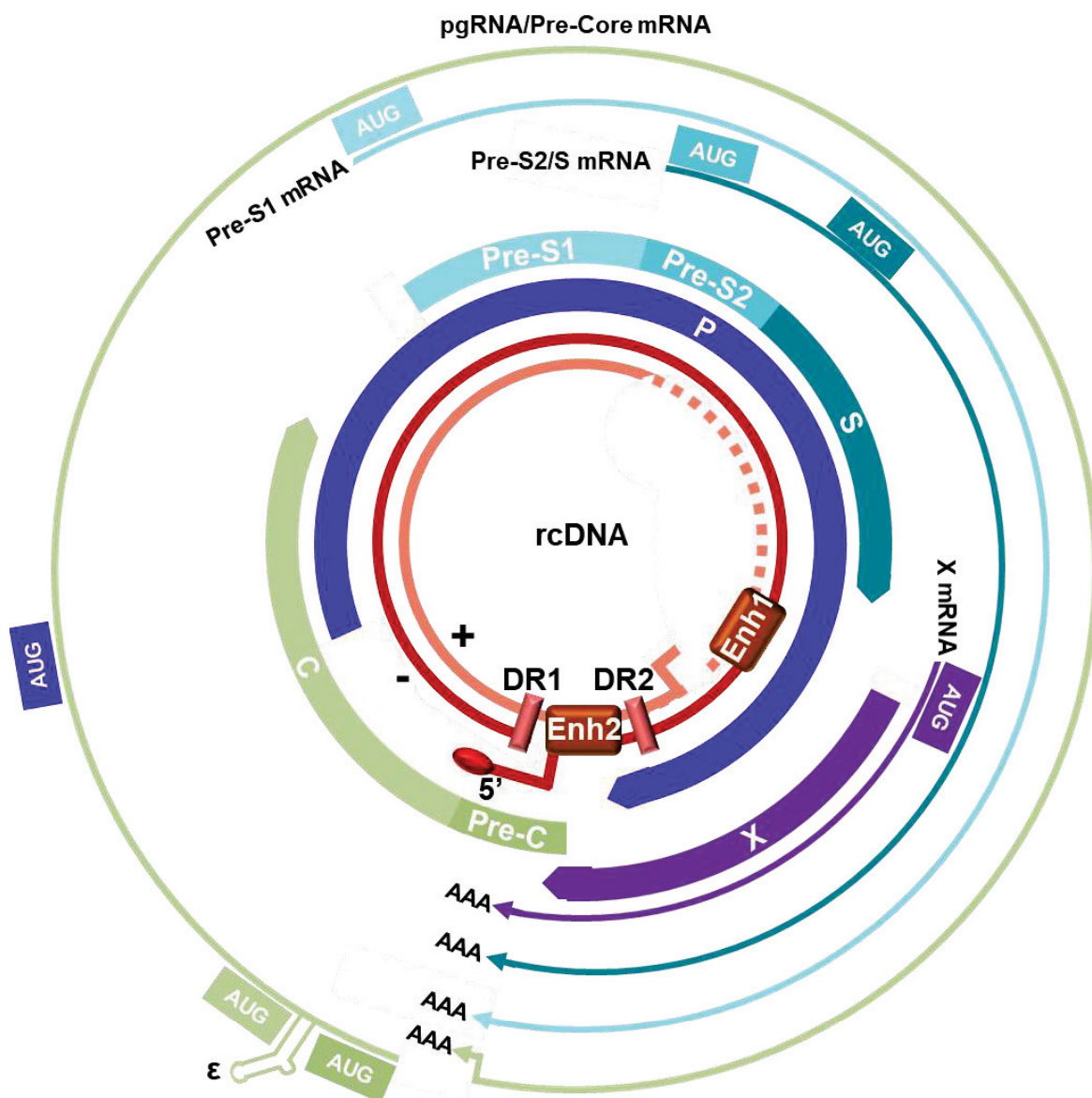


Figure 13 : Génome de HBV et ses différents transcrits (adaptée de Liang *et al* 2009)
Représentation schématique du génome partiellement double brin d'HBV contenant les différents ORF codant pour les différents ARN messenger viraux (ARNpg/Pre-core, X, Core, Pol et S).

Comme décrit précédemment il est partiellement double brin du fait que l'un des deux brins de son génome est incomplet (2,8kb environ). Cette structure particulière est présente dans les particules infectieuses complètes que nous décrirons par la suite, on parle alors d'ADNrc (relâché circulaire). Le brin négatif complet sert de matrice transcriptionnelle au brin positif dont il manque environ 600 nucléotides ¹⁰⁰. La complémentation du brin positif ferait intervenir des enzymes de réparation à l'ADN de la cellule infectée. Le génome complet permet la synthèse des transcrits nécessaires à la réplication virale et à son maintien dans l'hôte. Le génome viral est également composé de quatre régions promotrices de la transcription ainsi que de deux régions enhancers permettant le recrutement d'activateur de la transcription. La régulation de la transcription est également assurée par la présence de régions CRE (Cis-Regulatory Elements). Les transcrits générés codent pour les différentes protéines virales. L'ARNpg (ARN pré-génomique) quant à lui est généré à partir de l'intégralité du génome il coderait pour les protéines issues des régions P et C et sert de matrice à la polymérase virale pour obtenir l'ADNrc des nouveaux virions. Les deux autres régions codent pour leur ARNm propre ^{100,101}.

L'ORF Pol, qui couvre la plus grande partie du génome viral (environ 70 %), code pour la polymérase virale qui permet entre autres la reverse-transcription de l'ARNpg en ADNrc. La polymérase d'HBV est composée de quatre sous-domaines nécessaire à son activité de synthèse de l'ADNrc : la reverse-transcriptase permettant la conversion de l'ARN en ADN, une ribonucléase H permettant de dégrader le brin d'ARN dans les doubles brins hybrides ARN/ADN fréquents dans les étapes de reverse-transcription ainsi que dans la réplication de l'ADN, une région spacer et la protéine terminale permettant l'attachement et l'encapsidation ainsi que la reverse transcription à l'ARNpg via le motif ϵ sur ce dernier (Figure 13).

L'ORF Précore/Core code quant à lui pour la protéine de capside Core du virus ainsi que pour l'antigène précore nommés respectivement HBcAg et HBeAg. La traduction complète de cet ORF Précore/Core conduit à la synthèse de l'HBeAg à la suite des clivages de la région N terminale et C terminale du précurseur. Il s'agirait de la seule protéine d'HBV à subir une modification post-traductionnelle dans sa partie N et C terminale ¹⁰². Elle a également la particularité d'être sécrétée en quantité importante par les cellules infectées. Cependant, son véritable rôle lors de l'infection reste à l'heure actuelle non élucidée. Elle ne semble pas nécessaire au cycle viral, mais attesterait de l'établissement d'une infection chronique par le virus. Son interaction avec le système immunitaire est là aussi discutée (voir partie 2-b-Infection Chronique et Immunité).

La protéine HBcAg est la protéine composant la capside virale (voir partie ci-après). Celle-ci, peut s'assembler sous plusieurs formes allant du simple dimère à la capside virale complète sous la dépendance de mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation de sa partie C-terminale. Ce mécanisme induit des changements de conformation de cette partie lui permettant d'interagir avec les protéines d'enveloppe pour former la particule virale. Ce domaine possède également un site d'import nucléaire NLS (Nuclear Localisation Signal) ainsi que la capacité à fixer les acides nucléiques (notamment l'ARNpg voir partie I-B-1-c cycle viral) ¹⁰³.

L'ORF X code pour la protéine HBx. Celle-ci est indispensable à la transcription du minichromosome viral d'HBV ou ADNccc (covalently closed circular) responsable de la persistance virale que nous détaillerons par la suite ^{104,105}. HBx régule non seulement la réplication d'HBV, mais protège également l'ADNccc du facteur de restriction récemment découvert Smc5/6 en empêchant son interaction avec le chromosome viral et en entraînant sa dégradation ^{106,107}. De plus, cette protéine serait capable d'activer non seulement la transcription des gènes viraux d'HBV, mais également de gènes cellulaires. Les rôles de HBx ne sont pas clairs dans la mise en place de la cancérogenèse. Cependant son implication dans la régulation des gènes ou complexes protéiques impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose ou encore des mécanismes de réparations de dommage à l'ADN qui ont été décrites suggérerait un rôle d'HBx dans ce mécanisme ¹⁰⁴.

L'ORF S code pour les trois protéines d'enveloppes que sont les protéines LHBs (Large), MHBs (Medium) et SHBs (Small). Ces trois protéines sont obtenues à partir de deux ARNm différents. Le premier code pour la protéine LHBs et comprend l'intégralité du transcrit de la région S (Pré-S1, Pré-S2 et S) (Figure 13). Le second code pour les deux autres protéines d'enveloppe comprenant respectivement pour MHBs le transcrit Pré-S2 et S et pour SHBs le transcrit S (Figure 13). Ces trois protéines possèdent la même partie S terminale en 3'. Cette partie commune contient les 4 domaines transmembranaires (TM1 à 4) des protéines S. La partie Pré-S1 de LHBs, contient un site de myristoylation en N-terminal nécessaire pour la reconnaissance et l'entrée des particules virales dans les hépatocytes via le récepteur NTCP (sodium-tauchlorate cotransporting polypeptide) ^{108,109}. Cette dernière participe également à la formation de l'enveloppe virale autour de la capside. SHBs est la protéine la plus produites, elle est indispensable à la production de particules virales. La protéines MHBs, quant à elle, ne semble pas nécessaire à la production de particule virale ¹¹⁰. Cependant, elle agirait comme un « espaceur » permettant un meilleur agencement et fonctionnalité des protéines de l'enveloppe

virale. Les protéines HBsAg ont la particularité d'être sécrétées dans les particules virales, mais également sous forme de particules subvirales comme HBeAg (voir partie ci-après).

Il existe un autre transcrit provenant d'un épissage alternatif de l'ARNpg appelé SP1 produisant la protéine HBSP (Hepatitis B Spliced Protein) ¹¹¹. Celle-ci a été découverte à l'origine dans des biopsies hépatiques de patients chroniquement infectés et semble résulter d'une augmentation des mécanismes d'épissage alternatif dans les hépatocytes au cours de l'évolution de la maladie. Son rôle et ses fonctions sont encore à l'étude, mais il semblerait qu'elle joue un rôle dans des mécanismes réduisant les dommages au foie découlant de la réponse immunitaire ¹¹².

Tous ces transcrits aboutissent aux différentes protéines virales constituant les particules infectieuses et les particules subvirales.

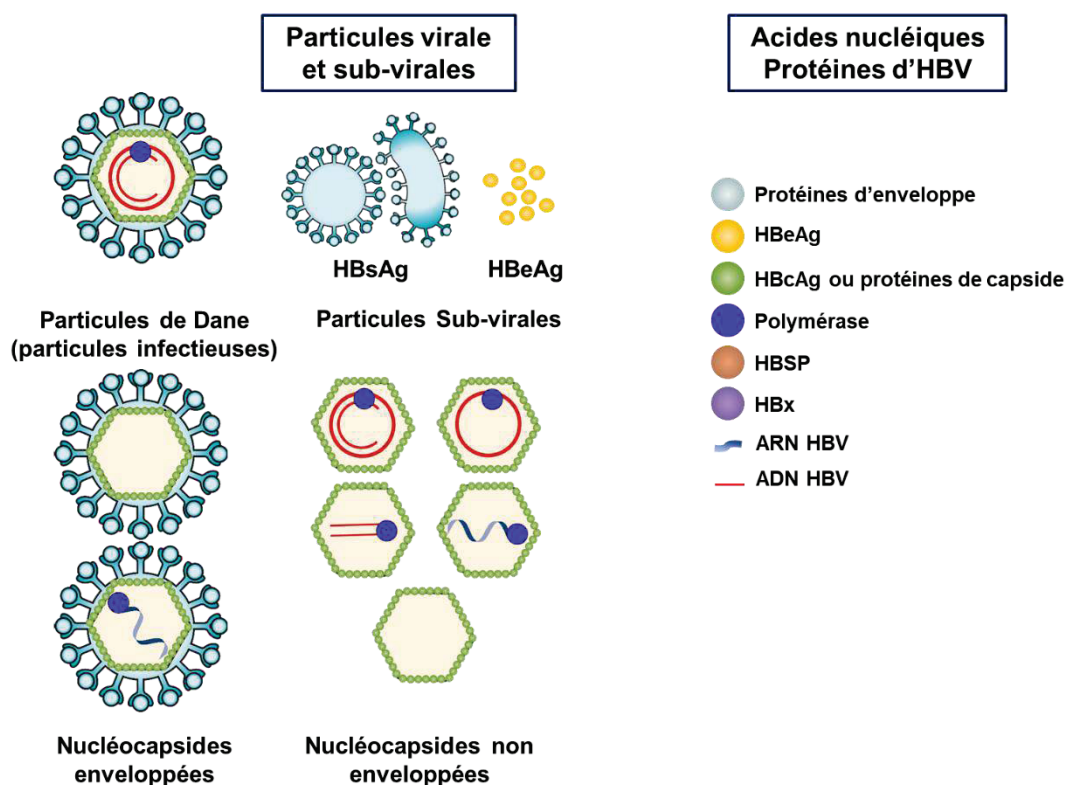


Figure 14 : Particules virales et sub-virales retrouvées lors de l'infection par HBV.

L'infection par HBV produit divers composant viraux au niveau protéiques (HBeAg, HBcAg, HBx...) mais également de nombreuses formes de particules incomplètes (HBsAg, particules dépourvues de génomes ou de l'ADNrc. Certaines particules pourvue uniquement de la capsid virale (HBcAg), dépourvues d'enveloppe, ont été également décritent *in vitro*.

a.3-Particules virales et particules subvirales.

L'infection par HBV a pour particularité de produire de nombreuses particules différentes. Dans le cadre d'une infection productive naturelle (en absence de traitement) on peut identifier deux composants majeurs : les particules virales complètes et les particules subvirales.

Les particules virales complètes ou particules de Dane ⁹⁷ sont les particules infectieuses d'HBV. Elles sont composées de l'extérieur vers l'intérieur : 1) d'une enveloppe lipopeptidique comportant les protéines S décrites précédemment LHBs/MHBs et SHBs ; 2) d'une nucléocapside icosaoédrique composée entre 180 et 240 dimères d'HBcAg ; 3) de l'ADNrc précédemment évoqué portant le génome viral et de la polymérase ^{113,114}. La taille des particules virales est comprise entre 40 et 50 nm (Figure 14).

Les particules subvirales sont des particules sécrétées comme les particules de Dane ou l'HBcAg. Cependant, celles-ci sont défectives et non-infectieuses du fait qu'elles ne contiennent pas le génome viral permettant sa réplication. Elles sont sécrétées en excès par les hépatocytes infectés, de 1000 à 100 000 fois plus en comparaison aux particules complètes ⁹⁷. Les particules subvirales sont composées des protéines de surfaces et existent sous deux formes en fonction de la composition en L, M ou SHBsAg (Figure 14). Les sphères sont composées principalement des protéines M et SHBsAg avec une prédominance de cette dernière. La protéine LHBsAg en est absente. Les filaments d'autre part, sont composés des trois protéines S dans des proportions identiques aux particules virales complètes. Ces particules subvirales non-infectieuses semblent pourtant jouer un rôle important dans sa mise en place. En effet, leur présence pourrait faciliter la persistance et la réplication virale par le biais d'effet immunomodulateur. Cependant, leurs impacts font débat dans la communauté HBV (voir partie I-B-2-b-Infection chronique et immunité)

Les particules virales et subvirales décrites ici sont classiquement retrouvées dans l'infection naturelle par HBV. D'autres particules subvirales, en revanche ont été retrouvées *in vitro* ou chez les patients notamment sous traitements antiviraux (voir partie I-B-3-a-Traitement actuel et recommandations)

Les capsides non-enveloppées ont été identifiées *in vitro* et leur relevance *in vivo* n'a pour l'instant pas été mise en évidence. Celles-ci ont été identifiées comme étant capable de diffuser dans les cellules par des mécanismes d'endocytoses clathrine-dépendant ¹¹⁵. Présentant un fort potentiel immunogénique, ces particules peuvent contenir l'ADN (rc, néosynthétisé,

double brin linéaire/dbl), l'ARNpg ou encore être vide. La capacité d'assemblage de l'HBcAg pourrait être à l'origine de ces capsides nues, et leur présence pourrait être un marqueur d'apoptose des cellules infectées.

Les particules virales complètes à ARNpg ou vide, seraient retrouvées dans les cas de traitements antiviraux. L'impact de ces particules est encore peu évalué et est à l'étude dans le suivi de l'évolution de la maladie en tant que marqueur¹¹⁶⁻¹¹⁸. (Voir partie I-B-b.1- Nouveaux marqueurs de suivi).

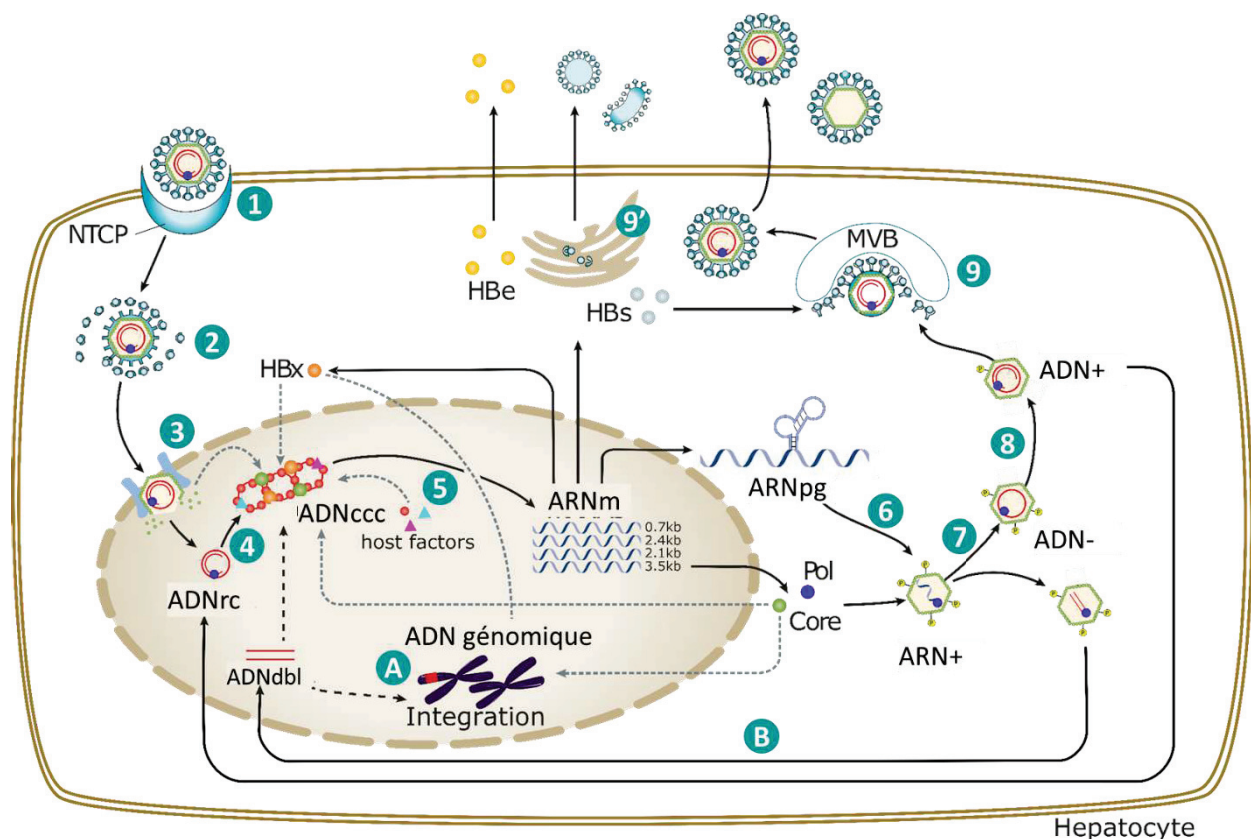


Figure 15 : Cycle viral du HBV (adaptée de Testoni B *et al* 2017) 1) entrée virale ; 2) libération de la capside ; 3) entrée nucléaire ; 4) conversion de l'ADNrc en ADNccc via l'intervention de facteurs cellulaires ; 5) synthèse des ARN messager ; 6) encapsidation de l'ARNpg ; 7/8) conversion de l'ARNpg en ADNrc sous l'action de la polymérase ; 9) incorporation de la capside néoformée dans l'enveloppe virale dans les multivesicular body (MVB) et sécrétion des particules virales ainsi qu 9') des particules sub-virales HBsAg et des protéines HBeAg ; A) Intégration du génome viral dans l'ADN de l'hôte ; B) Recyclage des capsides virales néoformées dans le noyau et libération du génome sous forme d'ADN double brins linéaires.

a.4-Cycle viral et ADNccc

Le cycle viral du HBV est réparti en trois étapes distinctes, la phase précoce, intermédiaire, et tardive. (Figure 15 les étapes seront mentionnées dans le texte ci-après par cette nomenclature (x) ; x correspondant au numéro ou à la lettre encadré/e en vert sur le schéma)

La phase précoce commence par l'attachement de la particule virale à l'intérieur de l'espace de Disse à l'hépatocyte, via des corécepteurs de type HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycans) puis via son récepteur spécifique d'entrée, le NTCP ¹¹⁹. L'interaction avec la partie pré-S1 de la protéine LHBs permet l'internalisation de la particule virale par des voies d'endocytose (1).

À la suite de l'entrée dans la cellule, les protéines de surface sont détachées libérant la nucléocapside et permettant le transport actif de cette dernière jusqu'au noyau par les microtubules (2).

Les mécanismes permettant l'entrée dans le noyau restent encore discutés. L'entrée se ferait par le passage de la nucléocapside complète à travers le pore nucléaire du fait de sa petite taille (~20nm). Une autre hypothèse impliquerait le NLS présent sur HBcAg qui permettrait l'import de la nucléocapside, de manière active par le biais d'importines. La maturation de la nucléocapside semble cependant un critère important pour le relargage du matériel génétique dans le noyau. L'ADN sous sa forme rc est ensuite relargué à l'intérieur du noyau (3).

L'ADNrc est alors complété pour former un ADNdb qui à la suite d'un processus de chromatinisation et d'attachement d'histones donne naissance à l'ADNccc (4). De nombreux facteurs cellulaires sont impliqués dans ce processus de conversion de l'ADNrc en ADNccc.

L'ADNccc est d'une importance capitale dans le maintien de l'infection par HBV dans l'hépatocyte. Il permet la persistance du génome viral au sein du noyau de la cellule du fait de sa stabilité induite par le détournement de facteur de l'hôte (histones, régulateurs épigénétiques...) ainsi que les protéines virales participant à sa protection et à sa transcription (HBx) décrits précédemment (5) ^{104,114}. De plus, la quantité d'ADNccc peut être augmentée par le biais de recyclage des nucléocapsides néoformée contenant de ADNdb ou rc viral et important celui-ci dans le noyau pour former un nouveau minichromosome viral (B). L'ADNccc est le support transcriptionnel des ARNm, ARNpg et des protéines virales. La stabilité, la localisation nucléaire et le renouvellement de celui-ci, posent donc un important

problème dans le contrôle et l'élimination de l'infection virale. La transcription des ARNm via l'ADNccc représente l'entrée dans la phase intermédiaire du cycle viral. Elle requiert le recrutement des facteurs de transcription spécifiques du foie HNF3 et HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factors 3 et 4).

Un autre évènement peut permettre le maintien du génome viral au sein du noyau de la cellule. Celui-ci peut être intégré à l'ADN génomiques de l'hôte à partir de l'ADNdbl par un processus de recombinaison homologue (A). Cet ADN intégré participerait à la production de particules subvirales indépendamment de l'ADNccc. Cet évènement aléatoire et ses conséquences sont cependant encore mal compris, mais laisse à supposer une implication dans la transformation des hépatocytes en cellules tumorales conduisant à la survenue de l'HCC ¹²⁰.

Les différents ARNm et l'ARNpg transcrits vont subir un épissage pour certains et être traduit par la suite pour donner les différentes protéines virales précédemment décrites : HBx, HBsAg, HBcAg ou Core, HBeAg, HBSP et la Polymérase virale via le réticulum endoplasmique. D'autre par l'ARNpg va également servir de matrice à la polymérase virale pour être rétro-transcrit et synthétiser ainsi l'ADNdb. Cette étape requiert l'interaction entre le domaine ϵ de l'ARNpg (Figure 13) et la polymérase virale. Ce mécanisme induit l'encapsidation de ce complexe et permet la formation d'une nouvelle nucléocapside (6). La reverse transcription de l'ADNpg en ADNrc par la polymérase virale se déroule alors à l'intérieur de la nucléocapside (7). Durant cette étape la nucléocapside (HBc) subit une déphosphorylation permettant sa maturation et son interaction avec les protéines d'enveloppes (8).

Commence alors la phase tardive. Les nucléocapsides matures contenant l'ADNrc migrent vers les membranes des vésicules intracellulaires où les trois protéines HBsAg sont produites, les MVB (Multi Vesicular Bodies) (9). L'assemblage se produit notamment par l'interaction entre la nucléocapside et le domaine Pré-S1 des protéines LHBsAg ¹¹⁰. Les particules virales complètes sont alors conduites à la membrane cytoplasmique pour être sécrétées par le biais de complexes endosomaux de transport ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport).

D'autre part les particules subvirales HbsAg et les HBeAg sont sécrétés par une autre voie dépendant de l'appareil de Golgi (9').

Les nouvelles particules produites peuvent alors infecter de nouvelles cellules et répandre l'infection virale dans les hépatocytes du foie.

2-Pathogénese du HBV et interaction avec l'immunité

a-Pathogénèse

a.1- Mode de transmission

L'infection par le HBV peut être transmise par la voie sanguine et par les voies génitales. Celles-ci peuvent avoir lieu 1) par transmission verticale de la mère à l'enfant durant l'accouchement ou par le biais du lait maternel ; 2) par transmission horizontale lors de rapports sexuels non-protégés, d'utilisation d'objets coupant/tranchant ou piquant (rasoirs, ciseaux...) au sein des familles/personnes proches ou chez les usagers de drogues échangeant des seringues contaminées. Le risque de contamination est accru en fonction de la charge virale inoculée et de l'absence de protection immunitaire (vaccin).

a.2-Evolution de l'infection

La primo-infection est la plupart du temps silencieuse et la durée avant la déclaration de la pathologie est variable entre quelques semaines à plusieurs mois.

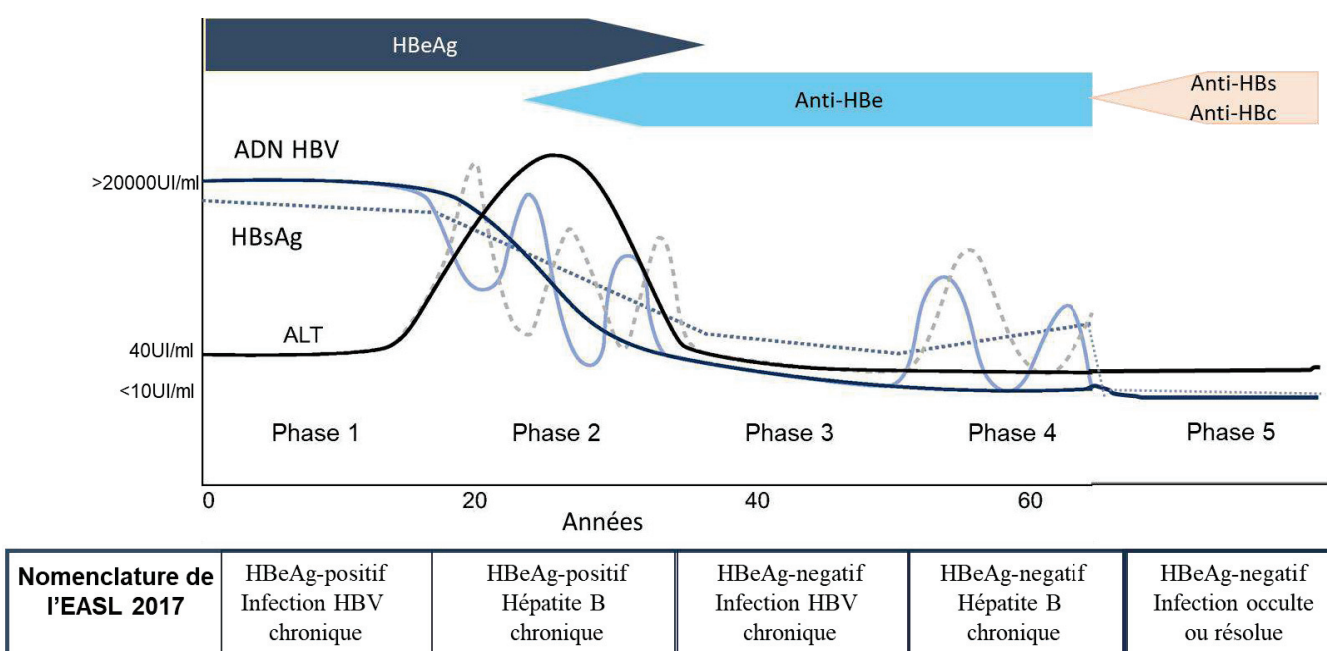


Figure 16 : Evolution, variabilité et nouvelle nomenclature des phases d'infections chroniques par HBV (adaptée de EASL CPG HBV 2017 ; Lok A *et al* 2017) Evolution naturelle de l'infection chronique par HBV au cours du temps des différents marqueurs : de suivies virologiques (ADN HBV, HBeAg, HBsAg) ; de suivies des fonctions hépatiques (ALT pour Alanine aminoTransférase) ; de suivies sérologiques (anticorps anti-HBeAg, anti-HBsAg ou anti-HBcAg).

L'hépatite B aigüe est la première phase de la maladie. Dans la majorité des cas cette phase est asymptomatique. Parfois, celle-ci peut se manifester par des symptômes non-spécifique (grippaux : courbatures, fièvre, fatigue, nausée...). Dans de très rares cas, l'infection conduit à une hépatite aigüe fulminante gravissime. Chez l'adulte dans 90 % des cas, l'infection se résout d'elle-même par le biais d'une réponse immunitaire innée et adaptative. L'activation d'une réponse T CD8⁺ et NK induisant la mort des cellules infectées d'une part, le contrôle via l'expression importante de cytokines inflammatoires antivirales et la production d'anticorps neutralisants par les lymphocytes B bloquant l'expansion de l'infection conduisent à la résolution de l'infection et à l'élimination de l'ADNccc du HBV. Dans 10 à 5 % des cas chez l'adulte la maladie évolue vers une hépatite chronique. A savoir que chez le très jeune enfant, la résolution de l'hépatite aigüe est plus rare et évolue le plus souvent vers une infection chronique par le HBV.

L'évolution de l'infection chronique par l'hépatite B est divisée en 5 phases prenant en compte plusieurs facteurs viraux (ADN HBV ou charge virale, HBeAg, HBsAg) et hépatiques (Alanine aminoTransferase ou ALAT, une enzyme hépatique renseignant lorsque les taux sont supérieurs à la normal (>~40UI/ml) d'un état inflammatoire du foie). Les patients sont répartis suivant la présence ou non de l'HBeAg sérique. Ces groupes sont également différenciés par l'infection chronique par HBV avec ou sans inflammation du foie indiqué par les ALAT ¹¹⁷ (Figure 16).

La première phase représente les patients atteints d'une infection chronique par le HBV et positif pour l'HBeAg. Cette phase est caractérisée par l'absence d'atteinte hépatique marquée de plus par des niveaux d'ALAT normaux. La charge virale ainsi que les quantités d'HBsAg circulant extrêmement élevés représente une contagiosité importante. La charge virale élevée et la prolifération des hépatocytes malgré l'absence de dommages au foie, pourrait jouer un rôle important dans la survenue des phénomènes d'intégrations des ADN viraux pouvant conduire à l'HCC débuterai dans cette phase précoce.

La seconde phase, HBeAg-positif et hépatite B chronique, quant à elle, est représentée par l'apparition de dommage au niveau hépatique accompagné de niveaux d'ALAT élevés en présence d'HBeAg sérique ainsi qu'une charge virale moins forte qu'en phase 1, mais toujours importante. Cette phase est accompagnée d'une inflammation hépatique forte ou modérée ainsi qu'une progression accrue de la fibrose. L'évolution de cette phase est variable en termes de temps, dans certains cas la production d'anticorps dirigés contre HBeAg et la suppression de la charge virale conduit à l'entrée dans la phase 3 HBeAg-négatif.

La phase 3, HBeAg-négatif et infection chronique par HBV est caractérisée par la présence d'anticorps anti-HBeAg, une faible charge virale (<2000 UI/ml) et un niveau d'ALAT normal. La séroconversion et la chute des quantités d'HBsAg sériques peuvent arriver spontanément durant cette phase. Cependant, l'infection virale bien qu'à plus faible niveau, est toujours présente. Le risque d'évolution vers la cirrhose bien que plus faible dans cette phase, la progression de la maladie vers la phase 4 HBeAg-négatif à Hépatite B chronique peut toutefois survenir.

La phase 4, quant à elle, est caractérisée par l'absence d'HBeAg ainsi que la fluctuation d'une faible charge virale et de forts niveaux d'ALAT en parallèle. L'inflammation et la fibrose hépatique sont sévères ou modérées dans cette phase. La perte de l'HBeAg serait due à des mutations de la région dans les promoteurs de la région C du génome d'HBV. Cette phase présente un faible taux de rémission de la pathologie.

La phase 5 appelée également infection HBV occulte est caractérisée par l'absence d'HBsAg sérique ainsi que d'une séroconversion à HBcAg et quelque fois à HBsAg. Les patients dans cette phase présentent un niveau d'ALAT normal et une charge virale faible ou indétectable. Cependant, l'ADN HBV est toujours détectable au niveau du foie laissant possible une réactivation de la réplication virale, dans les cas d'immunosuppression notamment. La survenue d'une cirrhose et/ou d'un HCC sont fortement diminués chez ces patients, cependant une surveillance est requise dans les cas de cirrhose antérieure à cette phase.

a.3-Cirrhose et Hépatocarcinome

Les hépatites B chroniques peuvent aboutir au développement de fibrose, cirrhose et HCC. Les risques de progression vers ces pathologies sont variables et dépendent des phases de la maladie. L'incidence de la survenue de cirrhose en 5 ans chez les patients non traités présentant une hépatite chronique B, est variable entre 8 et 20 %, de plus le risque d'insuffisance hépatique chez les patients cirrhotiques est de 20 %. Ces mêmes patients cirrhotiques présentent un risque de survenue de l'HCC entre 2 et 5 % ¹²¹. Les risques de développer un HCC ne concernent cependant pas uniquement les patients non traités. Les patients efficacement traités peuvent également développer ce cancer hépatique. Les facteurs de risques associés à ce développement sont comme dit précédemment la cirrhose et l'inflammation chronique du foie, mais également des facteurs hépatotoxiques (alcool, cigarettes), d'âge, génétiques ou encore liés à d'autres pathologies (co-infection HCV, HIV, diabète...). Les risques de progression et

l'évolution de la pathologie à HBV sont également liés à la réponse immunitaire de l'hôte que nous allons voir à présent.

b-Infection et hépatite chronique B et immunité

Le rôle d'HBV dans la survenue du cancer hépatique le définit comme un virus oncogénique. Dans le cadre d'une infection virale, le système immunitaire est normalement suffisamment équipé pour lutter efficacement contre cette dernière. Cependant dans le cadre de l'installation d'une infection chronique par HBV, le système immunitaire semble désœuvré et dans l'incapacité de générer une réponse efficace. De plus, son dysfonctionnement peut entraîner des dommages supplémentaires au foie conduisant à la fibrose, cirrhose et HCC (Figure 11).

Nous allons donc discuter ici des interactions connues entre HBV et le système immunitaire inné et adaptatif.

b.1-Les senseurs immunitaires innés impliqués dans la reconnaissance d'HBV

Les liens entre immunité innée et HBV sont sujets à d'importants débats dans la communauté scientifiques. Certains groupes décrivent un échappement du virus aux senseurs de l'immunité innée empêchant sa reconnaissance et l'activation de l'inflammation^{122,123}. Cette hypothèse est supportée par le fait que HBV serait un faible activateur de l'immunité innée et par les étapes de son cycle viral précédemment décrites qui permettrait de le tenir hors de portée des senseurs intracellulaires (TLR, NLR, RLR, CDS) (Figure 15 ; Figure 6 ; Figure 7). Cependant, d'autres groupes dont le nôtre, décrivent une inhibition précoce de la réponse immunitaire innée lors de l'infection par HBV¹²³⁻¹²⁷. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette divergence de point de vue ne les laissant cependant pas incompatible. Dans les phases précoces de l'infection, la charge virale est faible voir indétectable, et une stimulation faible des PRR peut conduire à des phénomènes de tolérance, mécanisme d'autant plus important dans l'environnement hépatique. D'autre part, la faible expression des gènes de l'immunité innée peut résulter d'une inhibition médiée par les particules virales et/ou subvirales^{126,128}.

Les études réalisées sur l'exposition, des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée professionnel ou non, de composant d'HBV ont donné lieu à des résultats variables. L'utilisation dans certains cas de protéines recombinantes ou de préparations virales

peu caractérisées, peut expliquer les discordances retrouvées dans les résultats entre les expériences *in vitro* et *in vivo* (comme l'utilisation de nucléocapside nues expliqué précédemment).

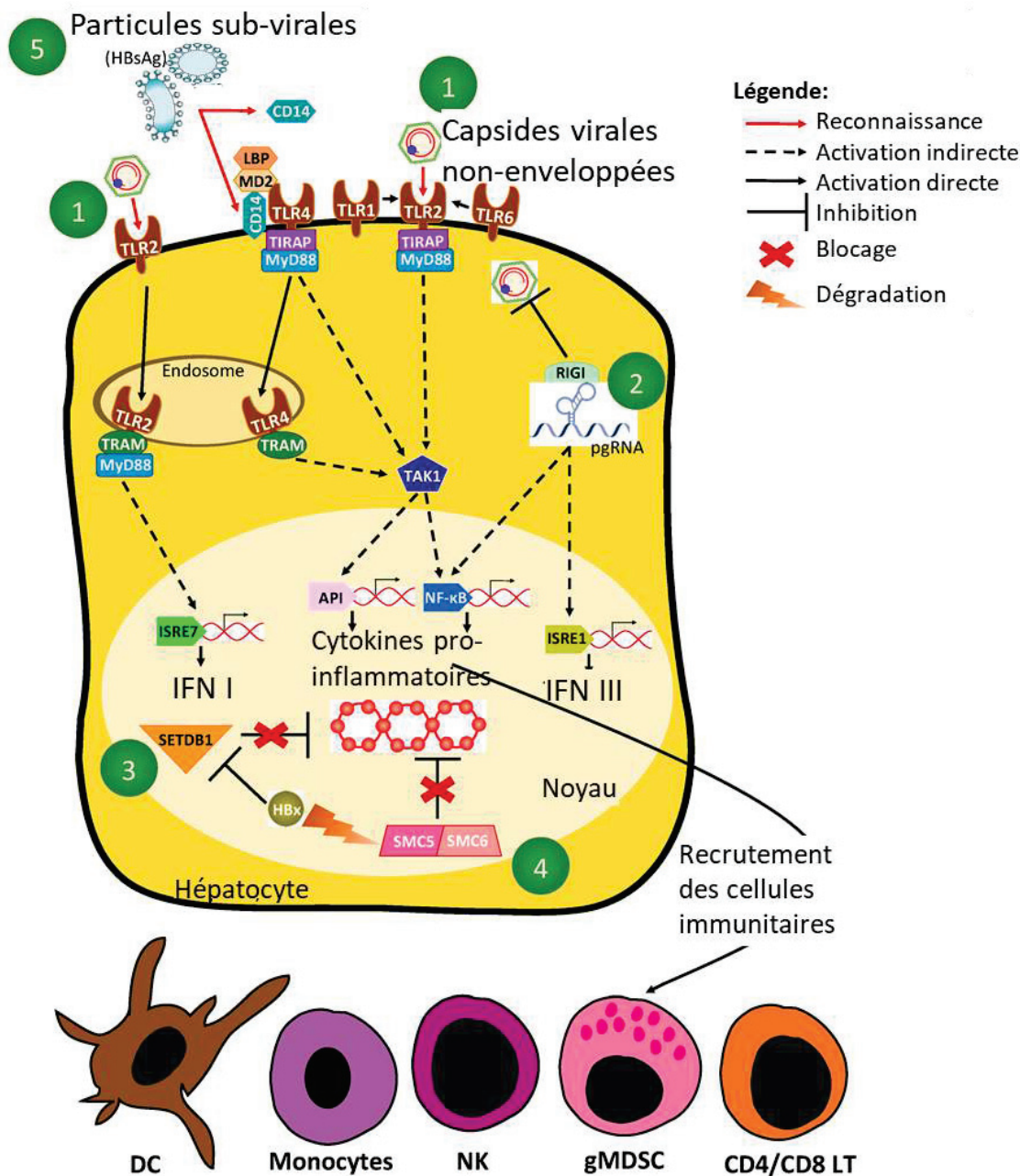


Figure 17 : Reconnaissance des particules d'HBV par l'hépatocytes et signalisations engendrées (adaptée de Faure--Dupuy *et al* 2017) 1) reconnaissance de la capside virale (HBcAg) par TLR2 ; 2) reconnaissance de l'ARNpg par RIG-I ; 3/4) inhibition épigénétique transcriptionnelle de l'ADNccc par SETDB1 ou SMC5/6 bloquée par la protéine virale HBxAg ; 5) reconnaissance des particules sub-virale HBsAg par CD14.

Au niveau des cellules hépatiques, les protéines de capsides virales ont été décrites pour être reconnu par le TLR2 entrainant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de

types I (Figure 17(1)). Ce mécanisme pourrait être induit par la libération de capsides virales lors de la mort d'hépatocytes infectés. Deux senseurs cytosoliques ont également été décrits pour être capable de détecter les acides nucléiques d'HBV dans les hépatocytes infectés. Le récepteur RIG-I a été décrit pour être capable de reconnaître l'ARNpg produit dans les cellules infectées représenté sur la Figure 17 (2). Cette reconnaissance induirait la synthèse d'IFN de type III et de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, la reconnaissance de l'ARNpg se ferait par la région ϵ où se fixe la polymérase virale. Ce mécanisme semble impliquer une compétition entre le senseur RIG-I et la polymérase virale dans la reconnaissance de l'ARNpg. La polymérase virale jouerait potentiellement un rôle d'inhibiteur de la reconnaissance par ce mécanisme et potentiellement pour d'autres senseurs d'acides nucléiques intra-cellulaire ¹²⁹. D'autre part, un autre récepteur a été décrit pour être capable de reconnaître l'ADNrc d'HBV, le senseur CDS cGAS ¹³⁰. La stimulation du senseur cGAS est capable de médier une action antivirale contre HBV par le biais de la voie STING entraînant l'inhibition de la réplication virale et de la quantité d'ADNccc. Cependant, comme pour RIG-I, il semblerait que la protection des acides nucléiques par les protéines virales permette d'éviter la reconnaissance via le récepteur de l'ADNrc. Dans ce cas précis, les auteurs émettent l'hypothèse du rôle de la nucléocapside renfermant le génome viral hors d'atteinte des récepteurs cytoplasmique comme cGAS. L'effet d'évasion à la reconnaissance de l'ADNrc ne semble cependant pas expliquer à lui seul ce mécanisme. En effet les auteurs, ont pu observer une diminution de la quantité de cGAS et des protéines de signalisation impliquées dans l'activation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et IFN. HBV semblerait se soustraire à l'activation de cGAS par le biais de deux mécanisme distinct 1) la séquestration de son génome dans la nucléocapside ; 2) l'inhibition de l'expression du senseur et des protéines impliquées dans sa voie de signalisation. 3) ces mécanismes seraient favorisés dans les cellules infectées par le fait d'une faible expression de l'adaptateur STING dans les hépatocytes.

D'autres mécanismes ont été identifiés comme étant capable de réprimer l'ADNccc au sein du noyau des hépatocytes. Soit par le biais de modifications épigénétiques (3) soit en bloquant sa transcription par fixation à celui-ci (4). Cependant, ces deux mécanismes sont inhibés par la même protéine virale, HBx comme expliqué brièvement pour Smc5/6 (4). Les particules virales et subvirales sécrétées pourraient jouer un rôle également dans l'induction de l'immunité innée par le biais de la fixation de l'HBsAg au récepteur CD14. Cette fixation pourrait conduire au recrutement de ce complexe au niveau du TLR4 induisant son internalisation et son activation

par la production de cytokines pro-inflammatoires (5). L'internalisation dans les CPA pourrait conduire à la présentation de ces antigènes et induire une réponse immunitaire adaptative.¹³¹

Comme détaillé ici, la reconnaissance d'HBV médiée par les récepteurs de l'immunité innée est encore peu référencée. De plus certains mécanismes décrits semblent être inhibés par le virus ou ses protéines. Ce à quoi nous allons nous intéresser dès à présent.

b.2-Inhibition de la réponse immunitaire innée par HBV

Les mécanismes antiviraux médiés par l'immunité innée sont dépendants 1) des PRR ; 2) de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires 3) de l'induction des ISG ; 4) du recrutement et de l'activation du système immunitaire adaptatif. Or, ces mécanismes sont souvent la cible des virus pour faciliter/permouvoir leur infection et leur persistance. L'infection par HBV semble en plus de son cycle viral pouvant lui permettre d'éviter de nombreux PRR, avoir développé de nombreuses stratégies de modulation de la réponse immunitaire innée (Figure 18).

Les modifications dans la sécrétion des cellules immunitaires innées dans le cadre d'infection chronique ont montré la production d'IL-10 capable d'inhiber la réponse cytotoxique. Ce mécanisme au niveau du foie permet en condition non-pathogénique, le maintien de l'homéostasie en empêchant l'activation abusive des cellules cytotoxiques NK et T CD8. Or durant l'infection par HBV, l'inhibition de ces cellules par le biais de l'IL-10 qui semble produit en corrélation d'une charge virale importante, conduirait à l'inhibition de ces cellules aussi bien pour leur activité cytotoxique que pour leur capacité à sécréter l'IFN- γ . Ce mécanisme conduirait à une diminution de l'activité antivirale au niveau du foie des cellules cytotoxiques (1).

D'autre part la faible activation et l'inhibition de l'expression des gènes de l'immunité innée dans le cadre d'expériences *in vitro*, mais également *in vivo* suggérerait un mécanisme de modulation de ces gènes en corrélation avec la quantité d'HBsAg et d'HbeAg^{124,132}. Cette modulation peut potentiellement être variable suivant les différentes phases de la maladie pouvant expliquer les variations au niveau de l'inflammation hépatiques entre celles-ci (2).

La diminution de ces gènes peut conduire à des régulations au niveau de l'expression des récepteurs tout comme la sécrétion des cytokines proinflammatoires de l'immunité innée. La diminution de l'expression de certains PRR comme TLR2 (3), TLR9 dans les pDC^{125,127,133} (4) ou encore TLR3 dans les cDC1 (4') peut expliquer en partie la diminution des réponses aux ligands respectifs de ces TLR. Les mécanismes impliqués pourraient passer par des récepteurs

régulateurs des voies de signalisation de ces TLR sur lesquels viendrait se fixer HBsAg (BDCA2 par exemple pour les pDC). L'inhibition des deux sous-types de DC produisant les IFN I et III pour les pDCs et III pour les cDC1 permettrait au virus de prévenir les productions d'ISG tout comme le recrutement des cellules immunitaires cytotoxiques menaçant sa persistance^{93,125,127,133,134}. L'inhibition de la synthèse des IFN pourrait également être aux

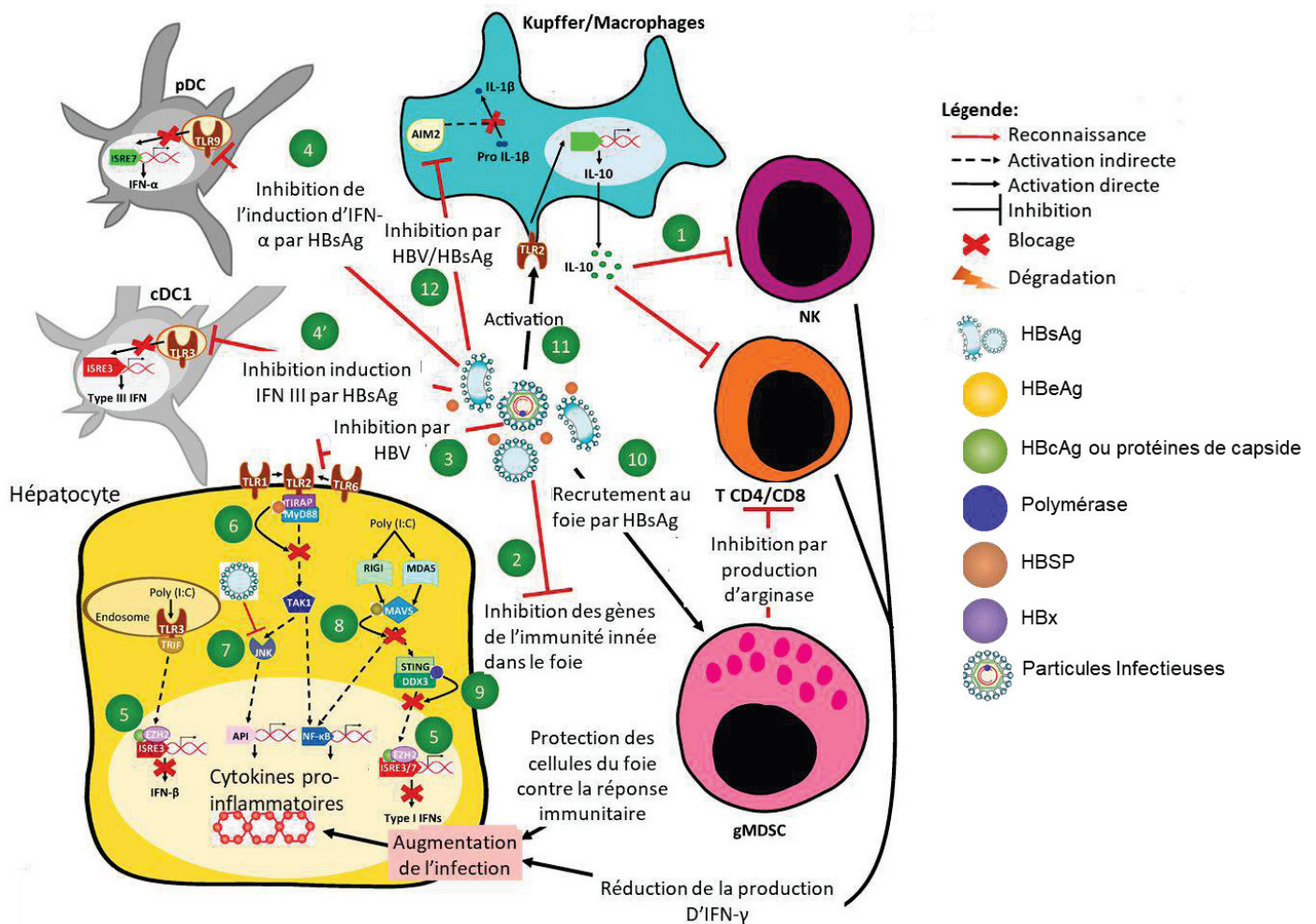


Figure 18 : Mécanisme inhibiteurs décrit sur les cellules immunitaires du foie et leurs senseurs par HBV (adaptée de Faure--Dupuy *et al* 2017) 1) inhibition de la réponse immunitaire médiée par la sécrétion d'IL-10 générée par l'activation du TLR2 dans les macrophages par HBV (11) ; 2) inhibition des gènes de l'immunité innée au niveau hépatique dans le cadre d'infection HBV chronique ; 3) inhibition de la voie TLR2 ; 4 et 4') inhibition des sécrétions d'IFN de type I et III respectivement des pDC et des cDC1 en présence d'HBsAg ; 5) inhibition de la voie TLR3 dans les hépatocytes ; 6) inhibition de la voie TLR2 par HBSP ; 7) inhibition de la voie JAK/STAT par HBV ; 8) inhibition de MAVS de la voie RLR par HBcAg ; 9) inhibition de la voie STING par la polymérase virale ; 10) recrutement des gMDSC au niveau du foie par HBsAg inhibant par la suite la réponse lymphocytaire ; 12) inhibition de l'inflammasome AIM2 et de la sécrétion d'IL-1 β fonctionnel.

protéines HBcAg présentes dans le noyau des cellules infectées par l'induction de modifications épigénétiques négatives des promoteurs des gènes codant pour les IFN et les cytokines pro-inflammatoires (5). L'inhibition de la voie TLR2, quant à elle, serait due à la seconde protéine virale sécrétée en excès. En effet des mécanismes impliquant l'interaction d'HbeAg avec les adaptateurs TIRAP/MyD88 induirait cette inhibition (6). L'HBsAg serait capable d'induire également une inhibition de la production d'IL-12. Cette cytokine, comme décrit dans la première partie, joue un rôle important pour l'activation de l'immunité adaptative notamment des T CD4 (7).

L'interaction de la protéine HBx avec les adaptateurs MAVS, TRIF ou le facteur de transcription IRF3 conduirait à leur dégradation et par ce biais à l'inhibition de la transduction du signal de nombreux senseurs cytosoliques (RLR, TLR3, CDS...) (8). L'inhibition d'autre senseurs cytosoliques comme STING ou DDX3 pourrait être induite par la polymérase virale (9). L'infection chronique par HBV pourrait être régulée par un type particulier de cellules dérivées de la lignée myéloïde granulocytiques suppressives, appelé gMDSC (granulocytic Myeloid-Derived Suppressive cells). Ces cellules recrutées au niveau du foie, probablement médié par HBsAg, sont d'importante productrice d'une enzyme appelée arginase. Cette enzyme comme son nom l'indique, est capable de diminuer la quantité de L-arginine dans l'environnement hépatique. Cette déprivation conduirait à un changement métabolique important des T CD4/CD8 conduisant à leur inhibition. Ce mécanisme pourrait 1) permettre la suppression de l'inflammation pendant les phases d'hépatites chroniques B ; 2) permettre la persistance virale par l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative T (10) ¹³⁵.

Les cellules macrophagiques du foie et leur modulation sont aussi un axe important pour la compréhension des mécanismes permettant la persistance d'HBV. Il a été décrit que l'activation via le TLR2 médiée par HBV pouvait conduire à la production d'IL-10. Le mécanisme inhibiteur de l'IL-10 a été décrit en (1) pour les cellules cytotoxiques (11). Cependant, cette cytokine peut également conduire à l'inhibition des autres cellules immunitaires. De plus, les macrophages du foie activé via l'inflammasome, présentent une importante source productrice d'IL-1 β . Cette cytokine a été décrite pour avoir un effet antiviral potentiellement plus fort que les IFN *in vitro* sur des hépatocytes infectés chroniquement par HBV ¹³⁶. Il a été observé en présence d'HBsAg une inhibition de l'inflammasome médié par AIM2 et *in fine* de la production d'IL-1 β (12) ⁹.

Les mécanismes décrit comme inhibant ou modulant les récepteurs, les productions de cytokines, et les cellules de l'immunité innée sont nombreux. Récemment, il a été décrit une

corrélation entre l'expression des récepteurs OX40 et OX40L plus faible chez les patients évoluant vers l'infection chronique notamment chez les jeunes enfants ¹³⁷. Ce récepteur de co-activation OX40 après ligation avec OX40L présent à la surface de certaines CPA, permet d'améliorer l'activation des T CD8⁺ et leurs capacités cytotoxiques. L'élimination de l'infection par HBV a été décrite comme nécessitant l'action de ces cellules ¹³⁸. L'activation complète du système immunitaire innée et adaptatif semble donc requise pour éliminer efficacement l'infection virale. Cependant au vu des nombreux mécanismes inhibiteurs viro-induits, l'activation du système immunitaire nécessiterait probablement un blocage efficace de l'immunomodulation engendré par HBV.

b.3-Inhibition de la réponse immunitaire adaptative par HBV

L'inhibition du système immunitaire par HBV touche également le système immunitaire adaptatif. En effet, l'inhibition du système immunitaire innée, permettant en temps normal l'activation du système adaptatif, provoque la modulation de ce dernier. Comme expliqué précédemment, les sécrétions de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) ou encore d'arginase provoquent l'inhibition des cellules T. Cette inhibition a plusieurs conséquences au niveau fonctionnel des T CD4 et T CD8 ¹³⁹.

D'une part, les capacités de différenciation en Th des CD4 sont orientées vers un profil Treg, mais également au recrutement des Treg naturels au vu de l'environnement cytokinique. Ces Treg vont par ailleurs permettre le maintien de cet environnement par la sécrétion de ces mêmes cytokines anti-inflammatoires, induisant de ce fait une tolérance potentielle en réponse aux antigènes viraux. D'autre part, ces derniers expriment à leurs surfaces le récepteur CTLA-4 capable d'inhiber par compétition avec le récepteur CD28 l'activation via les récepteurs CD80 et CD86 des CPA. Ces phénotypes vont également conduire à la surexpression de marqueurs inhibiteurs par les autres cellules immunitaires comme PD-1, Lag-3 (Lymphocyte-associated antigen-4) ou encore TIM-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3). L'environnement immunosuppresseur alors induit conduirait par ailleurs, à l'inhibition des facultés antivirales (IFN- γ , TNF- α), cytotoxiques ainsi que dans leur capacité de prolifération et de mémoire, des T CD8 (Figure 18) ¹⁴⁰.

Tout comme pour les lymphocytes T, l'environnement tolérogène inhiberait le recrutement et l'activation des lymphocytes B, entraînant l'absence de production d'anticorps neutralisants spécifiques des protéines virales d'HBV (anti-HBeAg et anti HBsAg) permettant son maintien et la propagation de son infection au niveau du foie.

Les deux branches du système immunitaires semblent être modulées lors de l'infection chronique par HBV. La résolution de l'infection chronique semble donc nécessiter l'utilisation/la mise au point de traitements efficaces à son élimination directe, ou à une aide apportée au système immunitaire, voire les deux.

3-Prise en charge de l'infection chronique par HBV

a-Traitements actuels et recommandations

La prise en charge des patients infectés chroniquement par HBV est répartie en deux catégories, les patients nécessitant ou non une mise sous traitements. En fonction du profil de l'infection (protéines virales, enzymes du foie) et du patient (âge, antécédents familiaux...) l'indication d'un traitement antiviral n'est pas obligatoirement requise et le simple suivi de l'évolution des marqueurs tous les trois à six mois est conseillé.

a.1-Marqueurs de suivi et vaccination

Les marqueurs de suivi ont été préalablement évoqués et dépendent principalement à l'heure actuelle de tendre à être le moins invasif possible. C'est pourquoi les marqueurs regardés à l'heure actuelle sont principalement sériques et que la recommandation de biopsies hépatiques est de moins en moins pratiquée. Il existe cependant des techniques non-invasives permettant d'évaluer la fibrose hépatique par utilisation d'élastographie impulsionnelle ultrasonore. Les marqueurs sériques peuvent être séparés en deux catégories. D'une part, la quantification des particules virales infectieuses par la quantification de l'ADN HBV sérique permet d'évaluer la charge virale. Les protéines sécrétées, HBsAg présent sur les particules virales et subvirales et l'HBeAg sont eux aussi quantifiés. Ce dernier marqueur permet en partie d'évaluer de la présence d'ADNccc transcriptionnellement actif et de déterminer la phase de la maladie HBeAg positif ou négatif. L'ADN viral et l'HBsAg quant à eux permettent de déterminer de l'infectiosité du patient et également la phase d'infection dans laquelle il se trouve. La détermination d'une séroconversion par la détection d'anticorps dirigés contre les protéines virales permet également 1) de déterminer par la présence d'anticorps de déterminer dans une nouvelle fois la phase de la pathologie ; 2) d'une infection contrôlée ou résolue par la détection d'anti-HBeAg anti-HBsAg et anti-HBc ; 3) ou encore de la présence d'anticorps anti-HBsAg protecteur dus à la vaccination. En effet, le traitement le plus efficace à l'heure actuelle reste

encore la vaccination préventive que nous allons aborder brièvement ci-après. L'autre catégorie concerne le suivi des enzymes du foie principalement les ALAT, mais dans les cas d'insuffisances hépatiques d'autres marqueurs peuvent indiquer cette défaillance, les autres transaminases comme les ASAT (Aspartate AminoTransférase), cependant moins spécifiques, ou certaines protéines de coagulation (prothrombine). Le but des thérapies antivirales est 1) d'induire une suppression à long terme de l'ADN viral ; 2) d'induire une séroconversion HBeAg et la suppression de cet antigène ; 3) de revenir/maintenir des taux d'ALAT normaux (<40 UI/ml) signifiant l'absence d'atteinte des fonctions hépatiques ; 4) l'élimination de l'HBsAg circulant ainsi qu'une séroconversion protectrice à la survenue d'une potentielle réactivation virale ; 5) une diminution de l'inflammation du foie de la nécrose et en absence d'un aggravement du score de fibrose entre le début et la fin du traitement. 6) l'élimination ou l'inactivation transcriptionnelle du réservoir d'HBV, l'ADNccc. Ce dernier point étant le plus difficile à évaluer et semble-t-il le moins atteignable avec les thérapies actuelles.

Le moyen le plus efficace de lutter contre l'infection virale, préalablement évoquée, reste encore aujourd'hui la vaccination prophylactique. Découvert à l'origine comme une lipoprotéine, l'identification de l'antigène HBsAg alors appelé « Australia antigen », a permis la mise au point des premiers vaccins prophylactiques ¹⁴¹. Ces vaccins, basés sur l'immunisation et la production d'anticorps durables, dirigées contre HBsAg (initialement isolé de sérum de patients) a permis de protéger efficacement les populations des infections par HBV ¹⁴². Les marqueurs permettant d'évaluer d'une bonne immunisation consistent à titrer les anticorps IgG dirigés contre HBsAg en absence d'autre anticorps anti-HBV, anti-HBeAg ou anti-HBcAg témoins respectivement d'une infection en cours ou d'une infection guérie/en cours de guérison. La couverture vaccinale est malheureusement encore insuffisante (84 % des adultes et seulement 39 % à la naissance en 2015 ([Global Hepatitis Report WHO 2017 PDF online](#))¹⁴³) et celle-ci ne permet pas de soigner les patients déjà infectés. Nous allons donc parler à présent des traitements antiviraux actuels utilisés pour lutter contre l'infection virale chronique par HBV.

a.2-IFN- α et PegIFN

L'utilisation de l'IFN- α recombinant en thérapies antivirales présente l'avantage de médier une réponse immunitaire due à la stimulation d'une part des ISG et d'autre part des cellules du système immunitaire. Ce traitement est recommandé chez les patients positif pour HBeAg et ne présentant pas d'inflammation hépatique (Hépatite chronique B HBeAg positif)

¹¹⁷. Le but de ce traitement est d'induire une réponse immunitaire à long terme capable de contrôler efficacement l'infection virale. Il s'agit d'un traitement utilisant le système immunitaire de l'hôte, par le biais d'une stimulation immunitaire innée. L'utilisation de ce traitement présente l'avantage d'être à durée limitée 48 semaines. Cependant ce traitement présente de nombreux effets secondaires, de nombreuses contre-indications et est difficilement tolérable pour les patients. En plus des changements des paramètres hépatiques (ALAT), virologiques (ADN HBV, HBeAg et HBsAg) et sérologiques (anti-HBeAg et anti-HBsAg) évoqués précédemment, le but préalablement évoqué en termes de réponses virologiques attendue sous traitement IFN- α sont 1) une baisse de la charge virale (<2000UI/ml) dans les 6 mois après le début du traitement et jusqu'à la fin de celui-ci ; 2) le maintien de cette faible charge virale (<2000UI/ml) dans les 12 mois suivant la fin du traitement. Il arrive dans certaines cohortes de patients que l'efficacité du traitement permette une élimination de l'HBsAg circulant (10 % des cas au bout de 3 ans après 1 an de traitement chez des patients dont la charge virale était faible ou indétectable). L'identification des facteurs permettant l'élimination du virus et notamment de l'HBsAg par ce traitement, permettrait de mieux comprendre quels acteurs de l'immunité stimuler pour aboutir à une élimination efficace du virus. D'autre part la faible charge virale initiale pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'infection, le maintien des perturbations immunologiques et enfin l'efficacité du traitement comme cela a été démontré *in vivo* chez la souris ¹⁴⁴. De plus, la diminution de l'ADNccc dans certaines études a pu être observée chez les patients traités à l'IFN- α . Ces quelques observations semblent indiquer que le système immunitaire dans le cadre d'infection chronique est potentiellement stimulant/ « ré-activable » afin de permettre d'éliminer à la fois la sécrétion de particules virales et son réservoir. Cette capacité d'élimination de l'ADNccc, par la stimulation du système immunitaire est un concept étudié *in vitro* et visant d'une part à stimuler l'induction de désaminases (APOBEC3A) ou de répresseurs épigénétiques et d'autre part à stimuler efficacement une réponse cellulaire cytotoxique ^{145,146}. Cependant, il semblerait que l'utilisation de l'IFN- α 2a soit insuffisante pour réaliser efficacement cette tâche. Ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un seul sous-type d'IFN- α (2-a ou 2-b, il en existe 13 sous-types en tout), l'utilisation de l'IFN- α seul (combinaison avec d'autres cytokines pro-inflammatoires ? ; risque important de l'accentuation des effets secondaires et de la faible tolérance des patients au traitement), de mécanismes de résistances viro-induits (importance de la charge virale et de l'antigénémie de départ sur l'évolution et l'efficacité du traitement), ou encore de facteurs génétiques chez les patients.

a.3-NUC

L'autre traitement utilisé à l'heure actuelle est l'utilisation des analogues de nucléos(t)ides ou NUC. Les NUC font parties des traitements antiviraux directs ou DAA (Direct-Acting Antiviral) car ils ciblent spécifiquement une étape de la réplication virale. Il s'agit d'inhibiteurs de la polymérase virale, bloquant l'étape de réverse-transcription lors de l'encapsidation des particules virales (Figure 15). L'avantage de l'utilisation de ces traitements est de conduire à une diminution rapide et importante de la charge virale chez la majorité des patients (<10 UI/ml). La diminution de la charge virale peut prendre entre trois et douze mois avant d'être indétectable dans certains cas. La bonne tolérance, l'absence en général d'effet

Variant HBV	LAM	TBV	ETV	ADV	TDF/TAF
Sauvage	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M + M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	I	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

Figure 19 : Principaux variants d'HBV résistant aux NUC (adaptée de Lampertico P *et al* 2017) R : résistant ; I : Intermédiaire/ faible sensibilité ; S : sensible

ADV : adefovir dipivoxil; ETV : entecavir; LAM : lamivudine; TAF : tenofovir alafenamide; TBV : telbivudine; TDF : tenofovir disoproxil fumarate

secondaire et la facilitée de prise médicamenteuse du traitement (voie orale), chez la plupart des patients, présente également un avantage important en comparaison à l'IFN- α , car celui-ci est de ce fait, applicable à la majeure partie des profils cliniques présentant une infection à HBV notamment les patients immunosupprimés (co-infection HIV, greffes...).

Cependant, les NUC nécessitent une prise à long terme, voir à vie. Ceci est dû au fait que 1) la baisse de l'antigénémie des HBeAg dans un premier temps est faible et survient au long terme (faible après 1 an de traitement, variable par la suite) et la séroconversion chez les patients HBeAg positifs (Figure 20); 2) une perte de l'antigénémie HBsAg faible, sur le très long terme 4ans après début du traitement chez les patients HBeAg positifs et encore plus faible chez les

patients HBeAg négatifs ; 3) le risque de rebond de la charge virale après arrêt ou non-respect des traitements en particulier chez les patients HBeAg négatifs ; 4) la survenue de mutants (région Pol) résistants à certains NUC (LAM, ADV, TBV) (Figure 19).

Afin d'aboutir à un traitement efficace, il est important de choisir les NUC présentant/et générant le moins de résistants (ETV, TDF, TAF). Il est important de noter que les NUC les plus anciens présentent le plus de risque d'émergence de mutants/résistants, et de ce fait la survenue de résistants aux NUC les plus récents (TDF/TAF) n'est malheureusement pas à écarter. L'utilisation de ces traitements même à long terme ne semble avoir qu'un effet limité

	PegIFN-α2a	LAM	TBV	ETV	ADV	TDF	TAF
Dose	180 mg*	100 mg	600 mg	0.5 mg	10 mg	245 mg	25 mg
Hépatite chronique B – HBeAg positif							
Séroconversion anti-HBeAg	32%	16–18%	22%	21%	12–18%	21%	10%
ADN HBV <60/80UI/ml	14%	34-44%	60%	67%	13-21%	76%	64%
Normalisation des ALAT	41%	41-72%	77%	68%	48-54%	68%	72%
Élimination de l'HBsAg	3%	0-1%	0,5%	2%	0%	3%	1%
Hépatite chronique B – HBeAg négatif							
ADN HBV <60/80UI/ml	19%	72-73%	88%	90%	51-63%	93%	94%
Normalisation des ALAT	59%	71-79%	74%	78%	72-77%	76%	83%
Élimination de l'HBsAg	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Figure 20 : Efficacité des traitements actuels 6 mois après la thérapie de 48 à 52 semaines (Lampertico P *et al* 2017)

ADV : adefovir dipivoxil; ETV : entecavir; LAM : lamivudine; NA : nucleos(t)ide analogue; TAF : tenofovir alafenamide; TBV : telbivudine; TDF : tenofovir disoproxil fumarate

sur la quantité d'ADNccc, signifiant qu'une l'élimination effective d'HBV ne peut pas être atteint par l'usage des NUC seul.

Il existe des essais combinant les deux traitements évoqués ici, NUC et IFN-α. Cependant, il semblerait que le traitement combiné entraîne de plus forts effets secondaires et ne semble pas donc pas recommandés. Pourtant, le principe de diminuer la charge virale pour

b-Nouveaux Traitements directs

The diagram illustrates the HBV life cycle within a hepatocyte, with various inhibitors blocking different stages:

- 1 Inhibiteur d'entrée**: Blocks viral entry into the cell.
- 2**: NTCP receptor.
- 3 Blocage du trafic intracellulaire**: Blocks intracellular transport.
- 4**: ADNccc (circular DNA).
- 5**: ADNccc and host factors.
- 6**: ARNm (mRNA) and ARNpg (pre-genomic RNA).
- 7**: Pol (polymerase) and Core protein.
- 8**: ADN+ (positive DNA).
- 9**: ADN- (negative DNA).
- 9'**: HBe (HBeAg) and HBs (HBsAg) secretion.
- Inhibiteur d'enveloppes et sécrétions**: Blocks viral envelope formation and secretion.
- Inhibiteur traduction**: Blocks viral translation.
- Inhibiteur protéines virales influençant les gènes cellulaires**: Blocks viral proteins influencing cellular genes.
- Inhibiteur assemblage nucléocapsides**: Blocks viral nucleocapsid assembly.
- ADN génomique**: Viral genomic DNA.
- Integration**: Integration of viral DNA into the host genome.
- ADNdbI**: Integrated viral DNA.
- ADNrc**: Replicative intermediate.
- ADNccc**: Circular DNA.
- ARNm**: mRNA.
- ARNpg**: pre-genomic RNA.
- Pol**: Polymerase.
- Core**: Core protein.
- ADN+**: Positive DNA.
- ADN-**: Negative DNA.
- NUC**: Nucleus.
- Hepatocyte**: The host cell.

82

Nous allons voir ici les DAA en développements ciblant principalement des étapes du cycle viral.

b.1-Nouveaux marqueurs de suivi

Les marqueurs actuels utilisés pour le suivi des patients manquent de fiabilité quant à l'évaluation de l'état transcriptionnel de l'ADNccc. Ces nouveaux marqueurs ont pour but 1) d'évaluer la présence de l'ADNccc au point de vue quantitatif ; 2) d'évaluer l'état qualitatif de ce dernier (marques épigénétiques, protéines virales ou cellulaires associées...) ; 3) d'évaluer à l'aide de marqueurs prédictifs l'efficacité des traitements ainsi qu'un potentiel échappement thérapeutique.

La quantification directe de l'ADNccc est un marqueur d'intérêt majeur dans la mise en place de nouveau traitement curatif. En effet du fait de son importance pour la persistance de l'infection virale d'HBV, les traitements capables de toucher celui-ci, sont donc de tout premier intérêt. La quantification de l'ADNccc est cependant difficile et n'est réalisable que sur des biopsies hépatiques du fait de sa présence détectable uniquement dans le foie.

Les antigènes liés à la protéine core d'HBV ou HBcrAg (Hepatitis B core-related antigen), nouvellement décrits, sont composés de plusieurs marqueurs codés par les ARNm de la région précore/core. Ces protéines sont, l'HBcAg, l'HBsAg et la protéine précurseur pré-C22. L'utilisation de ces marqueurs permettrait une meilleure évaluation de l'état transcriptionnel de l'ADNccc. En effet, l'ADN HBV intégré dans les cellules de l'hôte est responsable en partie de la sécrétion de l'HBsAg indépendamment de l'ADNccc. Le dosage de ce marqueur ne reflète donc pas suffisamment l'état d'activité de la réplication virale. La relevance de ce nouveau marqueur doit cependant être évalué en clinique avant d'être utilisé à la fois en clinique et en développement d'antiviraux.

La quantification de l'ARN HBV circulant, est un autre marqueur potentiel. La présence et la quantité de particules ARN positives semblent être corrélées avec l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc et permettent de prédire les potentiels rebonds de réplication viraux lors de l'arrêt, l'échappement ou l'efficacité lié aux traitements ¹¹⁶.

En combinaison avec les marqueurs de réplication actuellement utilisés, ceux-ci permettraient à la fois une meilleure évaluation des thérapies actuelles ou nouvelles ainsi qu'un meilleur suivi des patients infectés.

b.2-Myrcludex

Le principe d'un inhibiteur d'entrée, est simple, soit il cible la protéine virale responsable de l'attachement au récepteur d'entrée, principe de la production ou l'injection d'anticorps dirigé contre HBsAg dans le cas d'HBV. Soit celui-ci occupe la place de ce récepteur à la place de la particule virale et inhibe ainsi son entrée par compétition d'affinité ((1) Figure 21). La découverte du récepteur d'entrée NTCP a grandement participé au développement de ces inhibiteurs d'entrées ¹¹⁹. Ces développements ont conduit à la découverte de plusieurs drogues dont certaines sont en essai clinique à l'heure actuelle comme la cyclosporine ou le Myrcludex-B. Ce dernier a pour particularité d'être dérivé du domaine Pré-S1 de L-HBsAg du virus permettant l'attachement à NTCP. En effet, comme dit précédemment ce domaine nécessaire à l'entrée d'HBV après attachement à son récepteur dans l'hépatocyte est également aujourd'hui une drogue détournée à son désavantage. Après l'évaluation de plusieurs peptides dérivé du domaine Pré-S1 de L-HBsAg, modifié ou non, il s'est avéré que le peptide Pré-S myristoylé (pour Myrcludex-B) était un compétiteur capable de bloquer efficacement l'entrée des particules virales infectieuse ¹⁴⁷. Pour se maintenir au sein du foie, HBV a besoin de cycle d'étendre et de renouveler son infection au sein des hépatocytes. L'inhibition de son entrée est un bon moyen de contenir l'infection virale et ainsi de réduire son impact sur le foie. L'efficacité du Myrcludex-B a donné des résultats encourageants tant *in vitro* qu'*in vivo* ^{148,149}. Cette inhibition d'expansion de l'infection virale signifie donc une diminution de production de particules virales et subvirales et potentiellement une perte de sa capacité à maintenir une infection virale chronique.

b.3-CpAM

La protéine de capsid d'HBV en outre de son rôle dans l'encapsidation du génome viral, a été décrite pour avoir de nombreux effets sur la transcription des gènes viraux ou hôtes. Sa fixation à l'ADNccc ou des protéines régulatrices, épigénétiques, pouvant potentiellement agir sur la transcription des gènes cellulaires a été plusieurs fois décrite dans la littérature ^{120,150-152}. Ses nombreuses fonctions potentielles en font donc une cible antivirale de choix pour lutter contre HBV et l'installation de l'infection chronique. C'est donc dans ce but que les CpAM (Core protein Allosteric Modulator) ont été mis au point ou sont pour certains en développement pré-clinique ^{140,153}. Ces molécules semblent pour certaines avoir plusieurs effets sur le cycle viral. D'une part, elles participeraient à l'inhibition de l'encapsidation de l'ARNpg et conduirait à la formation de capsides aberrantes. De plus, l'absence d'encapsidation de l'ARNpg,

nécessaire au démarrage de la synthèse de l'ADNrc via la polymérase virale, bloque donc cette étape de conversion du cycle viral. L'utilisation d'inhibiteurs de HBcAg semble également conduire à un défaut de relargage de l'ADNrc dans le noyau lors des phases précoces de l'infection. Les résultats obtenus semblent prometteur du fait de l'effet sur la sécrétion des autres protéines virales (HBcAg et HBsAg) et particules subvirales (vides ou ARN) ^{154,155}. De plus, l'ARNpg ainsi libre pourrait être la cible des senseurs immunitaires innés précédemment évoqués. Nous reviendrons sur cette question dans la partie suivante (c-Nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques).

b.4-NAP

Une autre protéine virale est décrite pour avoir d'importants effets quant au maintien de l'infection virale, HBsAg. De plus cette dernière étant sécrétée en très grandes quantités via les particules subvirales et les difficultés à aboutir à son élimination et son contrôle par une séroconversion anti-HBsAg, en font une cible virale privilégiée. La stratégie adoptée par la société Replicor pour lutter contre cette protéine est basée sur l'utilisation de polymères d'acides nucléiques ou NAP (Nucleic Acid Polymers). Ceux-ci ont pour particularité de se fixer aux structures protéiques amphipatiques (hélices alpha) retrouvés chez de nombreux virus enveloppés. Certaines de ces molécules interagissant avec les protéines d'enveloppe par un mécanisme encore peu connu, semble inhiber la sécrétion et la formation des particules subvirales dans les hépatocytes infectés. De plus, certains NAP seraient capables via l'interaction avec HBsAg d'inhiber l'entrée des particules virales infectieuses. L'effet *in vivo* serait, de plus, augmenté par une réactivation du système immunitaire, libéré de l'inhibition viro-induite ¹⁵⁶. La faible toxicité et la bonne tolérance de ces drogues en font une nouvelle DAA de choix dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-HBV. Certains de ces NAP ont déjà été utilisés en clinique, seuls ou co-traitement avec des NUC ou l'IFN- α chez des patients infecté chroniquement par HBV ; HBcAg positifs ¹⁵⁷. Chez certains patients traités en monothérapie, une réduction de l'HBsAg et de la charge virale a pu être observée ainsi qu'une séroconversion anti-HBsAg. L'apparition de la sécrétion d'anticorps semble indiquer une activation de l'immunité accompagnant la baisse des paramètres viraux. La combinaison des NAP en avec des traitements immuno-thérapeutiques pourrait également être une bonne option pour une élimination définitive de l'infection chronique HBV.

c-Nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques

Le concept de l'immunothérapie n'est pas un concept nouveau du fait de l'utilisation de l'IFN- α comme traitement dans l'infection de l'hépatite B. Cependant comme expliqué précédemment, celui-ci n'est pas suffisamment efficace, les effets secondaires et la faible tolérance au traitement sont malheureusement problématiques. Pourtant, celle-ci a porté la preuve de concept d'une stimulation du système immunitaire efficace pour la lutte contre HBV. Il reste cependant à améliorer la stratégie immuno-thérapeutique afin de la rendre plus à même d'éliminer l'infection virale, tout en la rendant plus tolérable. Des essais employant d'autre IFN (IFN- β , IFN- γ ou IFN- λ) et cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β ...) *in vitro* et pour certains *in vivo* ont montrés leurs capacités à inhiber l'infection chronique par HBV et pour certains plus efficacement que l'IFN- α ^{136,158}. Cependant, les effets secondaires et l'injection d'une seule cytokine ne semblent pas suffisants pour permettre une élimination efficace chez tous les patients. Comme expliqué dans la première partie, un message cytokinique est dépendant du contenu en cytokines et du contexte environnemental dans lequel il est reçu. La stimulation par les agonistes des PRR, des cellules productrices de ces messages complexes semblerait donc plus appropriée. Du fait de la capacité du système immunitaire à médier tout aussi bien l'inflammation que le retour à l'homéostasie, cette stratégie pourrait être plus supportable tout en ayant un effet antiviral efficace chez les patients. De plus, le concept apporté de l'utilisation de DAA pour diminuer les mécanismes immunomodulateurs viro-induit en combinaison d'une immunothérapie est très séduisant. Rééduquer le système immunitaire pour lui permettre une réponse efficace, définitive et sûre à HBV, là réside tous les enjeux sur l'évaluation des stratégies immuno-thérapeutiques.

c.1- Agonistes de PRR

L'utilisation d'agonistes de PRR a déjà été mis en pratique en essai clinique en particulier pour le ligand de TLR7 ¹⁵⁹⁻¹⁶³. L'avantage de ce traitement est la facilité d'administration par voie orale et elle a été reportée pour avoir de faibles effets secondaires. Le principe d'action de cette molécule est la stimulation des cellules possédant le TLR7 au niveau hépatique notamment. Les cellules exprimant le plus fortement ce TLR sont les pDC et celle-ci produisant la majorité des IFN de types I sont la cible principale de cette molécule (Figure 5 et Figure 9). Les effets antiviraux obtenus par ce traitement semblent convainquant, *in vitro* et *in vivo* et les mécanismes induits semble dépendant 1) de l'activation des pDC sécrétant les IFN notamment l'IFN- α ; 2) de l'activation des ISG dans les hépatocytes infectés ou non. L'ISG15

qui semble être un bon marqueur prédictif de l'effet antiviral participant à la diminution des sécrétions virales, à une potentielle protection des cellules non infectées et à une augmentation de présentation d'antigènes viraux via les CMH I ; 3) de la stimulation des NK et potentiellement des macrophages du foie par via l'IFN ; 4) ce dernier mécanisme empêchant l'inhibition et supportant l'activation des T CD4 et CD8 via des supports de foyers myéloïdes intrahépatiques supportant la prolifération de ces derniers et appelés iMATE (intrahepatic Myeloid-cell Aggregates for T cell population Expansion)¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ ; (5)) une faible activité cytotoxique des T CD8+, mais une sécrétion d'IFN de type II importante renforçant l'effet des IFN produit par les pDC en 2) et 3) ; la production d'anticorps dans certains cas médié par le recrutement et l'activation des lymphocytes B par la stimulation TLR7 et les IFN et entraînant une séroconversion anti-HBeAg (chez les patients HBeAg positifs) et anti-HBsAg. L'utilisation de l'agoniste de TLR7 présente l'avantage de médier une inflammation et une réaction immunitaire spécifiquement intrahépatique. Cette particularité pourrait expliquer le peu d'effets secondaires observés au niveau de l'organisme entier comme dans le cas d'injection d'IFN- α . Cependant, les effets en cliniques bien qu'encourageant semblent signifier que la stratégie employée seule est insuffisante pour une élimination définitive de l'infection HBV¹⁶¹. En effet de faibles effets ont été observés au niveau de la quantité de l'ADNccc. L'utilisation du ligand de TLR7 passe également par l'activation préliminaire d'un faible panel de cellules immunitaires (pDC et Lymphocytes B). L'utilisation de ligands spécifique d'un plus grand nombre de cellules immunitaire ou non au niveau hépatique, notamment des hépatocytes cible du virus, pourrait améliorer l'effet anti-HBV d'une stratégie immuno-thérapeutique. Des essais utilisant d'autre ligands de PRR ont démontré des effets directs sur la réplication virale. C'est le cas pour les ligands de TLR2, d'un agoniste de RIG-I/NOD2 ou encore d'un agoniste de STING^{167,168}. Cependant, il est important de garder à l'esprit que certains de ces récepteurs et/ou leurs voies de signalisation, aboutissant à la sécrétion de cytokines, semblent modulés dans les infections chroniques par HBV. L'évaluation des effets immunomodulateurs viro-induits semble nécessaire afin d'aboutir à la stratégie immuno-thérapeutique la plus à même de réaliser l'élimination définitive d'HBV. L'utilisation en combinaison de DAA pour réduire les effets viro-induits pourrait appuyer l'effet anti-HBV.

La stratégie immuno-thérapeutique visant à stimuler l'immunité innée semble être une bonne option pour une élimination médiée par une réponse immunitaire innée et adaptative. Cependant, les concepts d'élimination efficace de l'infection HBV pointent tous vers l'aboutissement de l'élimination ou l'inactivation de l'ADNccc. Son élimination et son

inactivation peuvent passer par l'activation des ISG dans les cellules infectées, l'élimination des cellules infectées par les cellules T CD8⁺ ou encore les modifications de ce dernier par l'utilisation de nucléases comme CRISPR/Cas9.

c.2- Crispr-Cas9 et cellules CAR-T

Le développement de stratégies utilisant des protéines ou cellules immunitaires modifiées à des fins thérapeutiques n'est pas un concept nouveau. La stimulation de cellules spécifiques, comme le chargement d'antigènes spécifique dans les DC, pour induire leurs présentations et l'activation de l'immunité adaptative est une stratégie étudiée depuis longtemps en thérapie vaccinale anti-pathogénique et anti-cancéreuse ¹⁶⁹. Cependant, le développement dans le domaine des biotechnologies permet aujourd'hui d'envisager l'élimination de certains réservoirs viraux indépendamment de leur stabilité, notamment de l'ADNccc et des mécanismes immunomodulateurs viro-induits.

Le Cas9 (pour Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats Associated protein 9), est un système d'édition génomique identifié récemment chez les bactéries permettant leurs défenses contre les virus les infectants appelés bactériophages ¹⁷⁰. Cette protéine, initialement utilisée par les bactéries comme système immunitaire, est aujourd'hui en plein essor quant à son utilisation comme outil de modification génétique. Celle-ci fonctionne suivant le principe suivant 1) la Cas9 induit une coupure sur une zone déterminée du gène ou elle est guidée 2) cette coupure est en théorie spécifique grâce à l'utilisation d'un ARN guide reconnaissant la séquence d'ADN à cliver ; 3) la coupure est alors réparée par les mécanismes de recombinaisons non-homologues de la cellule. Dans le cadre d'HBV, celui-ci est à la fois en développement pour la dégradation de l'ADNccc et de l'ADN viral intégré (Figure 21). L'élimination de ces deux réservoirs impliquerait la suppression de la transcription des différents ARN aboutissant à la formation de nouvelles protéines, particules virales/subvirales et ainsi la diminution de l'effet immunomodulateur induit par celles-ci. De nombreuses études ont étudié le potentiel à éliminer l'ADN viral dans les cellules infectées par l'utilisation de la technologie Cas9 ¹⁷¹⁻¹⁷³. Les résultats obtenus en phase pré-clinique apportent la nécessité de nombreuses mises au point avant son utilisation en clinique et ceux, malgré son efficacité. Les risques de non-spécificités de l'édition génomique doivent être minutieusement évalués avant son utilisation afin de garantir l'impact du Cas9 uniquement sur l'ADN HBV. Le mode d'administration de la protéine et de son guide est important. Les systèmes actuels utilisent pour la plupart une importation de celle-ci via des vecteurs viraux comme les lentivirus, ou encore

le Virus Adéno-Associé (AAV))^{167,170}. On parle alors de transduction de la cellule par un transgène (codant ici pour la synthèse de la Cas9 et du/des ARN guides. Ces vecteurs viraux présentent bien sur des avantages et des inconvénients. Dans le cas des lentivecteurs, l'étape d'intégration du transgène nécessaire à son expression implique le risque d'une insertion au niveau de promoteur oncogène ou anti-oncogène. L'avantage et l'inconvénient de ce système est qu'il est stable tant que la cellule transduite n'est pas détruite signifiant d'une part une protection en cas d'infection de nouveaux virions, l'expression d'une protéine étrangère pouvant être détectée par le système immunitaire entraînant son activation et la destruction des cellules transduites. L'utilisation des AAV en revanche plus sûre du fait notamment de l'absence d'intégration des vecteurs, présente l'avantage d'une expression stable par le maintien du vecteur sous forme épisomale et est à l'heure actuelle en développement en thérapie génique dans de nombreuses pathologies. De plus, l'efficacité de transduction des vecteurs AAV semble être augmentée par la présence de la protéine virale HBx présentant un avantage important quant à son utilisation dans une stratégie anti-HBV¹⁷⁵. Cependant, l'utilisation efficace de ce vecteur viral doit être réalisée en absence de réponse immunitaire dirigée contre ce dernier. De nouvelles stratégies employant des nanoparticules lipidiques sont à l'étude pour une transduction efficace et sûre *in vivo*¹⁷⁶. D'autre méthode permettant de détruire l'ADNccc employant des nucléases sont également en développement comme les TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) une enzyme de restriction artificielle elle aussi dérivée d'un système bactérien (*Xanthomonas*). Les techniques d'édition des génomes étant en plein essor, les possibilités pour cibler l'ADNccc sont encourageantes, cependant, elles devront être utilisées avec une grande précaution.

Les modifications génomiques servent également au développement et à la mise au point de thérapies cellulaires. L'une d'entre elle, est la production de CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) que nous allons décrire ici. Les stratégies visant à générer une immunité adaptative efficace pour l'élimination définitive de l'infection par HBV passent par 1) la levée des mécanismes immunomodulateurs inhibant les lymphocytes ; 2) l'activité cytotoxique des T CD8+ contre les cellules infectées ; 3) l'activité neutralisante et protectrice des lymphocytes B par la production d'anticorps contre HBeAg et HBsAg. Le principe de la génération de CAR-T est d'insérer à l'intérieur de cellules T le matériel génétique codant pour des récepteurs (dérivés d'immunoglobulines) spécifiques d'antigènes, fusionnés à des protéines de costimulations CD28 et 4-1BB. Ce dernier permettant l'activation, la prolifération, la sécrétion d'IL-2, la survie et l'augmentation des facultés cytotoxiques de ces cellules. Et la dernière partie

de ce récepteur chimérique, le CD3 ζ permettant l'activation de la cascade de signalisation des lymphocytes T¹⁷⁷. Parmi les avantages de l'utilisation de telle cellules, la possibilité de diriger l'activité des cellules contre des antigènes protéiques ou glycanes de surface sans besoin de leurs présentations via le CMH I présente un fort potentiel dans les cadres de tumeurs ou cellules infectées inhibant ce mécanisme. Dans le cadre de l'infection HBV, une faible présentation des antigènes viraux via le CMH I a été décrite. L'utilisation des CAR-T semble donc être une bonne alternative pour palier à ce déficit. Le développement des techniques d'éditions génomiques dont nous avons parlé précédemment pourrait permettre d'une part, de générer des cellules CAR-T universelle (Modification du CMH) et d'autre part à la suppression des récepteurs inhibiteurs (PD-L1/PD-1 par exemple) à leur surface. Ces approches ont montré de bons résultats dans le traitement de certains cancers. Elles ont également été testées dans le cadre d'infection chronique par HBV et présentent une stratégie intéressante pour lutter efficacement contre le virus^{178,179}. L'inconvénient étant bien sûr de pouvoir contrôler et stopper l'activation de ces cellules pour éviter une inflammation, une cytotoxicité trop importante et *in fine* néfaste à l'organisme.

c.3- Combinaison DAA/Immunothérapies

Les stratégies antivirales pour lutter contre HBV sont nombreuses. Cependant, dans le cadre de l'immunothérapie, l'efficacité de celle-ci est dépendante de leur interaction avec les mécanismes immunomodulateurs viro-induit par HBV et ses protéines. D'autre par l'utilisation de DAA, actuelles ou en développement semble tout aussi prometteuses, mais semblent insuffisante pour restaurer entièrement le système immunitaire et le contrôle voire l'élimination totale de l'infection. La combinaison de ces deux principes thérapeutiques semble une stratégie prometteuse (Figure 22). Ce concept thérapeutique envisagé à l'heure actuelle, implique dans un premier temps l'usage de DAA ((1)Figure 22) permettant 1) une diminution de la propagation de l'infection ; 2) un contrôle et une diminution suffisamment importante de la réplication et des sécrétions virales (HBsAg ; HBeAg ; particules infectieuses) ; 3) une exposition des composés viraux aux senseurs de l'immunité innée. Ce dernier point pourrait être atteint dans le cadre de l'utilisation de CpAM par exemple empêchant l'encapsidation de l'ARNpg. L'autre point important de l'utilisation des DAA dans un premier temps est également de diminuer les effets inhibiteurs viro-induits sur l'expression des gènes de l'immunité ou leurs médiateurs.

Afin d'appuyer cet effort des DAA, l'utilisation de répresseurs des récepteurs co-inhibiteurs et des cytokines anti-inflammatoire pourrait permettre de modifier l'environnement tolérogène hépatiques pour une rééducation du système immunitaire plus efficace ((2) Figure 22). Basé sur ce concept, l'étude des anticorps ciblant les récepteur co-inhibiteur PD-1/PD-L1 ont montré des résultats très prometteurs dans le cadre d'infection chronique par HBV ¹⁸⁰. Dans le but de reconditionner le système immunitaire dans un second temps, l'utilisation d'agoniste de PRR est envisagée. La stimulation ciblant les senseurs de l'immunité innée a montré, comme expliquée précédemment, sa capacité à déclencher un phénotype antiviral important (agoniste de TLR7 par exemple.) Cependant, l'utilisation de tels ligands doit être encore optimisée pour identifier 1) le PRR le plus à même de déclencher une réponse immunitaire anti-HBV forte sur l'ensemble des paramètres viraux avec l'utilisation possible d'une vaccination thérapeutique anti-HBV (l'agoniste de PRR jouant le rôle d'adjuvant); 2) les cellules possédant ce PRR les plus à même de générer une réponse antivirale forte ; 3) l'activation directe ou indirecte des CPA et des cellules productrice d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires ; 4) la stimulation directe des hépatocytes afin de générer une réponse autocrine et paracrine luttant contre l'infection productive et son support transcriptionnel, l'ADNccc ^{139,140,153,181,182}.

Une réponse immunitaire innée complète permettrait alors le recrutement et l'activation de l'immunité adaptative. Cette activation pourrait être augmentée par l'utilisation de l'agoniste de PRR du fait de l'expression de ces récepteurs dans les cellules du système adaptatif (Figure 9). Cette stimulation amplifie par ailleurs les fonctions effectrices des cellules adaptatives. Les sécrétions cytokiniques, la formation d'iMATE, l'augmentation des capacités à présenter l'antigène des CPA (CMH II et I, récepteurs coactivateurs CD86/CD80...) et des hépatocytes infectés (CMH I) permettrait un recrutement efficace des cellules T et B. Cette activation conjointement avec les autres cellules effectrices de l'immunité innée (NK, NKT, MAIT) permettrait l'activation des T CD8+ pour éliminer les cellules infectées, ainsi que la production active d'anticorps neutralisant des protéines virales permettant l'élimination de l'infection chronique et la protection contre le risque de réactivation virale ou réinfection ((3)Figure 22). L'utilisation de CAR-T pourrait aider à la réalisation de cette étape dans le cas d'un trop faible nombre de cellule T HBV spécifiques. Cette stratégie intéressante demande cependant d'importantes mises au point. En effet, le système immunitaire étant à la fois destructeur et réparateur, l'inhibition des mécanismes immunomodulateur implique de nombreux risques. Les doses utilisées des différents traitements (agonistes, répresseurs de récepteurs co-inhibiteur...), la durée des traitements et leurs cibles devront être finement régulés et contrôlés.

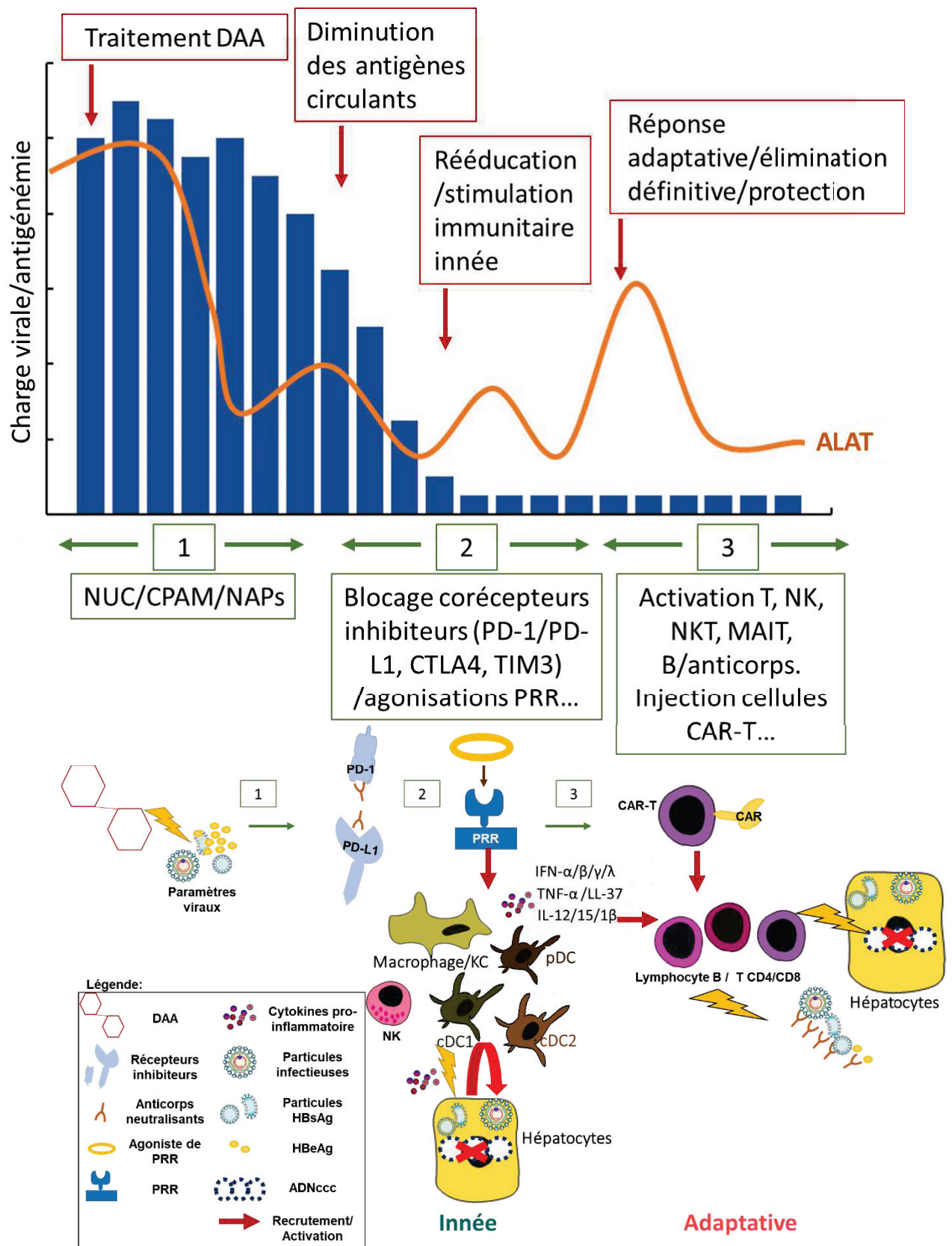


Figure 22 : Stratégies envisagées utilisant les DAA et l'immunothérapie dans la lutte contre l'infection chronique HBV (Ferrari C 2015; Testoni B *et al* 2017; Durantel D 2017; Soriano V *et al* 2017) 1) Diminuer les sécrétions virales par l'utilisation de drogues à effet direct (DAA) ; 2) rétablir une immunité innée fonctionnelle ; 3) Rééduquer le système immunitaire adaptatif pour lutter définitivement contre l'infection HBV.

II- Objectifs et hypothèses de travail

Les traitements actuels utilisés en cas d'infection chronique par HBV, et qui s'appuient essentiellement sur les analogues de nucléos(t)ides, ne sont pas suffisamment efficaces pour garantir l'élimination du virus de manière définitive et nécessitent une prise médicamenteuse à vie. C'est pourquoi comme expliqué précédemment, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies antivirales plus efficaces. Notre laboratoire travaille sur l'utilisation des agonistes de PRR dans le cadre d'infection chronique par HBV, dans le but de restaurer une réponse immunitaire permettant l'élimination du virus par le biais d'effecteurs de l'immunité cytokiniques, cellulaire et intracellulaire. Plus précisément, l'objectif est de développer des « adjuvants immuno-thérapeutiques » dans le cadre de stratégies plus complexes alliant des inhibiteurs de points de contrôle, des transferts de cellules T CD8⁺ ou une vaccination thérapeutique. La stratégie adjuvante proposée présente deux caractéristiques. D'une part elle vise à contribuer à une restauration de réponses immunitaires efficaces contre le virus par stimulation des cellules professionnelles de l'immunité, et en particulier les cellules de l'immunité innée (CPA : pDC, macrophages etc.), et d'autre part elle vise à combattre le virus dans les cellules le répliquant, c'est à dire les hépatocytes, en induisant des voies de signalisation antivirale via les PRR. Cependant il existe de nombreux PRR, comme décrit dans l'introduction, et beaucoup peuvent être à la fois exprimés sur les cellules professionnelles de l'immunité innée et sur les hépatocytes, alors que d'autres peuvent avoir une spécificité d'expression. Selon notre hypothèse de travail, il conviendrait d'identifier les PRR qui sont exprimés et fonctionnels à la fois dans les hépatocytes et dans un type cellulaire innée d'intérêt ; c'est l'objet de l'étude n°1. D'autre part, il conviendrait de définir l'activité anti-HBV directe de certains agonistes de PRR dans les hépatocytes, pour définir une valeur ajoutée à notre agoniste comme défini ci-dessus ; c'est l'objet de l'étude n°2. Et enfin, quand cela est pertinent, déterminer s'il n'existe pas des mécanismes de résistance viro-induit qui rendrait l'utilisation de certains agonistes moins efficace ; c'est l'objet de l'étude n°3. Les objectifs spécifiques de chaque étude vont maintenant être exposés l'un après l'autre.

Etude 1 : Characterisation of pattern recognition receptor (PRR) expression and functionality in liver primary cells and derived cell lines.

Dans le but d'utiliser au mieux des ligands ciblant les cellules dans le foie, nous avons dans un premier temps cherché à caractériser l'expression des PRR ainsi que leurs adaptateurs de ses différentes cellules. L'objectif principal était de déterminer quelles cellules exprimaient tel ou tel PRR dans l'environnement hépatique. L'expression de ces PRR pouvant conduire lors

de leur stimulation à des réponses cytokiniques participant à la lutte contre les pathogènes ou les tumeurs, il est apparu nécessaire de connaître quels récepteurs étaient exprimés par les différentes cellules hépatiques et leurs implications dans les concepts immuno-thérapeutiques. Comme expliqué précédemment, le foie possède un environnement immunitaire complexe dans lequel sont impliqués à la fois les cellules immunitaires comme les cellules macrophagiques/Kupffer ainsi que les LMNC totales et les cellules non-professionnelles spécifiques du foie comme les LSEC, les cellules étoilées et les hépatocytes. Nous souhaitons également comparer l'expression de ces PRR entre les cellules immunitaires du foie, les LMNC et les cellules immunitaires du sang périphérique, PBMC. Les proportions cellulaires différentes et l'environnement immunitaire particulier au niveau du foie laissent supposer une différence d'expression des récepteurs entre ces deux types de populations. Leur évaluation pour les concepts hépato-immuno-thérapeutiques, joue un rôle important dans le choix des agonistes de PRR bien représentés dans le foie. D'autre part, dans le but de déterminer la pertinence, au niveau immunitaire, des différents modèles cellulaires disponibles à l'étude des cellules du foie, nous voulions également comparer l'expression de ces PRR dans ces modèles aux cellules primaires correspondantes. L'environnement immunologique du foie étant décrit comme tolérogène, nous voulions enfin également regarder l'expression par ces différentes cellules, des récepteur et corécepteur inhibiteur comme PD1/PD-L1.

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les ligands de TLR les plus efficaces dans les hépatocytes à lutter contre l'infection HBV.

Etude 2 : Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes.

Les complexes stratégies immuno-thérapeutiques envisagées pour lutter contre les infections chroniques de type B visent à activer le système immunitaire afin d'aider à restaurer un contrôle immunologique du virus. Ces stratégies pourraient comprendre l'utilisation de ligands de PRR comme composantes adjuvantes. Ce type de stratégies est à l'étude pour de nombreuses pathologies chroniques, incluant les infections virales, les cancers ou encore les maladies auto-immunes. Le but de ces stratégies immuno-thérapeutiques repose sur deux principes. Le premier est d'activer le système immunitaire pour faciliter l'élimination de l'agent responsable de la pathologie (virus, cellules tumorales...) et le second d'aider par le déclenchement de cette réponse immunitaire à rééduquer les cellules effectrices qui dans certains cas sont sous un état anergique. Dans le cadre de l'infection chronique par HBV, il a été observé une inhibition de la réponse immunitaire (innée et adaptative) au vu des résultats de certains laboratoires dont le

nôtre. Bien que ce point soit débattu à l'heure actuelle, le fait est que le virus, chez de nombreuses personnes exposées, n'est pas éliminé par le système immunitaire et persiste dans les hépatocytes. L'ADNccc d'HBV responsable de la persistance du virus dans les hépatocytes. Il a été observé dans des modèles pré-cliniques d'étude que l'utilisation de certains stimulateurs de l'immunité pouvaient conduire à une diminution de la réplication virale et parfois de l'ADNccc sans effet lytique des hépatocytes infectés. Les mécanismes responsables de la diminution de la transcription de l'ADNccc, pourraient avoir deux origines possibles non-exclusives. Soit par dégradation/modification de l'ADNccc par des nucléases ou désaminases intranucléaires soit par la mise en place d'une répression transcriptionnelle induite par des modifications aux niveaux épigénétiques par des méthyltransférases. L'induction de ces mécanismes par la sécrétion autocrine des hépatocytes de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN pourrait potentiellement être induite par la stimulation de PRR spécifiques de ces cellules. Dans ce but, nous voulions étudier différents agonistes de TLR *in vitro* et leur impact direct sur l'infection chronique par HBV dans les hépatocytes.

Etude 3 : Interaction between Toll-Like Receptor 9-CpG oligodeoxynucleotides and Hepatitis B Virus virions leads to entry inhibition in hepatocytes and reduction of alpha Interferon production by plasmacytoid Dendritic Cells.

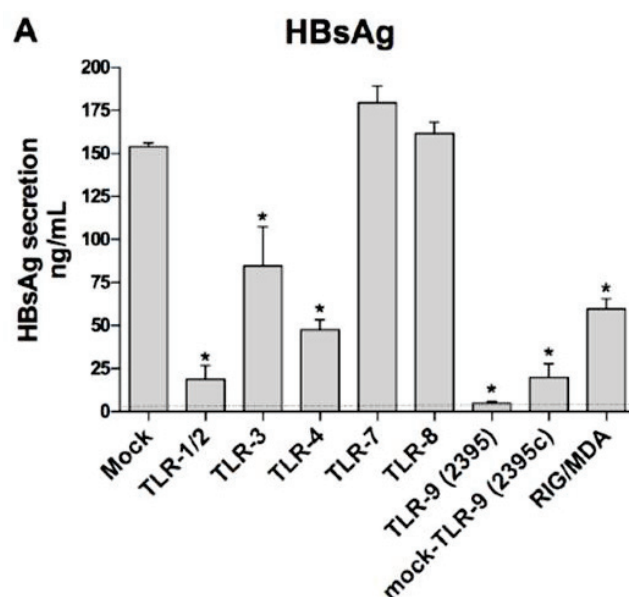


Figure 23 : Effet antiviral sur la sécrétion d'HBsAg des agonistes de PRR dans le modèle HepaRG chroniquement infecté par le HBV.

L'identification des agonistes de PRR ayant un effet antiviral sur l'infection chronique par HBV dans les hépatocytes au sein de notre équipe a donné lieu à la mise en évidence du fort potentiel antiviral de certains de ces agonistes. Cependant, lors de nos précédentes études, nous avons pu

identifier un fort effet inhibiteur de l'infection par HBV dans les hépatocytes par un traitement utilisant les agonistes de TLR9 de type CpG ⁴⁷ (Figure 23). Le TLR9 présente un fort intérêt dans la lutte antivirale. Celui-ci est spécialisé dans la reconnaissance des ADN simples ou doubles brins retrouvés dans les compartiments endosomaux. Ces ADN proviennent principalement de pathogènes intra ou extracellulaires comme les bactéries ou les virus, mais il arrive dans les cas d'auto-immunités qu'il s'agisse d'ADN du soi. La reconnaissance de son ligand par TLR9 conduit à l'activation d'une cascade de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoire. Cette voie d'activation varie en fonction du type cellulaire ainsi que de la localisation du TLR9. En effet, la présence du TLR9 dans les pDC présente la particularité de ne pas induire la même réponse inflammatoire en fonction de sa localisation dans les compartiments endosomaux précoces ou tardifs va conduire respectivement à la production importante d'IFN- α dont elles sont les principales productrices via l'activation d'IRF7 ou à la production de cytokines pro-inflammatoires tel l'IL-6 via l'activation de NF- κ B. Ces cytokines ont un fort effet antiviral dans nos modèles *in vitro* d'hépatocytes infectés chroniquement par HBV. Cependant, dans les hépatocytes la production de cytokines pro-inflammatoires ou d'IFN sous agonisation de TLR9 n'avait pas été observée. Ce résultat semblait indiquer que le mécanisme antiviral médié par l'utilisation de CpG ODN pour activer TLR9, était indépendant d'une sécrétion cytokinique. Peu de choses sont connues pour l'interaction entre HBV et TLR9. Ce qui a été décrit est une inhibition de la voie d'induction TLR9 par la présence d'HBV ou de ses particules subviraux, mais cet effet était fortement débattu. D'autre part, l'infection chronique par le HBV a été décrite pour inhiber la réponse IFN- α lors de l'agonisation de TLR9, en particulier dans les pDC. Nous avons donc étudié dans un premier temps le mécanisme antiviral dans les hépatocytes lors de l'infection par HBV médié par l'agonisation du TLR9. Dans un second temps, nous avons donc voulu comprendre l'effet inhibiteur d'HBV sur l'agonisation de la voie TLR9 dans les pDC.

Méthodes d'isolation des cellules primaires :

L'obtention des différentes cellules du foie a été réalisée comme suit (Figure 24) : à partir d'une résection de foie humain, celui-ci est perfusé dans un premier temps à la collagénase après avoir été préalablement lavé au PBS 1X afin d'éliminer les cellules du sang périphériques présentes dans les vaisseaux. Suite à l'effondrement de celui-ci, les cellules sont centrifugées afin de culotter les hépatocytes et de les séparer des cellules non parenchymateuses. Ces dernières sont alors chargées soit sur des gradients de Ficoll permettant ainsi d'obtenir les LMNC par centrifugation, soit sur des gradients d'Optiprep (iodixanol) permettant d'obtenir d'une part les cellules étoilées et d'autre part les LSEC et les Macrophages du foie (LSEC/KC). Les LSEC sont isolées par l'utilisation de billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre le CD146. Les macrophages du foie sont purifiés à partir de la fraction LSEC/KC ou à partir des LMNC via des billes magnétiques couplées à des anticorps sur le principe de la sélection négative des cellules CD14+.

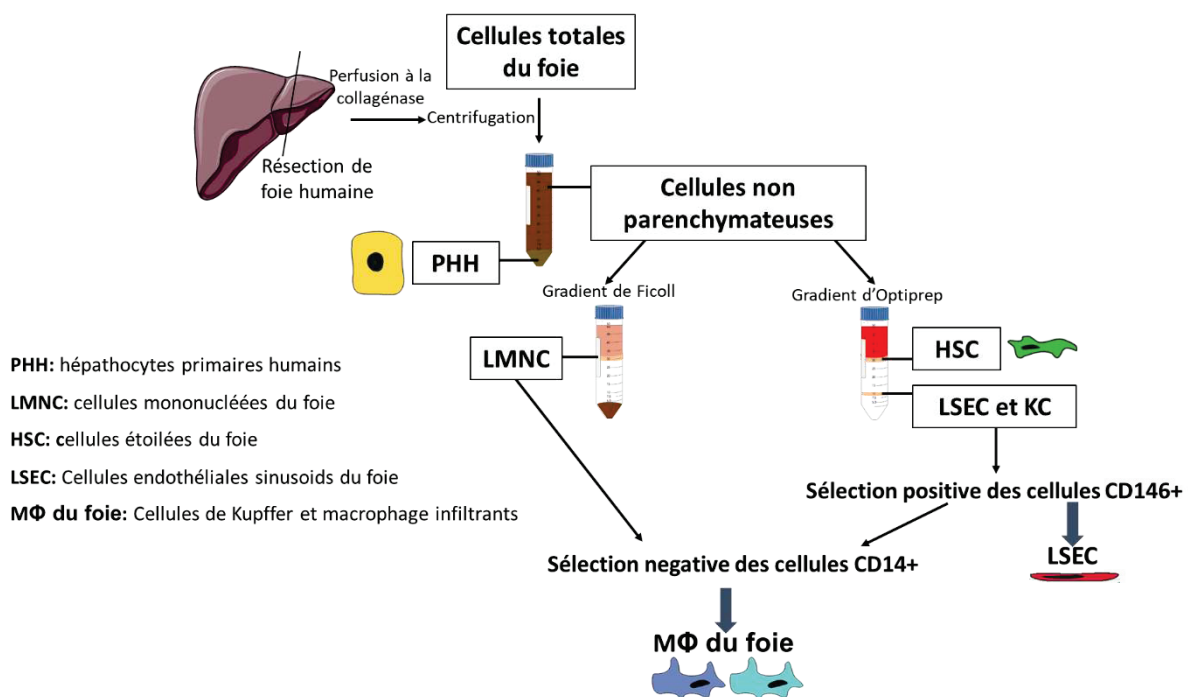


Figure 24 : Purification des différentes cellules du foie

La purification des cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC) ont été isolées comme suit (Figure 25) : Le sang provenant de poches ou de tubes de sang prélevés sur anticoagulant (citrate de sodium) sont dilué au 1/2 en PBS 1X avant d'être chargé sur un gradient de Ficoll. La fraction récupérée contient les PBMC. Les PBMC peuvent être déposés par la suite sur un gradient de Percoll permettant l'isolation des lymphocytes totaux, et des cellules

myéloïdes (monocytes et cellules dendritiques). Les pDC sont isolées à partir de la fraction myéloïde grâce à des billes couplés à des anticorps dirigés contre le CD304+ ou BDCA4+.

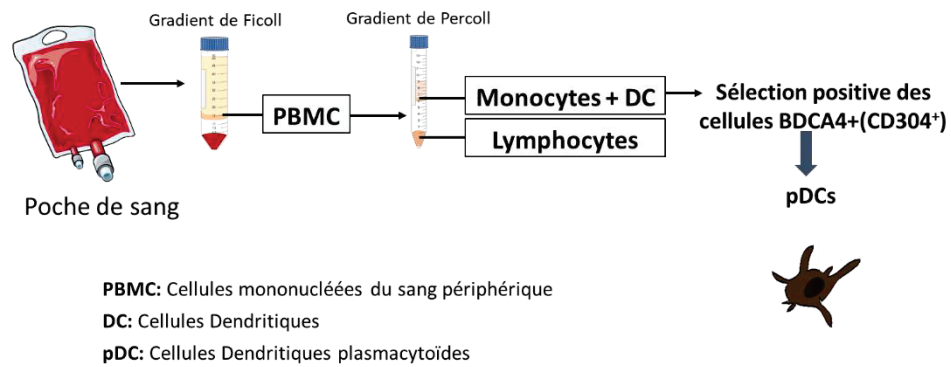


Figure 25 : Purification des cellules du sang périphérique

III- Résultats

Etude 1 : Characterisation of Pattern Recognition Receptors (PRR) expression and functionality in liver primary cells and derived cell lines

Suzanne Faure-Dupuy^{1,*}, Serena Vegna^{1,*}, Ludovic Aillot¹, Laura Dimier¹, Knud Esser², Mathias Broxtermann², Marc Bonnin¹, Nathalie Bendriss-Vermare¹, Michel Rivoire³, Guillaume Passot⁴, Mickaël Lesurtel⁵, Jean-Yves Mabrut⁵, Christian Ducerf⁵, Anna Salvetti¹, Ulrike Protzer^{2,6}, Fabien Zoulim^{1,5,7}, David Durantel^{1,7} and Julie Lucifora¹.

1 INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon 1 (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France;

2 Institute of Virology, Technical University of Munich / Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

3 INSERM U1032, Centre Léon Berard (CLB), Lyon, France ;

4 Service de chirurgie viscérale et endocrinienne, hospices civils de Lyon, centre hospitalier Lyon-Sud, 69310 Lyon, France

5 Hopital de la Croix-Rousse, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

6 German Center for Infection Research (DZIF), Munich partner site

7 DEVweCAN Laboratory of Excellence, Lyon, France;

* Contribution égale

Reçu le 07 Février 2018

Renvoyé et accepté le 9 et 10 Mai 2018

Characterization of Pattern Recognition Receptor Expression and Functionality in Liver Primary Cells and Derived Cell Lines

Suzanne Faure-Dupuy^a · Serena Vegna^a · Ludovic Aillot^a · Laura Dimier^a · Knud Esser^b
Mathias Broxtermann^b · Marc Bonnin^a · Nathalie Bendriss-Vermare^a · Michel Rivoire^c
Guillaume Passot^d · Mickaël Lesurtel^e · Jean-Yves Mabrut^e · Christian Ducerf^e · Anna Salvetti^a
Ulrike Protzer^{b, f} · Fabien Zoulim^{a, e, g} · David Durantel^{a, g} · Julie Lucifora^a

^aINSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), University of Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France; ^bInstitute of Virology, Technical University of Munich/Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany; ^cINSERM U1032, Centre Léon Bérard, Lyon, France; ^dService de chirurgie viscérale et endocrinienne, Hospices Civils de Lyon (HCL), centre hospitalier Lyon-Sud, Lyon, France; ^eHopital de la Croix-Rousse, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ^fGerman Center for Infection Research (DZIF), Munich Partner Site, Munich, Germany; ^gDEVweCAN Laboratory of Excellence, Lyon, France

Keywords

Checkpoint inhibitors · Hepatic stellate cell · Host defense · Kupffer cell · Liver sinusoidal endothelial cells · Macrophages · Pathogen-associated molecular patterns · Pattern recognition receptors · Primary cells · Primary human hepatocytes

Abstract

Different liver cell types are endowed with immunological properties, including cell-intrinsic innate immune functions that are important to initially control pathogen infections. However, a full landscape of expression and functionality of the innate immune signaling pathways in the major human liver cells is still missing. In order to comparatively characterize these pathways, we purified primary human hepatocytes, hepatic stellate cells, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), and Kupffer cells (KC) from human liver resections. We assessed mRNA and protein expression level of the major innate immune sensors, as well as checkpoint-inhibitor li-

gands in the purified cells, and found Toll-like receptors (TLR), RIG-I-like receptors, as well as several DNA cytosolic sensors to be expressed in the liver microenvironment. Amongst the cells tested, KC were shown to be most broadly active upon stimulation with PRR ligands emphasizing their predominant role in innate immune sensing the liver microenvironment. By KC immortalization, we generated a cell line that retained higher innate immune functionality as compared to THP1 cells, which are routinely used to study monocyte/macrophages functions. Our findings and the establishment of the KC line will help to understand immune mechanisms behind antiviral effects of TLR agonists or checkpoint inhibitors, which are in current preclinical or clinical development.

© 2018 S. Karger AG, Basel

S.F.-D. and S.V. contributed equally to this work.

KARGER

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/jin

Dr. Julie Lucifora
Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 – CNRS 5286
151 cours Albert Thomas
FR-69424 Lyon Cedex 03 (France)
E-Mail julie.lucifora@inserm.fr

Introduction

Infection by microorganisms leads to the activation of the host immune response through a sensing mediated by innate pattern recognition receptors (PRRs). PRRs include Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors, RIG-I-like receptors (RLRs), NOD-like receptors (NLRs), and DNA sensors, such as IFI16 (Gamma-interferon-inducible protein 16), cGAS or AIM2 (absent in melanoma 2) [1]. Each PRR detects specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from viruses, bacteria, mycobacteria, fungi, and parasites that initiate the recruitment of distinct sets of adaptor molecules such as Myd88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein), and STING (Stimulator of interferon genes), among others [1]. Activation of those signaling pathways leads to the secretion of many inflammatory cytokines, including interferons (IFN), but also different chemokines and antimicrobial peptides.

The liver is located at the crossroads of the systemic and enteric circulations and carries out important metabolic functions such as detoxification and glucose and lipid metabolism. In addition, the liver performs many essential immune tasks and is considered a secondary lymphoid organ due to the number of flowing-through, infiltrating, and resident immune cells it contains [2].

Mechanisms of physiologic tolerogenicity are in place in the liver in order to prevent a persistent inflammation in reaction to permanent exposure to gut-derived "microbial degradation products" or even live bacteria, which can pass-through gut mucosa [2, 3]. Among tolerogenic mechanisms, there are checkpoint ligand-receptor systems (i.e., PD-1/PD-L1, CTLA-4/B7-1 or 2...) that modulate T-cell receptor-mediated T cell activity [4, 5]. This physiologic tolerogenicity represents a sort of Achilles' heel of the liver, which consequently can be the target of various pathogens establishing chronic infections [6].

The liver is, however, also capable of mounting a potent antimicrobial response. The liver tissue environment is composed of highly specialized cell types, including parenchymal and a number of nonparenchymal cells that play a key role in regulating hepatic immune functions. Parenchymal cells, called hepatocytes, account for 80% of liver mass and respond to different type of stimuli [2, 3, 7]. LSEC are also well known to participate in liver immune response by secreting cytokines upon pathogenic stimuli [8]. These cells also play a key role upon danger signal leading to fibrosis since, upon shear stress, they will

undergo cytoskeletal remodeling, leading to a loss of fenestration [8, 9]. Hepatic stellate cell (HSC), the liver fibroblasts, and producers of extracellular matrix are localized in the space of Disse, an area between hepatocytes and sinusoids, and thus are not directly exposed to the bloodstream. These cells normally represent 5–8% of the total number of the liver cells. However, upon chronic inflammation, HSC undergo transformation to become myofibroblasts, the activated state of HSC [9–11]. Once activated, these cells proliferate and start secreting numerous components of the extracellular matrix creating a scar-like tissue [12]. However, during uncontrolled inflammation and scarring/healing process, the overproduction of extracellular matrix induces fibrosis, which can ultimately lead to cirrhosis and favor the development of hepatocellular carcinoma (HCC) [9, 12]. Finally, Kupffer cells (KC), the liver resident macrophages, represent 80% of total macrophages population within the body [13]. As macrophages, they form the first line of defense against pathogens and are specialized in pathogen recognition [14]. In response to stimulation, they produce a large spectrum of cytokines and chemokines that attract other immune cells such as neutrophils or infiltrating monocytes that will differentiate into macrophages upon entering the liver. KCs have a high phagocytic capacity and are implicated in the elimination of aging blood cells and pathogens. KC can subsequently present associated antigens to lymphocytes to reactivate them at the site of injury or infection [13].

Successful liver pathogens evolved strategies to either passively or actively evade innate and adaptive immunity. Indeed, hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) can persistently infect the hepatocytes. HBV and HCV, chronically infect around 70 and 250 million people worldwide respectively, leading to more than 1.2 million deaths per year (WHO 2017). While curative treatments have been recently developed for HCV [15], leading to viral clearance in more than 95% of cases, HBV cure is not achievable yet, as available treatments (i.e., nucleoside analogues) only allow the control of viral replication and require lifelong administration [16]. New treatments that could lead to a "functional cure" are currently under evaluation [16]. Among them, TLR7 agonists are evaluated in clinical phase II study after showing promising antiviral effects in preclinical models of HBV infections [17, 18]. Moreover, PD-1/PD-L1 inhibitors are considered to combat the development of several types of cancers [19, 20], including HCC in chronic HBV infection [21, 22]. Interestingly, they also are currently in clinical trial to treat CHB patients with-

out signs of HCC. In this context, a better knowledge of the expression and functionality of innate sensors in liver cells would help developing novel PRR agonists, with antimicrobial or anticancer properties, or other strategies to revert immune inhibitory processes. This led us to examine the expression and functionality of some PRR in isolated primary liver cells, as well as in cell lines derived thereof.

Material and Methods

Liver Primary Cells Purification and Cells Culture

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from at least 3 blood donors were isolated by Ficoll gradient cultured in RPMI medium supplemented with 10% of decompartmented FBS and 50 U/mL of penicillin/streptomycin (macrophage medium) at a density of 250,000 cells/cm². Liver cells were isolated from liver resections (online suppl. Fig. S1A and S1B; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000489966) obtained from three surgical departments in Lyon (Centre Léon Bérard, Hôpital de la Croix Rousse and Centre Hospitalier Lyon-Sud) with the French ministerial authorizations (AC 2013-1871, DC 2013-1870, AFNOR NF 96 900 sept 2011). After collagenase treatment, the liver extract is filtered and centrifuged, as previously described [23]. Pellets contain primary human hepatocytes (PHH), whereas supernatants contain remaining nonparenchymal and other liver resident cells. PHH were cultured on collagen layer and maintained in PHH medium (Williams medium supplemented with 5% of fetal clone II serum, 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 1× glutamax, 5 µg/mL of bovine insulin, 5 × 10⁻⁵ M of hydrocortisone, and 2% of DMSO) at a density of 250,000 cells/cm². The supernatants (containing all liver cells except PHH) were either used to purify total liver mononuclear cells (LMNC) by Ficoll gradient or used to purify hepatic stellate cells (HSC), KC and LSEC, by a two-phase iodixanol gradient [24] (online suppl. Fig. S1A). LMNC were further cultured in macrophage medium at a density of 250,000 cells/cm². HSC were further cultured in Williams medium supplemented with 10% of fetal clone II serum, 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 1× glutamax, 5 µg/mL of bovine insulin, and 5 × 10⁻⁵ M of hydrocortisone at a density of 125,000 cells/cm². LSEC were purified by positive selection with CD146 microbeads (Miltenyi Biotec) and culture in LSEC medium (MCD131 supplemented with 20% of fetal clone II serum, 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 5× glutamax, 35 mM of hydrocortisone, and 10 mg/mL of cAMP) at a density of 125,000 cells/cm². KC were isolated by negative selection using pan monocyte isolation kit (Miltenyi Biotec) and cultured in macrophage medium at a density of 125,000 cells/cm². At least 3 batches of each primary cells were used to perform the experiments. The photos of the liver resections and the yield of purified cells for each donor are presented in the online supplementary Figure 1B. THP1 (obtained from Thierry Walzer's laboratory, CIRI, Lyon) were cultured and differentiated as previously described [25]. Immortalized Kupffer cells (iKC) were immortalized by transduction with lentiviruses expressing the HPV E6E7 proteins, cultured in macrophage medium and differentiated by a 48-h treatment with 2% DMSO to stop proliferation at a density of 125,000 cells/cm².

RNA Extraction, Reverse Transcription, dPCR, and qPCR

Total RNA was extracted with Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) and cDNA synthesized using the SuperScript[®]III Reverse Transcriptase (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was first analyzed by digital PCR (dPCR), on a 96 × 96 Biomark HD system (Fluidigm) using EvaGreen[®] dye according to the manufacturer's instructions. Primers sequences are presented in online supplementary Table S1. qPCR analyses were performed using "Express SYBR GreenER[™] qPCR SuperMix Universal" (Invitrogen). mRNA expression was assessed by comparative cycle threshold (Ct) method, by normalizing the amount of target cDNA on housekeeping genes: RPLP0 and GUS for dPCR and RPLP0 for qPCR (2^{-ΔCt}).

Heat Map Construction and Analysis

Primary results obtain with Biomark HD system were analyzed with manufacturers software (Fluidigm Real-Time PCR Analysis). Construction of the Heat map was performed on MEV software.

Immunoblot Analysis

Cells were lysed in RIPA buffer supplemented with protease inhibitors for 30 min on ice, sonicated and boiled in Laemmli buffer complemented with DTT. Protein concentration was measured by BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Equal amounts of protein from total cell lysates (30–40 µg) were loaded onto SDS-PAGE Stain-Free precast gels (BioRad) and transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad). The membranes were blocked with TBST (1× TBS with 0.1% Tween 20) +5% milk at room temperature for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Primary antibodies and their corresponding positive controls used in this study are described in online supplementary Table S2. Membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (SIGMA) for 1 h at room temperature. Activity was visualized by chemiluminescence, and the signal was quantified by ImageLab software. Stain-free analysis was performed following manufacturer's instructions. Western blot analyses were performed on a pool of protein samples obtained from at least three different donors. The nature of positive control samples is specified in online supplementary Table S2.

PRR Stimulation and ELISA

TLR or RLR ligands from Invivogen or Ribox life science are listed in online supplementary Table S3. It is worth noting that a low concentration of RIGI/MDA5 agonist (Poly(I/C)-(LMW)-LyoVec from Invivogen) was used (i.e., 0.025 µg/mL) to stimulate cells, as this concentration was found to be not toxic in repetitive administration in HepaRG cells [26]. Cells were exposed to the ligands, supernatants were collected 24 h later, and IL-6/IP-10 concentration were assayed using DuoSet ELISA (R&D systems) according to the manufacturer's instructions.

Phagocytosis Assay

THP1, iKC, and KC phagocytosis capacity was assessed using pHrodo[™] Green E. coli Bioparticles[™] conjugates for phagocytosis. Cells were exposed for 1 h to the bioparticles at either 4 or 37 °C. After 1 h, cells were collected by scrapping, and phagocytosis was assessed by flow cytometry using FACScalibur flow cytometer and analyzed using CellQuestPro software (BD Biosciences).

Results and Discussion

Innate Immunity Gene RNA Expression in Various Primary Liver Cells

PHH, LSEC, HSC, and KC were purified from different liver resections (online suppl. Fig. S1A and S1B). RT-qPCR analyses using specific markers (i.e., HNF4α for PHH, L-SIGN for LSEC, α-SMA for HSC, and CD68 for KC) revealed a high enrichment for each cell type (online

suppl. Fig. S1C and S1D). The expression level of 53 mRNAs that are known to be involved in pathogens sensing and immune cell regulation was assessed in non-stimulated cells (i.e., basal state) by microfluidic high-throughput quantitative RT-dPCR (Fluidigm, Biomark) assays. As controls, we used total PBMC and total non-parenchymal liver mononuclear cells (LMNC) from different donors that were not infected with HBV, HCV, or HIV.

Interestingly, resident LMNCs showed, overall, higher expressions of the tested genes at basal state compared to PBMC supporting the fact that the liver is important for host immunity [2]. Nonstimulated liver cells showed high expression of cytosolic DNA (i.e., DDX3, Ku70, DHX9, or DHX36) and RNA sensors (i.e., RLR, RIG-I, and MDA-5) compared to PBMC (Fig. 1). Except for TLR2 and TLR4, which are highly expressed at basal level in KCs, TLR mRNA levels were relatively low in liver cells. In contrast, MyD88, TRIF, and TRAM, the main TLR adaptors, showed high basal expression level in all the different primary liver cells (Fig. 1) and IRF1, 3, and 7, the transcription factors involved in TLR signaling, were detected in almost all tested cells. Similarly, expression of NOD1 and NOD2 (previously described to be functional in hepatocytes [27, 28]) was barely detectable at basal level, but RIP2, a NOD adaptor protein was detected in almost all cells tested (Fig. 1). Inflammasome receptor mRNA (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2) were also barely detected, whereas mRNA coding for their signaling proteins (ASC and caspase 1) were readily detected in all liver cells. Finally, C-type lectin receptors, SOCS family, PD-1 and PD-L1, and TIM pathways were barely detected in the liver at basal state using microfluidic high-throughput quantitative RT-PCR (Fig. 1).

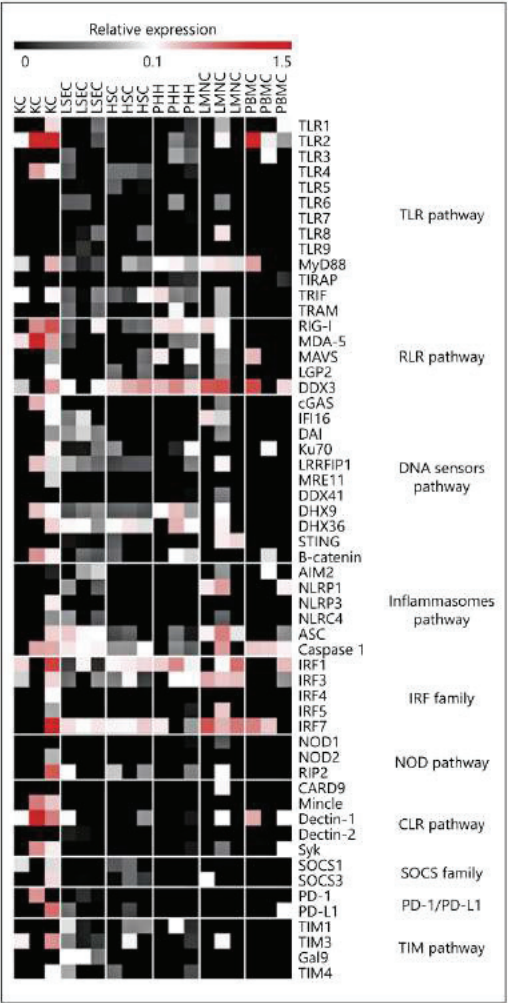


Fig. 1. Liver cells expression of innate sensors and related molecules. PHH, LSEC, HSC, KC, LMNC, and PBMC were purified from different donors and cultured for 24 h. RNAs were extracted, and the expression level of 53 mRNAs was assessed by microfluidic high-throughput quantitative RT-PCR (Fluidigm, Biomark) assays. Data are presented as relative expression to two housekeeping genes (RPLP0 and GUS). Black square indicates an absence of expression, nuances of grey a low expression, and nuances of red a higher expression. TLR, toll-like receptor; RLR, retinoic acid inducible gene (RIG)-like receptor; IRF, interferon regulatory factor; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor; CLR, C-type lectin receptor; SOCS, suppressor of cytokine signaling protein; PD-1, programmed cell death one; PD-L1, programmed cell death ligand one; TIM, T-cell immunoglobulin and mucin domain.

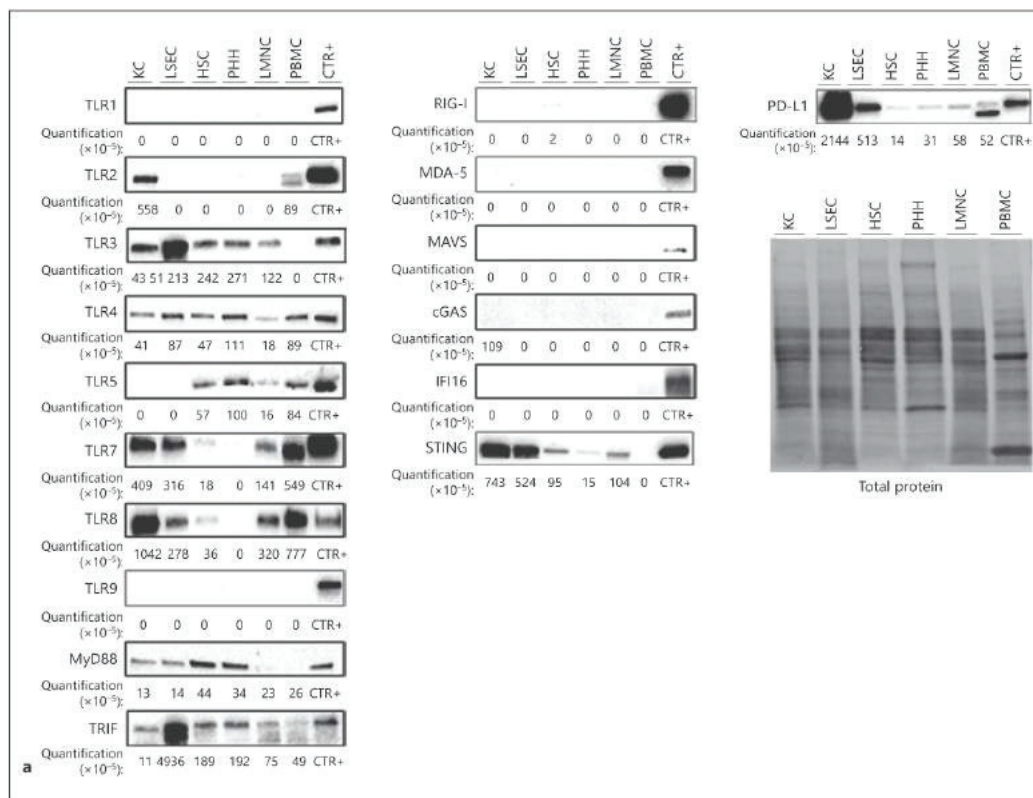


Fig. 2. TLR, RLR, cytosolic DNA sensors and PD-L1 expression in nonstimulated primary liver resident cells and in responses to PRR stimulations. **a** PHH, LSEC, HSC, KC, LMNC, and PBMC were purified from at least 3 different donors and cultured for 24 h. Proteins were extracted, pooled, and TLR1 to TLR9, MyD88, TRIF, RIG-I, MDA-5, MAVS, cGAS, IFI16, STING, and PD-L1 protein expression was assessed by Western blot analysis. Target protein levels were normalized to total protein quantification assessed by

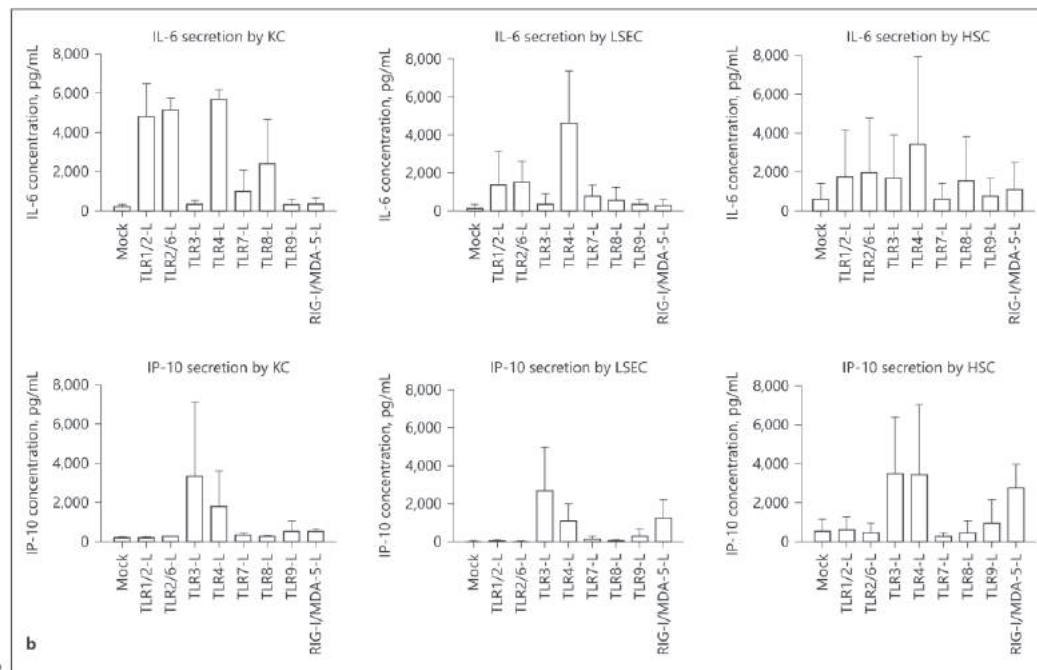
stain-free gels. Stimulated cells were used as controls (CTR+) for primary antibody efficiencies as indicated in Table S2. **b** KC, LSEC, and HSC from different donors were exposed to the indicated ligands at the concentration indicated in online supplementary Table S3 for 24 h. Supernatants were collected, and IL-6 and IP-10 secretions were analyzed by ELISA. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of three biological replicates.

(Figure continued on next page.)

Innate Immunity Gene Protein Expression and Functionality in Various Primary Liver Cells

By Western blot analyses, we assessed more specifically the expression patterns of PD-L1 as well as a subset of proteins belonging to the TLR, RLR, and DNA cytosolic sensor families in liver cells. TLR1, TLR9, members of the RLR family (RIG-I, MDA-5, and MAVS), and the DNA sensor IFI16 and cGAS proteins could not be de-

tected in any of the tested cells (Fig. 2a). To confirm whether the mRNAs of these different proteins were indeed negative, we performed standard RT-qPCR analyses, which are more sensitive than Fluidigm ones (used in Fig. 1) to detect them. With this method, we were able to detect the presence of these different mRNAs (online suppl. Fig. S2), suggesting that those proteins are expressed in liver cells at very low levels at basal state but



could be upregulated upon specific stimulation, as already described [29, 30]. Surprisingly, we could not detect TLR9 proteins either in PMBCs or in LMNCs (Fig. 2a) that should contain pDCs and B cells known to express TLR9 [31], and as confirmed with pDC purified from PBMC (Fig. 2a, TLR9, CTR+). This might be due to the heterogeneity of cell proportion between donors. TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, and TRIF proteins were detected (although at various levels) in both LMNC and PBMC (Fig. 2a), whereas TLR3 and STING proteins were only detected in LMNC, suggesting that percentage of the different immune cell populations are slightly different in blood compared to the liver and/or that the liver microenvironment may influence the phenotype of immune liver cells. TLR3, TLR4, MyD88, TRIF, and STING are ubiquitously expressed by KC, LSEC, HSC, and PHH (Fig. 2a) implying that the liver is particularly well equipped to detect lipopolysaccharides as well as cytosolic RNA and DNA [32]. Whereas TLR2 mRNAs were present in all cell types, their level was the highest in KCs (online suppl. Fig. S2), which translated at the

protein levels as TLR2 protein being only detectable in KCs. In accordance with their phagocytic capacities [3], KC and LSEC express TLR7 and TLR8 on protein level (Fig. 2a), both TLRs involved in intracellular ssRNA detection [33]. Interestingly, TLR5 protein was only detected in HSC and PHH (Fig. 2a). Since these cells are not directly exposed to blood streams, this specific basal expression could be an evolutionary way to detect infiltrating pathogens and avoid persistent inflammation due to the exposition of bacterial components coming from the enteric circulation. Finally, KC [1] but also LSEC highly express PD-L1 protein (Fig. 2a), highlighting those cells as the main drivers of liver tolerogenic activity [34]. Altogether, we observed that all mRNAs from the tested TLR, RLR, DNA sensors and their respective adaptors are at least expressed by one of the liver resident cell types. While adaptors (Myd88, TRIF, and STING) are detected at the protein level in all cells, a large number of proteins from these pathways are not detected. These results suggest the majority of sensors might be expressed at relatively low levels probably to

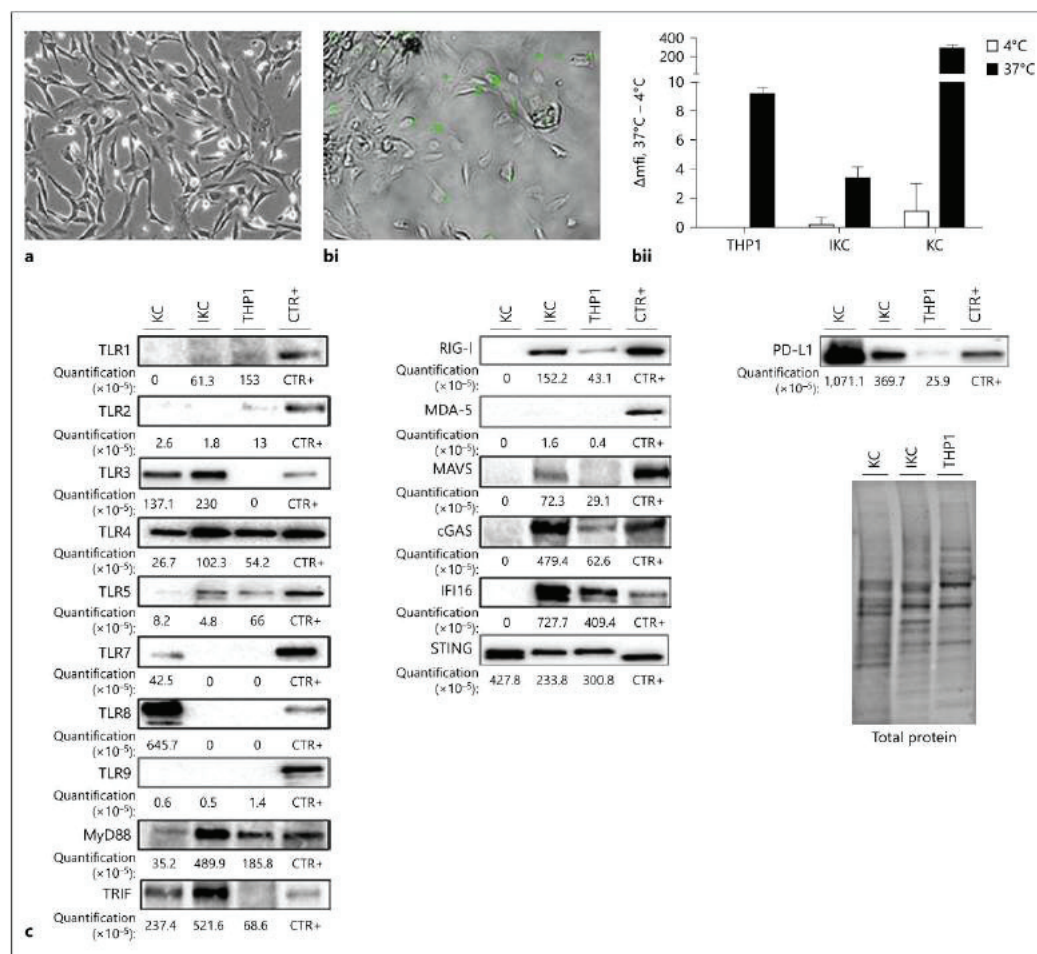
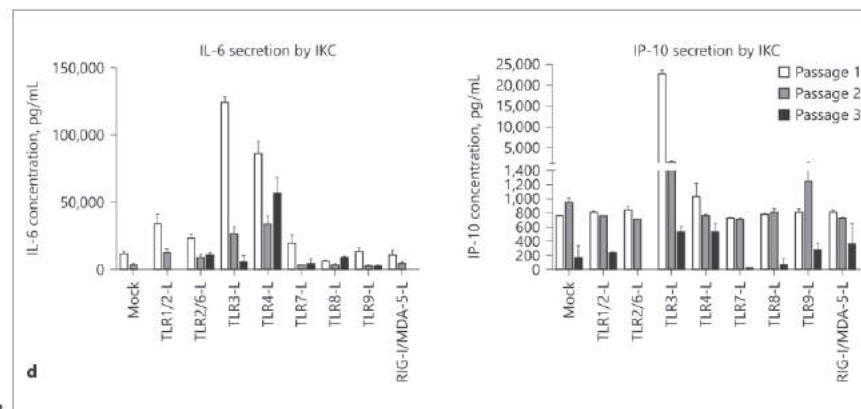


Fig. 3. Characterization of immortalized Kupffer cells (iKC). iKC from three different passages were seeded and cultured for 48 h with 2% DMSO. KC purified from three different donors were seeded and cultured for 24 h. THP1 were seeded and cultured for 48 h with PMA. Cells were then left untreated (**a**, **c**), exposed to pHrodo™ bacteria for 1 h at 4°C or 37°C (**b**) or exposed to the indicated ligands at the concentration indicated in online supplementary Table S3 for 24 h (**d**). **a**, **bi** Microscopic analyses of cells (×20 magnification) were performed. **bii** Bacteria phagocytosis was assessed by flow cytometry analysis. **c** Proteins were extracted,

pooled and TLR1 to TLR9, MyD88, TRIF, RIG-I, MDA-5, MAVS, cGAS, IFI16, STING, and PD-L1 protein expression was assessed by Western blot analyses. Target protein levels are normalized to total protein quantification assessed by stain-free staining. Stimulated cells were used as controls (CTR+) for primary antibody efficiencies as indicated in online supplementary Table S2. **d** Supernatants were collected, and IL-6 and IP-10 secretions were analyzed by ELISA. Data are presented as mean ± standard deviation of three biological replicates.

(Figure continued on next page.)



prevent chronic inflammatory stimulation at basal state [35]. However, in the presence of pathogens, parenchymal and nonparenchymal liver cells might mount an efficient immune response since all the adaptor molecules and the transcription factors are highly expressed already at basal state (Fig. 1, 2a). For instance, we previously showed that PHH express a number of PRR and that their agonization can efficiently inhibit HBV replication [36]. PHH responded to TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR2/6, and RIG-I/MDA-5 stimulation [36] despite the undetectable basal level of expression of several of those PRRs, such as TLR1/2 and RLR proteins (Fig. 2a). Functionality of TLR and RLR were also assessed in KC, LSEC, and HSC by stimulating cells from three to four different donors with the respective ligands. As expected from the protein expression data (Fig. 2a), KC produced IL-6 and/or IP-10 in response to TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7, and TLR8 ligands (Fig. 2b). Similarly, LSEC did also respond to TLR3 and TLR4 but not to TLR7 or TLR8 stimulations (Fig. 2b) suggesting that the amount of those proteins detected by Western blot analysis (Fig. 2a) was too low to derive a measurable response upon ex vivo stimulation with agonists. In contrast, LSEC produced IL-6 and IP-10 in response to TLR2 and RIG-I/MDA-5 ligands respectively (Fig. 2b), despite the fact that TLR2, RIG-I, or MDA-5 proteins were not detected (Fig. 2a) and only low amounts of mRNAs were detected in those cells (online suppl. Fig. S2). HSC mostly produced IP-10 in response to ligands for TLR3, TLR4, and RIG-I/MDA5, whereas IL-6 production was very variable from one donor to the other (Fig. 2b).

Generation and Characterization of an iKC Line

Access to liver resection and therefore primary liver cells is limited. To facilitate the study of liver cells, several models have been implemented over the years as surrogate models of PHH (Huh7 [37], HepG2 cells [38], and dHepaRG cells [39]), LSEC (TRP3 [40]), and HSC (LX-1 and LX-2 [41]). However, to our knowledge, no human KC derivate cell line has been described so far. KCs are a unique macrophage population differentiated from myeloid progenitor during embryogenesis and have specific functions, such as self-renewing capacity, which distinguish them from circulating monocytes [42]. We therefore immortalized KC by expressing the E6 and E7 proteins of the papilloma virus [43] to derive a polyclonal cell line (Fig. 3a). iKC acquired proliferative capacity, far beyond the self-renewing capacity of KC ex vivo. To stop iKC proliferation, cells were treated with 2% DMSO during 48 h for the following experiments. Although to a lower extent compared to primary KC, iKC retained their ability to phagocyte bacteria (Fig. 3bi, bii). KC, iKC, and THP1 (i.e., the most commonly used monocyte/macrophage-like cell line) [44–46] had a similar pattern of protein expression for TLR1, TLR4, MDA-5, and STING (Fig. 3c). Similar to the abolishment of TLR9 expression by HPV [47], TLR7 and TLR8 proteins were not detected in iKC (and THP1) as compared to KC, whereas higher amounts of TLR5, MyD88, RIG-I, cGAS, and IFI16 proteins were found in both cell lines (Fig. 3c). MAVS protein was only detected in iKC (Fig. 3c). Even though, KC and iKC express different amounts of TLR7, TLR8, Myd88, RIG-I, and MAVS proteins, their responses to the

respected stimulations were overall similar (Fig. 3d). Whereas a low basal signal was detected in both KC and THP1, TLR2 protein was not detected in iKC (Fig. 3c) and response to TLR1/2 agonization was much lower in iKC than in KC (Fig. 3d, to be compared to Fig. 2b). Interestingly, TLR3, TRIF, and PD-L1 protein expression pattern in iKC was closer to KC than THP1 (Fig. 3c). Furthermore, KC and iKC strongly responded to TLR3 and TLR4 stimulations (Fig. 3d). Of note, amounts of secreted IL-6 upon iKC stimulations were 10 times higher than those detected in KC, suggesting that immortalization processes potentiate these pathways (compare Fig. 2b and 3d). Of note, IL-6 and IP-10 secreted amounts (Fig. 3d), as well as proliferating capacity (data not shown), decreased with cell passaging of iKC highlight the importance to perform experiments on low passage cells.

To summarize, we provided here a comprehensive analysis of innate immune signaling capacity of the most important liver cell populations and demonstrate their ability to respond to pathogens or PRR ligand stimulation. This knowledge will be useful to understand mechanisms behind antiviral effects of TLR agonists or check-point inhibitors [16, 19–21, 48, 49], whose development as direct effectors or “adjuvant” in more complex immune-therapeutic strategies are currently investigated to treat cancer and chronic viral infection. For instance, TLR7, TLR8, RIGI, and STING agonists are currently developed to fight chronic HBV infections [16] but our work highlights other ligands such as TLR2 and TLR3 agonists have the best direct anti-HBV properties in HBV-replicating PHH [50]. In addition, in the liver microenvironment, the agonization of TLR2 and TLR3 might trigger the production of antiviral secretion by KC and/or LSEC.

Acknowledgments

The work was supported by grants from INSERM, ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; grants from CSS4 and CSS7 study committees), the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061), and the FINOVI foundation. The authors would like to thank Maud Michelet, Jennifer Molle, Loïc Peyrot, Anaëlle Dubois, Océane Floriot, and Marie-Laure Plissonnier for their help in the isolation of primary human hepatocytes, as well as Prof. Michel Rivoire's, Prof. Jean-Yves Mabrut's, and Dr. Guillaume Passot's staff for providing liver resections. The authors would also like to thank Maëlle Locatelli, Léa Monnier, Brieux Chardès, and Hélène Chabrolles for providing the hepatocyte cell lines. Finally, the authors thank the EFS (French establishment for blood donation) for providing the blood bags.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author Contributions

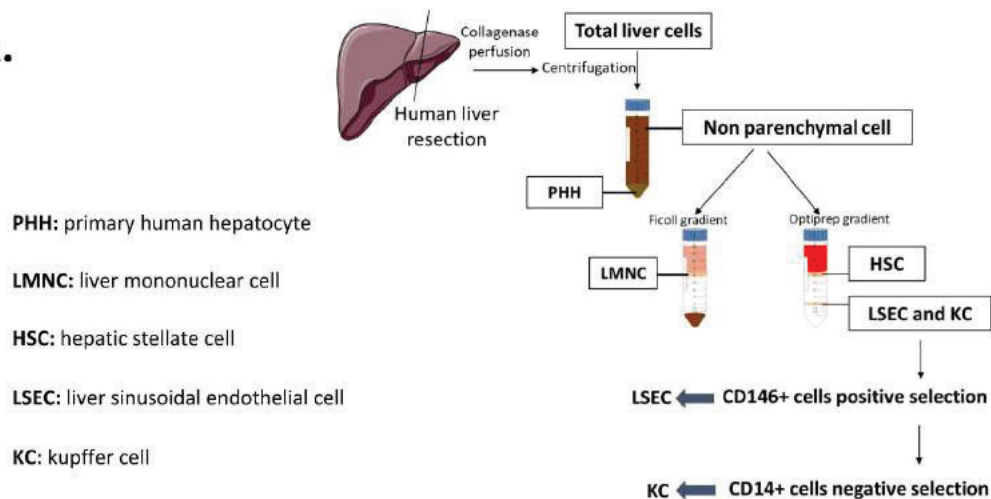
J.L., S.F.-D., S.V., and D.D. designed the study; S.F.-D., S.V., J.L., L.A., L.D., and M.B. performed and/or analyzed experiments; S.F.-D., K.E., M.Br., U.P., and N.B.-V. contributed to the establishment of protocols for liver cells isolation; M.R., G.P., M.L., J.-Y.M., and C.D. provided liver resections. F.Z. and A.S. provided material. J.L., S.F.-D., S.V., and D.D. wrote the manuscript. U.P., F.Z., and N.B.-V. did a critical reading of the manuscript.

References

- Pandey S, Kawai T, Akira S: Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;7:a016246.
- Crispe IN: The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147–163.
- Crispe IN: Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011;54:357–365.
- Dal Bello MG, Alama A, Coco S, Vanni I, Grossi F: Understanding the checkpoint blockade in lung cancer immunotherapy. *Drug Discov Today* 2017;22:1266–1273.
- Arasanz H, et al: PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* 2017;8:51936–51945.
- Protzer U, Maini MK, Knolle PA: Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 2012;12:201–213.
- Kmiec Z: Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:III–XIII, 1–151.
- Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B: Liver sinusoidal endothelial cells. *Compr Physiol* 2015;5:1751–1774.
- Eggert T, Greten TF: Tumor regulation of the tissue environment in the liver. *Pharmacol Ther* 2017;173:47–57.
- Silva BO, Ramos LF, Moraes KCM: Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence and phenotype reversion as cellular connections that modulates liver fibrosis. *Cell Biol Int* 2017;41:946–959.
- Tsuchida T, Friedman SL: Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:397–411.
- Moran-Salvador E, Mann J: Epigenetics and liver fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;4:125–134.
- Krenkel O, Tacke F: Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017;17:306–321.
- Seki S, et al: The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35–46.

- 15 Nehra V, Rizza SA, Temesgen Z: Sofosbuvir/velpatasvir fixed-dose combination for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Drugs Today* 2017;53:177–189.
- 16 Durantel D, Zoulim F: New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol* 2016;64(suppl):S117–S131.
- 17 Lawitz E, et al: Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther (Lond)* 2015;20:699–708.
- 18 Gane EJ, et al: The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2015;63:320–328.
- 19 Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E: The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *Oncimmunology* 2016;5:e1085148.
- 20 Nagasaka M, et al: PD1/PD-L1 inhibition as a potential radiosensitizer in head and neck squamous cell carcinoma: a case report. *J Immunother Cancer* 2016;4:83.
- 21 Hou Z, Zhou Q, Lu M, Tan D, Xu X: A programmed cell death-1 haplotype is associated with clearance of hepatitis B virus. *Ann Clin Lab Sci* 2017;47:334–343.
- 22 Wenjin Z, Chuanhui P, Yunle W, Lateef SA, Shusen Z: Longitudinal fluctuations in PD1 and PD-L1 expression in association with changes in anti-viral immune response in chronic hepatitis B. *BMC Gastroenterol* 2012;12:109.
- 23 Lecluyse EL, Alexandre E: Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 2010;640:57–82.
- 24 Hösel M, et al: Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human non-parenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* 2012;55:287–297.
- 25 Schütze N, et al: The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells – regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selenite. *Biofactors* 1999;10:329–338.
- 26 Luangsay S, et al: Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J Hepatol* 2015;63:1077–1085.
- 27 Vegna S, et al: NOD1 participates in the innate immune response triggered by hepatitis C virus polymerase. *J Virol* 2016;90:6022–6035.
- 28 Scott MJ, Chen C, Sun Q, Billiar TR: Hepatocytes express functional NOD1 and NOD2 receptors: a role for NOD1 in hepatocyte CC and CXC chemokine production. *J Hepatol* 2010;53:693–701.
- 29 Matikainen S, et al: Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *J Virol* 2006;80:3515–3522.
- 30 Le Goffic R, et al: Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol* 2007;178:3368–3372.
- 31 Mathan TSM, Figdor CG, Buschow SI: Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol* 2013;4:372–372.
- 32 Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–384.
- 33 Adzavon YM, et al: TLR7 and TLR8 agonist resiquimod (R848) differently regulates MIF expression in cells and organs. *Cytokine* 2017;97:156–166.
- 34 Folkl A, Bienze D: Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;134:33–38.
- 35 Leifer CA, Medvedev AE: Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol* 2016;100:927–941.
- 36 Luangsay S, et al: Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol* 2015;63:1314–1322.
- 37 Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J: Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gan* 1984;75:151–158.
- 38 Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282:615–616.
- 39 Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guiguen-Guillouzo C, Zoulim F: Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol* 2009;90:127–135.
- 40 Parent R, et al: An immortalized human liver endothelial sinusoidal cell line for the study of the pathobiology of the liver endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450:7–12.
- 41 Xu L, et al: Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142–151.
- 42 Ginhoux F, Williams M: Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* 2016;44:439–449.
- 43 Schütze DM, et al: Immortalization capacity of HPV types is inversely related to chromosomal instability. *Oncotarget* 2016;7:37608–37621.
- 44 Mantecca P, et al: Airborne nanoparticle release and toxicological risk from metal oxide-coated textiles: toward a multi-scale safe-by-design approach. *Environ Sci Technol* 2017;51:9305–9317.
- 45 Hernandez-Sánchez F, et al: High glucose induces O-GlcNAc glycosylation of the vitamin D receptor (VDR) in THP1 cells and in human macrophages derived from monocytes. *Cell Biol Int* 2017;41:1065–1074.
- 46 Xu B, Gao Y, Zhan S, Ge W: Quantitative proteomic profiling for clarification of the crucial roles of lysosomes in microbial infections. *Mol Immunol* 2017;87:122–131.
- 47 Hasan UA, et al: TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007;178:3186–3197.
- 48 Nowicki TS, Anderson JL, Federman N: Prospective immunotherapies in childhood sarcomas: PD1/PDL1 blockade in combination with tumor vaccines. *Pediatr Res* 2016;79:371–377.
- 49 Tsukahara T, et al: The future of immunotherapy for sarcoma. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16:1049–1057.
- 50 Lucifora J, et al: Direct antiviral effects of various pattern recognition receptor (PRR) agonists in HBV-replicating hepatocytes. *J Hepatol* 2015;62:S515–S516.

A.

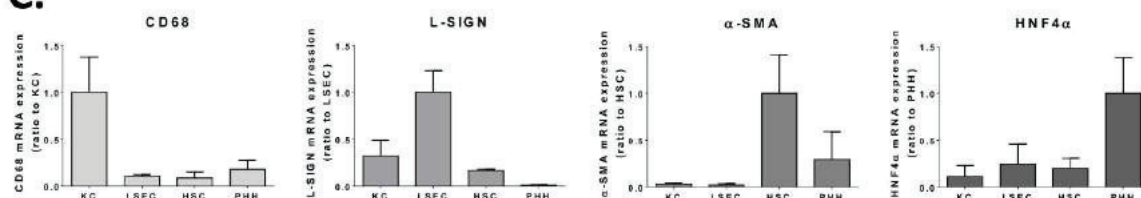


B.

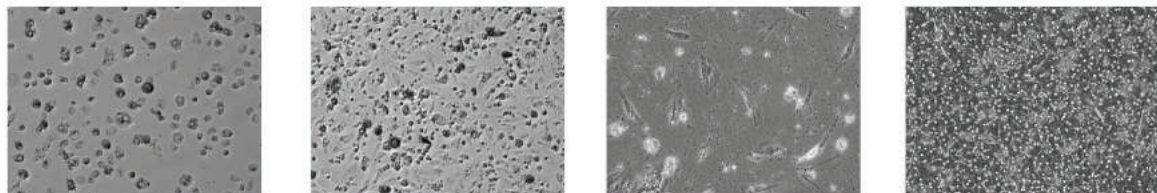
Cells (million)	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9	Donor 10	Donor 11	Donor 12
PHH	1000	1600	14	300	1280	1500	1429	1000	150	1500	850	80
LMNC	N/A	1710	N/A	N/A	1626	N/A	400	110	36	N/A	N/A	150
HSC	25	40	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	12	10	15	7	20
LSEC	N/A	70	2	53	50	80	N/A	44	2	25	6,5	6
KC	125	95	12	60	90	200	220	28	20	59	15	14

Photos				N/A						N/A			
--------	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	-----	--	--	--

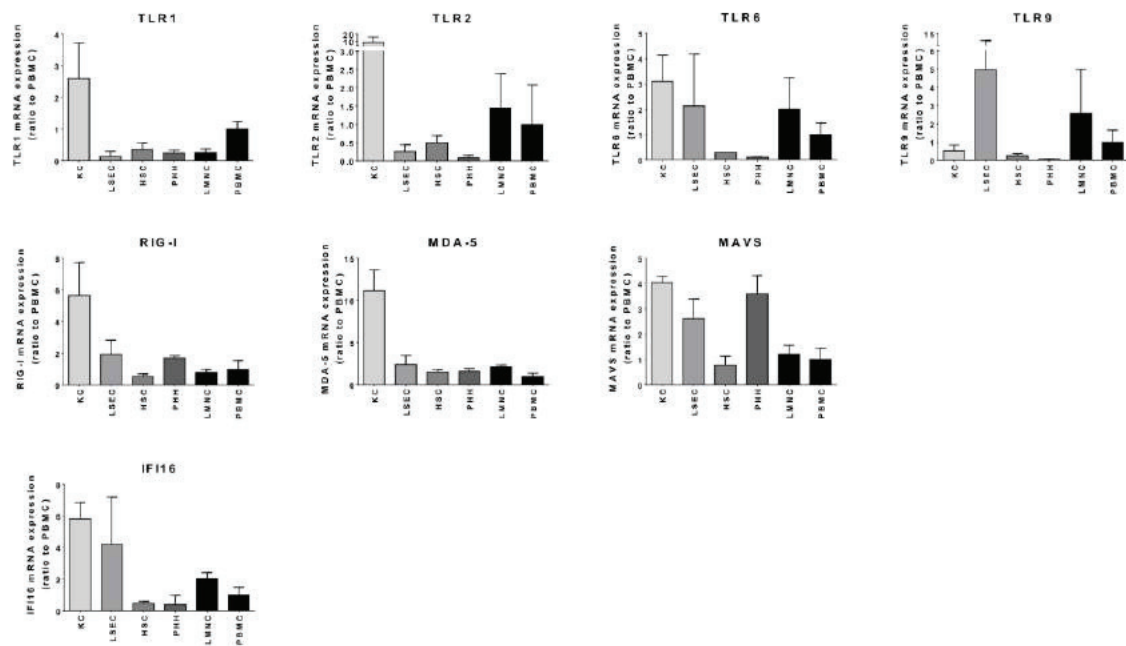
C.



D.



Supplementary Figure 1: Isolation method and purity of liver cells. (A) Schematic representation of the experimental procedure to purify PHH, LMNC, HSC, LSEC, and KC from liver resection. (B) Photos of the liver and yield of purified cells for the different donors used (N/A: data not available). (C) PHH, LSEC, HSC and KC were purified from three different donors and cultured for 24h. mRNAs were extracted and expression level of the indicated mRNA were analysed by RT-qPCR. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of three different experiments (three different donors). (D) Representative photos of the different type of purified liver cells.



Supplementary Figure 2: TLR1, TLR2, TLR6, TLR9, RIG-I, MDA-5, and IFI16 mRNA expression in liver primary cells. PHH, LSEC, HSC, KC, LMNC and PBMC were purified from different donors and cultured for 24h. RNAs were extracted and expression level of the indicated mRNA were analysed by RT-qPCR. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of three different experiments (three different donors).

Gene	Full name	Forward	Reverse
RPLP0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	CACGATTGAAATCCTGAGTGATGT	TGACCAGCCCAAAGGAGAAG
GUS	β -glucuronidase	CGTGGTTGGAGAGCTCATTGGAA	ATTCCCCAGCACTCTCGTCGGT
TLR1	Toll like receptor 1	ACAAGCAGGTTGTCTTGTT	GAGGCGCTGGTACCCTATT
TLR2	Toll like receptor 2	CTCTGGTGCTGACATCCAATGGAA	GGGCTTGAAACAGGAAGACGATAA
TRL3	Toll like receptor 3	AGAAGGTTTTCGGGCCAGCTTT	TGACAGCTCAGGGATGTTGGTATG
TLR4	Toll like receptor 4	CACACCAGAGTTGCTTTCAATGGC	AGAGAGGTCCAGGAAGTCAAGTT
TLR5	Toll like receptor 5	CCTGACCTTATAGTTGCCAGCTT	TCCGACATCTTCCCTGGATGCTAA
TLR6	Toll like receptor 6	ACCCATTCCACAGAACAGCATTCC	TCCTTGGGCCACTGCAATAAGTC
TLR7	Toll like receptor 7	CCAAGTGTCCAGAAGCCTCAAGA	CCAGATATCGCAACTGGAAGGCAT
TLR8	Toll like receptor 8	AGTTTCCTCGTCTCGAGTTGCTTG	AGAGGGTAGGTGGGAAATCCTGTT
TLR9	Toll like receptor 9	AACTGGCTGTTCTGAAGTCTGTG	AGGTGGGCAAGTCAGAAATCATGG
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	AGAAAGAGTTCCCGAGCATCCTGA	CAAGGCGAGTCCAGAACCAAGATT
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein	GCGCAGGCCTTACATAGGAA	CTGGCCAGGAGGATATTCGG
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β	AGAAACAGCACCAACTACCCA	GGTCTTTGACAGAGCAGGGGTTTT
TRAM	translocation associated membrane protein	TGGGTCTGCATGGACAATCT	GGCCGATGGGTATAACAGA
RIG-I	retinoic acid inducible gene I	TTCTGATTGCCACCTCAGTTGC	TCCTCTGCCTCTGGTTTGGATCAT
MDA-5	melanoma differentiation-associated protein 5	AGGTCTGGGCGATGGAGAATAACT	TGCTGAATCACTGCCCATGTT
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein	TGAACACAGTGGCCCTGAAAGT	ACGGGTTGAGTTGATGGGCAAT
LGP2/DHX58	DEXH-box helicase 58	GGCACCCACCATGTCAATG	CCCAGACCTCCCCACAGTT
DDX3	DEAD-box helicase 3	CAGTTCAGGGTGGAGTTCTAGCAA	CTGCCAATGCCATCGTAATCACTC
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase	GAAGGCCTGCGCATTCAAACCT	GAGAGAAAGATAGCCGCATGTTT
IFI16	gamma interferon inducible protein 16	GACCAGCCCTATCAAGAAAGAGGA	TCTGGGAGTTACCTGACATTTGGC
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors	GGTGAAGGAATGCCAAGCAC	CCTTCAGGATCAGTCCCGC
Ku70	-	GCATGCGTGGATTGTCTGTC	TAGTCTCCACTTGCTTCAAGGT
LRRFIP1	LRR binding FLII interacting protein 1	GAGCTCCGCTCTGCATTGGATAAA	CAAGAGTGCCTCCGATTGCT
MRE11	meiotic recombination 11 homolog	GGGTCTCAAAGAGGAAGAGACAC	GACATTTGCGGAAGGCTGCT
DDX41	DEAD-box helicase 41	GCAGTCTGAGGAGTGAGCTTC	CTACCCCTCAGATCAAGCCG
DHX9	DEXH-box helicase 9	AGCAATGCTGCCAGAGACTT	GCGGAGATGCTACCCCAAAA
DHX36	DEXH-box helicase 36	AGTGCCATTTCAGTTGCGGA	TGTTTCTTGGCAACCGACT
STING	stimulator of interferon genes	CCATGGGCTGGCATGGTTCATATTA	AATATACAGCCGTGGCTCACT
B-catenin	-	TTGTGCGGCGCCATTTTAAG	TCCTCAGACCTTCTCCGTC
AIM2	absent in melanoma 2	TCGGCACAGTGGTTTCTTAGAGG	TCGGGGTTTACCAGCTTTTCT
NLRP1	NLR family pyrin domain containing 1	CTACGTTGGCCACTTGGGAT	AGGTGAAGGTACGGCTATGC
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	AAAGGAAGGCCGACACCTTGAT	TGGCTGGTGCTCAGAACTGAAA
NLRC4	NLR family CARD domain containing 4	GAGGTCCCAACTCGTCAA	GATTTCCCGCAAATTAAC
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	GCGAGGGTCACAAACGT	TGCTCATCCGTGAGGACCTT
Caspase 1	-	AAAATCTCACTGCTTCGGACATG	GGAACGTGCTGTGAGAGGTCTT
IRF1	interferon regulatory factor 1	TTGTGCCGACAGCACCAGT	TCCACGTTTGTGGCTGCCACT
IRF3	interferon regulatory factor 3	ACCCAGCCGTGGACCAAGAG	TACCAAGGCCCTGAGGCAC
IRF4	interferon regulatory factor 4	GACCGAAGCTGGAGGGACTA	TGTCACCTGGCAACCATTTTC
IRF5	interferon regulatory factor 5	TGTCAGTGCAAGGTGTTCTGGA	TGTTGGTCTGGCCCTTTTGAA
IRF7	interferon regulatory factor 7	TGGTCTGGTGAGGCTGGAA	GATGTCGTCATAGAGGCTGTTGG
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1	AGAGGCTCTGCGGAACCA	TGTGGAGATGCCGTTGGA
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2	CCCTGCAGCTGGACTACAAC	AGATGCCTCGGTCTGAGATATTG
RIP2	receptor interacting serine/threonine kinase 2	CGCTGCTCGACAGTGAAAGA	TCAGGCTATTGCAAAATCCC
CARD9	caspace recruitment domain-containing protein 9	TTGAGAACTACCGCAGGAAGCG	GGCTAGGAGCCCTCAGTGTG
Mincle	macrophage inducible Ca ²⁺ -dependent lectin receptor	ACGAGAAATTTGTGCGCTGA	CTGGGAAGAGGACCTGAGACT
Dectin-1/CLECL7A	C-type lectin domain family 7 member A	TCAGGGGCTCTAAGAACAA	GAGGAGATGCAGCACACGAT
Dectin-2/CLECL6A	C-type lectin domain family 6 member A	AACACAGGGAGCCTGCATAAT	ATCCAGCCACAGACCAGAG
Syk	spleen tyrosine kinase	TGAGCCTCACCAACACAGG	ACAGCAAACTGAAATCAATGGGT
SOCS1	suppressor of cytokine signaling protein 1	CACCTCCGCACATTCGGTTC	CAGTAGAATCCGAGGCGTTC
SOCS3	suppressor of cytokine signaling protein 3	CCATTGCGGAGTTCTGGAC	TTGGCTTCTTGCTTGCTGTC
PD-1	programmed cell death 1	AAACCCTGGTGGTTGGTGTG	CTCCTATTGTCCTCGTGCG
PD-L1	programmed cell death ligand 1	CTGAACGCATTACTGTACGCG	AGACAATTAGTGACGCCAGGT
Tim1	T-cell immunoglobulin and mucin domain 1	ACTGGAGAAAGCCGACGTG	GGACCTCTGGGTTGGAAATGA
Tim3	T-cell immunoglobulin and mucin domain 3	CTACTGCTGCCGGATCCAAA	GTCCCTGGTGGTAAGCATC
Gal9	galectin 9	ACAGCCAAGTTGCTTTGGTTT	AAAGGGGACAGCTGGACTCA
Tim4	T-cell immunoglobulin and mucin domain 4	GTCCTGCTGACATCCAAAGAGT	TTGTTTTGTTCTGCTCAGGAAGT
CD68	Cluster of differentiation 68	AGGCTGGCTGTGCTTTTCTC	CTCTGTAAACCGTGGGTGTCA
L-SIGN	liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing integrin	GACTGCATTTGAACGCTGT	TGACGGAGTTGTGCCAGTTC
a-SMA	a-smooth muscle actin	GTGTTGCCCTGAAGAGCAT	GCTGGGACATTGAAAGTCTCA
NTCP	sodium-taurocholate cotransporting polypeptide	TGACCACCTGCTCCACCTTC	GAATGAGAACCAGGACAGTGAT

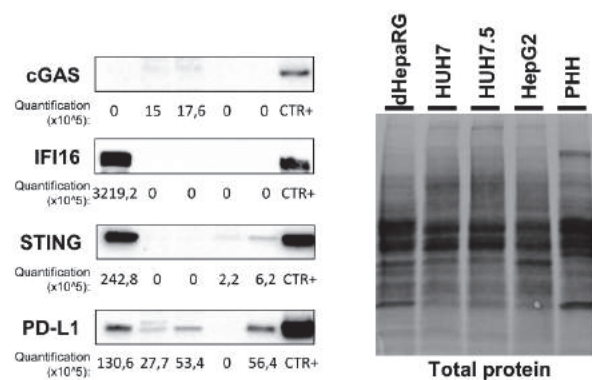
Table 1: Primers sequences.

Target protein	Name	Reference	Stimulated Control
TLR1	Polyclonal anti-TLR1 antibody	PA5-11589 (Thermo Fisher)	THP1 + PAM3CSK4
TLR2	Monoclonal anti-TLR2 antibody	#12276 (Cell Signaling)	THP1 + PAM3CSK4
TLR3	Monoclonal anti-TLR3 antibody	#6961 (Cell Signaling)	LMNC + Riboxxol
TLR4	Monoclonal anti-TLR4 antibody	sc-293072 (Santa Cruz)	THP1 + LPS
TLR5	Monoclonal anti-TLR5 antibody	Ab168382(Abcam)	THP1 + LPS
TLR7	Monoclonal anti-TLR7 antibody	#5632 (Cell Signaling)	THP1 + Imiquimod (R837)
TLR8	Monoclonal anti-TLR8 antibody	#11886 (Cell Signaling)	LMNC + ssRNA40/Lyovec
TLR9	Monoclonal anti-TLR9 antibody	#13674 (Cell Signaling)	pDC
RIG-I	Monoclonal I anti-RIG-I antibody	#3743 (Cell Signaling)	HepaRG + Poly(I:C) (LMNC)/Lyovec
MDA-5	Monoclonal anti-MDA5 antibody	#5321 (Cell Signaling)	HepaRG + Poly(I:C) (LMNC)/Lyovec
cGAS	Monoclonal anti-cGAS antibody	#15102 (Cell Signaling)	THP1 + STING
STING	Monoclonal anti-STING antibody	#13647 (Cell Signaling)	THP1 + STING
PD-1	Polyclonal anti-PD1 antibody	PA5-20350 (Thermo Fisher)	THP1 + PAM3CSK4
PD-L1	Polyclonal anti-PDL1 antibody	PA5-28115 (Thermo Fisher)	THP1 + PAM3CSK4
IFI16	Monoclonal anti-IFI16 antibody	Ab169788 (Abcam)	THP1 + Imiquimod (R837)
MyD88	Monoclonal anti-Myd88 antibody	#4283 (Cell Signaling)	THP1 + PAM3CSK4
TRIF	Polyclonal anti-TRIF antibody	#4596 (Cell Signaling)	LMNC + Riboxxol
MAVS	Polyclonal anti-MAVS antibody	#3993 (Cell Signaling)	HepaRG + Poly(I:C) (LMNC)/Lyovec

Table 2: Antibodies and controls used for western blot analysis.

PRR	Ligand	Reference	Concentration
TLR1/2	PAM3CSK4	ttrl-pms	0,5 µg/ml
TLR2/6	FSL-1	ttrl-fsl	1 µg/ml
TLR3	Poly(I:C) (HMW)	ttrl-pic	5 µg/ml
TLR3	Riboxol	A-00102	5 µg/ml
TLR4	LPS SM	ttrl-smtps	0,5 µg/ml
TLR7	Imiquimod (R837)	ttrl-imq	5 µg/ml
TLR8	ssRNA40/Lyovec	ttrl-lma40	1 µg/ml
TLR9	ODN 2395	ttrl-2395	5 µM
RIGI/MDA5	Poly(I:C) (LMW)/Lyovec	ttrl-picwlv	0,025 µg/ml
STING	2'3'-cGAMP	ttrl-cga23	5 µg/ml

Table 3: Ligands and concentration used for PRR stimulation.



Supplementary Figure 3: cGAS, IFI16, STING and PD-L1 expression in hepatocytes. PHH were purified from at least three different donors and cultured for 24h. HuH7, HuH7.5, HepG2-NTCP cells were seeded and cultured until reaching confluence. HepaRG cells were differentiated for four weeks. Proteins were collected and expression level of the indicated proteins were analysed by WB. Stimulated cells were used as controls (CTR+) for primary antibodies efficiencies as indicated in Table S2.

Etude 2 : Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immuno-competent hepatocytes

Julie Lucifora ^{1,*}, Marc Bonnin ^{1,*}, Ludovic Aillot ¹, Floriane Fusil ², Sarah Maadadi ¹, Laura Dimier ¹, Maud Michelet ¹, Océane Floriot ¹, Anaïs Ollivier ², Michel Rivoire ³, Malika Ait-Goughoulte ⁴, Stéphane Daffis ⁵, Simon P. Fletcher ⁵, Anna Salvetti ¹, François-Loïc Cosset ², Fabien Zoulim ^{1,6} and David Durantel ¹.

1 INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2 CIRI – International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

3 INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

4 Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche, 4070 Basel, Switzerland

5 Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA;

6 Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

* Contribution égale

Reçu le 25 Octobre 2017

Renvoyé pour modification le 12 Septembre 2017

Accepté le 23 Janvier 2018

En ligne le 12 Février 2018

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes

Received: 25 October 2017

Accepted: 13 March 2018

Published online: 29 March 2018

Julie Lucifora¹, Marc Bonnin¹, Ludovic Aillot¹, Floriane Fusil², Sarah Maadadi¹, Laura Dimier¹, Maud Michelet¹, Océane Floriot¹, Anaïs Ollivier², Michel Rivoire³, Malika Ait-Goughoulte⁴, Stéphane Daffis⁵, Simon P. Fletcher⁵, Anna Salvetti¹, François-Loïc Cosset², Fabien Zoulim^{1,6} & David Durantel¹

Current therapies for chronic hepatitis B virus (HBV) infections are effective at decreasing the viral load in serum, but do not lead to viral eradication. Recent studies highlighted the therapeutic or “adjuvant” potential of immune-modulators. Our aim was to explore the direct anti-HBV effect of Toll-Like-Receptors (TLR) agonists in hepatocytes. HBV-infected primary human hepatocytes (PHH) or differentiated HepaRG cells (dHepaRG) were treated with various TLR agonists. Amongst all TLR ligands tested, Pam3CSK4 (TLR1/2-ligand) and poly(I:C)-(HMW) (TLR3/MDA5-ligand) were the best at reducing all HBV parameters. No or little viral rebound was observed after treatment arrest, implying a long-lasting effect on cccDNA. We also tested Riboxol that features improved TLR3 specificity compared to poly(I:C)-(HMW). This agonist demonstrated a potent antiviral effect in HBV-infected PHH. Whereas, poly(I:C)-(HMW) and Pam3CSK4 mainly induced the expression of classical genes from the interferon or NF- κ B pathway respectively, Riboxol had a mixed phenotype. Moreover, TLR2 and TLR3 ligands can activate hepatocytes and immune cells, as demonstrated by antiviral cytokines produced by stimulated hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells. In conclusion, our data highlight the potential of innate immunity activation in the direct control of HBV replication in hepatocytes, and support the development of TLR-based antiviral strategies.

Hepatitis B virus (HBV) is a small DNA virus that persists within hepatocytes thanks to the establishment and maintenance of a covalently-closed-circular DNA (cccDNA). This cccDNA serve as the main template for viral RNA synthesis, including the pre-genomic RNA (pgRNA), which is subsequently converted into relaxed-circular DNA (rcDNA) by a HBV polymerase-mediated reverse-transcription step taking place inside nucleocapsids. Different viral particles and antigens circulate in the blood of infected patients, including HBe antigens (HBeAg), Dane particles (infectious particles or virions), spheres and rod (empty enveloped particles); the later three features envelope proteins at their surface and all comprise the pool of secreted HBs antigens (HBsAg). Nucleic acid-free subviral particles are produced in large excess compared to virions, and therefore are thought to play an important role in terms of immune subversion¹.

With around 250 million people chronically infected, who are at high risk to develop severe liver diseases, such as cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC), HBV infection remain a major medical burden worldwide. Current therapies for chronic HBV infections, mainly relying on nucleos(t)ides analogues (e.g. entecavir, tenofovir...), are effective at suppressing viremia in blood of patients and somehow improve long-term outcome, but have only low rates of HBsAg loss, with or without associated anti-HBs seroconversion, and typically do not lead to cccDNA elimination². Moreover, there are life-long treatments, as drug administration arrest almost

¹INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ²CIRI – International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France. ³INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France. ⁴Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche, 4070, Basel, Switzerland. ⁵Gilead Sciences, Inc, Foster City, CA, USA. ⁶Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. Julie Lucifora and Marc Bonnin contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.L. (email: julie.lucifora@inserm.fr) or D.D. (email: david.durantel@inserm.fr)

universally leads to a rebound in viremia and liver diseases. This warrants the identification of new antiviral strategies, including immune-therapeutic components, to improve the functional cure rates and decrease further the risk of end-stage liver diseases.

Infection of human cells by microorganisms initially leads to the activation of the host innate immune response through a sensing mediated by pattern recognition receptors (PRR). PRR include Toll-like receptors (TLR), C-type lectin receptors (CLR), RIG-I-like receptors (RLR) and NOD-like receptors (NLR), intracellular DNA sensors and cytoplasmic RNA helicases such as RIG-I (Retinoic-acid Inducible Gene-1) and MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene-5)³. Each PRR detects pathogen-associated molecular patterns (PAMP) derived from viruses, bacteria, mycobacteria, fungi or parasites and activates downstream signaling events leading to specific gene expression programs and the secretion of interferons (IFN), inflammatory cytokines/chemokines, and other antimicrobial peptides³. Many IFNs and pro-inflammatory cytokines have been shown to have direct anti-HBV effect in hepatocytes⁴. The use of PRR agonists, in particular TLR7-L (TLR7-Ligands), to induce endogenous IFNs and other cytokines, has been successfully applied to animal models of HBV infection. It is worth noting that the sub-cutaneous injection of Pegylated-IFN- α is currently a therapeutic option for treating CHB patients, although it is associated with many adverse effects⁵. The induction of endogenous IFN- α might therefore be of interest to increase the antiviral effect and lower side effects. It was shown both in HBV-infected chimpanzees and WHV-infected woodchucks that the orally delivered TLR7 agonist GS-9620 significantly reduced viremia and HBsAg^{6–8}. Moreover, GS-9620 also impacted on cccDNA expression, and led to anti-HBs seroconversion in WHV-infected woodchucks^{6–8}. In human, GS-9620 was shown to be safe⁹, but its anti-HBV effect was modest at used doses (AASLD 2017). TLR9 ligands are likely to be used in the HBV field as adjuvants for HBV prophylactic vaccination^{10,11}, but have also been recently shown to induce a weak antiviral activity in mono-therapy in animal models of HBV infection^{12,13}. However, neither TLR7 nor TLR9 are expressed in hepatocytes¹⁴ suggesting that their antiviral effect results from the activation of non-hepatocyte cells, such as plasmacytoid dendritic cells, and the endogenous action of IFN and other cytokines. We previously showed that hepatocytes (primary human hepatocytes (PHH) and differentiated HepaRG cells (dHepaRG)) express a number of other PRR and that their agonization could inhibit HBV replication when the ligands were applied before viral infection and maintained throughout the experiment¹⁴. To provide further insight into the potential of TLR agonists to induce efficient and durable antiviral effect in already established HBV infections, we tested the direct anti-HBV effect of different TLR agonists in HBV-infected hepatocytes *in vitro*, and extended the testing for TLR2-L and TLR3-L *in vivo*.

Results

Antiviral effect of various TLR agonists *in vitro*. To assess the effects of TLR stimulation on established HBV infection, HBV-infected PHH and dHepaRG cells were treated with Pam3CSK4 (TLR-1/2 agonist), poly(I:C)-(HMW) (TLR3-agonist), LPS (TLR-4 agonist), FLA-BS (TLR-5 agonist), FSL-1 (TLR-2/6-agonist), Imiquimod (ImiQ, TLR-7 agonist), CL264 (TLR-7 agonist), ssRNA (TLR-8 agonist) or 2395 (CpG ODN, TLR-9 agonist). As expected from our previous study and the pattern of TLR expression in dHepaRG and PHH¹⁴, cells produced significant amount of IL-6 (Figs 1A,D and S1) and IP-10 (Fig. 1A and D) mainly in response to Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW), LPS and FSL. Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) and LPS treatments significantly decreased both total intracellular HBV DNA (Fig. 1B and E) and HBeAg secretion (Fig. 1C and F) in both HBV-infected dHepaRG cells or PHH. Treatments with FSL induced a 55–65% reduction of total intracellular HBV DNA in both HBV-infected dHepaRG and PHH (Fig. 1B), but only a significant effect on HBeAg secretion in PHH (Fig. 1C and F). As hepatocytes do not express TLR7¹⁴, TLR7 ligands (Imiquimod; ImiQ or CL264) induced neither IL-6 nor IP-10 following stimulation of dHepaRG. However, surprisingly, ImiQ treatment decreased total intracellular HBV DNA (Fig. 1B) as well as secretion of HBeAg (Fig. 1C) in dHepaRG, although not in PHH. This phenotype in dHepaRG was nevertheless independent of an innate response, as no production of cytokines was detected (Fig. 1A and D); we therefore did not pursue investigations on this agonist *in vitro*, as the phenotype in PHH is more relevant and likely more predictive as compared to that obtained with dHepaRG cells. As Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) were the most potent inhibitors of HBV in both *in vitro* models (Fig. 1), we further focused on the characterization of their antiviral effects for the rest of the study.

Dose-response antiviral effect, in the absence of toxicity, of Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW).

Both Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) induced a dose-dependent reduction of total intracellular HBV DNA, as well as extracellular HBeAg and HBsAg secretions without significant toxicity (Fig. S2, panels A and B). It is worth noting that, despite an absence of cytotoxicity, a significant reduction in apolipoprotein B secretion suggests that Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) could alter hepatocyte differentiation status (Fig. S2, bottom graphs of panel A). However, this phenomenon was similar to that observed with IFN- α treatment, which is used to treat CHB patients.

Long lasting antiviral effect of Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW).

In contrast to the rebound observed after the arrest of nucleos(t)ides analogues¹⁵, reduction of total intracellular HBV DNA, HBeAg and HBsAg secretions after Pam3CSK4 or poly(I:C)-(HMW) treatment of dHepaRG cells were sustained for at least 10 days after the end of treatment (Fig. 2A–C). Additionally, using qPCR or Southern blot analyses, we observed a decrease in cccDNA levels in HBV-infected dHepaRG treated with Pam3CSK4 or poly(I:C)-(HMW) (Figs 2D and S3). Importantly, this decrease of cccDNA following Pam3CSK4 or poly(I:C)-(HMW) treatment could be confirmed in two out of three experiments using three different donors of PHH (Fig. S4A).

Riboxol: a novel TLR3 agonist with potent anti-HBV activity.

As poly(I:C)-(HMW) can also activate MDA5 (Fig. 3A), we tested Riboxol, a synthetic 50 base pair double-stranded RNA, which is a specific ligand of TLR3 (Figs 3A and S5). Similarly to poly(I:C)-(HMW), treatments of HBV-infected PHH with Riboxol

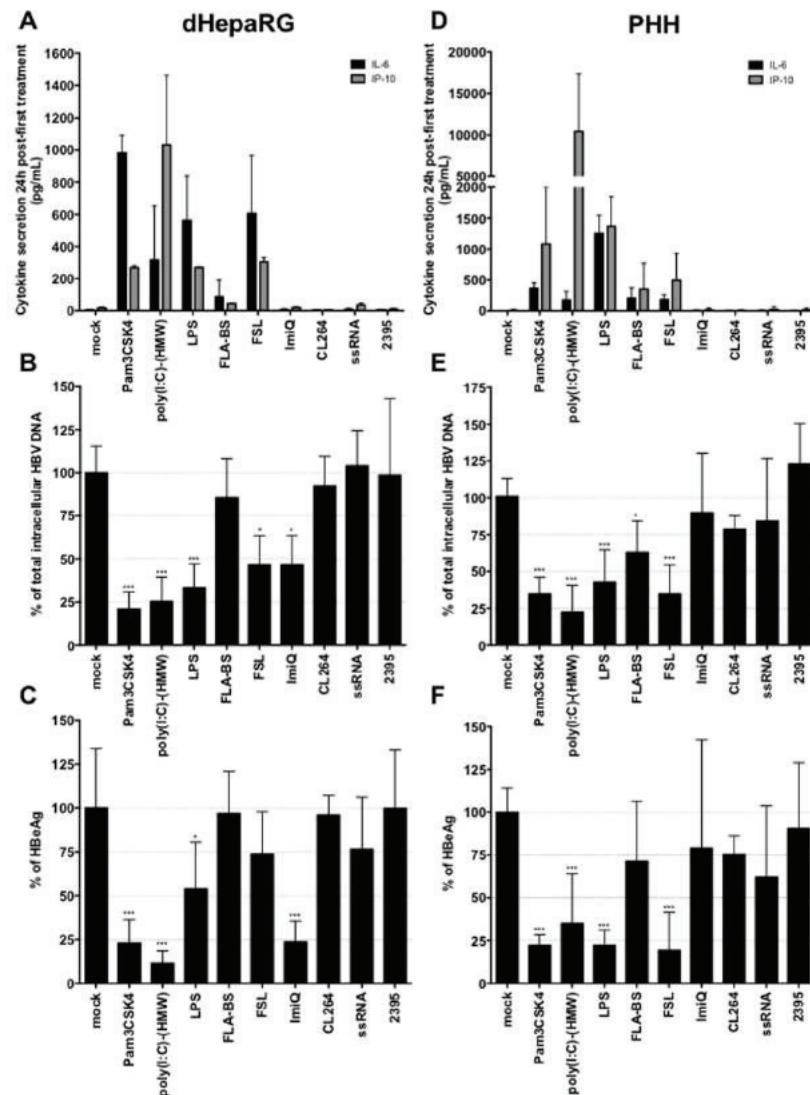


Figure 1. Antiviral activity of TLR-agonists in HBV-infected primary human hepatocytes (PHH) and differentiated HepaRG cells (dHepaRG). (A–C) dHepaRG or (D–F) PHH were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for (A–C) seven days or (D–F) 4 days, then treated twice with the indicated molecules (see method part for concentrations) for seven additional days. (A,D) Twenty-four hours after the first treatment, a fraction of cell supernatants was collected, and IL-6 and IP-10 contents were quantified by ELISA. (B,E) At the end of treatments, cells were harvested, total DNAs extracted, and total intracellular HBV DNA amounts quantified by qPCR. (C,F) Supernatants were also collected and HBeAg levels assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ SD of three independent experiments (three batches of dHepaRG and three donors of PHH), each performed with three biological replicates.

dose-dependently decreased total intracellular HBV DNA, as well as extracellular HBeAg and HBsAg (Fig. 3B). Of note, a weak decrease in cccDNA levels was observed in two out of four experiments using four different donors of PHH (Fig. S4B), thus suggesting a weaker activity on this marker as compared to poly(I:C)-(HMW).

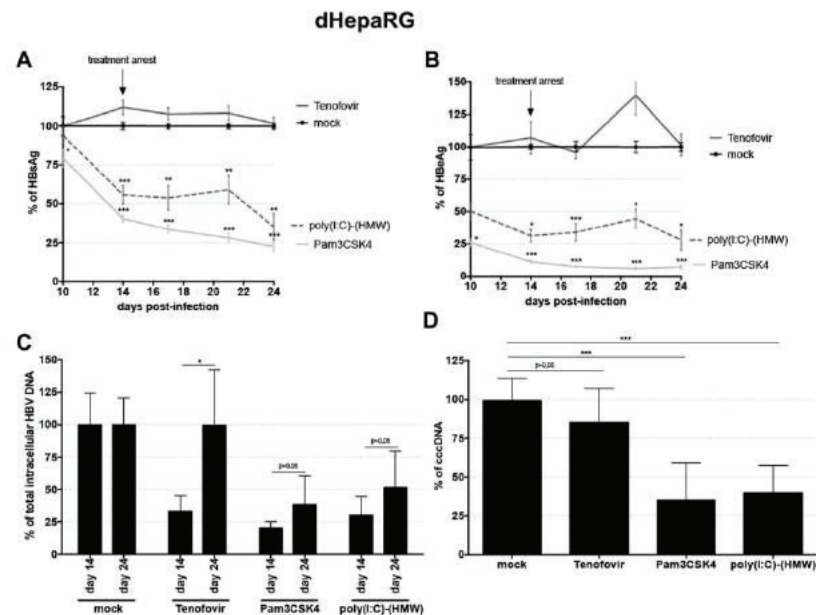


Figure 2. Inhibition of HBV by Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) is maintained after treatment arrest in dHepaRG cells. dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days, treated twice with the indicated molecules for seven days, and further cultured without treatment for 10 additional days. Supernatant were collected at the indicated times and (A) HBsAg and (B) HBeAg levels assessed by ELISA. Cells were harvested at (C) day-14 or (D) day-24 post-infection, total DNAs extracted, and (C) total intracellular HBV DNAs or (D) cccDNA amounts quantified by qPCR. Results are the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments each performed with three biological replicates.

Interestingly, besides its resistance to body fluids and its relevant physicochemical characteristics, which allow *in vivo* injection¹⁶, Riboxol did not affect hepatocyte viability and differentiation (assessed by ApoB secretion), in contrast to Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) ligands (Figs 3B and S6).

Kinetics of inhibition and pathways involved. The antiviral effect of Pam3CSK4 was rapid, with a 50% reduction of total HBV RNAs in HBV-infected dHepaRG or PHH (measured at 24 h or 48 h post-treatment, respectively) with a single administration of the compound (Fig. 4A,D). The reduction in HBV RNAs, following a single dose of a TLR3 ligand, was less efficient and inhibition of shorter duration in HBV-infected dHepaRG (Fig. 4A,D). As expected Pam3CSK4 treatment induced a transient increase of IL-6 mRNA, but not OAS1 mRNA levels, two prototypic genes of NF- κ B and IFN pathways. In contrast, poly(I:C)-(HMW) mostly induced a transient increase of OAS mRNA level (Fig. 4B,C,E,F). Interestingly, Riboxol induced similar (or higher) OAS mRNA level relative to poly(I:C)-(HMW), but slightly higher IL-6 mRNA level (2 fold more), as compared to poly(I:C)-(HMW) (Fig. 4B,C,E,F). This correlated well with the pattern of IL-6 and IP-10 secretion (Fig. S7). Altogether, those data indicate that Riboxol and poly(I:C)-(HMW) can activate both NF- κ B and type-I IFN pathways.

The antiviral effect of TLR2 and TLR3 ligands in hepatocyte cultures is not due to type-I IFN and IL-6 production. IL-6 is the main cytokine produced by hepatocytes in response to TLR1/2 or TLR3 ligands (Fig. S1). It was previously shown that IL-6 and/or type-I IFN have antiviral activity against HBV^{4,15,17–19}, which was confirmed here (Fig. 5A and B). In order to investigate if secretion of IL-6 and/or type-I IFN by the stimulated hepatocytes contribute to the observed antiviral phenotypes of Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) or Riboxol, dHepaRG cells were treated with these ligands together with blocking antibodies against IL-6, IFNAR1 or both. We confirmed that the amount of anti-IL-6 antibody used was able to fully neutralize (Fig. 5A) the antiviral effect of a dose of rIL-6 hundred times higher than that secreted by dHepaRG cells (Figs 5A and S1,S7). The amount of anti-IFNAR1 antibody used was able to substantially decrease the antiviral effect of a dose of rhPEG-IFN- α at least twenty times higher than the level of type-I IFN produced by hepatocytes (Figs S1 and 5B). The anti-IFNAR1

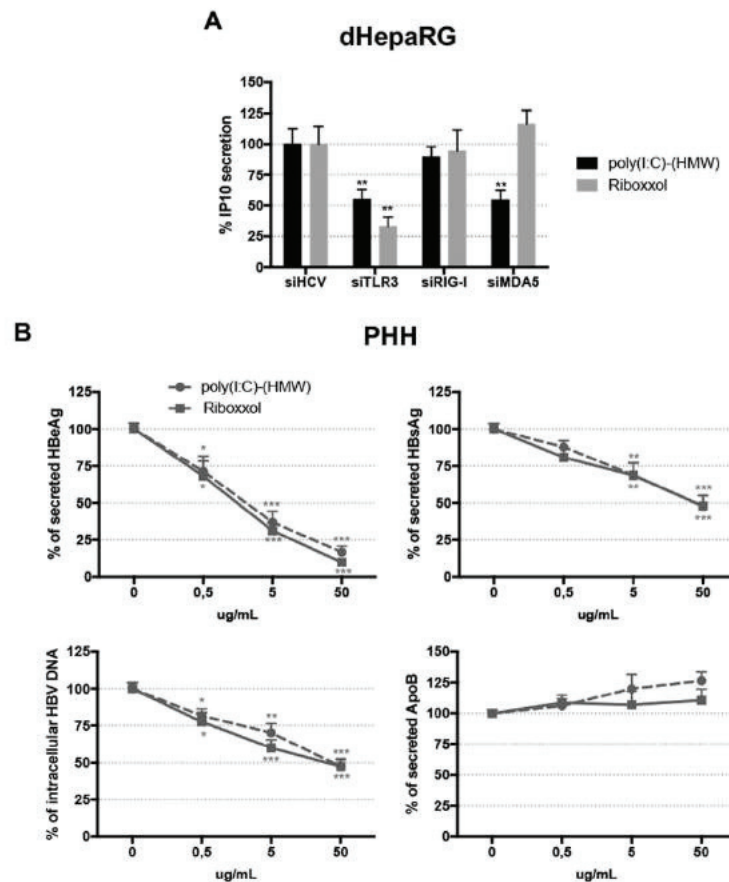


Figure 3. Inhibition of HBV by Poly(I:C)(HMW) and Riboxol. (A) Uninfected dHepaRG cells were transfected with the indicated siRNA. 14 days later, cells were stimulated with 10 μ g/ml of the indicated ligands. Cells were lysed 24 h later and IP10 secretions were assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ SD of three independent experiments each performed in technical duplicates. (B) PHH were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated twice with poly(I:C)-(HMW) or Riboxol at the indicated concentration for seven days. At the end of the experiments, supernatants were collected, and HBeAg, HBsAg and ApoB levels assessed by ELISA. Cells were harvested, total DNAs extracted and total intracellular HBV DNA amounts were quantified by qPCR. Results are the mean $\pm$ SD of four independent experiments (four donors of PHH) each performed with three biological replicates.

antibody did not rescue the antiviral effect of Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW), or Riboxol (Fig. 5C–E). The neutralizing anti-IL-6 antibody only induced a slight rescue of HBeAg when combined with Pam3CSK4 or Riboxol (Fig. 5C–E). These data indicate that hepatocyte-produced IL-6 or type-I IFN are not the main drivers of the antiviral effect of Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) or Riboxol.

Cytokines produced by immune cells upon TLR2 or TLR3 stimulation and antiviral effect in mice models. If IL-6 and type-I IFNs production by hepatocytes do not seem to be solely involved in the antiviral effect in our experimental conditions, their production in the liver microenvironment by other cell types are expected to be beneficial for the overall antiviral effect we can anticipate *in vivo*. To this end, we demonstrated that treatment of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with Pam3CSK4 strongly induced IL-6, as well as some IL-1 β and TNF- α (Fig. 6A). Poly(I:C)-(HMW) induced less IL-6 but more IFN- γ and IFN- α whereas Riboxol induced all these cytokines, which are known to inhibit HBV^{4,15,17–20} (Fig. 6A). As expected HBeAg

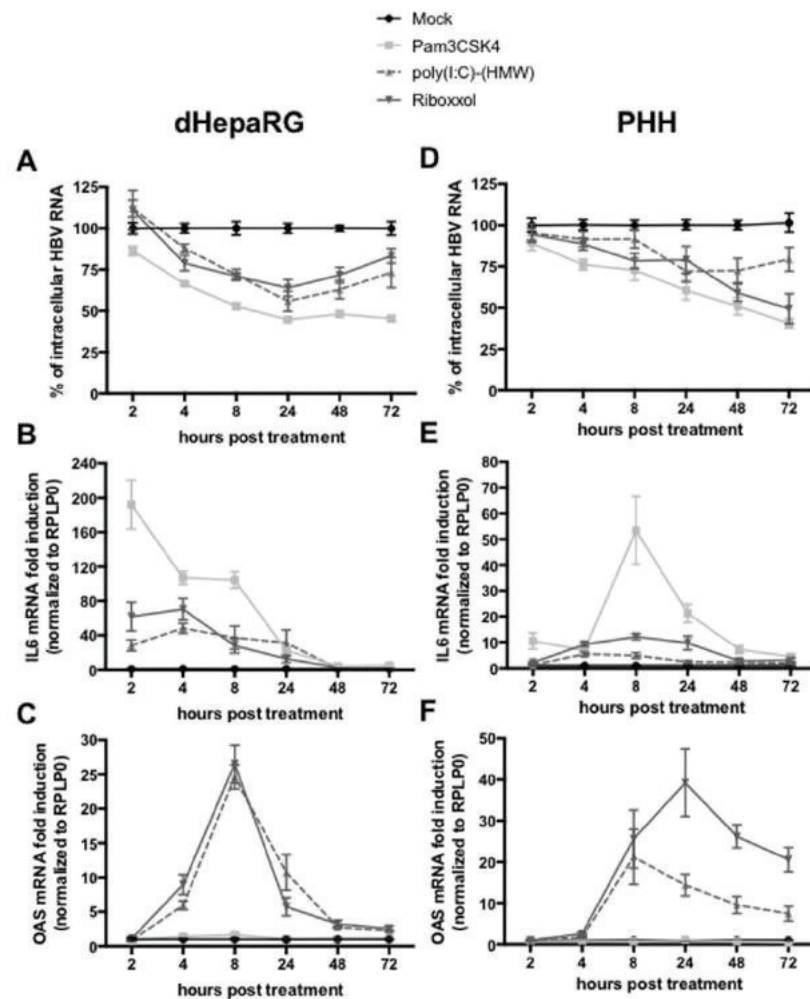


Figure 4. Riboxinol induced both type I IFN and NF κ B pathways. (A–C) dHepaRG cells or (D–F) PHH were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated twice or not with Pam3CSK4 (1 μ g/mL), poly(I:C)-(HMW) (20 μ g/mL for dHepaRG, 5 μ g/mL for PHH) or Riboxinol (50 μ g/mL for dHepaRG, 5 μ g/mL for PHH) for seven days. At the indicated time post-treatment, cells were harvested, (A,D) total RNAs extracted and levels of HBV RNA, (B,E) IL-6 mRNA or (C,F) OAS mRNA assessed by RT-qPCR. Results are the mean $\pm$ SEM of three independent experiments (three batches of dHepaRG and three donors of PHH) each performed with three biological replicates.

secretion by HBV-infected dHepaRG was reduced in the presence of supernatants from these stimulated PBMCs (Fig. 6B). Of note, the amount of cytokines produced by PBMCs and their antiviral effect on HBV-infected hepatocytes may vary from one donor to another (compared Figs 6 to S8). To assess the effect of TLR2-L or TLR3-L *in vivo*, HBV-infected liver-humanized (HuHep) mice were intravenously (IV) injected 2 times per week during 3 weeks with Pam3CSK4 or Riboxinol. The dose escalation protocol we have chosen led to very moderate decreases of HBV parameters in this animal model (Fig. S9A) suggesting that either higher doses or a liver-specific delivery of these ligands have to be further tested.

Discussion

Toll-like receptors are important molecular mediators linking innate and adaptive immunity, and their stimulation by cognate agonists induced an antiviral response in animal models of HBV infection. Indeed, treatments of chimpanzees or woodchucks with TLR7 or TLR9 agonists led to reduction of HBV replication markers^{8–12}. The strongest antiviral phenotype was obtained with GS-9620, a TLR-7 agonist, in the woodchuck model, with a strong effect of treatment on cccDNA and a long-lasting efficacy associated with an anti-HBsAg seroconversion. These antiviral effects probably resulted from the activation of non-parenchymal cells and subsequent production of anti-HBV cytokines/IFNs, since hepatocytes do not express TLR7 or TLR9 and cannot therefore be directly activated by these agonists¹⁴. However, hepatocytes express a number of other TLRs and we investigated here if their stimulation with specific agonists could directly inhibit an already established HBV infection in isolated hepatocytes (i.e., in the absence of immune cells).

We demonstrated that ligands of TLR1/2 (Pam3CSK4) and TLR3 (poly(I:C)-(HMW) or Riboxol activated hepatocytes (PHH or dHepaRG) innate responses and efficiently decreased levels all HBV replication markers, including a strong phenotype on HBV RNAs. This suggests that those treatments are able to prevent transcription of viral RNAs from cccDNA and/or to interfere with their stability. Underlying mechanisms are likely to involve either direct negative epigenetic regulations on cccDNA or a direct IRF3-mediated (i.e., IFN-independent) ISG induction, which would be independent from the production of either IL-6 or IFN- α and their secondary effect on cells via downstream pathways^{17,18}, as shown by our neutralization studies. As HBV-infected dHepaRG cells are able to maintain HBV replication for months²¹, we could show that Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW)-mediated antiviral effect was sustained after arrest of the treatments contrary to the antiviral effect of nucleos(t)ides analogues, thus suggesting a role of epigenetic regulations. In addition, this lack of (or weak) rebound was associated to a slight, but significant, reduction of cccDNA levels measured by both qPCR and Southern blotting in dHepaRG. This suggests that Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) could trigger cellular pathways that can subsequently affect cccDNA stability, as shown previously with some cytokines or lymphotoxin-beta agonists^{15,20}. It is nevertheless worth noting that the effect on cccDNA of Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) or Riboxol could not be confirmed in all PHH donors tested suggesting that (i) either dHepaRG are particularly efficient to trigger innate cellular pathways and/or (ii) the low level of replication of HBV in dHepaRG is more prone to cccDNA degradation and/or (iii) PHH donor heterogeneity (e.g. genetic background, alteration of liver function due to the underlying donor disease or treatment) may affect pathways triggering cccDNA destabilization. This also emphasizes the importance of performing experiments with multiple PHH donors. In addition to the direct antiviral effect observed in infected hepatocytes, Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) and Riboxol also activated PBMCs to produce different cytokines, which could in turn inhibit HBV replication. Among them, IL-6 might be the main driver of this indirect antiviral effect against HBV since its lower induction in PBMCs from donor 2 stimulated with Riboxol led to a lower inhibition of HBeAg secretion (Fig. S8B).

Our data are in accordance with experiments performed in HBV transgenic mice or WHV infected woodchuck that identified respectively TLR3 and TLR2 pathways as potential therapeutic targets^{22–24}. However, in contrast to agonists of TLR7 (e.g., GS-9620), TLR8 (e.g., GS-9688) and RIG-I/NOD2 (e.g., SB-9200) that can be delivered orally to human, TLR3 and TLR2 ligands cannot and will likely require strategy for delivery since their IV administration with a dose escalation protocol (from 20 to 80 μ g during 3 weeks) only led to very moderate decreases of HBV parameters in HBV-infected HuHep mice. In this respect, nanoparticles will be used to reduce the active dose of ligands, protect these ligands from degradation and specifically deliver specifically them to the liver, thereby preventing systemic exposure and potential adverse effects²⁵. These ligands may also be used as part of a combination therapies with currently, e.g. with currently used anti-HBV drugs, as well as with immunotherapies, such as therapeutic vaccines and/or checkpoint inhibitors.

Methods

Cell culture and HBV infection. HepaRG cells were cultured, differentiated, and infected by HBV as previously described²⁶. Primary human hepatocytes (PHH) were freshly prepared from human liver resection obtained from the Centre Léon Bérard (Lyon) with French ministerial authorizations (AC 2013-1871, DC 2013-1870, AFNOR NF 96 900 sept 2011) as previously described²⁷. HBV inoculum was prepared from HepAD38²⁸ supernatants by polyethylene-glycol-MW-8000 (PEG8000, SIGMA) precipitation (8% final) as previously described²⁹. Viral stocks with titer reaching at least 1×10^{10} vge/mL were tested endotoxin free. Blood from healthy donors was obtained from “Etablissement Français du Sang”, Lyon France. PBMCs were isolated by gradient centrifugation using Histopaque (Sigma-Aldrich) and cultivated in RPMI medium, 10% FBS, 5% Penicillin-Streptomycin. Poly(I:C)-(HMW), Riboxol and Pam3CSK4 were added at 5 μ g/mL concentration. PBMCs were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ after TLRs stimulation.

Reagents. The following PRR agonists were purchased from InvivoGen and used at the indicated final concentration unless stated otherwise in the figure legends: Pam3CSK4 (TLR-1/2 agonist, 0.5 μ g/mL), Poly(I:C)-(HMW) (TLR3-agonist, 5 μ g/mL), LPS (TLR-4 agonist, 0.5 μ g/mL), FLA-BS (TLR-5 agonist, 1 μ g/mL), FSL-1 (TLR-2/6-agonist, 1 μ g/mL), Imiquimod (R837, TLR-7 agonist, 5 μ g/mL), CL264 (TLR-7 agonist 5 μ g/mL), ssRNA40/lyoVecTM (ssRNA, TLR-8 agonist, 1 μ g/mL), 2395 (CpG ODN-2395 (class-C), TLR-9 agonist, 5 μ M). Riboxol, recombinant IL6 and rhPEG-IFN- α (Roferon) were purchased respectively from Ribox life science, R&D Systems and Roche. Neutralizing anti-IFNRA1 antibodies (IgG2a, #21385-1) and their isotype control antibodies (IgG2a, #281-010) were purchased respectively from PBL assay Science and Ancell. Neutralizing anti-IL-6 antibodies (IgG1, #501110) and their isotype control antibodies (IgG2, #400414) were purchased from Biologend. Transfection of siRNA (SMARTpoolTM from Dharmacon/GE) were performed using Dharmafect-1 transfection reagent as recommended by the manufacturer (Dharmacon/GE). siRNA against TLR3 (# L-007745-00) RIG-I (# L-012511-00), MDA5 (# L-013041-00) and HCV (as siRNA control) was used at final concentration of 25 nM.

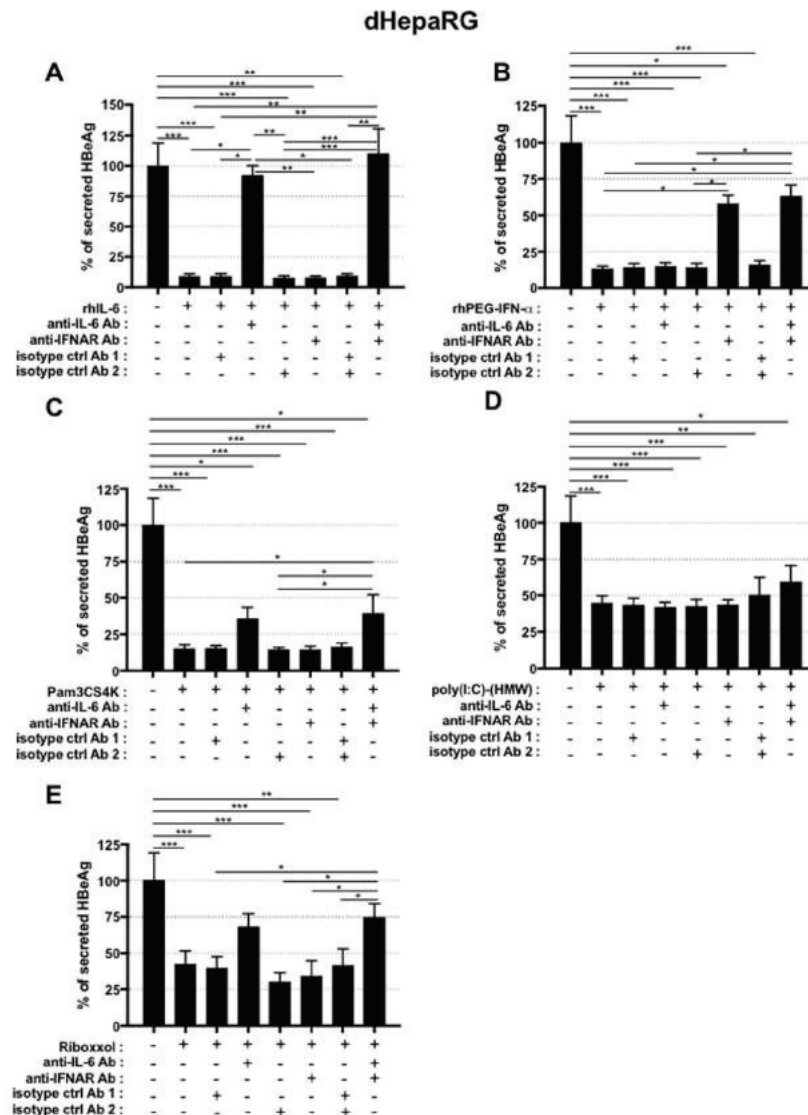


Figure 5. Inhibition of HBV by TLR-L is partially due to IL-6 secretion. dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated, or co-treated, twice as indicated with (A to E) anti-IL-6 antibodies (Ab) (2 μ g/mL), (A to E) anti-IFNAR1 Ab (2 μ g/mL), (A to E) isotype control (ctrl) Abs (1 for control of anti-IL6 Ab, 2 for control of anti-IFNAR1 Ab) (2 μ g/mL), (A) rhIL-6 (100 ng/mL), (B) rhPEG-IFN- α (500 IU/mL), (C) Pam3CSK4 (1 μ g/mL), (D) poly(I:C)-(HMW) (20 μ g/mL) or (E) Riboxol (50 μ g/mL) for seven more days (2 treatments). At the end of the experiment, supernatants were collected and HBsAg levels assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ SD of two independent experiments each performed with three biological replicates.

Western blot analysis. Cells were harvested in RIPA lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris HCl pH = 8, 50 mM, SDS 0.1%, NP40 1%, Na Deoxycholate 0.5%) containing protease inhibitors (Protein Cocktail Inhibitors from Sigma-Aldrich, NaF 10 mM, Na Orthovanadate 10 mM). Clarified lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and

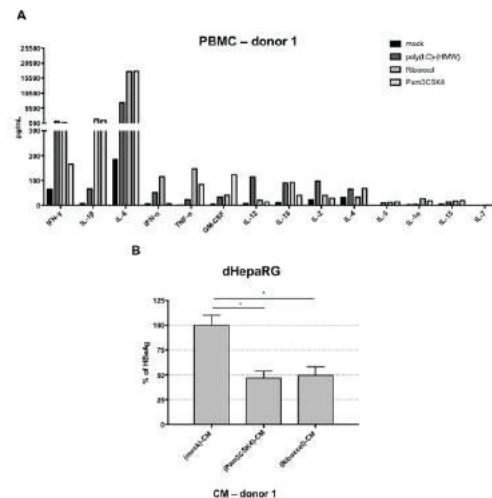


Figure 6. TLR2 and 3 ligands lead to production of inflammatory cytokines by immune blood cells. **(A)** Fresh PBMC from a healthy donor were cultivated and stimulated or not with Pam3CSK4 (5 µg/mL), poly(I:C)-HMW (5 µg/mL) or Riboxol (5 µg/mL) for 24 h. Supernatant were collected and cytokines content was analyzed with Luminex Assay. **(B)** dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated or not during 10 days with the indicated conditioned media (CM) diluted 1/100. Supernatant were collected and HBeAg levels were assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ SD of two independent experiments each performed with two or three biological replicates.

Western Blot transfer onto PVDF or nitrocellulose membranes using the TransTurbo Blot apparatus according to the manufacturer (Biorad). Primary antibodies are the TLR3 antibody (D10F10, #6961) RIG-I antibody (D14G6, #3743) MDA5 antibody (D74E4, #5321) from Cell Signaling and the anti-huActin (clone C4, #08691002) from MP Biomedicals. Secondary HRP antibodies anti-rabbit and anti-mouse were purchased from Sigma-Aldrich.

Nucleic acid extractions, reverse transcription and qPCR analyses. Total RNA and total DNA were respectively extracted from cells with the NucleoSpin RNA II kit and Nucleospin® 96 tissue kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). RNA reverse transcription was performed using the Superscript III RT (Life Technologies). Quantitative PCR for HBV were performed using HBV specific primers and normalized to PRNP housekeeping gene as previously described¹⁵.

cccDNA detection. After total DNA isolation and T5 exonuclease digestion (NEB, France) digestion for 1 h, cccDNA was quantified as previously described³⁰. Alternatively, cccDNA was analyzed by Southern blot after Hirt extraction as described previously³¹.

Enzyme-linked Immunoassay for IL-6, IP10, HBeAg, HBsAg, and ApoB detection in cell supernatant. Human IL-6 and human IP-10 cytokines were detected in the supernatants using the DuoSet® ELISA kit according to the manufacturer (R&D Systems). HBeAg and HBsAg were detected in the supernatant of HBV-infected cells using the Autobio kit according to the manufacturer (AutoBio, China). ApoB secretion was detected in the supernatant of cells using the Total Human Apolipoprotein B assay according to the manufacturer (AlerCHEK, USA).

Measurement of cytokines by Luminex. IL-12p70, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-13, IL-15, IL-18, IL-2, IL-31, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF-α and TNF-β were measured with a ProcartaPlex Human Th1/Th2 & Cytokine Panel 1 C (18 plex) kit (eBiosciences). Samples were analyzed using a Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions.

Viability/cytotoxicity assays. Neutral red uptake assay and Sulforhodamine staining to estimate cell viability/cytotoxicity were performed as previously described⁴.

In vivo experiments. All experiments were performed in accordance with the European Union guidelines for approval of the protocols by the local ethics committee (Authorization Agreement C2EA-15, "Comité Rhône-Alpes d'Éthique pour l'Expérimentation Animale", Lyon, France - APAFIS#1570-2015073112163780). Primary Human Hepatocytes (PHH, Corning, BD Gentest) were injected in FRG mice intrasplenically 48 h after

adeno-uPA conditioning³². Mice were subjected to NTBC cycling during the liver repopulation process. Mice with HSA levels >19 mg/ml, as determined using a Cobas C501 analyzer, Roche Applied Science, were infected by IP injection with 5×10^6 vge/mL of HBV. Six weeks later, mice were injected intravenously twice a week during 3 weeks with Pam3CSK4 or Riboxol (20 ug per mouse per injection the first week, 40 ug per mouse per injection the second week and 80 ug per mouse per injection the third week). Sera were collected at different time before and after treatments. Mice were sacrificed 10.5 weeks post HBV infection and liver pieces were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before further processing. HBV viremia was determined by extraction of DNA from sera (supplemented with a known amount of non-HBV DNA; pUC19 plasmid from New England Biolabs) using the NucleoSpin[®] RNA Virus kit (Macherey Nagel) followed by qPCR. For each serum, quantity of viral genome equivalent was calculated according to a standard curve (built with dilutions of a plasmid containing the HBV sequence) and normalized to the ratio between the actual and theoretical amount of recovered pUC19 DNA. Total DNA were extracted from liver pieces and cccDNA amount was quantified after T5 digestions as described previously³³.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the XLStat software and Kruskal-Wallis tests with multiple comparison respect to non-treated cells (Dunn's post-test). For all tests, a p value ≤ 0.05 was considered as significant. *Correspond to p value ≤ 0.05 ; **correspond to p value ≤ 0.01 ; ***correspond to p value ≤ 0.001 .

References

- Zeisel, M. B. *et al.* Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308943> (2015).
- Durantel, D. & Zoulim, F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol* **64**, S117–131, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.016> (2016).
- Pandey, S., Kawai, T. & Akira, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a016246, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246> (2015).
- Isorce, N. *et al.* Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral Res* **130**, 36–45, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.008> (2016).
- Konerman, M. A. & Lok, A. S. Interferon Treatment for Hepatitis B. *Clin Liver Dis* **20**, 645–665, <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.06.002> (2016).
- Lanford, R. E. *et al.* GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* **144**(1508–1517), 1517 e1501–1510, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.003> (2013).
- Lawitz, E. *et al.* Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* **20**, 699–708, <https://doi.org/10.3851/TMP2845> (2015).
- Menne, S. *et al.* Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. *J Hepatol* **62**, 1237–1245, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.026> (2015).
- Gane, E. J. *et al.* The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **63**, 320–328, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.037> (2015).
- Dammermann, W., Dornbrack, J., Broker, K., Bentzien, F. & Luth, S. CpG oligonucleotides increase HBV-specific cytokine responses in whole blood and enhance cytokine release assay sensitivity. *J Virol Methods* **248**, 195–201, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.07.011> (2017).
- Campbell, J. D. Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study. *Methods Mol Biol* **1494**, 15–27, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_2 (2017).
- Meng, Z. *et al.* Combination therapy including CpG oligodeoxynucleotides and entecavir induces early viral response and enhanced inhibition of viral replication in a woodchuck model of chronic hepadnaviral infection. *Antiviral Res* **125**, 14–24, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.11.001> (2016).
- Huang, L. R. *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nature Immunology* **14**, 574–583, <https://doi.org/10.1038/ni.2573> (2013).
- Luangsai, S. *et al.* Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J Hepatol* **63**, 1077–1085, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.022> (2015).
- Lucifora, J. *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–1228, <https://doi.org/10.1126/science.1243462> (2014).
- Jelinek, I. *et al.* TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J Immunol* **186**, 2422–2429, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002845> (2011).
- Hosel, M. *et al.* Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* **50**, 1773–1782 (2009).
- Belloni, L. *et al.* Mimicking Interferon- α (IFN α) inhibitory activity on hep- atitis B virus (HBV) transcription and replication by targeting the epigenetic control of nuclear cccDNA minichromosome with epigenetic small molecules. *Hepatology* **56**, 369A (2012).
- Palumbo, G. A. *et al.* IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear cccDNA Minichromosome. *PLoS One* **10**, e0142599, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142599> (2015).
- Xia, Y. *et al.* Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* **150**, 194–205, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.026> (2016).
- Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* **55**, 996–1003, doi:10.1016/j.jhep.2011.02.015 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015> (2011).
- Isogawa, M., Robek, M. D., Furuchi, Y. & Chisari, F. V. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* **79**, 7269–7272 (2005).
- Wu, J. *et al.* Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* **49**, 1132–1140 (2008).
- Zhang, X. *et al.* Role of Toll-like receptor 2 in the immune response against hepadnaviral infection. *J Hepatol* **57**, 522–528, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.05.004> (2012).
- Tyler, B., Gullotti, D., Mangraviti, A., Utsuki, T. & Brem, H. Poly(lactic acid) (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **107**, 163–175, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018> (2016).
- Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15655–15660 (2002).
- Lecluyse, E. L. & Alexandre, E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* **640**, 57–82, https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_3 (2010).

28. Ladner, S. K. *et al.* Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1715–1720 (1997).
29. Luangsai, S. *et al.* Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol* **63**, 1314–1322, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.014> (2015).
30. Werle-Lapostolle, B. *et al.* Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* **126**, 1750–1758 (2004).
31. Lucifora, J. *et al.* Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector. *Antiviral Res* **145**, 14–19, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.006> (2017).
32. Calattini, S. *et al.* Functional and Biochemical Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) Particles Produced in a Humanized Liver Mouse Model. *J Biol Chem* **290**, 23173–23187, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662999> (2015).
33. Allweiss, L. *et al.* Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA *in vivo*. *Gut*, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312162> (2017).

Acknowledgements

The authors would like to thank Lydie Lefrançois and Jennifer Molle for help with the isolation of primary human hepatocytes, the staff from Prof Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection and Dr. Serge Lebecque and Dr. Toufic Reno for advises on Riboxol. This work was supported by grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis; grants from CSS4), The "ANRS consortium on humanized mouse models for viral hepatitis", FINOVI (Foundation for innovation in infectiology), ARC (French Agency for Research against Cancer), Gilead Science, the European Research Council (ERC-AdG-233130-HEPCENT - to FLC) and INSERM. This work was also supported by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) and the LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048) of the "Université de Lyon", within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). MB was the recipient of RPF (Roche Postdoc Fellowship) program supported by Hoffmann-La Roche (http://www.roche.com/careers/workplaces/wp_research/postdoc_fellowship_rpf_program.htm). The authors thanks the Plateforme de Thérapie Génique in Nantes (France) for the production of the *in vivo* certified lots of adeno-uPA vector as well as J.F. Henry, N. Aguilera and J.L. Thoumas from the animal facility (PBES, Plateau de Biologie Experimentale de la Souris, ENS de Lyon).

Author Contributions

Study concept and design: J.L., D.D., F.Z., S.F., S.D. Acquisition of data: J.L., M.B., L.A., F.F., S.M., O.F., L.D., M.M., S.D., A.O. Analysis and interpretation of data: J.L., M.B., M.A.G. and D.D. Drafting of the manuscript: J.L. and D.D. Statistical analyses: J.L. Material support: M.R., A.S., F.L.C.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23525-w>.

Competing Interests: S.M., L.D., O.F., M.M., L.A., A.S., F.F., F.L.C., A.O. have nothing to declare. F.Z., J.L. and D.D. received a research grant from Gilead Science to perform experiments. S.D. and S.F. are employees of Gilead Science. M.B. was the recipient of RPF (Roche Postdoc Fellowship) program supported by Hoffmann-La Roche. MAG is an employee of Hoffman-La Roche.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Supplementary figures

Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes

Julie Lucifora^{1,*,\$}, Marc Bonnin^{1,\$}, Ludovic Aillot¹, Floriane Fusil², Sarah Maadadi¹, Laura Dimier¹, Maud Michelet¹, Océane Floriot¹, Anaïs Ollivier², Michel Rivoire³, Malika Ait-Goughoulte⁴, Stéphane Daffis⁵, Simon P. Fletcher⁵, Anna Salvetti¹, François-Loïc Cosset², Fabien Zoulim^{1,6} and David Durantel^{1,*}

¹ INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

² CIRI – International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

³ INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

⁴ Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche, 4070 Basel, Switzerland

⁵ Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA;

⁶ Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

\$ equal contribution

*Correspondence:

Dr. David Durantel and Dr. Julie Lucifora

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), UMR Inserm 1052 - CNRS 5286, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France ; Phone: + 33 4 72 68 19 70 ; Fax : +33 4 72 68 19 71 ; E-mail: david.durantel@inserm.fr and julie.lucifora@inserm.fr

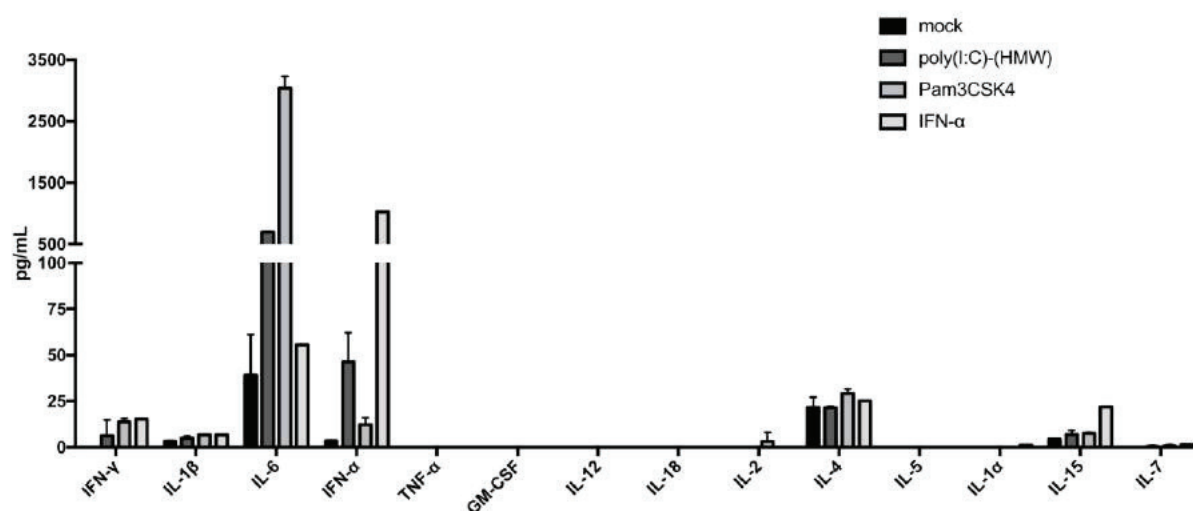


Figure S1: **Cytokines secretion by dHepaRG stimulated with poly(I:C)-(HMW) or Pam3CSK4.** dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days, treated or not with Pam3CSK4 (0,5 ug/mL), poly(I:C)-(HMW) (5 ug/mL) or PEG-IFN-α (1000 IU/mL) for 24h. Supernatants were collected and amount of the indicated cytokines were measured by Luminex assay. Results are the mean +/- SD one experiment performed with two biological replicate.

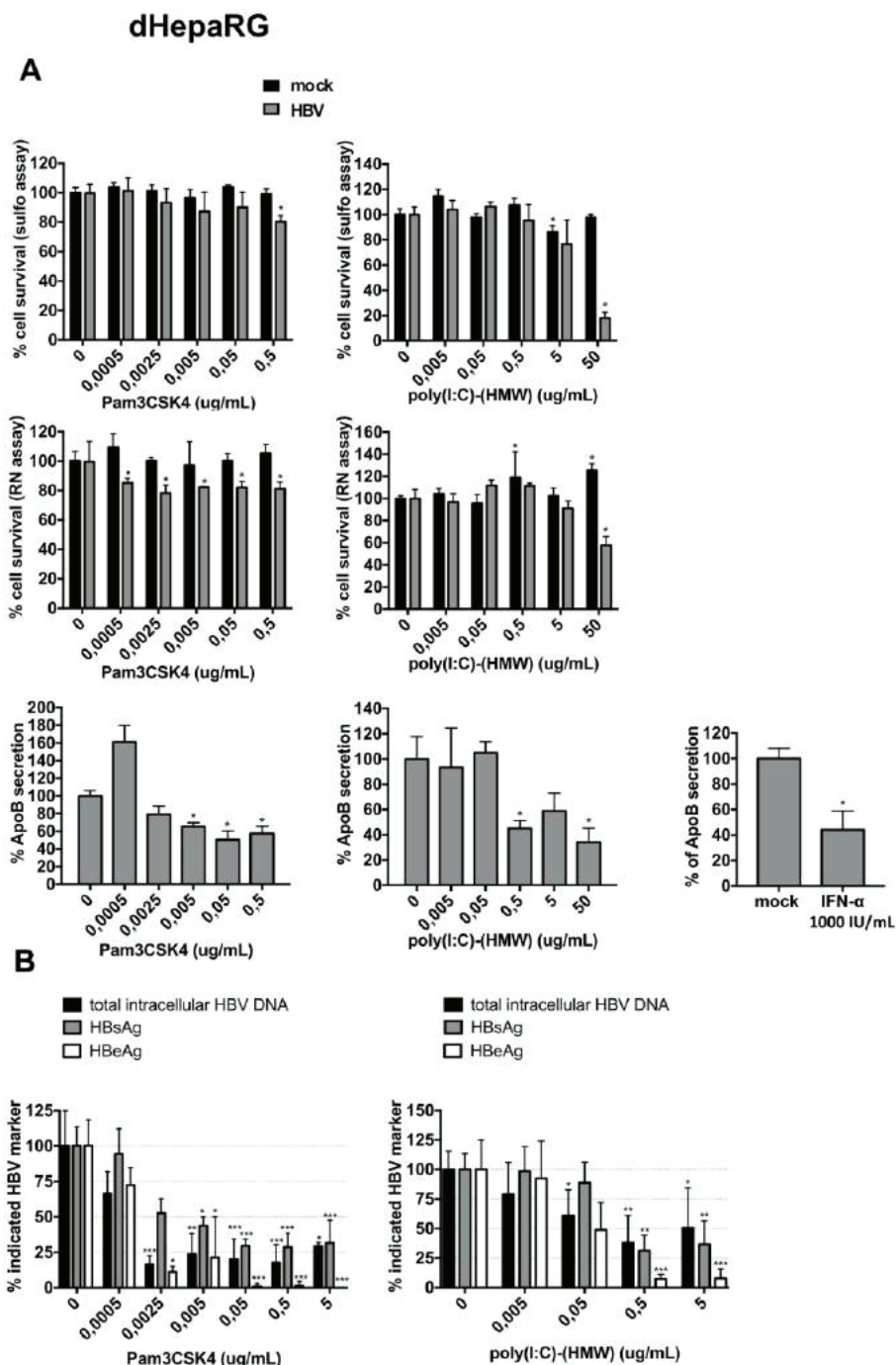
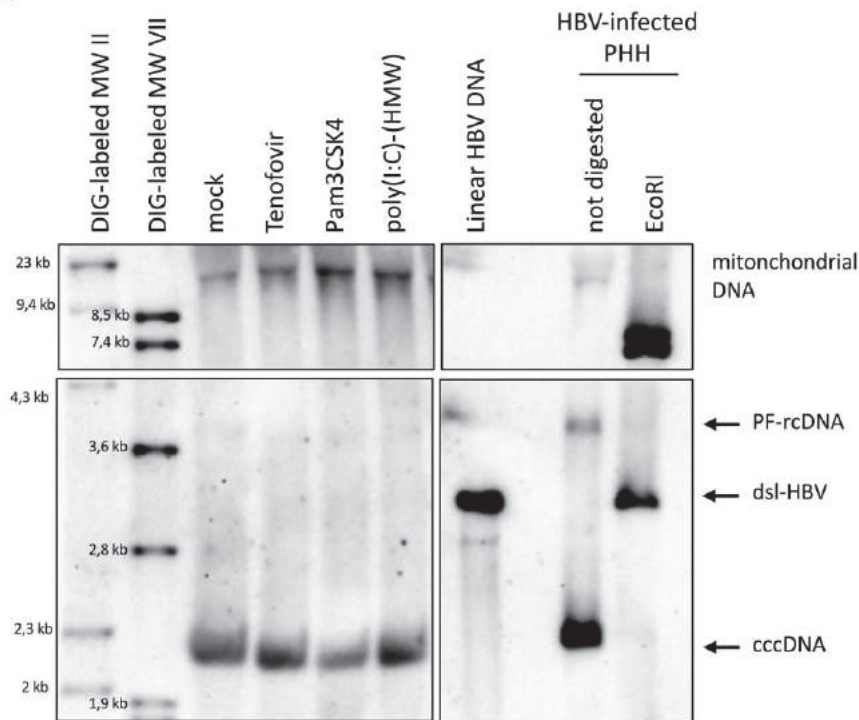


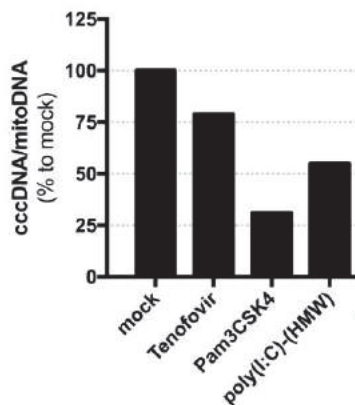
Figure S2: Pam3CSK4 and poly(I:C)-(HMW) inhibit HBV in HBV-infected dHepaRG in a dose dependent manner without toxicity. dHepaRG were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated with the indicated molecules at the indicated concentrations for seven more days (2 treatments). At the end of the experiments, (A) cells survival rates was assessed by sulforhodamin or neutral red assays, (B) total DNAs were extracted and total intracellular HBV DNA amounts were evaluated by qPCR analyses. Supernatant were collected and (A) ApoB, (B) HBeAg or HBsAg levels were assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments each performed with three biological replicate.

dHepaRG

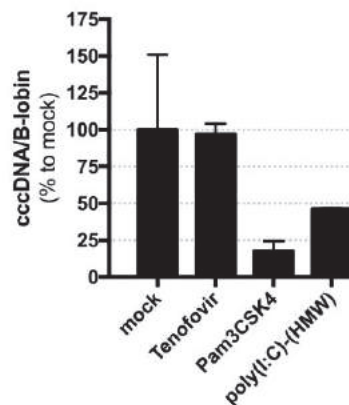
A



B cccDNA quantification by Southern Blot on Hirt DNA extraction



C cccDNA quantification by qPCR on total DNA extractions



D Total intracellular HBV DNA quantification by qPCR on total DNA extractions

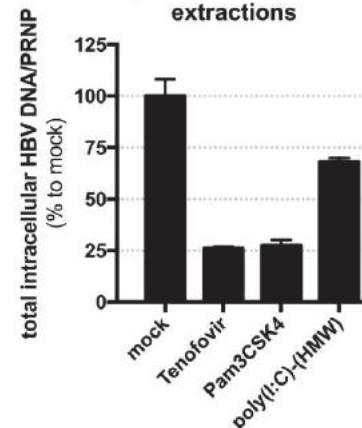
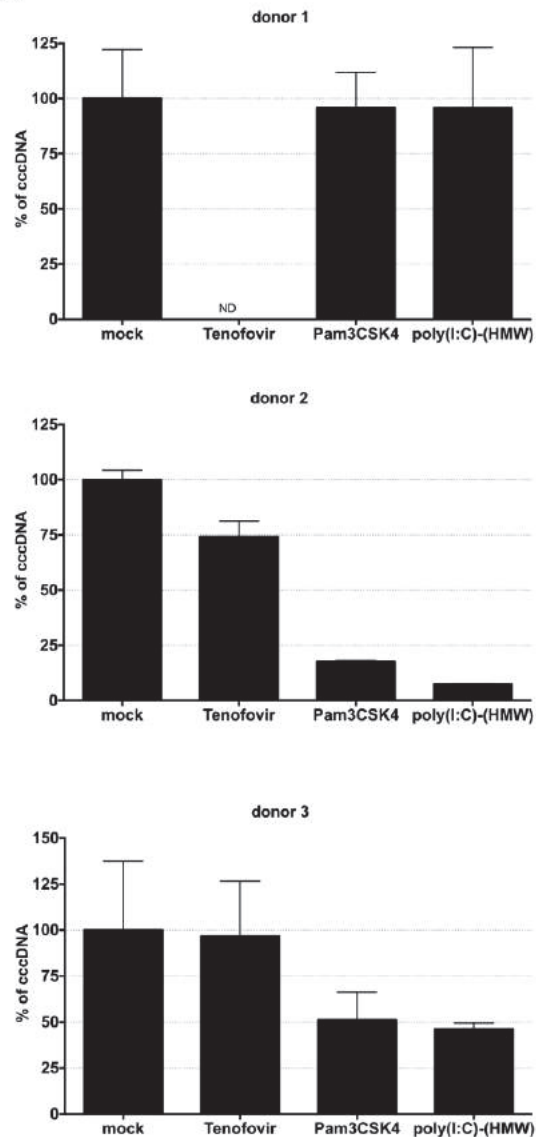


Figure S3: **Pam3CSK4** and **poly(I:C)-(HMW)** treatments decreased cccDNA levels in HBV-infected dHepaRG. dHepaRG were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated with Tenofovir (10 μ M), Pam3CSK4 (0,5 μ g/mL) or poly(I:C)-(HMW) (0,5 μ g/mL) for seven more days (2 treatments). At the end of the experiments, cells were harvested, (A, B) DNAs were extracted following a Hirt procedure or (C, D) a total DNA extraction procedure and submitted to (A) Southern blot analyses using HBV-DIG labeled probes or (C, D) qPCR analyses to detect (C) cccDNA or (D) total intracellular HBV DNAs. (B) cccDNA and mitochondrial DNA were quantified on the southern blot analyses using the « ImageLab » software from Bio-Rad.

PHH

A



B

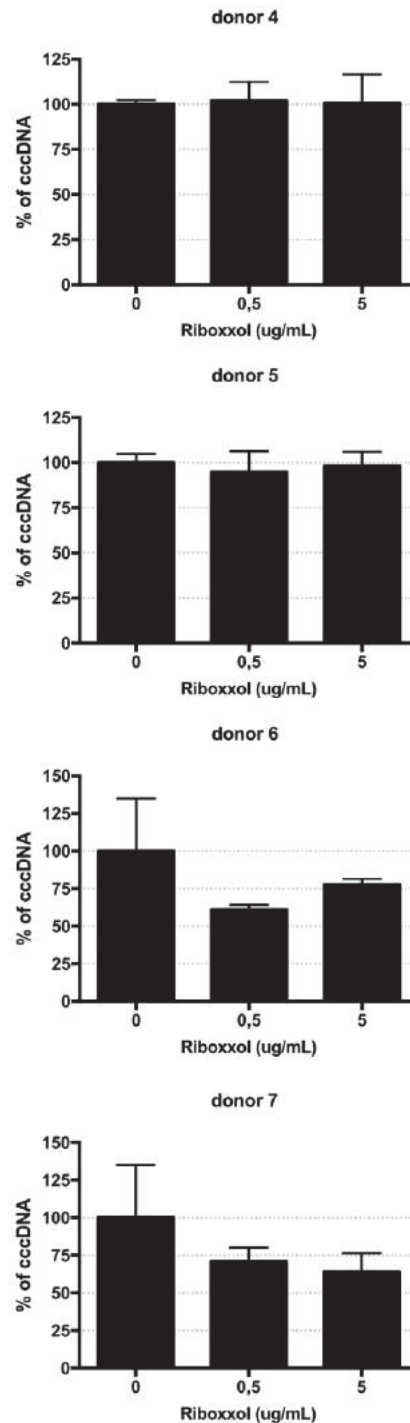


Figure S4: **Effect of Pam3CSK4, poly(I:C)-(HMW) and riboxxol treatments on cccDNA levels in HBV-infected PHH.** PHH were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for four days and treated with Tenofovir (10 uM), Pam3CSK4 (0,5 ug/mL), poly(I:C)-(HMW) (0,5 ug/mL) or Riboxxol (indicated concentrations) for seven more days (2 treatments). At the end of the experiments, cells were harvest, total DNAs were extracted and cccDNA amounts were evaluated by qPCR analyses. For each donor, results are the mean +/- SD one experiment performed with three biological replicate.

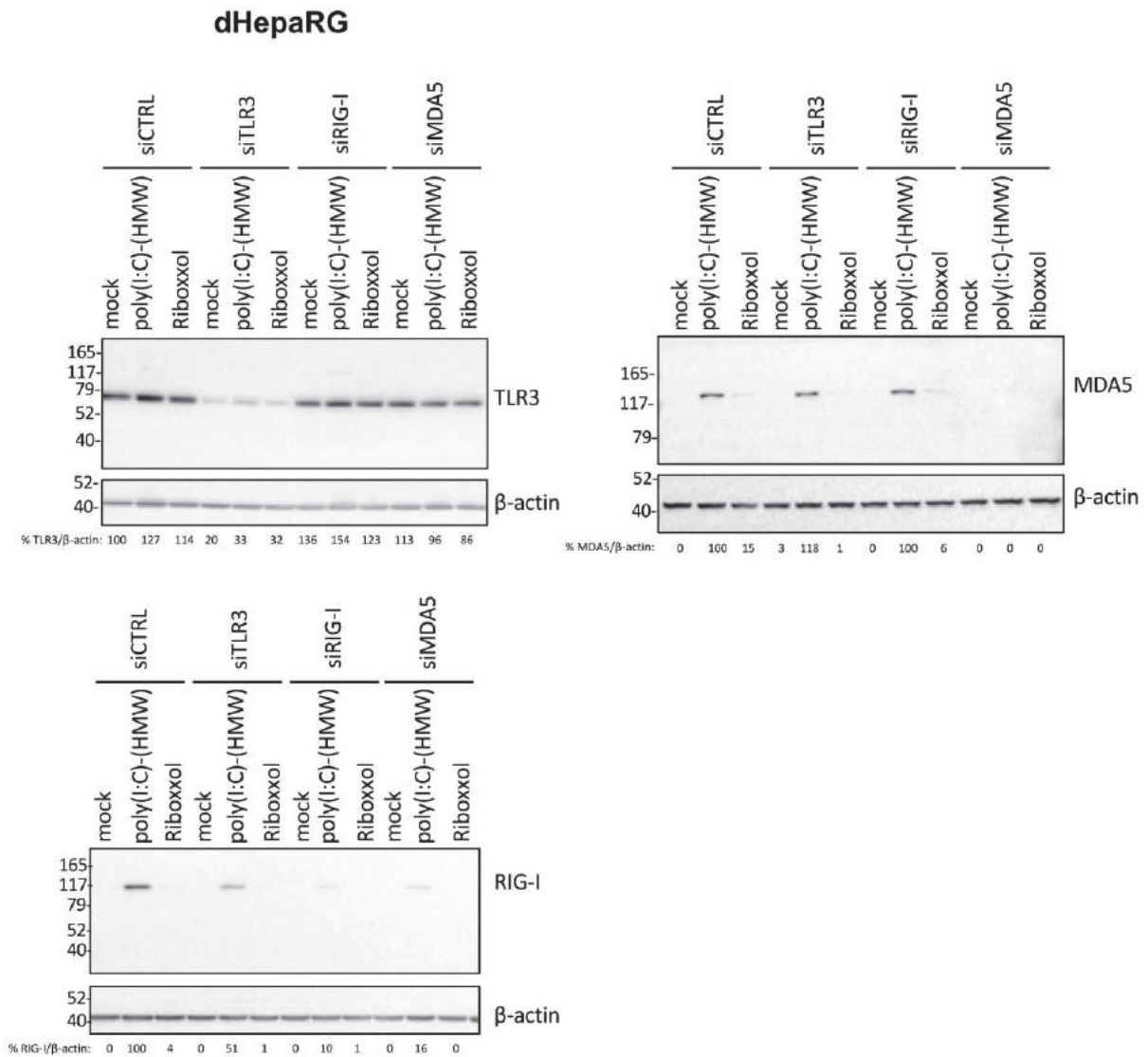


Figure S5: TLR3, MDA5 and RIG-I protein levels after siRNA transfection. Uninfected dHepaRG cells were transfected with the indicated siRNA. 14 days later, cells were stimulated with 10 µg/ml of the indicated ligands. Cells were lysed 24h later and TLR3, MDA5 or RIG-I protein levels were analyzed by western blot. Blots presented here are representative of three independent experiments.

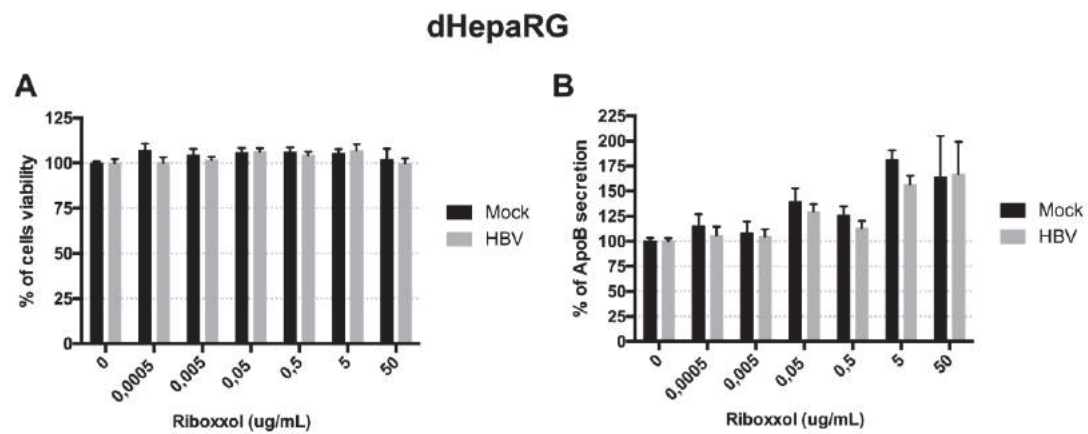


Figure S6: Treatments with Riboxxol did not impact on dHepaRG survival and differentiation status. dHepaRG were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated with the riboxxol at the indicated concentrations for seven more days (2 treatments). At the end of the experiments, (A) cells survival rates was assessed by sulforhodamin assay, (B) supernatant were collected and ApoB levels were assessed by ELISA. Results are the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments each performed with three biological replicate.

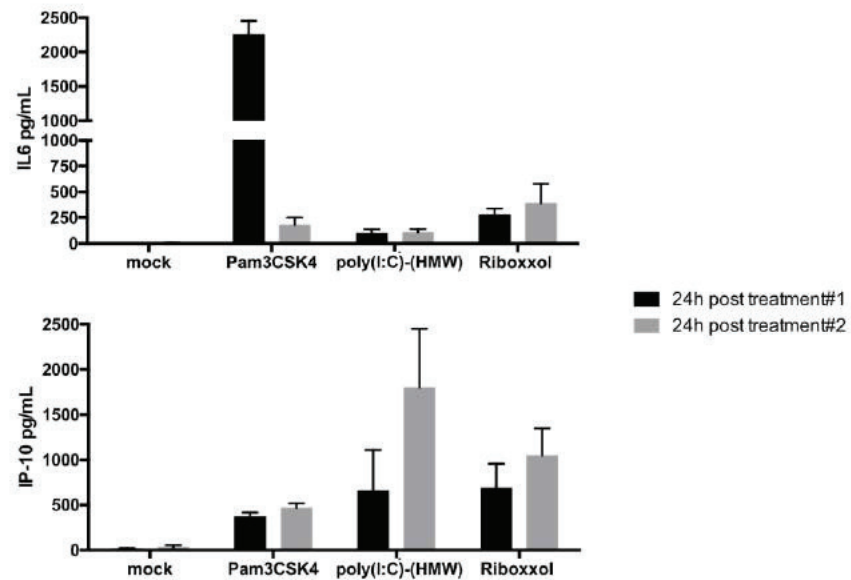


Figure S7: Riboxxol induced secretion of both IL-6 and IP-10. dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days, treated or not with Pam3CSK4 (0,5 ug/mL), poly(I:C)-(HMW) (5 ug/mL) or Riboxxol (50 ug/mL) for seven days (2 treatments). Supernatants were collected and amount of IL6 and IP-10 were quantified by ELISA. Results are the mean +/- SD of three independent experiments each performed with three biological replicate.

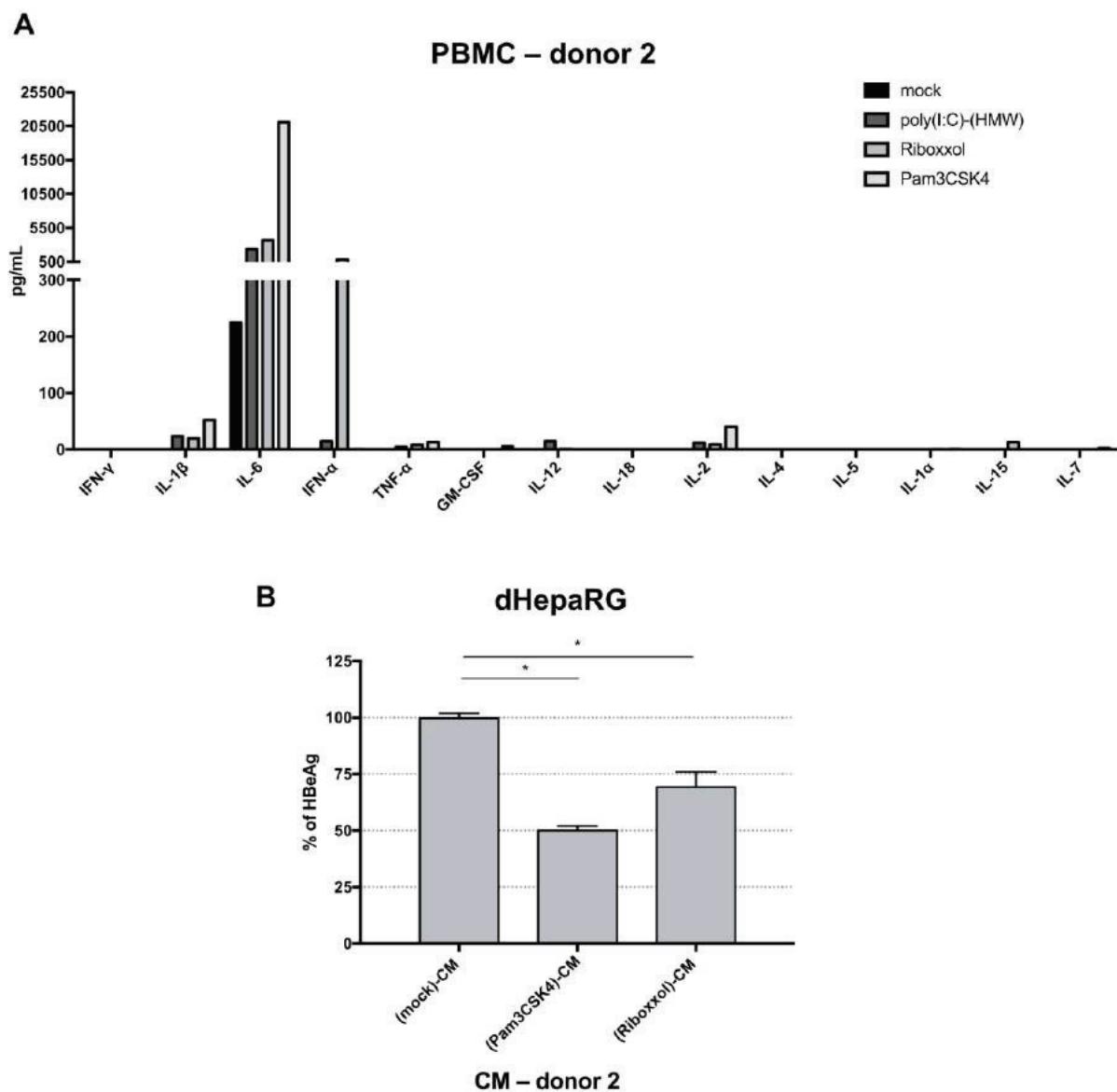


Figure S8: TLR2 and 3 ligands lead to production of inflammatory cytokines by immune blood cells. (A) Fresh PBMC from a healthy donor were cultivated and stimulated or not with Pam3CSK4 (5 μ g/mL), poly(I:C)-(HMW) (5 μ g/mL) or Riboxol (5 μ g/mL) for 24h. Supernatant were collected and cytokines content was analyzed with Luminex Assay. (B) dHepaRG cells were infected by HBV at a multiplicity of infection of 100 viral genome equivalent (vge)/cell for seven days and treated or not during 10 days with the indicated conditioned media (CM) diluted 1/100. Supernatant were collected and HBeAg levels were assessed by ELISA.

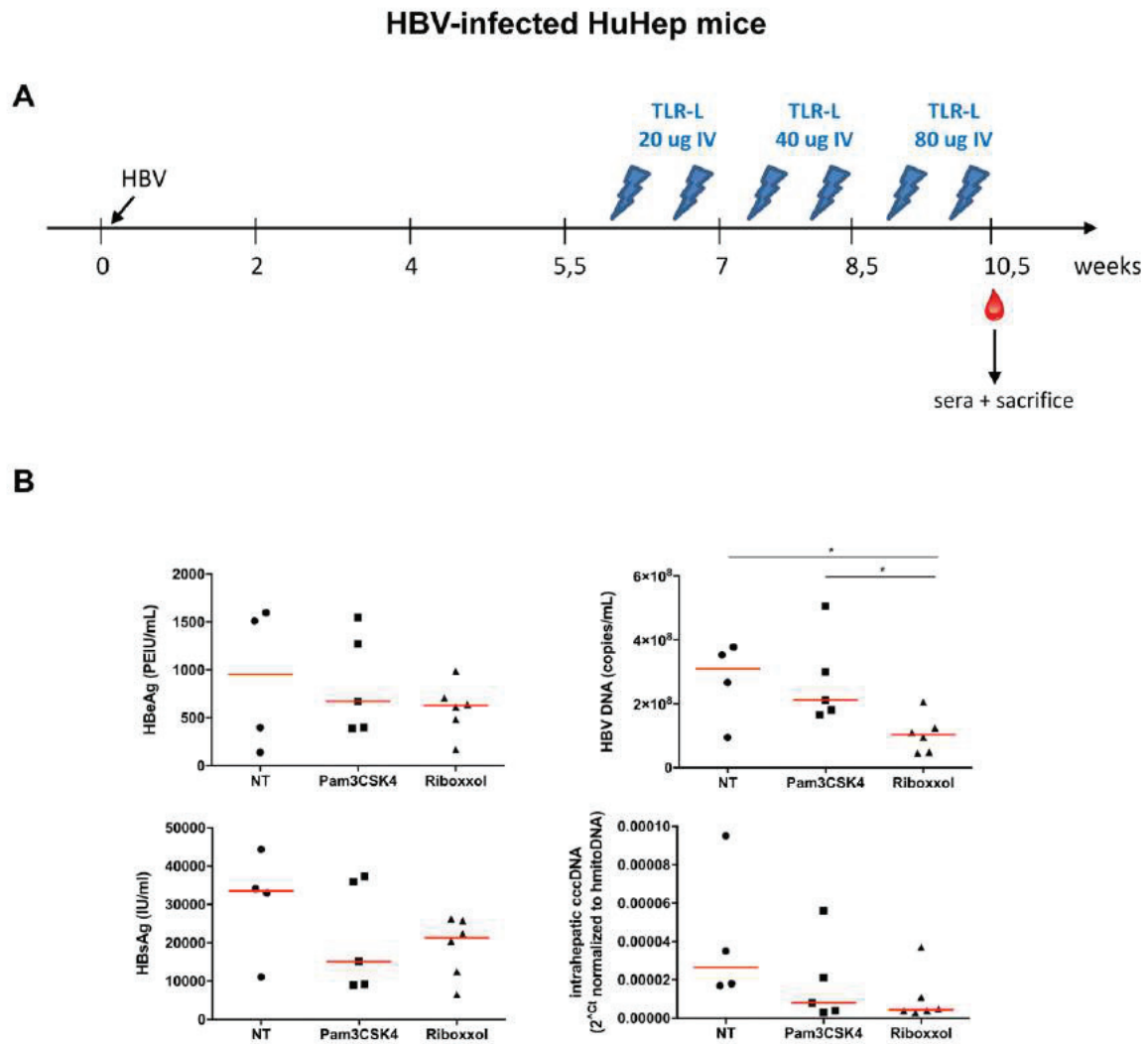


Figure S9: **Effect of Pam3CS4K and Riboxol in HBV-infected HuHep mice.** HuHep mice were infected IP with HBV and treated IV with TLR-L (Pam3CSK4 or Riboxol) or not (NT; no treatment) (A) according to the scheme. Mice were sacrificed after 3 weeks of treatment and (B) levels of HBV markers (HBeAg, HBsAg, viremia and intrahepatic HBV cccDNA) were assessed by ELISA, qPCR or RT-qPCR. Each dot represents one animal and red lines the median from the 4-5 animals.

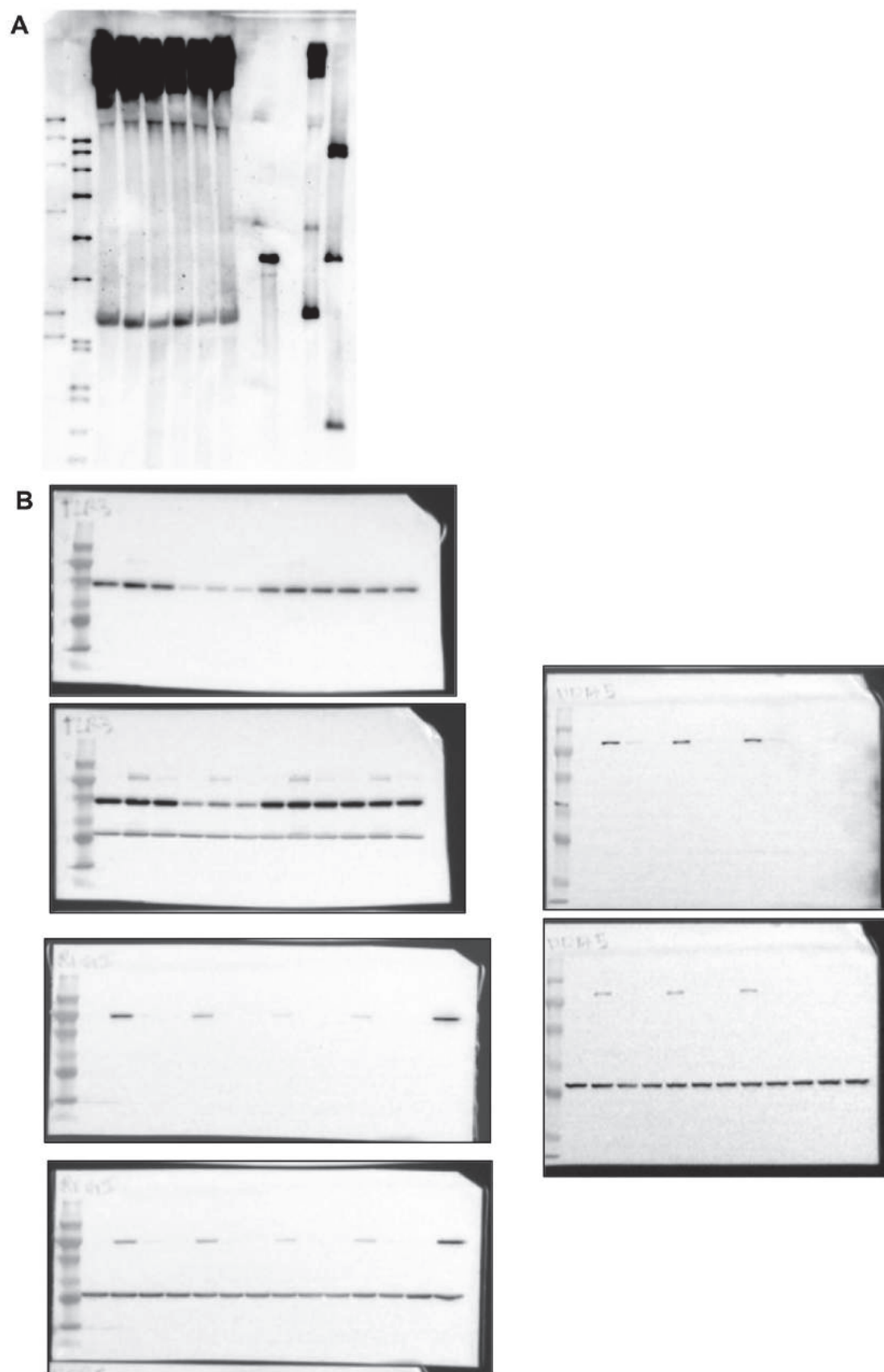


Figure S11: **Full blots** from (A) fig S3A, (B) fig S5

Etude 3 : Interaction between Toll-Like Receptor 9-CpG Oligodeoxynucleotides and Hepatitis B Virus Virions Leads to Entry Inhibition in Hepatocytes and Reduction of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells

Ludovic Aillot, ^{a,b*} Marc Bonnin, ^{a,b*} Malika Ait-Goughoulte, ^c Nathalie Bendriss-Vermare, ^{a,b} Sarah Maadadi, ^{a,b} Laura Dimier, ^{a,b} Miroslava Subic, ^c Caroline Scholtes, ^{a,e} Isabel Najera, ^c Fabien Zoulim, ^{a,b,d,e} Julie Lucifora, ^{a,b} David Durantel. ^{a,b,d}

a INSERM, U1052, CNRS, UMR_5286, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon, France

b University of Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL1), Lyon, France

c Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-LaRoche, Basel, Switzerland

d LabEx DEVweCAN, Lyon, France

e Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France

* Contribution égale

Reçu le 23 Aout 2017

Renvoyé pour modification le 12 Septembre 2017

Accepté le 23 Janvier 2018

En ligne le 12 Février 2018



Interaction between Toll-Like Receptor 9-CpG Oligodeoxynucleotides and Hepatitis B Virus Virions Leads to Entry Inhibition in Hepatocytes and Reduction of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells

Ludovic Aillot,^{a,b} Marc Bonnin,^{a,b} Malika Ait-Goughoulte,^c Nathalie Bendriss-Vermare,^{a,b} Sarah Maadadi,^{a,b} Laura Dimier,^{a,b} Miroslava Subic,^e Caroline Scholtes,^{a,e} Isabel Najera,^c Fabien Zoulim,^{a,b,d,e} Julie Lucifora,^{a,b} David Duranfel^{a,b,d}

^aINSERM, U1052, CNRS, UMR_S286, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon, France

^bUniversity of Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL1), Lyon, France

^cRoche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland

^dLabEx DEVweCAN, Lyon, France

^eDepartment of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France

ABSTRACT We previously reported that Toll-like receptor 9 (TLR9)-CpG oligonucleotides could inhibit the establishment of hepatitis B virus (HBV) infections in hepatocytes. Our aim was to uncover the underlying mechanisms of this inhibition. HepaRG cells, RPMI-B lymphoblastoma cells, and primary plasmacytoid dendritic cells (pDCs) exposed to HBV and TLR9 ligands/agonists in various configurations were used. We observed an inhibition of HBV infection upon TLR9 stimulations only when agonist was applied during inoculation. This inhibition was independent of interleukin-6 (IL-6)/interferon-inducible protein 10 (IP-10) production as well as of TLR9 expression in hepatocytes. We further demonstrated an entry inhibition mechanism by showing a noncovalent binding of TLR9 agonist to HBV particles. Besides inhibiting HBV entry into hepatocytes, this biophysical interaction between HBV virions and TLR9 agonist was responsible for a reduction of alpha interferon (IFN- α) expression by pDCs. Interestingly, subviral particles composed of only HBsAg were able to genuinely inhibit the TLR9 pathway, without titrating TLR9 ligands. To conclude, our data suggest that synthetic TLR9-CpG oligonucleotides can strongly inhibit HBV entry by "coating" HBV virions and thereby preventing their interaction with cellular receptor. This titration effect of TLR9 agonist is also artifactually responsible for the inhibition of TLR9 engagement in pDCs, whereas a genuine inhibition of this innate pathway was confirmed with HBsAg subviral particles.

KEYWORDS hepatitis B virus, Toll-like receptor 9, hepatocytes, entry inhibition, plasmacytoid dendritic cells, agonist, plasmacytoid cells, Toll-like receptors

Hepatitis B virus (HBV) chronically infects 240 million people worldwide and represents one of the major etiologies for cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1, 2). The progression rate of chronicity is tightly linked with the maturity of the immune system, since 90 to 95% of infected newborns become chronic carriers, whereas only 5 to 10% of adults do (3). As HBV long-term persistence is characterized by subversion of both innate and adaptive immunity (4, 5), a better understanding of the underlying cellular and molecular mechanisms of this escape should help in defining new therapeutic strategies to reactivate the host immune system and control viral replication. Current front-line therapies include the use of nucleoside analogues to specifically inhibit viral reverse transcription and/or pegylated interferon alpha 2a or 2b (Peg-IFN-

Received 23 August 2017; Returned for modification 12 September 2017; Accepted 23 January 2018.

Accepted manuscript posted online 12 February 2018.

Citation Aillot L, Bonnin M, Ait-Goughoulte M, Bendriss-Vermare N, Maadadi S, Dimier L, Subic M, Scholtes C, Najera I, Zoulim F, Lucifora J, Duranfel D. 2018. Interaction between Toll-like receptor 9-CpG oligodeoxynucleotides and hepatitis B virus virions leads to entry inhibition in hepatocytes and reduction of alpha interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01741-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01741-17>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to David Duranfel, david.duranfel@inserm.fr. L.A. and M.B. contributed equally to this work.

α), which is a nonselective immune stimulator and generally poorly tolerated by patients. Both types of therapies do not lead to a very high percentage of HBsAg loss, which is considered a clinical endpoint marker for a functional cure (6). Besides Peg-IFN- α , another immunostimulator(s) could be envisaged to widen the anti-HBV arsenal (7).

Pattern recognition receptors (PRRs) are a class of proteins, including the Toll-like receptor (TLR) family, that recognize conserved microbial structures known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and activate the expression of major histocompatibility complex (MHC) proteins, costimulatory proteins, interferons, and proinflammatory cytokines, thus linking innate to adaptive immunity to resolve microbial infections (8). Toll-like receptor 9, one of the 10 members of the TLR family in humans, is mainly expressed by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs), has an endosomal subcellular localization, and recognizes unmethylated CpG DNA (9). Once activated, TLR9 dimerizes in the presence of its ligand and recruits the cytoplasmic MyD88 adaptor to activate the downstream signaling pathway that ultimately leads to the nuclear translocation of transcription factors, such as NF- κ B and IRF5/7, and modulation of the gene expression associated with interferon (IFN) and proinflammatory responses (8, 9).

TLR9 or TLR7 agonists (e.g., viral DNA or RNA) on pDCs lead to the production of IFN- α α 1 β proinflammatory cytokines (e.g., interleukin-6 [IL-6]), which contribute to the activation of both innate and adaptive responses to first control spreading and then clear viral infection (10). IFN- α has direct antiviral properties *per se* in virally infected cells by inducing the Jak/Stat pathway and the expression of numerous IFN-stimulated gene (ISG) proteins, bearing antiviral activities (11, 12). This strategy of *in vivo* agonization (i.e., stimulation with an agonist) by PRR agonists, in particular by TLR7 ligands (TLR7-L) to produce endogenous IFNs, has been recently described in animal models of HBV infection. Indeed, it was shown in both HBV-infected chimpanzees and woodchuck HBV (WHB)-infected woodchucks that the orally delivered TLR7 agonist GS-9620 was able to significantly reduce HBV viremia and HBs antigenemia, to reduce covalently closed circular DNA (cccDNA) expression, and to lead to anti-HBs seroconversion (13, 14). *In vivo* stimulation of TLR9 is also an envisaged strategy in the fields of cancer and infectious disease therapies (15, 16). TLR9 ligands (TLR9-L) are likely to be used in the HBV field as adjuvants for HBV vaccination (17–19) but have also been recently shown to induce an antiviral activity in animal models of HBV infection (20–22). However, regarding the latter, the antiviral effect obtained in the woodchuck model with a TLR9-L seems to be far less potent than that obtained with GS-9620 (14, 22). Interestingly, it was recently demonstrated that TLR9-L were able to induce the formation of a myeloid cell-derived lymphoid structure in the liver of mice, called iMATES, in which T lymphocytes can expand and mature to control chronic viral liver infections (23). The induction of such structures in the context of chronic HBV infection (CHB) could contribute to the restoration of anti-HBV immune response.

The relative lack of potency of TLR9-L could be due to HBV-mediated inhibition of the TLR9 receptor expression and/or downstream pathway. Indeed, several studies have proposed that, as part of its numerous strategies to escape immune responses, HBV could impair TLR9 expression and its pathway in pDCs, leading to a reduced production of IFN- α and costimulatory cytokines/chemokines (20, 24–27). However, the underlying molecular mechanism(s) of this viral evasion remains to be fully defined. It could be related either to the activation of a negative regulatory pathway by HBsAg binding to the regulatory receptor BDCA2 (25) or to the presence of inhibitory CpG within the HBV genome (20, 26) or due to a reduction of TLR9 expression (26). It is worth noting that most of the *ex vivo* experiments performed to date were done with peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-derived pDCs and not with liver-derived pDCs, which represents a major issue. Moreover, the use of cells derived from chronically infected patients is best suited to performing more relevant *ex vivo* experiments. Such experimental drawbacks are often at the origin of controversies regarding the impact of HBV on innate immune cell function in the context of CHB (28). This was well

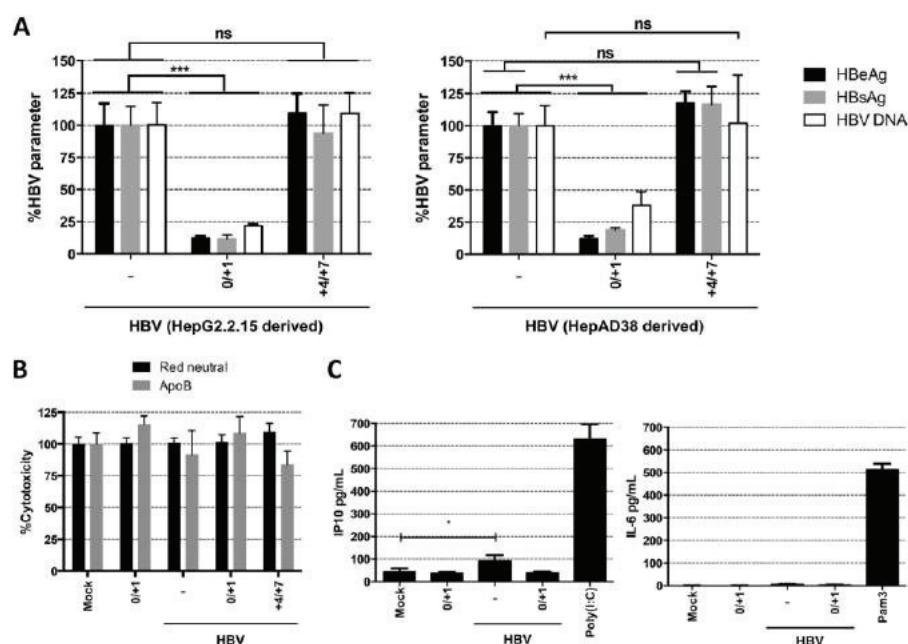


FIG 1 CpG ODN 2395 inhibits the establishment of HBV infection in dHepaRG cells. (A) dHepaRG cells were either mock infected or infected with HepG2.2.15 cell-derived (left panel) or HepAD38 cell-derived (right panel) HBV (100 vge/cell). CpG ODN 2395 was added (or not [- condition]) at 2 μ M either during HBV inoculation (0/+1 condition; CpG is then washed away at the end of the inoculation period) or after 4 days of infection and until harvesting of supernatant and intracellular material (+4/+7 condition). HBeAg and HBsAg secretion was monitored by ELISA, and HBV DNA intracellular accumulation was monitored by qPCR. (B) Neutral red assay and monitoring of ApoB secretion were performed under the same conditions as those in panel A to check toxicity and impact of treatment on cell differentiation. (C) The secretion of IP-10 and IL-6 was monitored by ELISA 1 day after stimulation with CpG ODN 2395 of dHepaRG cells that were infected or not. Pam3CSK4 and poly(I:C)-HMW were used as positive controls for the production by dHepaRG cells of IP-10 and IL-6, respectively. Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays using two different batches of HBV, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***). ns, not significant.

exemplified in the case of CD14⁺ myeloid dendritic cells (29, 30). Therefore, further studies are needed to better understand this potential HBV-mediated inhibition of the TLR9 pathway to improve the potential development of TLR9-L-based immunotherapeutic strategies.

We previously observed that a TLR9 agonist (CpG oligodeoxynucleotide [ODN] 2395) and its negative control (i.e., GpC ODN) were surprisingly both able to inhibit HBV replication in differentiated HepaRG cells (dHepaRG) when the ligands were applied during an early step of infection (i.e., overnight [ON] virus inoculation) and maintained throughout the experiment (31). As this antiviral effect seemed independent of the innate engagement of TLR9 and therefore of any cytokine production, our initial hypothesis was that TLR9 could interfere with HBV entry. Here, we wanted to get further insights on the underlying molecular mechanisms of this inhibition.

RESULTS

Treatment of dHepaRG cells with CpG ODN 2395 during HBV inoculation leads to strong antiviral effect, irrespective of cytokine secretion. Differentiated HepaRG (dHepaRG) cells were treated with 2 μ M CpG ODN 2395 either during HBV inoculation (0/+1 conditions, i.e., CpG ODN mixed with HBV inoculum) or 4 days after the onset of HBV infection, when viral replication was already established (+4/+7 conditions). HepG2.2.15-derived (Fig. 1A, left) or HepAD38-derived (Fig. 1A, right) HBV inocula were

used for experiments. Levels of secretion of HBV viral proteins (HBeAg/HBsAg) as well as the intracellular HBV DNA accumulation were analyzed at day 7 postinfection (p.i.). A strong inhibition of HBeAg and HBsAg secretion, as well as of intracellular HBV DNA accumulation, was observed only under the 0/+1 conditions and not after the infection was established (+4/+7 conditions) (Fig. 1A), thus suggesting that CpG ODN 2395 interfered with early steps of the viral life cycle. Moreover, this antiviral effect was due neither to TLR9-induced cytotoxicity nor to dHepaRG dedifferentiation, as shown, respectively, by neutral red assay and ApoB enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 1B), the latter being used as a surrogate marker of hepatocyte differentiation in the dHepaRG model (32).

Treatment of mock- or HBV-infected dHepaRG cells with CpG ODN 2395 for 24 h did not produce interferon-inducible protein 10 (IP-10) or IL-6, unlike when cells were treated with positive-control TLR1/2 ligands (Pam3CSK4) or TLR3 ligands [poly(I:C)-HMW] (Fig. 1C), suggesting that the observed antiviral effect is independent of the production/secretion of these cytokines in supernatants. Similar results were obtained with primary human hepatocytes (see Fig. S1 in the supplemental material), thus indicating that the inhibitory phenotype is not dependent on cell type.

Importantly, the antiviral effect was also observed when other TLR9-L, i.e., CpG ODN 2006, CpG ODN 2216, or the GpC ODN 2395 negative control, were used (Fig. S2). These data indicate that the antiviral effect can be obtained with all types (A, B, and C, as well as control GpC) of prototypic deoxynucleotide synthetic TLR9 ligands and is independent of any CpG ODN-mediated cytokine secretion. Moreover, an inhibition was also observed with CpG-rich plasmid DNA as well as with human genomic DNA (Fig. S2), thus suggesting that many types of CpG containing DNA could derive this antiviral effect.

The CpG ODN 2395-induced anti-HBV effect is TLR9 independent. As TLR9 is the cognate receptor for CpG ODN 2395, we sought to determine the basal TLR9 protein expression level in dHepaRG cells, compared to two TLR9-positive cell lines, i.e., 293-TLR9 and RPMI-B cells. We had previously shown that TLR9 is only poorly expressed at RNA level in hepatocytes and that receptor engagement does not lead to cytokine production (31). As TLR9 expression had been already described in transformed hepatocytes and during hepatocellular carcinogenesis (33), we went further in the analysis by definitely showing that dHepaRG cells, which are not transformed, express neither TLR9 mRNA (Fig. 2A) nor full-length TLR9 protein, as measured by Western blot analysis (Fig. 2B and C) and by TLR9 intracellular fluorescence-activated cell sorting (FACS) labeling (Fig. 2D). However, a modest shift of the signal with anti-human TLR9 (anti-huTLR9) antibody was observed in the TLR9-negative 293T cells and in dHepaRG cells compared to the isotypic control antibody, suggesting that 293T and dHepaRG cells may express very low levels of TLR9 protein, which would not be detected by Western blot analysis, or, more likely, that monoclonal antibody (MAb) TLR9 has somehow aspecific reactivity. In order to evaluate the latter, we performed small interfering RNA (siRNA)-TLR9 (or siRNA-control) transfection in HEK-293T, HEK-293-TLR9, and dHepaRG cells and FACS analyses. The efficacy of siRNA-TLR9 on its target is shown in Fig. 3A and B. No shift backward of the MAb-TLR9 reactivity in HEK-293T and HepaRG cells in the presence of siRNA-TLR9 was observed compared to that obtained in HEK-293-TLR9 cells (Fig. 2D), demonstrating that the low signal detected in these cells is not specific.

If TLR9 is not detectable and is nonfunctional at basal level in dHepaRG cells, we nevertheless wanted to investigate whether its expression could be induced by HBV infection or treatment with its agonist or IL-1 β , a cytokine known to induce the NF- κ B pathway, which regulates the *TLR-9* gene. In dHepaRG cells, none of these conditions led to a detectable expression of TLR9 (Fig. 3C). While siTLR9 is specific in targeting the TLR9 mRNA in the 293-TLR9 cell line (Fig. 3A and B) and siRNA transfection works well in dHepaRG cells, as demonstrated with the capacity of siHBV to reduce HBeAg and HBsAg secretions (Fig. 3D) and intracellular DNA (Fig. S3), siTLR9 transfection did not have any antiviral effect against HBV in the presence or absence of CpG ODN 2395

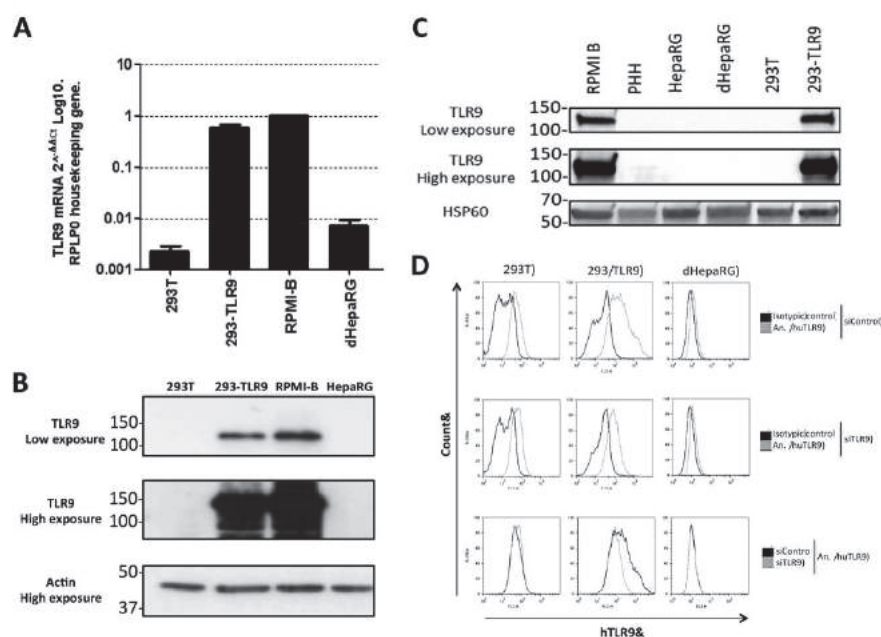


FIG 2 dHepaRG cells do not express TLR9. (A) Total RNA was extracted from dHepaRG cells as well as control cell lines (HEK-293T, HEK-293-TLR9, and RPMI-8) and was analyzed for *TLR9* mRNA expression by RT-qPCR with *TLR9* and control primers. (B and C) Proteins were extracted from dHepaRG cells as well as control cell lines (HEK-293T, HEK-293-TLR9, RPMI-8, PHH, and undifferentiated HepaRG) and were analyzed for TLR9 protein expression by Western blotting (50 mg of protein loaded/lane into SDS-PAGE gel) using anti-TLR9 and antiactin antibodies. Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***). Numbers at left of gels are molecular masses in kilodaltons. (D) FACS analyses were done on indicated cell lines that were transfected 48 h before with either control or TLR9-targeting siRNAs.

agonization, like that observed with control siRNA (i.e., siHCV) (Fig. 3D; also Fig. S3). Collectively, these data demonstrate that TLR9 itself does not have any role in the CpG ODN 2395-mediated anti-HBV effect.

CpG ODN 2395 cosediments with HBV Dane particles in an iodixanol gradient.

Next, we investigated whether the antiviral effect of CpG ODNs could be due to an interaction between the virus and CpG ODN molecules. We performed an ultracentrifugation experiment in an iodixanol gradient (see linearity of gradient in Fig. S4A) 4 h after incubation at 37°C of the virus with 2 μ M CpG ODN 2395-fluorescein isothiocyanate (FITC). HBV DNA could be detected (by nonradioactive probes after dot blotting) within fractions 10 to 19 for the conditions containing the virus, with a maximum intensity in fraction 17 (Fr17) corresponding to the density of Dane particles (i.e., 1.18 g $\cdot$ cm⁻³) (34). The distribution of HBV DNA in the gradient was the same for the condition CpG ODN 2395-FITC plus HBV, thus indicating that the mixture with CpG ODN 2395-FITC did not overall alter the density of particles. However, in Fr16 to Fr19 corresponding to the density of the HBV Dane particles and where HBV DNA is detected at the highest levels, 2395-FITC fluorimetry intensity was about three times higher and 2395-FITC sedimented better in fractions above 1.18 g $\cdot$ cm⁻³ (i.e., Fr18 and Fr19) when incubated with HBV compared to the condition 2395-FITC alone (Fig. S4B). This result was the first indication that CpG ODN 2395 could physically interact with HBV, leading to their cosedimentation in the iodixanol gradient. This interaction of CpG with HBV virions could be the main mechanism of the inhibition of viral entry and subsequent infection in dHepaRG cells.

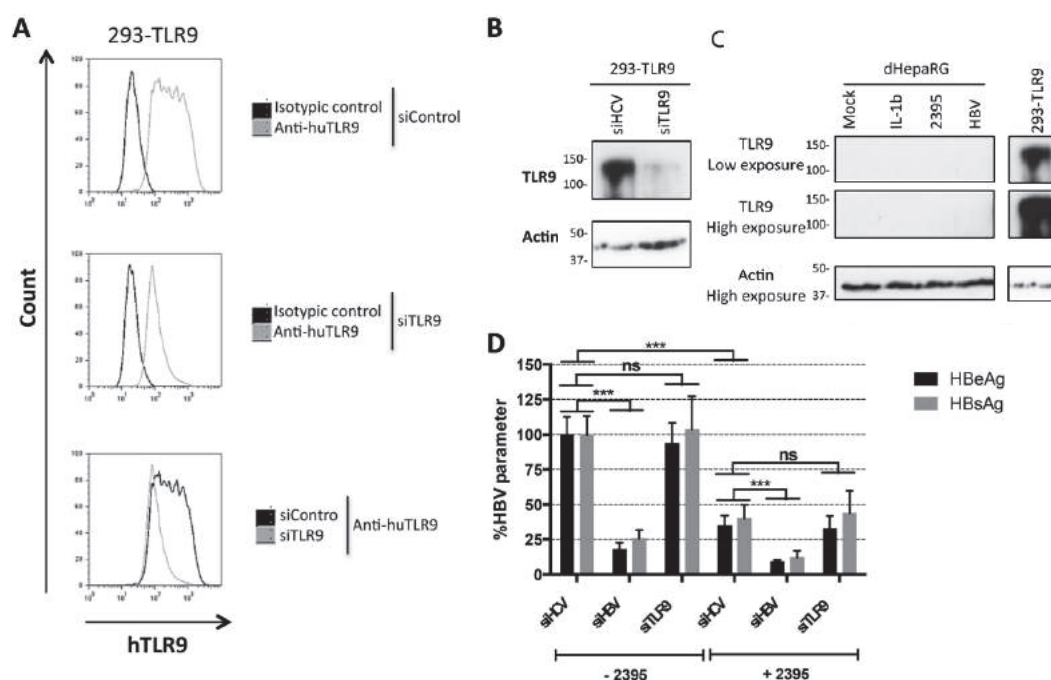


FIG 3 CpG ODN 2395-mediated anti-HBV effect is independent of TLR9. (A and B) The efficacy of siRNA-TLR9 on its target was verified by FACS and Western blotting analyses on HEK-293-TLR9 cells. (C) The Western blot assay was performed as described for Fig. 2B but using protein extracts coming from either untreated, HBV-infected (100 vge/cell for 24 h), CpG ODN 2395-treated (2 μ M for 24 h), or IL-1 β -treated (1 mg/ml for 24 h) dHepaRG cells. (D) Differentiated HepaRG cells were transfected with siRNA targeting either HBV, TLR9, or hepatitis C virus (HCV; siRNA used as control here) for 48 h before being infected with HBV (100 vge/cell) in the presence or absence of 2 μ M CpG ODN 2395. Replication levels were evaluated and normalized to neutral red cytotoxicity relative to siHCV by monitoring HBeAg and HBsAg secretion in supernatant after 7 days of infection. Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***). ns, not significant. Numbers at left of gels in panels B and C are molecular masses in kilodaltons.

Functional consequences of CpG ODN 2395 and HBV interplay. In order to study the functional consequences of the interplay between CpG ODN 2395 and HBV, we incubated (or not, i.e., mock condition) the virus (an equivalent of 10^9 virus genome equivalents [vge]; two types of inoculum, HepG2215- and HepAD38-derived virus) with 2 μ M CpG ODN 2395 for 4 h at 37°C in a 2-ml total volume before loading onto an ultrafiltration column. A control containing only CpG ODN 2395 was also processed. A 100-kDa-cutoff ultrafiltration column was used, as it was expected to retain HBV particles and subparticles but let free CpG ODNs (molecular mass = 7,100 g/mol) pass through the filter. After filtration/retention, a final retained volume of 200 μ l was harvested and diluted back to 2 ml to obtain the initial HBV amount and a free CpG ODN 2395 concentration at 0.2 μ M, before it was used for dHepaRG infection. While incubating the virus with 2 μ M CpG ODN 2395 highly inhibits the infection, as seen in Fig. 1A, incubating the virus with a low CpG concentration (0.2 μ M) had a very modest antiviral effect (Fig. 4A and B and S5; compare groups of bars 1 and 2 in each panel). Moreover, filtration retention of HBV alone does not reduce infection efficiency (Amicon-mock condition), demonstrating that the column does not capture the virus onto the filter through aspecific interactions. However, incubating the virus with 2 μ M CpG ODN 2395 before concentration and resuspension strongly inhibited the infection (Amicon-2395 0.2 μ M condition in Fig. 4A and B and S5). These results also support the hypothesis that the antiviral effect of CpG ODN molecules may be due to direct

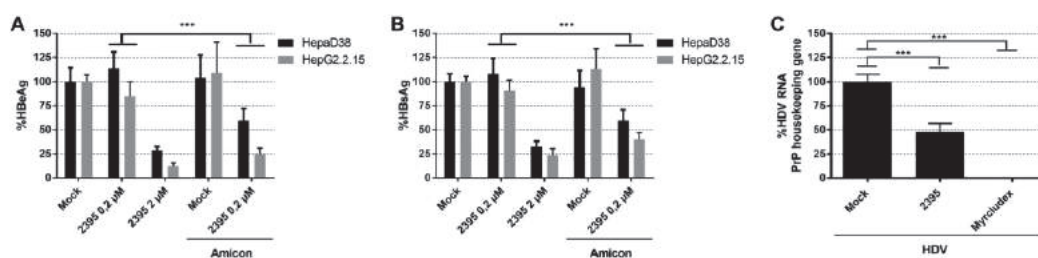


FIG 4 CpG ODN 2395 coating of HBV infectious particles is responsible for the inhibition of the establishment of infection. (A and B) dHepaRG cells were inoculated for 24 h with HepG2.2.15-derived or HepAD38-derived HBV at 100 vge/cell in the presence of 0 (i.e., mock), 0.2, or 2 mM CpG ODN 2395, and then inoculum was removed and cells were washed and left for 7 days before HBeAg (A) and HBsAg (B) were monitored in the supernatant. Results of this part of the experiment are represented in the 3 left pairs of bars in each graph. For the two remaining pairs of bars of each graph (noted with underlining and "Amicon"), HBVs (2.5×10^6 vge) were incubated (or not [Mock]) for 4 h at 37°C with 2 μM CpG ODN 2395 before filtration/retention on a 100-kDa-cutoff Amicon column. Then, the retained fraction in the upper compartment of the system was diluted 10 times, leading to a theoretical 0.2 μM final concentration of CpG ODN 2395 before infection was done at a theoretical MOI of 100 vge/cell to ensure the same infection conditions as those for control nonfiltered/retained conditions. (C) dHepaRG cells were inoculated with HDV (MOI of 10 vge/cell) that was mock incubated or preincubated with CpG ODN 2395 (2 mM) or myristolux (100 nM). Twenty-four hours later, inoculum was removed and infection was left to proceed for 6 days. Intracellular HDV RNA was quantified by RT-qPCR, relative to the *PIP* housekeeping gene, as previously described (46). Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***).

interactions with HBV infectious particles or with the viral receptor, thereby preventing their entry.

To further ascertain this, we used the hepatitis delta virus (HDV), which enters cells by the same molecular process but postentry replicates differently than HBV in hepatocytes. HDV is used as a surrogate virus to study HBV entry (35). When added to HDV during inoculation, CpG ODN 2395 at 2 μM led to a 50% reduction of the entry of the virus. This inhibition was less potent than that observed with a very strong entry inhibitor (i.e., myristoylated pre-S1 peptide [amino acids (aa) 2 to 48] myristolux) but was significant and in the same range as that observed with HBV (Fig. 4C). Moreover, competition experiments done by FACS with CpG ODN 2395-FITC, myristolux, and HBV showed that a preexposure to the pre-S1 peptide (which binds to cells specifically via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide [hNTCP]) impaired the binding of CpG ODN 2395-FITC to HepaRG cells, thus suggesting that the TLR9-L somehow binds to cells, at least partially, via the HBV entry receptor hNTCP (Fig. S6). This could contribute to the overall inhibitory phenotype observed.

Noncovalent interaction between CpG ODN 2395 and HBV "titrates" the ligand. We reasoned that if CpG ODN 2395 is binding/interacting with HBV virions, then it should be retained in the upper chamber of the column, and its concentration in the flowthrough fraction should be reduced; this reduction of concentration should be associated with a reduced capacity to agonize its receptor in TLR9-positive cells and lead to a weaker production of IL-6 cytokines by these cells. To check this hypothesis, CpG ODN 2395 at 2 μM was incubated or not (mock) with HBV inoculum for 4 h at 37°C in a total volume of 2 ml. After filtration/retention, the flowthrough fraction was diluted several times to achieve a theoretical 1.5 to 0.5 μM final concentration before stimulating RPMI-B cells. We observed that the flowthrough activated fewer RPMI-B cells in a dose-dependent manner when CpG ODN 2395 was incubated with the virus than under the condition of CpG ODN 2395 alone (Fig. 5). To ensure that this "titration" effect was not due to the polyethylene glycol (PEG; usually used for concentrating HBV) or to the origin of virus (stably transformed cell lines), we performed the titration of CpG ODN 2395 with three HBV preparations, i.e., two PEG-precipitated preparations obtained from either HepG2.2.15 or HepAD38 cells and the other concentrated with a 100-kDa-cutoff Centricon centrifugal filter. We observed that the non-PEG-precipitated HBV inoculum was also able to "titrate" CpG ODN 2395, demonstrating that the PEG used for virus concentration as well as the cell line origin of viruses is not responsible for interaction between HBV and TLR9-L (Fig. 5).

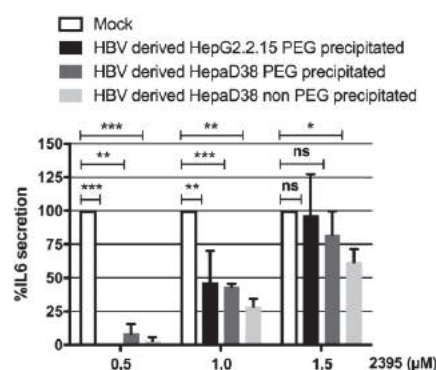


FIG 5 CpG ODN 2395 is titrated by HBV, thus explaining reduced stimulation of RPMI-B cells. As in Fig. 4, 2 μM CpG ODN 2395 was incubated (or not [Mock]) with HBV (2.5×10^9 vge) in RPMI 1640 medium for 4 h at 37°C before filtration/retention on a 100-kDa-cutoff Amicon column. Flowthrough fractions were serially diluted in a final volume of 200 ml in RPMI 1640 medium to obtain theoretical final concentrations of 0.5, 1, and 1.5 μM CpG ODN 2395. These dilutions were used to stimulate 10^5 RPMI-B cells for 24 h before IL-6 ELISA measurement. The experiment was performed with three different lots of viral inocula prepared either by PEG precipitation or by Centricon concentration (noted as "non PEG") and produced by either HepG2.2.15 or HepaD38 cells. Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays for each HBV inoculum, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***). ns, not significant.

Titration of TLR9-L by HBV is responsible for the lower stimulation of pDCs in *ex vivo* experiments. Several studies have already shown *ex vivo* that HBV could readily (as fast as in 2 h) inhibit TLR9 but not TLR7 signaling in PBMCs and pDCs isolated from naive donors, thus suggesting that the *in vivo* inhibition could be recapitulated *in vitro* (25–27, 36). In these studies, the impact of HBV on the production of TLR9-L-mediated IFN- α was analyzed by mixing HBV inoculum with TLR9-L. If our hypothesis is correct, we could expect a correlation between the TLR9-L titration by HBV and the reduction of IFN- α expression in pDCs.

Plasmacytoid DCs were purified from PBMCs isolated from disease-free blood donors, and their purity and functionality were checked by FACS (Fig. S7). Using FITC-CpG ODN 2395, we first looked at the delivery of the ligands to pDCs and found that it was greatly impaired in the presence of increasing amounts of HBV (Fig. 6A), thus suggesting that less TLR9-L was delivered and made available for TLR9 stimulation within the endosomal compartment. To get functional insights, pDCs were incubated with HBV (full inoculum, i.e., containing both infectious particles and subviral particles [SVPs]) or a mock inoculum for 2 h and then either extensively washed to remove excess virus or not washed before stimulation of cells with CpG ODN 2395 for 6 h and performance of reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) analysis on IFN- α expression. We found that the removal of HBV inoculum before stimulation with TLR9-L reverted the inhibitory phenotype observed otherwise (Fig. 6B), thus confirming the hypothesis of a direct interaction between the agonist and the HBV particles. The level of expression of TLR9 was verified in pDCs exposed to HBV or not to ascertain that the difference in IFN- α expression could not be due to reduced expression of the sensors (Fig. 6C).

Subviral particles containing mainly HBsAg can nevertheless inhibit IFN- α expression irrespective of the titration effect. So far, our results point toward an artifactual inhibition of TLR9-L-mediated IFN- α expression in pDCs by HBV. However, one has to keep in mind that the virus circulates *in vivo* as a mixture of infectious particles (i.e., Dane particles, containing nucleocapsids) and SVPs (i.e., capsid-free particles); the latter are also richer in their content of HBsAg and weaker in pre-S1 and

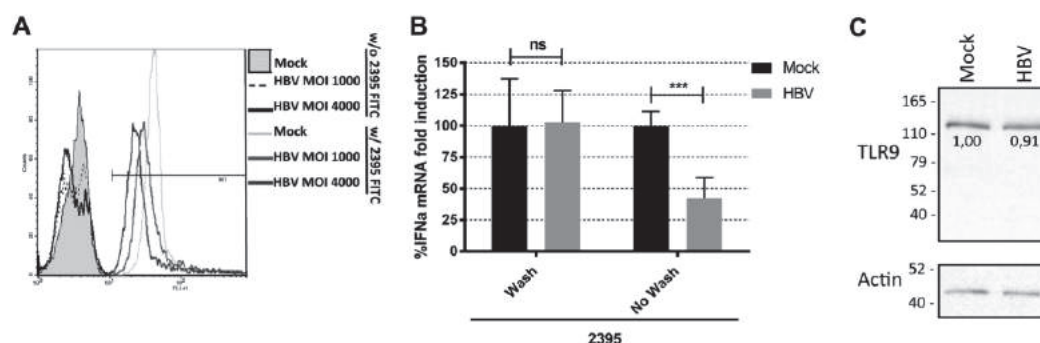


FIG 6 The “titration effect” is responsible for the impaired delivery of CpG ODN 2395 and lack of IFN- α expression induction in primary pDCs. (A) CpG ODN 2395-FITC (noted as w/2395 FITC) or buffer (noted as w/o) was premixed with increasing amounts of HBV (0, 1,000, or 4,000 vge/cell) before being incubated with primary pDCs (40,000 cells), as described in Materials and Methods before FACS analysis, to evaluate CpG ODN 2395-FITC delivery to cells. (B) Primary pDCs (40,000 cells in a final volume of 200 μ l) were exposed or mock exposed to HBV (4,000 vge/cell) for 2 h and then either not washed (i.e., HBV not removed) and stimulated with CpG ODN 2395 (1 mM) or washed (i.e., HBV removed) and stimulated with CpG ODN 2395 (1 mM). After 6 h of exposure to CpG ODN 2395, total RNA was extracted and RT-qPCR was performed to monitor IFN- α expression (in comparison with the *RPLP0* housekeeping gene). Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***). ns, not significant. (C) Western blot analysis was performed with anti-TLR9 and antiactin antibodies, after SDS-PAGE was done with protein extracts of 100,000 pDCs exposed or not to HBV (4,000 vge/cell in a final volume of 450 μ l) for 8 h. Numbers at left are molecular masses in kilodaltons.

pre-S2 envelope proteins than Dane particles (34). SVPs are also present in blood in large excess compared to Dane particles (i.e., ratio between 1,000 and 100,000). The serum concentration of HBsAg can reach hundreds of micrograms per milliliter in infected patients, which represents a tremendous amount of viral proteins. In our experimental setting, with full HBV inoculum, we used up to 4,000 virus genome equivalents/cell as the maximum multiplicity of infection (MOI); this corresponded to a concentration of only around 200 ng/ml of HBsAg. To reconcile data that we and others obtained, we examined whether the titration leading to the inhibitory effect with HBV virions could occur with recombinant SVPs containing only HBsAg and no pre-S1/pre-S2. We found (i) that SVPs were not able to titrate CpG ODN 2395 (Fig. 7A and B); (ii) that they were not able to prevent entry of FITC-CpG ODN 2395 into primary pDCs (Fig. 7C); and (iii) that they could inhibit, in the absence of significantly decreased expression of TLR9 (Fig. 7D), IFN- α expression in pDCs by 50% when used at a physiological concentration of 5 μ g/ml (Fig. 7E). The latter result suggests that HBV, via HBsAg, would be able to inhibit TLR9 functions in pDCs and that this inhibitory phenotype could be recapitulated *ex vivo* using naive primary pDCs freshly exposed to the viral antigen.

To go further in the demonstration, we selected 9 HBV-positive patients (Table 1 gives patient characteristics) and 5 noninfected controls. Fifteen milliliters of blood could be obtained from each individual. As we could not purify pDCs from such a small amount of blood, we first verified that IFN- α expression in isolated PBMCs was mainly due to pDC content by showing that the slopes of IFN- α expression between 3 and 6 h after induction with CpG ODN 2395 were similar in isolated PBMCs and pDCs, as well as by depletion experiments (Fig. S8). Having established this, we used freshly isolated PBMCs for further experiments to indirectly access phenotypes on pDCs. The basal level of IFN- α expression measured in 100,000 PBMCs was higher in healthy donors than in HBV-infected patients, thus suggesting a basal reduction of IFN- α expression in the absence of stimulation in patients (Fig. 8A). As the process of purifying PBMCs from HBV-infected patients was associated with the loss of HBsAg (data not shown), we undertook experiments in which recombinant HBsAg was “added back” concomitantly to CpG ODN 2395 stimulation to determine whether the same inhibitory phenotype as that observed in Fig. 7 with pDCs from naive donors would be obtained with pDCs from patients. A strong inhibition of IFN- α expression was observed with PBMCs from both

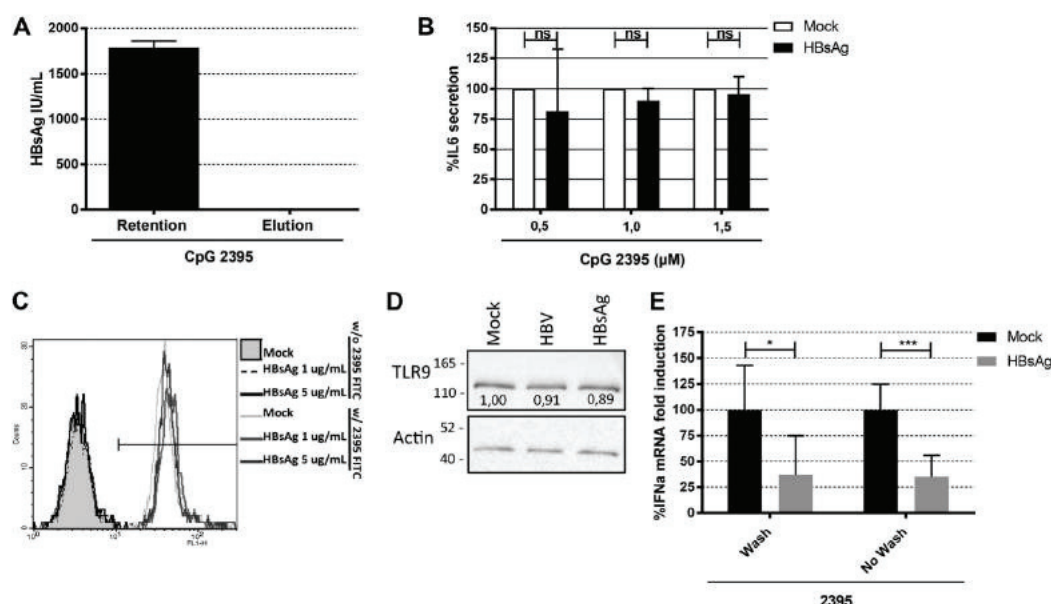


FIG 7 HBV subviral particles do not titrate CpG ODN 2395 and inhibit the IFN- α expression induction in primary pDCs. Two micromolar CpG ODN 2395 was incubated with 5 μ g/ml of HBsAg (i.e., equivalent amount of HBsAg found in an HBV inoculum of about 100,000 vge) in RPMI 1640 medium for 4 h at 37°C before filtration/retention on a 100-kDa-cutoff Amicon column. (A) HBsAg was quantified in the retained and flowthrough fractions by ELISA. Results are given as means for three independent assays. (B) Flowthrough fractions were serially diluted in a final volume of 200 μ l in RPMI 1640 medium to obtain theoretical final concentrations of 0.5, 1, and 1.5 μ M CpG ODN 2395. These dilutions were used to stimulate 10^5 RPMI-B cells for 24 h before IL-6 ELISA measurement. Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for six independent assays. ns, not significant. (C) CpG ODN 2395-FITC (noted as w/2395 FITC) or buffer (noted as w/o) was premixed with increasing amounts of HBsAg before being incubated with primary pDCs (40,000 cells) as described in Materials and Methods before FACS analysis to evaluate CpG ODN 2395-FITC delivery to pDCs. (D) Western blot analysis was performed with anti-TLR9 and antiactin antibodies, after SDS-PAGE was done with protein extracts of 100,000 pDCs exposed or not to HBsAg (5 mg/ml in a final volume of 450 μ l) for 8 h. Numbers at left of gel are molecular masses in kilodaltons. (E) Primary pDCs (40,000 cells in a final volume of 200 μ l) were exposed or mock exposed to HBsAg (5 mg/ml) for 2 h and then either not washed (i.e., HBsAg not removed) and stimulated with CpG ODN 2395 (1 mM) or washed (i.e., HBsAg removed) and stimulated with CpG ODN 2395 (1 mM). After 6 h of exposure to CpG ODN 2395, total RNA was extracted, and RT-qPCR was performed to monitor IFN- α expression (in comparison with the *RPLP0* housekeeping gene). Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***).

HBV patients and healthy donors (Fig. 8B). This inhibition was stronger at 3 h after CpG ODN 2395 stimulation than at 6 h and was HBsAg dose dependent. As previously shown, the inhibition was also very potent with HBV in the context of CpG ODN 2395 "trapping." Importantly, these differences were not due to changes in the level of TLR9 expression (Fig. 8C and D).

DISCUSSION

With the urgent need to discover new therapies to treat CHB patients and reach functional cure, the development of drugs that activate innate immunity represents a very promising approach, as recently exemplified by the interesting results obtained in animal models of HBV infections (i.e., chimpanzees and woodchucks) with an orally delivered TLR7 agonist (GS-9620) (13, 14). TLR9 agonists hold also high therapeutic potential for solid cancer and chronic infections with their ability to enhance both innate and adaptive antitumoral/antiviral responses; in this respect, some TLR9-L (e.g., PF-3512676 and ISS-1018) are being tested in clinical trials as immunotherapy for cancer (21, 37–39).

TLR9-L have also been tested in animal models of CHB infections. In HBV transgenic mice, hydrodynamically infected mice, and WHV-infected woodchucks, some anti-HBV activity has been described (20, 22, 40). However, the efficacy of such an approach

TABLE 1 Virological and biological characteristics of patients with chronic HBV infection^c

Identifier	Age (yr)	HBsAg (IU/ml)		HBeAg (NCU/ml) ^a	HBV DNA IU/ml ^b	vge/ml ^b	No. of leukocytes (10e9/liter)	No. of platelets (10e9/liter)	Enzyme concn (units/liter)				Bilirubin (μmol/liter)	TP (%)	Albumin (g/liter)	Fibrosis ^d
		Hospital ^e	Laboratory ^b						ASAT	ALAT	PAL	GGT				
P1	51	790	588	Neg	5.22e2	2.61e3	5.66	181	20	24	82	49	9	107	40	F1
P2	34	52	44	Neg	9.72e2	4.80e3	6.41	269	16	20	58	17	7	122	38	F0
P3	43	430	157	Neg	2.86e2	1.43e3	7.92	341	20	28	60	25	8	123	47	F0
P4	28	100	143	Neg	8.03e2	4.02e3	6.64	224	25	36	60	19	9	89	46	F1
P5	33	47	23	Neg	2.63e2	1.32e3	5.69	301	35	40	68	36	7	112	49	F1
P6	35	39,000	22,310	1,493.49	3.89e8	1.94e9	5.02	270	26	35	64	25	13	107	45	F1
P7	46	61,000	31,285	1,564.16	>1e9	>5e9	7.16	193	21	31	51	17	6	83	58	F1
P8	20	88,000	45,183	1,394.6	4.08e8	2.04e9	6.14	240	46	84	117	38	11	103	43	F2
P9	21	25,000	19,856	1,510.91	5.12e8	2.56e9	4.84	189	22	18	54	23	5	79	44	F2

^cQuantification done at hospital.^bQuantification done in the laboratory.^aAbbreviations: NCU, normalized control unit; ASAT, aspartate aminotransferase; ALAT, alanine transaminase; PAL, alkaline phosphatase; GGT, gamma-glutamyltransferase; TP, level of prothrombine.^dFibrosis level: F0, none; F1, mild; F2, severe.

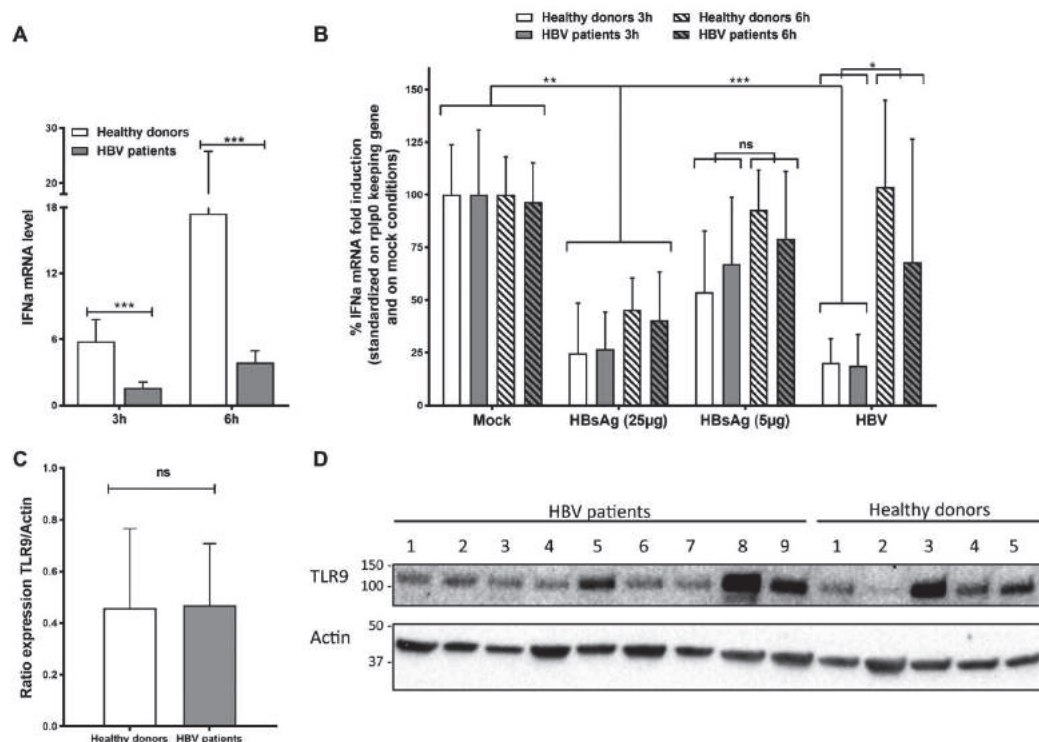


FIG 8 HBsAg-mediated inhibition of IFN- α expression is not exacerbated *ex vivo* according to *in vivo* HBsAg status. PBMCs were freshly purified from 15 ml of blood taken from healthy donors and either HBsAg-high or HBsAg-low HBV-infected patients. (A) RNA was extracted at 3 and 6 h after PBMC purification from 100,000 cells for each category, and IFN- α expression was monitored by RT-qPCR to determine basal level of expression. (B) Freshly purified PBMCs (100,000 cells), isolated from healthy donors and HBV-infected patients, were simultaneously exposed to CpG ODN 2395 (1 mM) and either mock, HBsAg (either 25 or 5 μ g/ml), or HBV (1,000 vge/cells). At either 3 or 6 h postexposure, RNA was extracted and IFN- α expression was monitored by RT-qPCR (in comparison with the *RPLP0* housekeeping gene). Results are given as mean $\pm$ standard error of the mean for three independent assays, and differences from the control condition were considered statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***), ns, not significant. (C) Relative quantification of signals from panel D from each category of PBMCs. (D) Western blot analysis was performed with anti-TLR9 and antiactin antibodies, on protein extracts from PBMCs (6×10^6 cells) isolated from indicated types of patients/individuals. Numbers at left are molecular masses in kilodaltons. Each lane refers to an individual patient or donor.

could be compromised by the fact that HBV might have evolved strategies to inhibit TLR9 functions. A few studies have indeed pointed out that HBV could inhibit the production of IFN- α by pDCs via mechanisms that could involve (i) HBsAg binding to regulatory receptor BDCA2, (ii) the presence of inhibitory CpG islands within the HBV genome, or (iii) inhibition of the expression of TLR9 itself (20, 25–27, 36). One study has also reported that HBV could impair cross talk between pDC and NK cells, and eventually NK/NKT cytotoxic activities, by a direct (via HBsAg) and indirect (i.e., IP-10-mediated) inhibition of both IFN- α and OX40L expression in pDCs (36). Despite these studies, we are far from understanding all the underlying mechanisms of these potential inhibitions. This is, at least in part, due to the difficulty of working with human samples from cohorts of CHB patients at different stages of disease and in particular with immune cells from the liver compartment. Progress has been made possible thanks to our ability to recapitulate the inhibitory phenotype *ex vivo* using primary pDCs isolated from noninfected PBMCs and exposed to HBV (mainly produced *in vitro* from cell lines and not derived from patients). However, the findings of this work lead us to mitigate results published with such an approach.

Indeed, we report here that CpG ODNs can dramatically impair the establishment of HBV infection in hepatocytes, while TLR9-L does not have any effect on HBV replication when already established (i.e., 4 days postinfection). The antiviral effect observed is associated neither with the expression of TLR9 nor with the production of cytokines such as IL-6 or IP-10. We showed that CpG ODNs in fact interfere with viral entry by binding noncovalently to HBV infectious particles and likely preventing their interactions with viral receptors. Such an interaction of short oligodeoxynucleotides with viral particles had been already observed with other viruses, including herpes simplex virus 1 (HSV-1) (41) and HIV; for the latter, it was shown that electrostatic interactions between positive residues of the variable v3 loop of the virus and the polyanionic chain of oligodeoxynucleotides were involved (42, 43). Cosedimentation of HBV with FITC-labeled CpG ODN 2395 in an iodixanol gradient suggests that CpG ODN 2395 could also physically interact with HBV. The semiquantification of CpG ODN 2395-FITC with HBV in cosedimentary fractions represents only 2% of the total amount of FITC signal and 39% of total HBV DNA. Yet under this experimental condition, we calculated that incubating HBV with 2 μ M CpG ODN 2395 leads to an HBV/2395 ratio of $1/6 \times 10^5$ molecules in the corresponding fractions. Interestingly, incubating CpG ODN 2395 at 0.2 μ M with HBV during the infection step leads to a very modest inhibition of infection (reduction of about 15% of HBeAg and HBsAg). One may speculate that the interaction between the Dane particle and ligand could be cooperative, as an excess of 6×10^4 molecules of CpG ODN 2395 when incubated at 0.2 μ M with HBV was not sufficient to inhibit infection establishment. It is important to note that, so far, we were not able to perform biophysical experiments to fully demonstrate the interaction between CpG ODNs and HBV particles and subparticles; such experiments will have to be done in the future to further characterize this likely interaction as well as determine its specificity and map interacting domains.

While exploring the functional consequences of this likely interaction, we found that it is responsible for the major antiviral effect, as the incubation of HBV with 2 μ M CpG ODN 2395, followed by a passage in a filtration retention column and the use of retained fraction, led to the inhibition of the establishment of infection as well as the condition under which the mixture was done (without passaging on the column) just before incubation with dHepaRG cells. In addition, we showed that the flowthrough fraction resulting from filtration retention of the mixture of HBV/CpG ODN 2395 was depleted in free CpG ODN 2395; the depletion was demonstrated by showing lack of TLR9 activation of RPMI-8 lymphoblastoma cells. Using primary pDCs isolated from PBMCs, we were also able to show that the lack of TLR9 activation in these cells was also due to the depletion of CpG ODN 2395 by HBV. Indeed, when pDCs were exposed to HBV before CpG ODN 2395 was added, a washing step between the two events was able to restore the ability of TLR9 to be activated, while no washing (i.e., no removal of HBV) was associated with inhibition of TLR9 activation. This has serious implications as most experimenters working on the potential viral inhibition of the TLR9 pathway in pDCs *ex vivo* do incubate the virus together with CpG ODN TLR9-L.

Our findings also have important implications regarding the use of CpG ODN 2395 as a potential immunotherapeutic agent in the context of CHB. Indeed, used alone, the effect of CpG ODN 2395 could be impaired by circulating virions. A recent study performed in the woodchuck model showed that CpG ODN 2395 used alone was not very efficient against HBV, whereas in combination with entecavir it could potentiate the action of the nucleoside analogue (22); as entecavir reduces the amount of circulating virions, our result could explain why depletion of virions could lead to a better efficacy of CpG ODN 2395. Another explanation for the lack of efficacy of CpG ODN 2395 *in vivo* could come from the large excess of circulating HBsAg. Indeed, it was suggested that HBsAg (i.e., subviral particles) could inhibit TLR9 activation in naive pDCs when a large amount of HBsAg was used in the experiment, i.e., between 5 and 10 μ g/ml (25). We also obtained similar results with pDCs isolated from healthy donors or with pDCs within PBMCs isolated from healthy donors or HBV-infected patients and importantly showed that HBsAg was not able to titrate CpG ODN 2395 because no

interaction between two entities could be evidenced. Because we used pure HBsAg particles produced in the absence of pre-S1/pre-S2, one could speculate that CpG ODN 2395 could interact within the pre-S1/pre-S2 area, but this question would have to be addressed properly.

In addition to the main demonstration above, we also provided evidence that the HBsAg-mediated inhibition was quite labile. Indeed, pDCs within PBMCs isolated from patients behaved similarly to pDCs within PBMCs from healthy donors with respect to the *ex vivo* recapitulation of the inhibitory phenotype following experimental reexposure to HBsAg (after the initial amount of HBsAg was lost during the PBMC purification process). In other words, it does not seem that the *in vivo* HBsAg status exacerbated the *ex vivo*-implemented HBsAg-mediated inhibitory phenotype. Moreover, in contrast to what was published by another group (26), with isolated pDCs, we did not observe that pDCs within the PBMC population isolated from HBV-infected patients had different levels of expression of TLR9 from healthy controls. Yet, and interestingly, we also found that the basal level of IFN- α expression was lower in HBV-infected patients than in healthy donors, thus further evidencing the inhibitory phenotype.

In CHB patients, both HBsAg levels and viremia can be as high as hundreds of micrograms per milliliter and up to 10^8 to 10^{10} vge/ml, respectively; our findings suggest that both HBsAg and viremia should be lowered in the blood of patients before an agonization with CpG ODNs could be envisaged to adjuvant a potential more-complex immunotherapeutic approach.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, HBV infection, siRNA transfection, PRR agonist treatments, and others materials/reagents. HepaRG cells were cultured, differentiated, and infected by HBV as previously described (31). HBV inoculum was prepared from either HepG2.2.15 (44) or HepaD38 (45) cell supernatants by either polyethylene glycol (molecular weight [MW], 8000; PEG₈₀₀₀) precipitation (8% final concentration) or concentration using a 100-kDa-cutoff Centricon centrifugal filter (Millipore). Viral stocks were prepared at a minimum of 2×10^9 vge (virus genome equivalents)/ml. A multiplicity of infection comprising between 100 and 1,000 vge/cell was used for viral infection or exposure. For infection of hepatocytes, HBV inoculum was prepared with 4% PEG₈₀₀₀ to enhance virus entry. HDV inoculum was prepared and used for *in vitro* infections, and its replication was monitored as recently described (46). *Pichia pastoris*-derived recombinant HBsAg *adw* subviral particles were purchased from Jena BioSciences (Germany). This preparation was tested to ensure that it was endotoxin free. RPMI 8226 B lymphoblastoma cells (kindly given by U. Hasan, CIRI, INSERM U1111, France) were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 100 IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 2 mM L-glutamine. HEK-293-TLR9 (kindly given by C. Caux, CRCL, INSERM U1052, France) and HEK-293T cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 100 IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 2 mM L-glutamine. PBMCs and pDCs were cultured in the same medium as RPMI-8 cells with addition of 2.5 mM nonessential amino acids (Invitrogen) and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen). All cell types were routinely controlled for their mycoplasma status by using the MycoAlert Plus mycoplasma detection kit from Lonza.

Transfection of siRNA (SMARTpool from Dharmacon/GE) was performed using Dharmafect-1 transfection reagent as recommended by the manufacturer (Dharmacon/GE). An siRNA against HCV was used as a control siRNA for transfection.

TLR9 agonization was performed using CpG ODN 2006, CpG ODN 2216, CpG ODN 2395, CpG ODN 2395-FITC, and GpC ODN 2395 (InvivoGen) at a 2 μ M final concentration unless stated differently in the text. TLR2 and TLR3 stimulations were performed using either 0.5 μ g/ml of Pam3CSK4 or 5 μ g/ml of poly(I-C)-HMW (InvivoGen) for 24 h. Recombinant hIL-1 β (MBL International Corporation) treatment of HepaRG cells was performed at 1 ng/ml for 24 h.

The filtration/retention assay was performed using a 100-kDa-cutoff Amicon column (Merck Millipore).

PBMC and primary pDC purification. PBMCs and pDCs were essentially isolated as previously reported (26, 36), with the following modifications. PBMCs were separated using Histopaque (Sigma-Aldrich) and left overnight (ON) at 4°C in PBMC medium. Then, pDCs were purified after Percoll+ separation (GE Healthcare) and positively selected with anti-BDCA4-conjugated magnetic microbeads (plasmacytoid dendritic cell isolation kit II, human; Miltenyi Biotec). It is worth noting that cells were passaged twice on column to increase purity, as recommended by the provider. The purity of pDCs was assessed postpurification by FACS staining with anti-BDCA2 and anti-CD123 (Miltenyi Biotec) (see Fig. S2 in the supplemental material). PBMCs (from healthy donors and HBV-infected patients) used for experiments, whose results are presented in Fig. 8, have been used immediately after purification in order to conserve as much as possible their *in vivo* phenotypes.

Nucleic acid extraction and RT-qPCR. Total RNA was extracted from cells with the NucleoSpin RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). RNA reverse transcription was

performed using Superscript III reverse transcriptase (RT) (Life Technologies). cDNA was then analyzed by qPCR with the Express SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen). RNA expression level was determined using the comparative cycle threshold (C_T) method, where the amount of target DNA was normalized to the housekeeping gene Rplp0 cDNA and to the TLR9-positive cell line RPMI-8 (2^{-ΔΔC_T}). The primers used for the TLR9 qPCR step were as follows: forward, 5'-GGC CCC CGG CTT CTT-3', and reverse, 5'-CAG GAG TGG TCC ACT GTC TTG A-3'. The primers for the IFN-α qPCR step were as follows: forward, 5'-GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC AC-3', and reverse, 5'-TCT CAT GAT TTC TGC TCT GAC AA-3'. The primers used for the Rplp0 qPCR step were as follows: forward, 5'-CAC CAT TGA AAT CCT GAG TGA TGT-3', and reverse, 5'-TGA CCA GCC CAA AGG AGA AG-3'. To quantify intracellular HBV, total DNA was extracted from infected dHepaRG cells using NucleoSpin 96 tissue vacuum processing (Macherey Nagel). Quantitative PCR for intracellular HBV DNA was performed using HBV-specific primers and normalized to the *Pp* housekeeping gene. The primers used for the *Pp* qPCR step were as follows: forward, 5'-TGC TGG GAA GTG CCA TGA G-3', and reverse, 5'-CGG TGC ATG TTT TCA CGA TAG TA-3'.

ELISA for IL-6, IP-10, HBV HBeAg and HBsAg, and ApoB detection in cell supernatant. Human IL-6 and IP-10 cytokines were detected in the supernatants using the DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). HBeAg and HBsAg were detected in the supernatant of HBV-infected cells using the AutoBio kit according to the manufacturer (AutoBio, China). ApoB secretion was detected in the supernatant of cells using the total human apolipoprotein B assay according to the manufacturer (AlerCHEK, USA).

Western blot analysis. Cells were harvested in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) containing protease inhibitors (protease inhibitor cocktail from Sigma-Aldrich, 10 mM NaF, 10 mM sodium orthovanadate). Clarified lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and Western blot transfer onto polyvinylidene difluoride (PVDF) or nitrocellulose membranes using the Trans Turbo Blot apparatus according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Primary antibodies are the anti-huTLR9 clone D9M9H from Cell Signaling and the anti-human actin clone C4 from MP Biomedicals. Secondary horseradish peroxidase (HRP) anti-rabbit and anti-mouse antibodies were purchased from Sigma-Aldrich.

FACS analysis. To evaluate TLR9 intracellular expression, cells treated with Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) were incubated with anti-huTLR9 phycoerythrin (PE)-labeled clone eB72-1665 (eBioscience) or rat IgG2a control PE-labeled clone eB2a (eBioscience) and washed in Perm/Wash buffer before analysis. To evaluate CpG ODN 2395-FITC delivery in pDCs, CpG ODN 2395-FITC was incubated with an increasing quantity of Centricon-concentrated HepaD38 cell-derived HBV or recombinant HBsAg for 10 min at 37°C before addition of 40,000 pDCs in a final volume of 200 μl to obtain 1 μM 2395-FITC, an HBV multiplicity of infection (MOI) of 1,000 to 4,000, or HBsAg at a 1- to 5-μg/ml final concentration for 30 extra minutes. Then, cells were fixed in 1× phosphate-buffered saline (PBS)-2% paraformaldehyde (PFA) and washed in 1× PBS before analysis. To evaluate purity of pDCs after purification, cells were fixed in 1× PBS-2% PFA after incubation with anti-huCD123 and anti-huBDCA2 (Miltenyi Biotec) and washed in 1× PBS before analysis. All the analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer, and data were processed using CellQuest software (Becton Dickinson).

Ultracentrifugation in iodixanol gradient and detection of HBV DNA by nonradioactive dot blotting. The iodixanol gradient was prepared using 60% iodixanol solution (Sigma Aldrich) serially diluted in TEN (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) to obtain increasing-density fractions from 7 to 56%. Ultracentrifugation was performed at 24,200 rpm for 17 hours according to the instructions of the manufacturer (Beckman Coulter). Twenty-four fractions were harvested for each condition before dot blotting onto a Hybond XL membrane (GE Healthcare) using the Minifold 1 apparatus according to the manufacturer (GE Healthcare). FITC fluorimetry was performed using the Typhoon FLA 9500 imager according to the manufacturer (GE Healthcare). To detect HBV DNA, membranes were first denatured (0.5 M NaOH, 1 M NaCl) and then reequilibrated (0.5 M Tris HCl, pH 7.5, 3 M NaCl) before DNA fixation at 80°C for 1 hour. After membrane saturation using digoxigenin (DIG) easy-Hyb solution according to the manufacturer (Roche), hybridization of DIG-labeled specific anti-HBV DNA was performed overnight at 42°C. After several washes according to increasing stringency (solution 1, 2× SSPE [1× SSPE is 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 1 mM EDTA (pH 7.7)], 0.5% SDS for 5 min at 42°C; solution 2, 2× SSPE, 0.1% SDS for 15 min at 65°C; 0.1× SSPE, 0.1% SDS for 45 min at 65°C), DIG probe was revealed using CSPD (a chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase) ready-to-use substrate according to the manufacturer (Roche).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the *t* and Student parametric tests with the GraphPad Prism software on three independent experiments at least. For all tests, a *P* value of ≤0.05 was considered significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.01741-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claude Négrier (chef du Service d'hématologie biologique et d'hémostase clinique, HCL, Lyon) for providing blood samples from healthy donors.

This work was supported by grants from ANRS (French national agency for research

on AIDS and viral hepatitis), FINOVI (Foundation for innovation in infectiology), and INSERM. It was also supported by the DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). Besides academic funding, this work was mainly supported by Hoffmann-La Roche via its RPF (Roche Postdoc Fellowship) program; M. Bonnin was the recipient of this program under the supervision of D. Durantel (academic side) and M. Ait-Goughoulte/I. Najera (Roche scientist leaders).

Author contributions were as follows: study concept and design, M.B., M.A.-G., J.L., and D.D.; acquisition of data, M.B., L.A., S.M., L.D., J.L., and D.D.; analysis and interpretation of data, M.B., L.A., M.A.-G., N.B.-V., J.L., and D.D.; drafting of the manuscript, M.B. and D.D.; critical revision of the manuscript for important intellectual content, M.A.-G., N.B.-V., I.N., F.Z., J.L., and D.D.; statistical analysis, M.B.; technical or material support, S.M., M.S., C.C., and L.D.

M.B., L.A., N.B.-V., S.M., and L.D. have no conflicts of interest to declare. F.Z., J.L., and D.D. received a research grant from Hoffmann-La Roche to perform experiments. M.A.-G. and I.N. are employees of Hoffmann-La Roche.

REFERENCES

- El-Serag HB. 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142:1264–1273.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>.
- Chan SL, Wong VWS, Qin S, Chan HLY. 2016. Infection and cancer: the case of hepatitis B. *J Clin Oncol* 34:83–90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.5724>.
- Busch K, Thimme R. 2015. Natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Med Microbiol Immunol* 204:5–10. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0369-7>.
- Tan A, Koh S, Bertolotti A. 2015. Immune response in hepatitis B virus infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a021428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021428>.
- Ferrari C. 2015. HBV and the immune response. *Liver Int* 35:121–128. <https://doi.org/10.1111/liv.12749>.
- Zoulim F, Durantel D. 2015. Antiviral therapies and prospects for a cure of chronic hepatitis B. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5:a021501. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021501>.
- Isorce N, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. 2015. Immune-modulators to combat hepatitis B virus infection: from IFN-alpha to novel investigational immunotherapeutic strategies. *Antiviral Res* 122:69–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.008>.
- Pandey S, Kawai T, Akira S. 2014. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016246. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>.
- Hirsch I, Caux C, Hasan U, Bendriss-Vermare N, Olive D. 2010. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* 31:391–397. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.07.004>.
- Swiecki M, Colonna M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15:471–485. <https://doi.org/10.1038/nri3865>.
- Lin F-C, Young HA. 2014. Interferons: success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:369–376. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.015>.
- Sadler AJ, Williams BR. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8:559–568. <https://doi.org/10.1038/nri2314>.
- Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Glavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, Fosdick A, Frey CR, Zheng J, Wolfgang G, Halcomb RL, Tumas DB. 2013. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* 144:1508–1517. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.003>.
- Menne S, Tumas DB, Liu KH, Thampy L, AlDeghalther D, Baldwin BH, Bellezza CA, Cote PJ, Zheng J, Halcomb R, Fosdick A, Fletcher SP, Daffis S, Li L, Yue P, Wolfgang GH, Tennant BC. 2015. Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the woodchuck model of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 62:1237–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.026>.
- Adams S. 2009. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 1:949–964. <https://doi.org/10.2217/mt.09.70>.
- Gosu V, Basith S, Kwon O-P, Choi S. 2012. Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. *Molecules* 17:13503. <https://doi.org/10.3390/molecules171113503>.
- Heyward WL, Kyle M, Blumenau J, Davis M, Reisinger K, Kabongo ML, Bennett S, Janssen RS, Namini H, Martin JT. 2013. Immunogenicity and safety of an investigational hepatitis B vaccine with a Toll-like receptor 9 agonist adjuvant (HBsAg-1018) compared to a licensed hepatitis B vaccine in healthy adults 40–70 years of age. *Vaccine* 31:5300–5305. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.068>.
- Janssen RS, Mangoo-Karim R, Pergola PE, Girndt M, Namini H, Rahman S, Bennett SR, Heyward WL, Martin JT. 2013. Immunogenicity and safety of an investigational hepatitis B vaccine with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant (HBsAg-1018) compared with a licensed hepatitis B vaccine in patients with chronic kidney disease. *Vaccine* 31:5306–5313. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.067>.
- Janssen JM, Heyward WL, Martin JT, Janssen RS. 2015. Immunogenicity and safety of an investigational hepatitis B vaccine with a Toll-like receptor 9 agonist adjuvant (HBsAg-1018) compared with a licensed hepatitis B vaccine in patients with chronic kidney disease and type 2 diabetes mellitus. *Vaccine* 33:833–837. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.060>.
- Ly S, Wang J, Dou S, Yang X, Ni X, Sun R, Tian Z, Wei H. 2014. Nanoparticles encapsulating hepatitis B virus cytosine-phosphate-guanosine induce therapeutic immunity against HBV infection. *Hepatology* 59:385–394. <https://doi.org/10.1002/hep.26654>.
- Shahrakhyahed A, Sanchooli J, Sanadgol N, Arababadi MK, Kennedy D. 2014. TLR9: an important molecule in the fight against hepatitis B virus. *Postgrad Med J* 90:396–401. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2013-132309>.
- Meng Z, Zhang X, Pei R, Zhang E, Kemper T, Vollmer J, Davis HL, Glebe D, Gerlich W, Roggendorf M, Lu M. 2016. Combination therapy including CpG oligodeoxynucleotides and entecavir induces early viral response and enhanced inhibition of viral replication in a woodchuck model of chronic hepadnaviral infection. *Antiviral Res* 125:14–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.11.001>.
- Huang L-R, Wohlleber D, Reisinger F, Jenne CN, Cheng R-L, Abdullah Z, Schildberg FA, Odenthal M, Dienes H-P, van Rooijen N, Schmitt E, Garbi N, Croft M, Kurts C, Kubas P, Protzer U, Heikenwalder M, Knolle PA. 2013. Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8+ T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat Immunol* 14:574–583. <https://doi.org/10.1038/ni.2573>.
- Xie Q, Shen HC, Jia NN, Wang H, Lin LY, An BY, Gui HL, Guo SM, Cai W, Yu H, Guo Q, Bao S. 2009. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with re-

- duced expression of TLR9. *Microbes Infect* 11:515–523. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.02.008>.
25. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z, Shen F, Zhang Q, Sun S, Yuan Z. 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 46:2640–2646. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.031>.
 26. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, Zoulim F, Tommasino M, Trepo C, Hasan U, Chemin I. 2011. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 6:e26315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026315>.
 27. Woltman AM, Op den Brouw ML, Blesta PJ, Shi CC, Janssen HL. 2011. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 6:e15324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015324>.
 28. Gehring AJ, D'Angelo JA. 2015. Dissecting the dendritic cell controversy in chronic hepatitis B virus infection. *Cell Mol Immunol* 12:283–291. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.95>.
 29. Gehring AJ, Haniffa M, Kennedy PT, Ho ZZ, Boni C, Shin A, Banu N, Chia A, Lim SG, Ferrari C, Ginhoux F, Bertolotti A. 2013. Mobilizing monocytes to cross-present circulating viral antigen in chronic infection. *J Clin Invest* 123:3766–3776. <https://doi.org/10.1172/JCI66043>.
 30. van Montfort N, van der Aa E, van den Bosch A, Brouwers H, Vanwolleghem T, Janssen HLA, Javanbakht H, Buschow SI, Woltman AM. 2016. Hepatitis B virus surface antigen activates myeloid dendritic cells via a soluble CD14-dependent mechanism. *J Virol* 90:6187–6199. <https://doi.org/10.1128/JVI.02903-15>.
 31. Luangsay S, Ait-Goughoulte M, Michelet M, Floriot O, Bonnin M, Gruffaz M, Rivoire M, Fletcher S, Javanbakht H, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. 2015. Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J Hepatol* 63:1077–1085. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.022>.
 32. Marion MJ, Hantz O, Durantel D. 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. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_13.
 33. Xu H-Z, Liu Y-P, Guleng B, Ren J-L. 2014. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: pathogenic mechanisms and novel therapeutic interventions. *Gastrointest Tumors* 1:135–145. <https://doi.org/10.1159/000365307>.
 34. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. 2013. Hepadnaviruses, p 2185–2221. In Knipe DM, Howley PM, Cohen JL, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed), *Fields virology*, 6th ed, vol 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
 35. Li W, Urban S. 2016. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: basic insights and clinical implications. *J Hepatol* 64: S32–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.011>.
 36. Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, Larat S, Marlu A, Leroy V, Plumas J, Aspod C. 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.046>.
 37. Krieg AM. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5:471–484. <https://doi.org/10.1038/nrd2059>.
 38. Krieg AM. 2008. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 27:161–167. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210911>.
 39. Wittig B, Schmidt M, Scheithauer W, Schmoll HJ. 2015. MGN1703, an immunomodulator and toll-like receptor 9 (TLR-9) agonist: from bench to bedside. *Crit Rev Oncol Hematol* 94:31–44. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.12.002>.
 40. Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. 2005. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 79: 7269–7272. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7269-7272.2005>.
 41. Sauter MM, Gauger JLL, Brandt CR. 2014. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral Res* 109:83–96. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.015>.
 42. Stein CA, Cleary AM, Yakubov L, Lederman S. 1993. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to the third variable loop domain (v3) of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Antisense Res Dev* 3:19–31. <https://doi.org/10.1089/ard.1993.3.19>.
 43. Ahn KS, Ou W, Silver J. 2004. Inhibition of certain strains of HIV-1 by cell surface polyanions in the form of cholesterol-labeled oligonucleotides. *Virology* 330:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.010>.
 44. Sells MA, Chen ML, Acs G. 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1005–1009. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.4.1005>.
 45. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. 1997. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1715–1720.
 46. Alfaiate D, Lucifora J, Abeywickrama-Samarakoon N, Michelet M, Testoni B, Cortay JC, Sureau C, Zoulim F, Deny P, Durantel D. 2016. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral Res* 136:19–31. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.006>.

**Interaction between TLR9-CpG-ODNs and HBV virions leads to entry
inhibition in hepatocytes and reduction of IFN α production by pDC**

**Ludovic Aillot^{1,2,+}, Marc Bonnin^{1,2,+}, Malika Ait-Goughoulte³, Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2},
Sarah Maadadi^{1,2}, Laura Dimier^{1,2}, Miroslava Subic⁵, Caroline Scholtes^{1,5}, Isabel Najera³,
Fabien Zoulim^{1,2,4,5}, Julie Lucifora^{1,2} and David Durantel^{1,2,4}**

¹INSERM, U1052, CNRS, UMR_5286, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon, France;

²University of Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL1), Lyon, France;

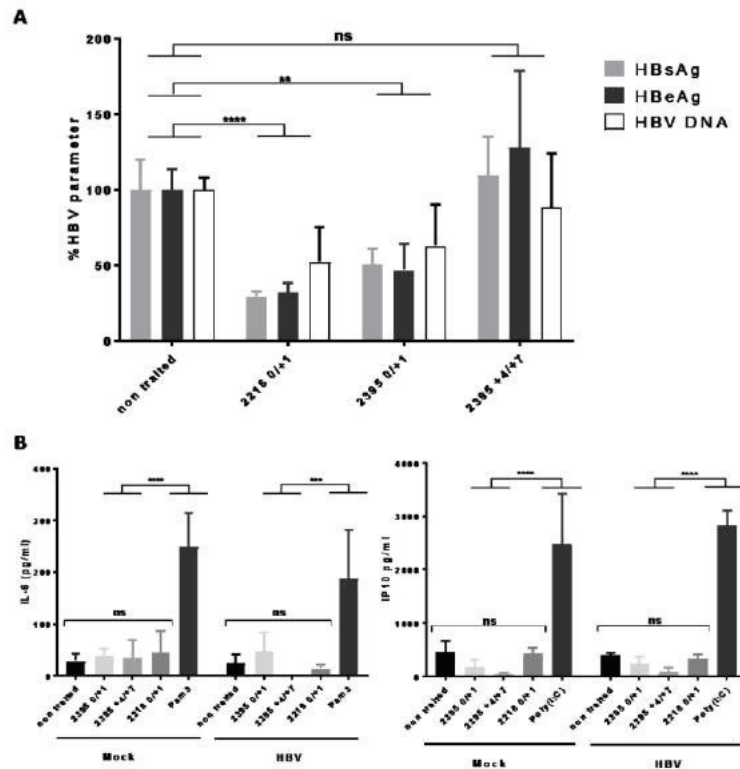
³Roche Pharma Research and Early Development (pRED), Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche,
4070 Basel, Switzerland;

⁴Labex DEVweCAN,

⁵Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France.

⁺ These authors contributed equally to this work

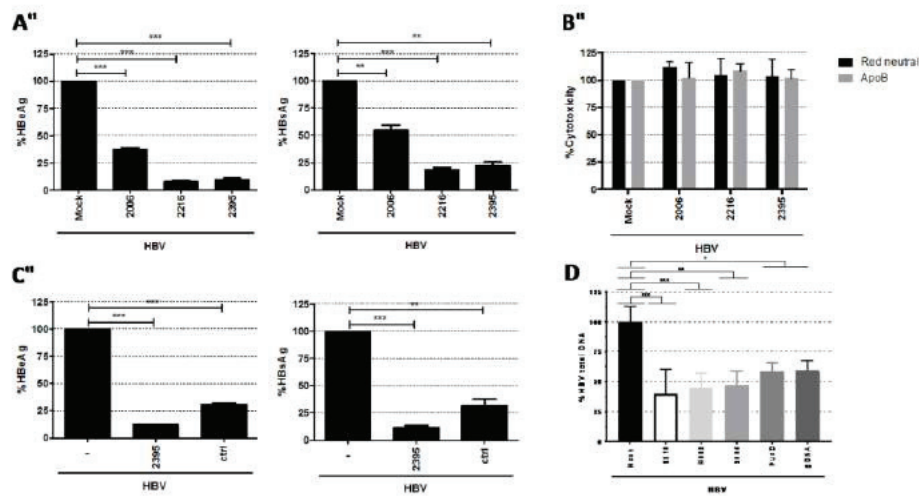
SUPPLEMENTARY FIGURES AND FIGURE LEGENDS



21

22 **Supplementary Figure 1. CpG ODN 2395 inhibits the establishment of HBV infection in PHH.**

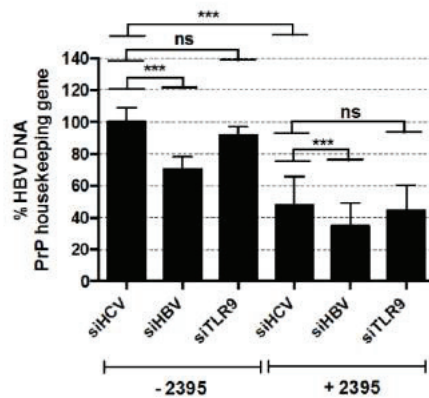
23 A) PHH were either mock or infected with HBV (250 vge/cell). CpG ODN 2395 or 2216 was added
 24 (or not; non treated condition) at 2 μ M either during HBV inoculation (0/+1 condition; CpG is then
 25 washed away at the end of the inoculation period) or after 4 days of infection and until harvesting of
 26 supernatant and intracellular material (+4/+7 condition). HBeAg and HBsAg secretion was
 27 monitored by ELISA and HBV DNA intracellular accumulation by qPCR. B) The secretion of IL-6
 28 and IP-10 was monitored by ELISA three days post-stimulation with CpG ODN 2395 of PHH
 29 infected or not. Pam3CSK4 and poly(I:C)-HMW were used as positive controls for the production
 30 by PHH of IL-6 and IP-10 respectively. Results are given as a mean $\pm$ SD of three technical
 31 replicates, and differences were considered as statistically significant to the control condition when
 32 the p value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or ≤ 0.001 (***).



33
 34 **Supplementary Figure 2. Different types of CpG ODN activators, as well as GpC ODN**
 35 **control or DNA, inhibits the establishment of HBV infection in dHepaRG cells. A)**
 36 **Differentiated HepaRG were infected with HepG2.2.15 derived-HBV (100 vge/cell). CpG ODN**
 37 **2006 (Class B), 2216 (Class A), 2395 (Class C) was added (or not; Mock condition) at 2 μ M during**
 38 **HBV inoculation. HBeAg and HBsAg secretion was monitored by ELISA at day 7 post infection.**
 39 **B) Neutral red assay and monitoring of ApoB secretion were performed in the same condition than**
 40 **panel A to check toxicity and impact of treatment on cell differentiation. C) Differentiated HepaRG**
 41 **were infected with HepG2.2.15 derived-HBV (100 vge/cell). CpG ODN 2395 or GpC ODN 2395**
 42 **control (noted ctrl) was added (or not; (-) condition) at 2 μ M during HBV inoculation. HBeAg and**
 43 **HBsAg secretion was monitored by ELISA at day 7 post infection. D) Differentiated HepaRG were**
 44 **infected with HepG2.2.15 derived-HBV (250 vge/cell). CpG ODN 2216 (Class A), 2395 and M362**
 45 **(Class C), CpG-rich plasmid DNA (PucD) and genomic DNA (gDNA) was added (or not; Mock**
 46 **condition) at 2 μ M during HBV inoculation. HBV total DNA was monitored by qPCR at day 7 post**
 47 **infection. Results are given as a mean $\pm$ sem of three independant assays, and differences were**
 48 **considered as statistically significant to the control condition when the p value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01**
 49 **(**), or ≤ 0.001 (***).**

50

51

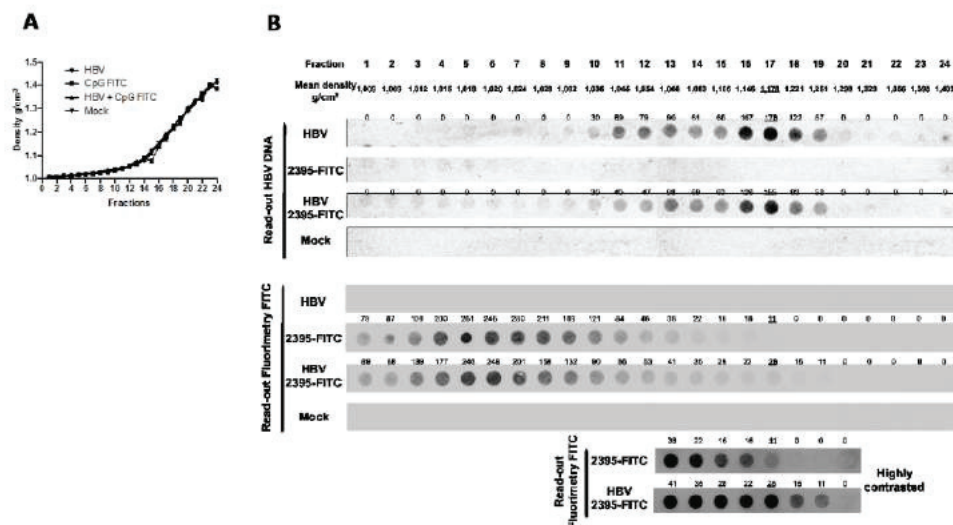


52

53 **Supplementary Figure 3. CpG ODN 2395-mediated anti-HBV effect is independent of TLR9.**

54 Differentiated HepaRG cells were transfected with siRNA targeting either HBV, TLR9, or HCV
 55 (hepatitis C virus, siRNA used as control here) for 48h before being infected with HBV (100
 56 vge/cell) in presence or absence of 2 μ M CpG ODN 2395. Intracellular HBV DNA levels were
 57 evaluated by qPCR and normalized to the *PrP* house keeping gene expression. Results are given as
 58 a mean $\pm$ SEM of three independent assays, and differences were considered as statistically
 59 significant to the control condition when the p value was ≤ 0.001 (***).

60



61

62 **Supplementary Figure 4. CpG ODN 2395-FITC co-sedimentes with HBV virion in iodixanol**

63 **gradient.** Ultracentrifugation in iodixanol gradient from 7 to 56% was performed after incubating

64 for 4h at 37°C the virus with 2 μ M of CpG ODN 2395-FITC labelled. A) The curve of density

65 (indicated in g/cm³) of fractions collected in the 4 different indicated conditions were established

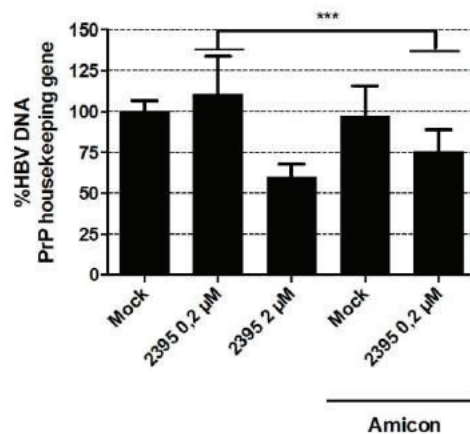
66 with a refractometer. B) Upper panels: HBV DNA repartition in collected fractions was revealed

67 after dot blotting and hybridization with a specific DIG-HBV probe. Middle panels: CpG ODN

68 2395-FITC profile revealed after fluorimetry detection. Bottom panels: zoom and amplification or

69 the corresponding area of the middle panels. Results are representative of three independent

70 experiments.



71

72 **Supplementary Figure 5. CpG ODN 2395 coating of HBV infectious is responsible for the**

73 **inhibition of the establishment of infection.** Differentiated HepaRG cells were inoculated for 24h

74 with HBV at 100 vge/cell in the presence of 0 (i.e. mock), 0.2 or 2 μ M of CpG ODN 2395, then

75 inoculum was removed, cells washed and let for 7 days before intracellular HBV DNA levels were

76 monitored by qPCR and normalized to the *PrP* house keeping gene expression. Results of this part

77 of the experiment are represented in the 3 left bars in each graph. For the two remaining bars

78 underlined Amicon: HBV viruses (2.5×10^8 vge) were incubated (or not; mock) for 4h at 37°C with

79 2 μ M of CpG ODN 2395 before filtration/retention on 100 kDa cut-off Amicon column. Then, the

80 restrained fraction in the upper compartment of the system was 10 times diluted leading to a

81 theoretical 0.2 μ M final concentration of CpG ODN 2395 before infection was done at a theoretical

82 MOI of 100 vge/cell to ensure same infection conditions than in control not filtered/retented

83 conditions. Results are given as a mean $\pm$ SEM of three independent assays, and differences were

84 considered as statistically significant to the control condition when the p value was ≤ 0.001 (***).

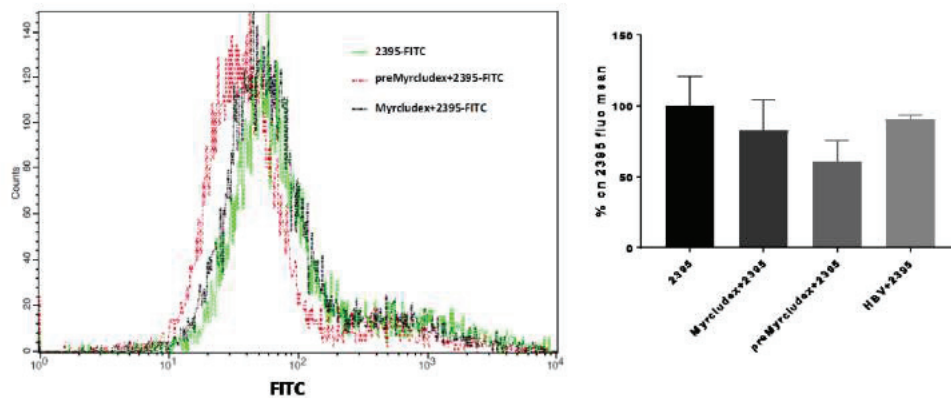
85

86

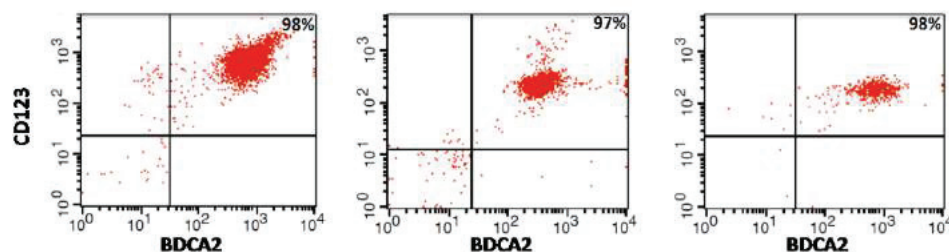
87

88

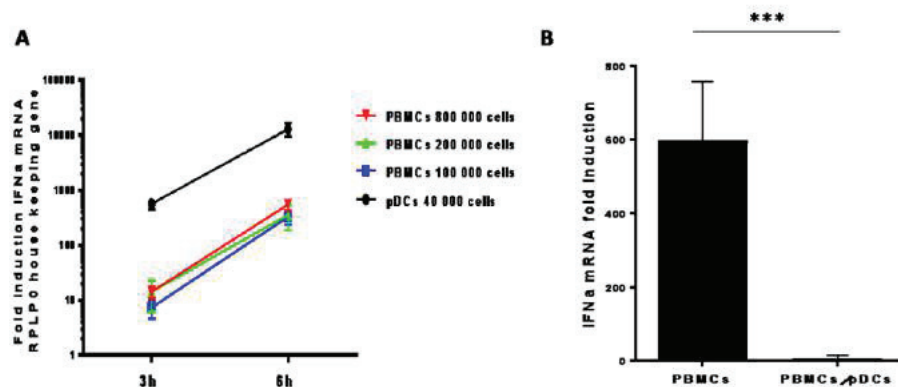
89



90
 91 **Supplementary Figure 6. CpG ODN 2395 binds to dHepaRG cells, at least partially, via**
 92 **hNTCP.** CpG ODN 2395-FITC was pre-mixed or not with Mycludex (100nM) or HBV (MOI 250)
 93 before being incubated with dHepaRG (250,000 cells) pre-treated or not with Mycludex (100nM
 94 24h before CpG adding; i.e., preMycludex). CpG ODN 2395-FITC delivery to cells was evaluated
 95 by FACS analysis. Representative histogram and fluorescence mean analysis of three experiments.
 96 Results are given as a mean $\pm$ SEM of three independent assays, and differences were considered as
 97 statistically significant to the control condition when the p value was ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), or
 98 ≤ 0.001 (***).
 99



100
 101 **Supplementary Figure 7. Purity of 3 batches of primary pDCs prepared from normal donors.**
 102 pDCs were purified from PBMC (from normal donors) after Percoll+ separation and positively
 103 selected twice with anti-BDCA4 conjugated magnetic microbeads as described in « materials and
 104 methods » section. The purity of purified pDCs was analysed by dual staining with anti-BDCA2
 105 and anti-CD123 antibodies. Stained cells were analysed on a FACScalibur apparatus.



106

107 **Supplementary Figure 8. IFN- α expression in PBMC comes mainly from pDCs.** PBMC and
 108 pDC were freshly isolated from 500 mL of blood from healthy donors. A) The indicated number of
 109 cells were stimulated with 1 μ M of CpG ODN 2395 for either 3 or 6h, then RNAs were extracted
 110 and subjected to RTqPCR to monitor *IFN- α* expression. B) pDC were depleted or not from PMBC
 111 and cells stimulated with 1 μ M of CpG ODN 2395 for 6h, then RNAs were extracted and subjected
 112 to RTqPCR to monitor *IFN- α* expression. Results are given as a mean $\pm$ SEM of three independent
 113 assays, and differences were considered as statistically significant to the control condition when the
 114 p value was ≤ 0.001 (***)

IV- Discussion/perspectives

L'immunologie particulière et complexe du foie est un outil indispensable au maintien de l'homéostasie et de la défense de l'environnement hépatique^{1,2}. Aux vues de ses nombreuses fonctions, le foie est un organe vital. La compréhension des mécanismes permettant le maintien de son intégrité, est donc indispensable afin de mieux comprendre les rouages biologiques impliqués dans les processus de pathogénèses et de cancérogénèses. Une bonne compréhension des rôles immunitaires des cellules le composant, ainsi que les senseurs exprimés par ces dernières présente donc un fort intérêt pour 1) une meilleure compréhension de l'implication de ces cellules lors de processus inflammatoires ; 2) une utilisation adéquate de la stimulation de ces récepteurs et *in fine* des cellules hépatiques dans des stratégies thérapeutiques dans le contexte d'infections chroniques. Le modèle que nous avons utilisé dans cette thèse est celui des infections chroniques par le virus de l'hépatite B.

Dans ce but nous avons donc caractérisé, dans un premier temps, l'expression et la fonctionnalité de différents PRR dans les différentes cellules hépatiques que sont les hépatocytes, les macrophages du foie/KC, les cellules étoilées et les LSEC (Etude1)^{2,50}. Les résultats ont été obtenus (résumés dans la Figure 26) grâce à l'utilisation de la technologie de RT-qPCR microfluidique à haut débit (fluidigm) et en parallèle d'immunoblot. Nous avons ainsi pu évaluer les niveaux d'expressions, dans les cellules hépatiques, d'un grand nombre de senseurs immunitaires ainsi que de leurs adaptateurs et également de récepteurs inhibiteurs. Les niveaux d'expressions de nombreux récepteurs, à l'état basal, étant très faibles, voire indétectables, la liste des récepteurs non détectés dans nos résultats n'est donc pas exclusive. En contrepartie, les différents PRR identifiés, justifient probablement d'une expression importante dans ces cellules et présentent donc un intérêt particulier dans l'environnement non-pathologique du foie. L'expression de ces récepteurs a également été comparée à celle des cellules immunitaires hépatiques et du sang périphérique que sont respectivement les LMNC et les PBMC. L'une des premières observations, concernant ces deux dernières populations immunitaires, indique une expression différente en termes de PRR et d'adaptateurs. Ce résultat n'est cependant pas étonnant du fait d'une composition en types cellulaires différentes entre les LMNC et les PBMC (Figure 1). Ces différences d'expression des PRR pourraient jouer un rôle important dans la maintenance de l'environnement tolérogène du foie. En effet, la majorité des TLR extracellulaires (TLR1/2, 2/6, 4 et 5), reconnaissant les structures des parois bactériennes ou leurs dérivés, semble être moins fortement exprimée dans les LMNC en comparaison aux

PBMC. Leurs expressions dans les cellules hépatiques, hépatocytes, cellules étoilées et LSEC semblent, elle aussi assez réduites. Du fait de sa localisation en aval de la circulation intestinale, le foie reçoit, via la veine porte les éléments arrivant de la digestion, contenant des dérivés antigéniques du bol alimentaire (éléments de micro-organismes, de plantes et d'animaux). Ces éléments pourraient activer fortement les TLR membranaires et induire une inflammation ⁵⁵. Une faible expression de ces récepteurs à l'état basal pourrait être un moyen à la fois de tolérer une quantité en antigène plus importante et donc d'empêcher une activation inflammatoire excessive. Les habitudes alimentaires et la composition de la flore intestinale pourraient jouer un rôle important quant aux capacités immunitaires hépatiques. Ces paramètres pourraient grandement influencer l'équilibre tolérance/inflammation suivant les individus. D'autre part, les macrophages hépatiques/KC expriment plus fortement ces récepteurs. Ces cellules immunitaires professionnelles, du fait de leur localisation spécifique, pourraient jusqu'à un certain seuil en réponse à la stimulation des PRR extracellulaires, sécréter des cytokines anti-inflammatoires. Ce mécanisme impliquerait de manière importante ces cellules dans le maintien de l'homéostasie du foie, mais également dans un potentiel rôle délétère pour l'organe dans l'installation de certains pathogènes, comme cela a été décrit pour HBV.

Malgré l'expression faible de ces récepteurs par les cellules du foie, celles-ci sont parfaitement capables d'induire *ex vivo* la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'agoniste correspondant du PRR. Les productions d'IL-6 indiquent que les TLR1/2, 2/6 et 4 sont fonctionnels dans les quatre types cellulaires du foie étudiés ici. Il semble donc possible d'utiliser les ligands correspondant afin de générer une réponse immunitaire au niveau hépatique. Un autre TLR semble bien représenté parmi ces cellules, le TLR3. Celui-ci présent au niveau endosomal est présent aussi bien au niveau des cellules immunitaires professionnelles (LMNC, macrophage hépatiques/KC) que dans les cellules non-professionnelles (LSEC, cellules étoilées et hépatocytes). Une production cytokinique (IP-10) en réponse au ligand de TLR3 est détectée signifiant que celui-ci est fonctionnel dans toutes ces cellules, comme le laissait penser la présence de la protéine adaptatrice TRIF. Le TLR3 est connu pour reconnaître les ARNdb principalement viraux, mais aussi des cellules mortes. Sa présence au niveau hépatique laisse à supposer d'un mécanisme de lutte contre les pathogènes (en particulier viraux) mais également un mécanisme possible de tolérance du soi lors d'événements nécessitant une régénération hépatique. La présence de ce récepteur est intéressante du fait de ces capacités à générer une production d'IFN et de cytokines inflammatoires, mais également la production de chimiokines pouvant recruter d'autres cellules immunitaires. Bien que non

regardée spécifiquement ici, une population de DC exprime fortement ce TLR3. La population cDC1, précédemment décrite pour sa capacité à induire une forte réponse antivirale/anticancéreuse par la sécrétion d'IFN- λ et l'activation des T CD8⁺ en réponse à un ligand de TLR3 ^{19,24,24}. De plus, cette population étant mieux représentée au niveau du foie (Figure 4), la présence importante du TLR3 dans les LMNC, pourrait être du fait en partie des cDC1. L'utilisation d'un ligand de TLR3 pour activer ces cellules, pourrait avoir un fort intérêt par le biais de l'activation de ces cellules en immunothérapie.

De plus, nous avons comparé l'expression et la capacité d'activation de ces récepteurs, à la fois, dans les cellules primaires isolées à partir du foie et dans les lignées cellulaires dérivées. Le but étant d'identifier les modèles cellulaires relevant quant au test impliquant l'utilisation d'agoniste de PRR ainsi que les voies immunitaires fonctionnelles utiles à l'étude des mécanismes antiviraux par exemple dans notre cas. De plus, les accès aux pièces hépatiques étant difficiles, l'emploi de lignées cellulaires pertinentes est de tout premier intérêt. Nous avons donc réalisé l'analyse à la fois des lignées hépatocytaires à notre disposition ainsi que des lignées de macrophages donc l'une a été créée au laboratoire la lignée iKC. Cette dernière a été dérivée de macrophages/KC isolés du foie et immortalisée grâce à l'expression des protéines E6/E7 du papilloma virus. La caractérisation des TLR et RLR a déjà été réalisée au sein du laboratoire sur la lignée principalement utilisée, la lignée HepaRG. Les HepaRG peuvent être différenciées en hépatocytes mais également en d'autres cellules du foie appelées cholangiocytes. Cette lignée dérivée de progéniteurs hépatiques immortalisées, mais non transformées, a été décrite comme la plus proche, immunitairement parlant, des hépatocytes primaires humains ⁴⁷. Les HepaRG peuvent être différenciées en hépatocytes mais également en d'autres cellules du foie appelées cholangiocytes. Brièvement, les cholangiocytes sont les cellules épithéliales du canalicule biliaire et participent à la sécrétion de la bile. Le ratio hépatocytes/cholangiocytes est principalement en faveur des cholangiocytes pouvant expliquer des différences d'expressions des PRR, mais nous y reviendrons ci-après. L'importante similitude entre les HepaRG différenciées et les hépatocytes primaires, fait de ces cellules un bon modèle aussi bien en termes d'expression des PRR et de leurs voies de signalisation que des réponses cytokiniques engendrées par l'utilisation d'agonistes correspondant. Afin de compléter ce travail nous avons regardé l'expression des CDS ainsi que du récepteur co-inhibiteur PD-L1. L'expression des senseurs IFI16 et le senseur/adaptateur de la majorité des CDS, STING, diffère cependant des cellules primaires. Cette différence peut s'expliquer par la présence de cholangiocytes dans les HepaRG différenciées exprimant leurs propres récepteurs.

En contre-parti l'expression du senseur cGAS semble plus importante dans les hépatocytes primaires. À l'inverse des deux récepteurs précédant il est possible que la population cholangiocytaire n'exprime pas ce senseur, et l'expression étant faible dans les hépatocytes (y

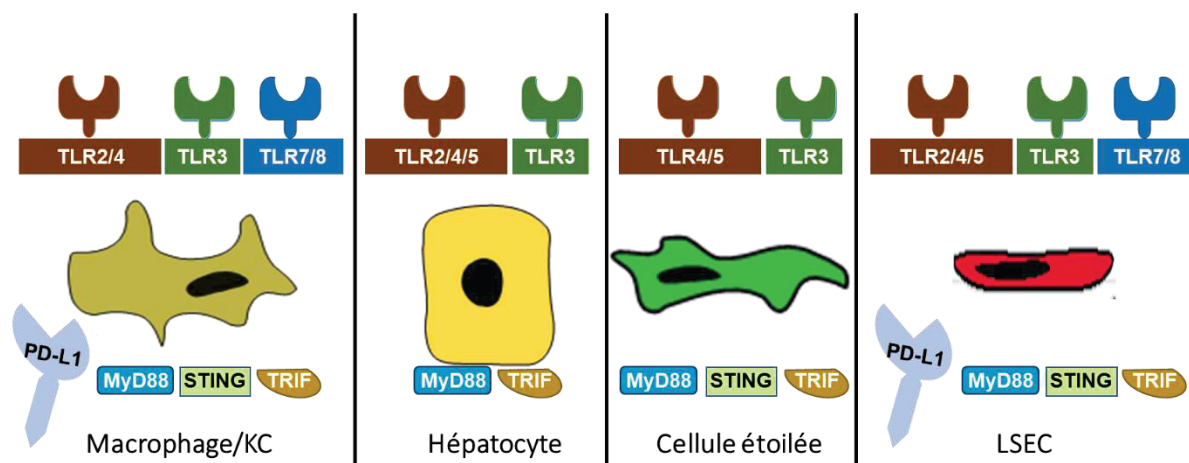


Figure 26 : Résumé de l'expression des PRR, des adaptateurs et des récepteurs inhibiteurs dans les cellules hépatiques. (Faure-Dupuy S *et al* 2018)

compris primaires), la détection de ce senseur est perdue dans la population totale de HepaRG différenciées. Le point le plus intéressant réside ici dans l'expression du récepteur PD-L1. Etant donné l'environnement tolérrogène du foie, l'expression de ce récepteur joue un rôle important dans le dialogue avec les cellules immunitaires et provoque leur inhibition (T CD8 notamment...). L'expression du PD-L1 est aussi bien retrouvée dans les hépatocytes primaires que dans la lignée HepaRG différenciées. Un mécanisme de tolérance envers les hépatocytes du fait de la prise en charge de nombreux toxiques et composés potentiellement immunogènes, est nécessaire dans l'environnement hépatique. L'expression d'un tel récepteur par ces cellules leur conférerait la capacité d'inhiber une réponse immunitaire dirigée contre elles. L'évolution de PD-L1 au cours d'infection chronique par HBV ainsi que de l'effet de contact avec des cellules immunitaires a déjà été décrites ^{1,2,48,139,140}. Les modulations de ce récepteur dans ce contexte pourraient influencer sur l'efficacité d'une réponse immunitaire et participer à l'inhibition des effecteurs de l'immunité. D'autre part, la caractérisation de la population macrophagique hépatique primaire en comparaison à une lignée de macrophage utilisée en laboratoire que sont les THP1 et la nouvelle lignée iKC. Les PRR exprimés et leur fonctionnalité par ces lignées sont relativement comparables (TLR1/2, 2/6, 4 et 5 ; TLR3 n'étant pas retrouvé dans les THP1) à l'exception de l'expression des senseurs d'acides nucléiques. Cette différence au niveau des

senseurs TLR7 et 8 peut s'expliquer par l'utilisation des protéines E6/E7 du papillomavirus pour immortaliser les iKC. Ces protéines sont décrites pour inhiber l'expression de ces récepteurs. Les capacités de phagocytoses des pathogènes, bien qu'amoinnées, sont aussi bien fonctionnelles dans les KC primaires que dans les THP1 ou les iKC. L'expression du récepteur PD-L1 importante également dans les KC est peu exprimé par les THP1 alors que ce phénotype semble être conservé dans la lignée immortalisée iKC. L'immortalisation des KC humaine nous a permis de générer une lignée utilisable pour les mécanismes utilisant des agonistes des PRR présenté ici, mais également du récepteur co-inhibiteur PD-L1. Ce nouvel outil pourrait permettre d'étudier plus simplement le comportement et la modulation des KC en réponse à certains stimuli (agonistes de PRR, pathogènes, drogues...) ou environnement (cocultures avec d'autres cellules hépatiques transformées/infectées ou non). Ce nouvel outil semble plus relevant que les THP1 pour étudier les populations macrophagiques du foie. Cependant, la lignée iKC semble perdre son phénotype primaire au fur et à mesure des passages. La dérive du phénotype des cellules primaires semble importante au fur et à mesure des passages et demande donc l'utilisation de ces cellules dans un temps limité.

L'exploration de l'expression et de la fonctionnalité des PRR dans les cellules hépatocytaires primaires et les lignées dérivées nous a permis dans un premier temps d'identifier les cellules pouvant être impliquées dans la réponse immunitaire en réponse à un pathogène ou plus spécifiquement à un ligand. L'exploration des capacités de réponse à un agoniste de PRR présente un grand intérêt pour la mise en place de stratégie immuno-thérapeutique dans un contexte anti-cancéreux ou anti-infectieux. Nous avons donc pu identifier les PRR exprimés et fonctionnels dans les cellules hépatiques que sont les TLR2, TLR4 et TLR3.

Notre laboratoire travaillant sur les stratégies antivirales d'immunothérapie dans le cadre de l'infection chronique par HBV, nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation des agonistes de ces PRR dans ce contexte.

Comme expliqué dans l'introduction, les agonistes de certains PRR (TLR7 par exemple ¹⁶³) sont d'ores et déjà en étude clinique dans les stratégies de lutte anti-HBV. Cependant, les PRR stimulés par ces agonistes ne ciblent pas ou peu les cellules infectées par HBV, que sont les hépatocytes. Notre stratégie première est d'utiliser un agoniste de PRR capable d'induire un effet antiviral, dans les hépatocytes infectés dans un premier temps, mais également dans les cellules immunitaires professionnelles.

Dans ce but, nous avons donc testé de nombreux agonistes de PRR, dont principalement des ligands de TLR (Etude2). Nous avons pu observer, que tous n'étaient pas capables dans un premier temps, d'induire une production cytokinique et dans un second temps, d'engendrer un effet antiviral sur l'infection chronique par HBV. C'est le cas notamment des ligands de TLR7, 8 et 9. L'absence de cytokines sécrétées et d'inhibition de la réplication virale s'explique par l'absence d'expression de ces PRR dans les hépatocytes, précédemment décrits (Etude1). A noter, cependant un effet antiviral en absence de sécrétion de cytokines dans les HepaRG pour le ligand de TLR7, Imiquimod. Ce résultat bien qu'intrigant, au vu de l'absence de cet effet dans les hépatocytes primaires, nous n'avons pas cherché à approfondir le mécanisme sous-jacent (modification métabolique ?; activation/inhibition d'une autre voie de signalisation à vocation anti/provirale ?; effet sur les cholangiocytes ?...). D'autre part, certains ligands se sont montrés efficaces quant à la production de cytokines dans les hépatocytes. Cependant, les effets antiviraux semblent dépendre des TLR stimulés et potentiellement de leur expression plus ou moins importante dans ces cellules. En effet, les productions cytokiniques les plus fortes sont retrouvées après utilisation des ligands de TLR1/2, TLR3, TLR4 et TLR2/6. Ces TLR, préalablement décrits dans les hépatocytes (Etude1), l'induction de la production de cytokines en réponse à leurs ligands présentent également un important effet antiviral. Le TLR5 quant à lui, pourtant détecté précédemment dans les hépatocytes primaires, semble induire une faible production cytokinique et un effet antiviral mitigé. Cela peut s'expliquer par une expression trop faible de ce récepteur, contrairement à ce que laissait penser les résultats d'immunoblot de l'Etude 1. Comme expliqué dans l'introduction, les voies de signalisations des TLR bien qu'identiques pour certains peuvent conduire à des réponses cytokiniques variables en termes de quantités et d'expression. Ces variations peuvent expliquer les différences de productions cytokiniques observées en fonction des ligands utilisés. Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier les TLR2 (Pam3CSK4) et 3 (Poly(I:C)-(HMW) et Riboxol) comme les plus à même de générer une production cytokinique importante, et par ce biais un fort effet antiviral dans les hépatocytes infectés par HBV. Cet effet antiviral est d'ailleurs confirmé comme agissant sur la réplication intracellulaire (ARN et ADN HBV), la production de particules virales et subvirales (HBsAg et HBeAg) et ce en absence de cytotoxicité sur les hépatocytes infectés. Les effets médiés par les ligands de TLR2 et 3 ont également pour avantage d'être stable au cours du temps contrairement à l'utilisation d'un NUC (ici le Ténofovir). L'absence de « rebond » de la réplication virale plusieurs jours après l'arrêt des agonistes pourrait indiquer un éventuel impact de la stimulation de ces TLR sur la matrice transcriptionnelle d'HBV dans les hépatocytes, l'ADNccc (Figure 27). Cet effet pourrait être médié par la production d'IFN

ou de cytokines pro-inflammatoires par les hépatocytes, qui de manière autocrine et paracrine, induirait la synthèse d'ISG et/ou de régulateur épigénétiques, agissant sur la répression de l'ADNccc ^{145,146}. Cet effet antiviral semble médié en parti par la sécrétion d'IL-6 et peu ou pas par la sécrétion IFN de type I pour l'utilisation des agonistes PAM3CSK4 et Riboxxol. Dans le cas du Poly(I:C)-(HMW) en revanche l'effet ne semble pas dépendre de ces deux cytokines inflammatoires. La spécificité pour TLR3 du ligand Riboxxol en comparaison au Poly(I:C)-(HMW) pourrait être responsable de la différence observée en termes de réponse antivirale. Le Riboxxol synthétisé sous forme d'ARNdb est de taille et de structure rigoureusement définie (50 paires de bases). Le Poly(I:C)-(HMW) synthétisé lui aussi sous forme d'ARNdb de taille variable, est capable, de ce fait, d'activer aussi bien les RLR que sont RIG-I et MDA-5 ^{66,68,69}.

Ce manque de spécificité pouvant poser d'important problème d'induction cytokinique trop importante, l'utilisation du Riboxxol spécifique de TLR3, semble être plus sûre *in vivo*. L'analyse de tout le spectre possible de cytokines et mécanismes antiviraux responsable de l'effet anti-HBV est complexe. Une médiation dépendante d'autres IFN est possible, notamment par les IFN de type III, ceux-ci ayant déjà été décrits pour leur effet antiviral contre

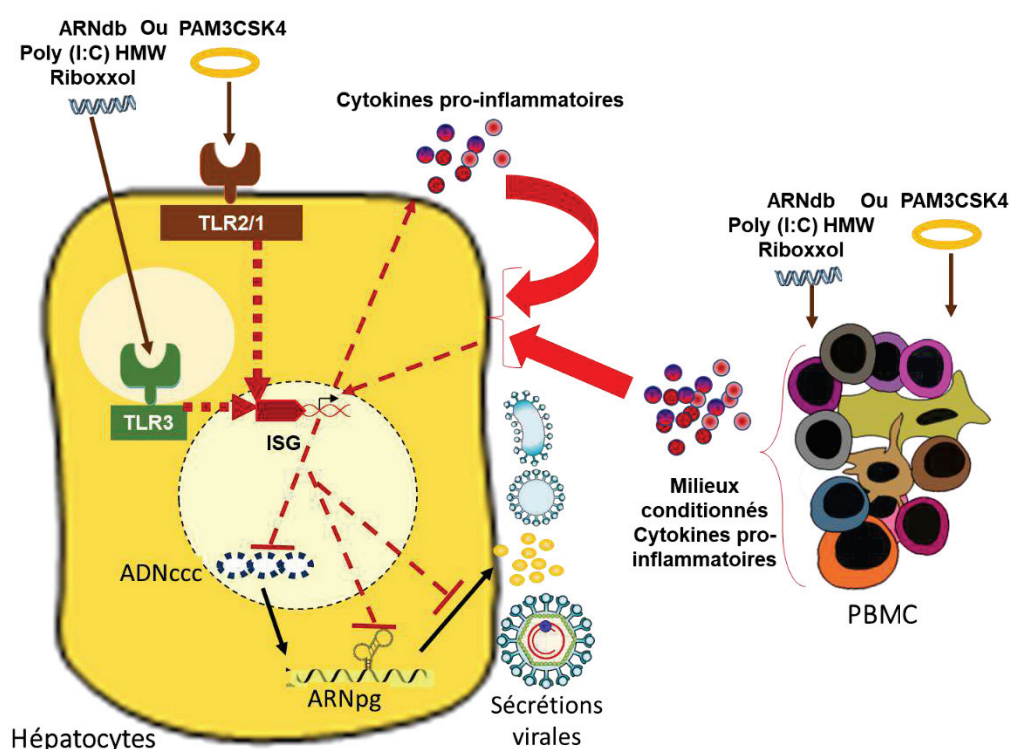


Figure 27 : Effet antiviral direct des ligands de TLR2 et TLR3 dans les hépatocytes infectés par HBV (adaptée de Lucifora J et al 2018) Induction d'un effet direct anti-HBV dans les hépatocytes par l'utilisation des ligands TLR2 et 3 via la mise en place d'un processus inflammatoire capable d'inhiber l'ADNccc. Cette effet anti-viral est efficace également par la stimulation de cellules immunitaires par ces deux ligands

HBV au sein du laboratoire^{136,158}. Cependant, les cytokines avaient alors été testées séparément. L'utilisation d'agoniste de TLR conduisant à la sécrétion conjointe des différents IFN de types III et d'autres cytokines inflammatoires dont l'IL-6, pourrait médier un effet antiviral plus fort. Il faudra par la suite déterminer l'impact potentiel de ces autres IFN et cytokines par l'inhibition des récepteurs, après avoir préalablement déterminé ceux exprimés par les hépatocytes, sur l'infection chronique par HBV.

D'autre part, nous avons également obtenu un effet antiviral fort intéressant par l'utilisation de milieux conditionnés obtenus, en stimulant des PBMC de donneur sain, avec ces mêmes ligands. L'analyse et l'utilisation des cytokines produites par les cellules immunitaires en réponse aux PAM3CSK4, Poly(I:C)-(HMW) et Riboxol nous ont permis 1) d'évaluer la production de certaines cytokines pro-inflammatoires dont les cytokines préalablement identifiées pour leur effet anti-HBV (IL-6, IL-1 β , IFN de type I et II) ; 2) d'observer une différence de réponse entre les ligands de TLR2 et TLR3, ces derniers entraînant la production d'IFN plus importante que le PAM3CSK4 ; 3) d'identifier des variations de ces différentes cytokines et leurs niveaux de productions entre deux individus ; 4) d'obtenir une inhibition de la réplication virale par ajout de ces milieux conditionnés sur des hépatocytes infectés par HBV. Ce résultat préliminaire est cependant encourageant, mais la même expérience serait à réaliser sur les cellules immunitaires de l'environnement hépatique, les LMNC. Les composants immunitaires, aussi bien en termes de récepteurs, que de types cellulaires, étant différents des PBMC, la réponse cytokinique pourrait elle aussi varier. L'utilisation du ligand de TLR3 comme précédemment sous-entendu, pourrait par ailleurs stimuler la population cDC1, et renforcer l'effet antiviral par le système immunitaire. Bien que la sécrétion d'IFN- λ n'ait pas été regardée ici, la présence de la sécrétion d'IFN- α en présence d'un agoniste de TLR3, TLR absent des cellules productrices de cet IFN en majorité que sont les pDC, laisse à supposer une activation de ces dernières par l'IFN- λ ¹⁸³. Comme expliqué précédemment, la population totale de DC (cDC1 et pDC comprises) étant plus importante dans les LMNC, la stimulation par le ligand de TLR3 pourrait entraîner une plus grande variété d'IFN sécrétée, dont notamment les IFN- α et - λ connu pour leur fort effet antiviral contre HBV. L'utilisation du ligand de TLR3 présente donc un fort potentiel dans un système hépatique complet (cellules du foie immunitaires et non immunitaires).

Nous avons mis en évidence deux mécanismes antiviraux par l'utilisation des agonistes de TLR2 et TLR3, d'une part un effet direct sur les hépatocytes infectés et d'autre part un effet indirect médié par les sécrétions cytokiniques après stimulation des cellules immunitaires de

sang périphérique. L'effet direct de ces agonistes dans les hépatocytes chroniquement infectés par HBV est très intéressant pour le développement de stratégies immuno-thérapeutiques antivirales ciblant les TLR2 et TLR3. Les mécanismes précisément impliqués dans l'inhibition de la réplication virale, en absence de cytotoxicité sur les hépatocytes, sont cependant encore à déterminer. Mais ils incluent très probablement une inactivation transcriptionnelle de l'ADNccc par des mécanismes de régulations épigénétiques, une inhibition de la quantité des ARN viraux (régulation post-traductionnelle, modification du métabolisme des ARNs viraux) et/ou l'action d'effecteurs cellulaires conduisant à l'inactivation et à termes à la dégradation de l'ADNccc. Cependant, d'importantes variations d'efficacité au niveau de l'ADNccc ont pu être observées en fonction des donneurs d'hépatocytes primaires. Ces variations peuvent être le résultat de plusieurs facteurs indépendants. D'une part, l'expression et la faculté de réponse des récepteurs immunitaires innées peuvent varier en fonction des individus (facteurs génétiques, différence en termes de réponse cytokinique) et en fonction des facteurs environnementaux et alimentaires (pathogènes de la flore intestinal, PAMP associée à l'alimentation...) auxquels sont exposés ceux-ci. D'autre part, les différences des niveaux d'infections et de réplifications du HBV observés dans les hépatocytes primaires peuvent influencer sur l'impact de la réponse immunitaire antivirale, potentiellement par des mécanismes viro-induit. L'interaction entre les facteurs de l'hôte et les facteurs viraux, au niveau immunitaire (élimination effective/échec de l'élimination du HBV) ou cellulaire (différences d'expressions des facteurs de transcription ou d'entrée HNF/NTCP dans les hépatocytes ?), implique que l'utilisation de la stimulation des PRR ne conduit pas à une réponse antivirale aussi efficace pour tous les individus. Cependant, l'utilisation en combinaison de drogues impactant la réplication virale pourrait augmenter la portée de l'efficacité d'utilisation des agonistes de TLR2 et TLR3.

Les résultats, d'utilisation de ces agonistes *in vivo* ont été ici obtenus dans des souris immunodéprimées (FRG), dont le foie a été reconstitué à partir d'hépatocytes primaires humains (HuHep). Le Pam3CSK4 et le Riboxol ont montré une efficacité plus modérée sur l'inhibition de la réplication d'HBV dans ce modèle. Ces résultats plus faibles, pourraient s'expliquer par une faible distribution au foie des ligands. D'une part l'administration des ligands peut être mise en cause, du fait de l'utilisation de la voie intraveineuse pouvant limiter l'accès à l'environnement hépatique. De plus, la stabilité du Pam3CSK4 et du Riboxol *in vivo* du fait d'une dégradation ou encore d'une élimination pourrait également diminuer l'efficacité des traitements. Les doses utilisées peuvent être par ailleurs trop faibles, ou les temps entre les traitements trop rapprochés ou au contraire trop long. L'utilisation *in vivo* de ces agonistes

pourrait nécessiter beaucoup de mise au point étant donné les de ces nombreux paramètres pouvant influencer sur leur efficacité. L'un des points à l'essai dans notre équipe et en collaboration, est la voie d'administration de ces ligands par l'utilisation de nanoparticules acheminées naturellement vers le foie, permettant dans un même temps, d'augmenter la délivrance et l'efficacité du ligand au niveau hépatique. Il serait intéressant également d'évaluer par la suite l'efficacité d'un tel traitement dans ces souris immunocompétentes pour voir les potentiels effets bénéfiques à la stimulation aussi bien des cellules immunitaires que des hépatocytes pour induire une inhibition voire une élimination effective de l'infection par HBV. L'utilisation de modèles murins immunocompétent est possible grâce à l'utilisation de modèles doubles humanisés (foie et cellules immunitaires) ¹⁴⁴, ou encore de l'utilisation de vecteurs AAV contenant le génome HBV ^{184,185}, permettant de s'absoudre de l'absence du NTCP humain, pour l'infection des hépatocytes murins.

L'autre point, préalablement expliqué, pouvant influencer sur la réponse aux agonistes de TLR est le niveau d'infection, de réplication et de sécrétion des différentes particules virales et subvirales (HBsAg, HBeAg et l'ADN HBV sériques). Les mécanismes inhibiteurs induits par le virus pourraient influencer sur la stimulation du TLR cible. L'un de ses mécanismes concerne un récepteur particulier : le TLR9 et son ligand synthétique le CpG ODN.

Nous avons pu observer deux mécanismes indépendants dans l'interaction entre TLR9 et HBV. D'une part lors de l'infection d'hépatocytes, le traitement simultané par un ligand de TLR9 CpG ODN inhibe l'infection virale. A la vue de nos résultats, les hépatocytes n'expriment pas le TLR9 d'une part, et ne produisent aucune sécrétion cytokinique en réponse aux différents ligands de la voie TLR9 d'autre part. Le mécanisme impliqué dans l'effet antiviral contre HBV semble indépendant de l'activation de la voie TLR9 dans les hépatocytes. De plus, la co-sédimentation des particules virales complètes et la déplétion du ligand de TLR9/CpG ODN par celles-ci laisse suggérer un recouvrement de la particule virale HBV par le CpG ODN. Ce recouvrement pourrait bloquer la reconnaissance de la particule virale en empêchant son interaction avec son récepteur d'entrée et ainsi inhiber l'installation de l'infection. Ce phénomène, inhibant l'entrée des particules virales dans les hépatocytes, dû à la fixation d'acides nucléiques, rappelle par ailleurs le mécanisme de l'une des DAA en développement précédemment décrite, les NAP. En effet, bien que ceux-ci soient conçus initialement pour inhiber la formation des particules subvirales HBsAg, suivant leur formulation, ces NAP semblent également capables d'interférer avec les mécanismes d'entrée d'HBV^{156,157}. Le

mécanisme impliquant les acides nucléiques de type NAP ou CpG ODN dans l'interaction avec les particules virales d'HBV pourrait être similaire, voir identique.

D'autre part, la présence de particules virales HBV semble interférer avec l'activation de la voie TLR9 et à la synthèse de l'IFN- α . Après l'identification de l'interférence entre le ligand de TLR9 et les particules virales dans l'installation de l'infection, nous avons pu observer que celle-ci est responsable de l'inhibition de l'IFN- α , par les particules virales HBV, via la séquestration du ligand. Ce mécanisme est réversible par l'élimination des particules virales HBV avant l'agonisation du TLR9 dans les pDC. Le recouvrement des particules virales par les ADN, ce mécanisme ne semble pas par ailleurs uniquement restreint aux CpG ODN synthétiques, conduit à la rétention de celui-ci et par ce biais à une moins forte stimulation du TLR9 et *in fine* à une diminution de la synthèse d'IFN- α (Figure 28).

Cependant, en présence de particules subviraux HBsAg, le phénomène d'inhibition de la voie TLR9 et de la synthèse d'IFN- α est retrouvé. Cet effet semble indépendant de la rétention du ligand par les particules subviraux contrairement aux particules virales complètes. Il semblerait donc qu'un effet inhibiteur de la voie TLR9 dans le cadre d'infection chronique soit dû à une interférence entre les particules virales complètes et le ligand CpG. Cependant, un effet indépendant de cette interférence est médié par les particules subviraux HBsAg est responsable de l'inhibition de la voie TLR9 d'une part et de la synthèse d'IFN *in fine*.

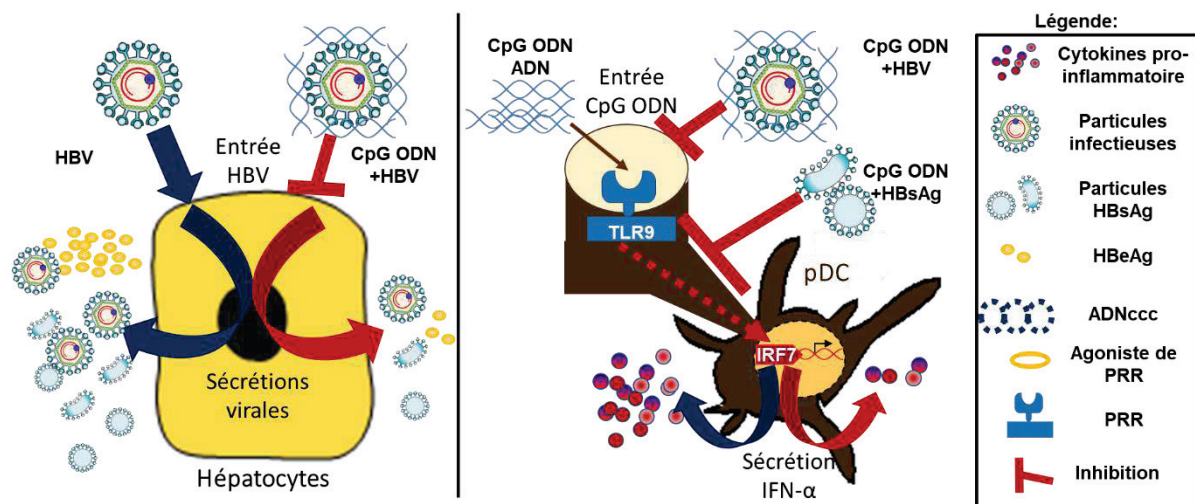


Figure 28 : Résumé graphique de l'interaction entre le CpG ODN et les particules virales HBV. Effet du CpG ODN sur HBV 1) dans les hépatocytes : inhibition de l'entrée des particules virales. 2) dans les pDC : inhibition de l'entrée du CpG ODN pour activer le TLR9 entraînant une diminution de la sécrétion d'IFN- α ; 3) effet d'HBsAg : inhibition de la voie TLR9 indépendante d'une interaction avec le ligand de TLR9.

Ce mécanisme laisse à supposer que l'utilisation du ligand de TLR9 en présence de particules virales circulante semble compromis par 1) la rétention dudit ligand par les particules virales complètes empêche la stimulation du récepteur TLR9 et la production d'IFN/cytokines pro-inflammatoires permettant un effet antiviral et l'activation du système immunitaire ; 2) la présence en excès des particules subviraux HBsAg (1000 à 100000 fois plus que de particules infectieuses) ; 3) la présence des particules subviraux HBsAg capable d'inhiber fortement la réponse IFN des pDC impliquant une donc une perte d'effet de la stimulation TLR9 dans la mise en place d'une réponse antivirale efficace.

L'utilisation d'un ligand de TLR9 nécessiterait donc de diminuer fortement la sécrétion de particules virales, mais surtout subviraux afin d'éviter l'interférence de recouvrement de la particule virale complète et l'inhibition induite par les particules subviraux.

Cependant le mécanisme induit par les particules subviraux HBsAg, demeure très intéressant. En effet, l'identification du mécanisme impliqué pourrait permettre de mieux comprendre la mise en place de l'inhibition des cellules immunitaires et en particulier ici des pDC. Un mécanisme impliquant la liaison des particules HBsAg à un ou plusieurs récepteurs inhibiteurs, précédemment décrit, est suspecté. Un groupe a décrit une possible liaison de cet antigène au récepteur BDCA2 des pDC ¹²⁷. Cependant, cette interaction n'a pas été redémontrée par la suite. L'identification du/des récepteurs ciblés par les particules subviraux d'HBsAg pourrait donner lieu à de nouveaux composés antiviraux bloquant leur interaction. D'autre part d'autre mécanisme ne sont pas exclu. Les particules subviraux pourraient également avoir un impact plus direct sur les voies d'activations du TLR9/IRF7. La différence de composition entre les particules virales complètes et subviraux, en L, M et SHBsAg, pourrait également jouer un rôle dans le mécanisme d'inhibition de l'IFN. Une différence également dans la forme des particules subviraux (sphères ou bâtonnets) pourrait être impliqué. Les récepteurs inhibiteurs, précédemment décrits, BDCA2, ILT7, NKp44 ou encore DCIR ^{87,88,127}, pourraient non seulement être la cible de ces particules subviraux, mais également être impliqué par une forme ou l'autre de ces dernières (bâtonnets ou filaments).

Dans le but d'identifier la cible de l'HBsAg, il conviendrait dans un premier temps de le localiser au niveau cellulaire dans la pDC par utilisation de techniques d'immunofluorescences ou encore de microscopies électroniques. L'interaction avec un récepteur inhibiteur pouvant entraîner son internalisation, il faudrait également identifier les protéines, spécifiques ou non des pDC, interagissant avec l'HBsAg. La caractérisation des interactions entre les particules subviraux et les récepteurs cellulaires pourrait être faite en

utilisant un répertoire de ces dernières, permettant dans un premier temps d'identifier lesquelles interagissent ensembles par l'utilisation de PLA (Proximity ligation assay) ou co-immunoprécipitation après une lyse douce des membranes des cellules. Par la suite, l'évaluation de cette interaction pourrait être réalisée par l'utilisation de la technique de résonance des plasmons de surface (SPR) comme utilisé dans la technologie Biacore.

Ces différentes études nous ont permis de conforter l'idée qu'une utilisation d'agonistes de TLR, dans les stratégies immuno-thérapeutiques dans le cadre d'infection chronique par HBV, semble encourageante. Le concept de stimulation des cellules hépatiques, dont les hépatocytes infectés, pour induire une élimination virale, semble être une voie fructueuse. La stimulation simultanée des effecteurs professionnels de l'immunité amplifierait alors l'effet antiviral induit dans les hépatocytes. Les récepteurs TLR2 et TLR3 étant bien représentés et fonctionnels dans le foie, l'utilisation de leurs ligands sont de bons candidats dans la lutte anti-HBV. La valorisation de ces ligands est de plus appuyée par le fort effet antiviral et répresseur qu'ils semblent générer sur la réplication du HBV et la fonctionnalité de sa matrice transcriptionnelle, l'ADNccc. Cependant, leur utilisation demande encore beaucoup d'optimisation. En effet, leur utilisation tel quelle *in vivo*, est peu efficiente. La voie d'administration doit être améliorée pour permettre 1) une meilleure distribution au foie des ligands ; 2) un contrôle plus précis de la dose effective de ligand ; 3) éviter les effets secondaires dus à une mauvaise distribution des ligands ; 4) un effet suffisamment stable dans le temps des ligands. L'utilisation de ces ligands seuls cependant peut être insuffisante pour aboutir à une élimination définitive et sûre d'HBV. Comme expliqué précédemment l'utilisation des méthodes immuno-thérapeutiques pourraient être incluses dans une stratégie plus large pour une guérison fonctionnelle. En effet, l'utilisation de DAA permettant la diminution de la réplication, de la prolifération et de la sécrétion des particules virales et subvirales d'HBV pourrait être nécessaire pour utiliser par la suite les composés immuno-thérapeutiques ¹³⁹. Les effets immuno-modulateurs viro-induit pouvant rendre ses composés inefficaces, comme dans l'exemple de l'effet induit par l'interaction entre le CpG ODN et les particules virales de l'étude 3, ou encore de l'effet sur les macrophages en annexe. Dans le but de s'affranchir de tels effets, la diminution des paramètres viraux semble indispensable.

De plus, la diminution des mécanismes régulateurs de l'immunité, pouvant être exacerbés dans le cadre de l'infection chronique par HBV, du fait de la présence des gMDSC ou encore de l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD1/PD-L1, la modulation de ces cellules et/ou récepteurs pourrait aider favorablement l'utilisation des agonistes de PRR ¹⁸⁰. Les

stratégies d'utilisation d'anticorps neutralisant contre les récepteurs inhibiteurs, à l'origine à l'essai dans les thérapies anti-cancéreuses, sont à l'étude dans le cadre des infections virales chroniques. Leur utilisation dans des modèles murins d'infections chroniques HBV a montré une capacité à diminuer les effets inhibiteurs sur les T CD8⁺ et à augmenter de ce fait leurs capacités cytotoxiques. L'activation de l'immunité adaptative par ailleurs, pourrait être elle aussi améliorée. L'utilisation combinée d'agonistes de PRR et de protéines virales immunogènes, pourrait servir à stimuler la présentation antigénique des CPA. Cette activation des CPA conduirait à la formation des iMATE^{164,165} servant de plateforme au recrutement et à l'activation des lymphocytes spécifiques des antigènes viraux utilisés. Cette stratégie de vaccination thérapeutique, pourrait également être incluse dans le processus de thérapie anti-HBV. Elles auraient pour avantage d'induire, d'une part, un processus immunitaire complet incluant aussi bien les cellules immunitaires innées qu'adaptatives et d'autre part, leurs auto-régulations pour éviter une inflammation excessive. Une autre stratégie permettant d'augmenter l'activité des T CD8⁺ contre les cellules infectées par HBV serait bien entendu l'utilisation des CAR-T¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. L'environnement cytokinique inflammatoire généré par les agonistes de PRR pourrait aider à l'activité cytotoxique de ces cellules. Le rôle potentiel des récepteurs activateurs OX40/OX40L, dans l'élimination naturelle du virus HBV est également une piste exploitable^{137,186}. L'induction de l'expression de ces récepteurs, permettant une activation efficace des capacités cytotoxiques des T CD8⁺, pourrait être réalisée par l'utilisation de vecteurs AAV par exemples codant pour ces ligands et ciblant les cellules immunitaires du foie (CPA, T CD8⁺...). Cet environnement pourrait également conduire à l'activation des autres cellules cytotoxiques (NK/NKT...) mais aussi à la génération d'une séroconversion anti-HBV par l'activation des lymphocytes B. La production d'anticorps pourrait être ainsi stimulée, et fournir une aide supplémentaire à l'élimination d'HBV, mais également à la protection d'une potentielle réactivation ou réinfection. Ce processus pourrait être généré plus spécifiquement par l'utilisation d'une vaccination thérapeutique, précédemment évoquée, couplant un agoniste de PRR à des fragments immunogènes de protéines HBsAg.

L'implication des concepts immuno-thérapeutiques dans la lutte contre les infections chroniques par HBV, semble prometteuse. Les mécanismes permettant d'activer/rééduquer le système immunitaire par l'utilisation d'agonistes de récepteurs immunitaires innées en combinaison avec des DAA doivent cependant être bien évalués. En effet, l'induction d'une immunité efficace par l'utilisation d'agonistes et d'anticorps neutralisant contre les récepteurs co-inhibiteur pourrait également conduire à une inflammation excessive générant des

dommages et des effets secondaires, trop importants. Une évaluation minutieuse et une bonne maîtrise des doses ainsi que le temps de traitements utilisant des agonistes et des anti-inhibiteurs. Un traitement curatif efficace implique également la sûreté de son utilisation.

Références

1. Heymann, F. & Tacke, F. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 88–110 (2016).
2. Doherty, D. G. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* **66**, 60–75 (2016).
3. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22 (2004).
4. Crispe, I. N. Liver antigen-presenting cells. *J. Hepatol.* **54**, 357–365 (2011).
5. Koyama, Y. & Brenner, D. A. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 55–64 (2017).
6. Protzer, U., Maini, M. K. & Knolle, P. A. Living in the liver: hepatic infections. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 201–213 (2012).
7. Hünninger, K. & Kurzai, O. Phagocytes as central players in the defence against invasive fungal infection. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2018). doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.021
8. Scott, C. L. *et al.* Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* **7**, 10321 (2016).
9. Zannetti, C. *et al.* Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *J. Immunol.* **197**, 356–367 (2016).
10. McDonald, B. & Kubes, P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology* **151**, 1087–1095 (2016).
11. Tripathi, S., Verma, A., Kim, E.-J., White, M. R. & Hartshorn, K. L. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 931–938
12. Porto, B. N. & Stein, R. T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front. Immunol.* **7**, (2016).
13. Xu, R., Huang, H., Zhang, Z. & Wang, F.-S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **11**, 224–231 (2014).
14. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
15. Hou, X., Zhou, R., Wei, H., Sun, R. & Tian, Z. NKG2D–retinoic acid early inducible-1 recognition between natural killer cells and kupffer cells in a novel murine natural killer cell–dependent fulminant hepatitis. *Hepatology* **49**, 940–949
16. Peng, H. & Tian, Z. Re-examining the origin and function of liver-resident NK cells. *Trends Immunol.* **36**, 293–299 (2015).
17. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).
18. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* **139**, 380–397 (1974).

19. Durand, M. & Segura, E. The Known Unknowns of the Human Dendritic Cell Network. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
20. Segura, E., Durand, M. & Amigorena, S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* **210**, 1035–1047 (2013).
21. Segura, E. & Amigorena, S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.* **158**, 73–78 (2014).
22. Segura, E. & Amigorena, S. Chapter One - Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. in *Advances in Immunology* (ed. Alt, F. W.) **127**, 1–31 (Academic Press, 2015).
23. Aa, E. van der, Laar, L. van de, Janssen, H. L. A., Montfoort, N. van & Woltman, A. M. BDCA3 expression is associated with high IFN- λ production by CD34+-derived dendritic cells generated in the presence of GM-CSF, IL-4, and/or TGF- β . *Eur. J. Immunol.* **45**, 1471–1481
24. van der Aa, E., van Montfoort, N. & Woltman, A. M. BDCA3+CLEC9A+ human dendritic cell function and development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 39–48 (2015).
25. Vu Manh, T.-P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I. & Dalod, M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
26. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).
27. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20
28. Sittig, S. P. *et al.* A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators of Inflammation* (2016). doi:10.1155/2016/3605643
29. Holdsworth, S. R. & Gan, P.-Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 2243–2254 (2015).
30. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).
31. See, P. *et al.* Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* **356**, eaag3009 (2017).
32. Aspord, C., Leloup, C., Reche, S. & Plumas, J. pDCs efficiently process synthetic long peptides to induce functional virus- and tumour-specific T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2880–2892
33. Alculumbre, S. G. *et al.* Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* **1** (2017). doi:10.1038/s41590-017-0012-z
34. Riva, A. & Chokshi, S. Immune checkpoint receptors: homeostatic regulators of immunity. *Hepatol. Int.* 1–14 (2018). doi:10.1007/s12072-018-9867-9
35. Silva, R. *et al.* The PD-1:PD-L1 immune inhibitory checkpoint in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: a comprehensive review and future perspectives. *Rev. Port. Cardiol.* (2016).
36. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).

37. Samson, M., Lakomy, D., Audia, S. & Bonnotte, B. Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev. Médecine Interne* **32**, 292–301 (2011).
38. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res.* **21**, 5047–5056 (2015).
39. Godfrey, D. I., Pellicci, D. G. & Smyth, M. J. The Elusive NKT Cell Antigen--Is the Search Over? *Science* **306**, 1687–1689 (2004).
40. Mori, L., Lepore, M. & Libero, G. D. The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 479–510 (2016).
41. Lantz, O. & Legoux, F. MAIT cells: an historical and evolutionary perspective. *Immunol. Cell Biol.* **0**,
42. Zhu, S., Zhang, H. & Bai, L. NKT cells in liver diseases. *Front. Med.* **12**, 249–261 (2018).
43. Bourhis, L. L. *et al.* Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 701–708 (2010).
44. van Wilgenburg, B. *et al.* MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
45. Cooper, M. D. The early history of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 191–197 (2015).
46. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. The structure of a typical antibody molecule. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis. 5th Ed.* (2001).
47. Luangsay, S. *et al.* Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J. Hepatol.* **63**, 1077–1085 (2015).
48. Crispe, I. N. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 51–62 (2003).
49. Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.-C. & Rabourdin-Combe, C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* **28**, 221–236
50. Mehrfeld, C., Zenner, S., Kornek, M. & Lukacs-Kornek, V. The Contribution of Non-Professional Antigen-Presenting Cells to Immunity and Tolerance in the Liver. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
51. Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 397–411 (2017).
52. Troeger, J. S. *et al.* Deactivation of Hepatic Stellate Cells During Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology* **143**, 1073-1083.e22 (2012).
53. Kisseleva, T. *et al.* Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9448–9453 (2012).
54. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J. A. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
55. Pandey, S., Kawai, T. & Akira, S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016246 (2015).

56. Chow, J., Franz, K. M. & Kagan, J. C. PRRs are watching you: Localization of innate sensing and signaling regulators. *Virology* **479–480**, 104–109 (2015).
57. Marr, N. & Turvey, S. E. Role of human TLR4 in respiratory syncytial virus-induced NF- κ B activation, viral entry and replication. *Innate Immun.* **18**, 856–865 (2012).
58. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
59. Heil, F. *et al.* The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2987–2997
60. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 5598–5603 (2004).
61. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Sousa, C. R. e. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
62. Alexopoulou, L., Desnues, B. & Demaria, O. Le récepteur Toll-like 8 - Un TLR pas comme les autres. *médecine/sciences* **28**, 96–102 (2012).
63. Desnues, B. *et al.* TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1497–1502 (2014).
64. Pelka, K. *et al.* The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport. *Immunity* **48**, 911-922.e7 (2018).
65. Oshiumi, H., Kouwaki, T. & Seya, T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
66. Loo, Y.-M. & Gale, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
67. Chen Nanhua *et al.* RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life* **69**, 297–304 (2017).
68. Kell, A. M. & Gale, M. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* **479–480**, 110–121 (2015).
69. Zevini, A., Olganier, D. & Hiscott, J. Cross-Talk between the Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends Immunol.* **38**, 194–205 (2017).
70. Bridgeman, A. *et al.* Viruses transfer the antiviral second messenger cGAMP between cells. *Science* **349**, 1228–1232 (2015).
71. Gentili, M. *et al.* Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* **349**, 1232–1236 (2015).
72. Schoggins, J. W. Viruses carry antiviral cargo. *Science* **349**, 1166–1167 (2015).
73. Zheng, C. Evasion of Cytosolic DNA-Stimulated Innate Immune Responses by Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **92**, e00099-17 (2018).
74. Dempsey, A. & Bowie, A. G. Innate Immune Recognition of DNA: a recent history. *Virology* **0**, 146–152 (2015).

75. Kufer, T. A., Nigro, G. & Sansonetti, P. J. Multifaceted Functions of NOD-Like Receptor Proteins in Myeloid Cells at the Intersection of Innate and Adaptive Immunity. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
76. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *J. Mol. Biol.* **430**, 217–237 (2018).
77. Baker, P. J. *et al.* Posttranslational Modification as a Critical Determinant of Cytoplasmic Innate Immune Recognition. *Physiol. Rev.* **97**, 1165–1209 (2017).
78. Mayer, S., Raulf, M.-K. & Lepenies, B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 223–237 (2017).
79. Cummings, R. D. & McEver, R. P. C-Type Lectins. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
80. Mayer, S., Raulf, M.-K. & Lepenies, B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 223–237 (2017).
81. Zhang, F., Ren, S. & Zuo, Y. DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin: C-Type Lectins for Infection. *Int. Rev. Immunol.* **33**, 54–66 (2014).
82. Bates, E. E. M. *et al.* APCs Express DCIR, a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. *J. Immunol.* **163**, 1973–1983 (1999).
83. Meyer-Wentrup, F. *et al.* Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* **111**, 4245–4253 (2008).
84. Dambuza, I. M. & Brown, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 21–27 (2015).
85. Monteiro, J. T. & Lepenies, B. Myeloid C-Type Lectin Receptors in Viral Recognition and Antiviral Immunity. *Viruses* **9**, 59 (2017).
86. Tang, J., Lin, G., Langdon, W. Y., Tao, L. & Zhang, J. Regulation of C-Type Lectin Receptor-Mediated Antifungal Immunity. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
87. Florentin, J. *et al.* HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **120**, 4544–4551 (2012).
88. Hirsch, I., Janovec, V., Stranska, R. & Bendriss-Vermare, N. Cross Talk between Inhibitory Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif-Signaling and Toll-Like Receptor Pathways in Macrophages and Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
89. Touw, W. van der, Chen, H.-M., Pan, P.-Y. & Chen, S.-H. LILRB receptor-mediated regulation of myeloid cell maturation and function. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 1079–1087 (2017).
90. Rosental, B. *et al.* Proliferating Cell Nuclear Antigen Is a Novel Inhibitory Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44. *J. Immunol.* **187**, 5693–5702 (2011).
91. Bao, M. & Liu, Y.-J. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* **4**, 40–52 (2013).
92. Janovec, V. *et al.* The MEK1/2-ERK Pathway Inhibits Type I IFN Production in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018).

93. Pellerin, A. *et al.* Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms. *EMBO Mol. Med.* **7**, 464–476 (2015).
94. Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L. & Sekerkova, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin. Sci.* **126**, 593–612 (2014).
95. Rehmann, B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat. Med.* **19**, 859–868 (2013).
96. Schmidt, S. V., Nino-Castro, A. C. & Schultze, J. L. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
97. Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet* **295**, 695–698 (1970).
98. Locarnini, S., Littlejohn, M., Aziz, M. N. & Yuen, L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin. Cancer Biol.* **23**, 561–575 (2013).
99. Mühlemann, B. *et al.* Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period. *Nature* **557**, 418–423 (2018).
100. Landers, T. A., Greenberg, H. B. & Robinson, W. S. Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Endogenous DNA Polymerase Reaction. *J. Virol.* **23**, 368–376 (1977).
101. 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.* **72**, 4597–4601 (1975).
102. Garcia, P. D., Ou, J. H., Rutter, W. J. & Walter, P. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J. Cell Biol.* **106**, 1093–1104 (1988).
103. Ludgate, L. *et al.* Cell-Free Hepatitis B Virus Capsid Assembly Dependent on the Core Protein C-Terminal Domain and Regulated by Phosphorylation. *J. Virol.* **90**, 5830–5844 (2016).
104. Wei, Y., Neuveut, C., Tiollais, P. & Buendia, M.-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol. Biol.* **58**, 267–272 (2010).
105. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003 (2011).
106. Decorsière, A. *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **531**, 386–380 (2016).
107. Murphy, C. M. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **16**, 2846–2854 (2016).
108. Gripon, P., Le seyec, J., Rumin, S. & Guguen-guillouzo, C. Myristylation of the Hepatitis B Virus Large Surface Protein Is Essential for Viral Infectivity. *Virology* **213**, 292–299 (1995).
109. Falco, S. D. *et al.* N-terminal myristylation of HBV preS1 domain enhances receptor recognition. *J. Pept. Res.* **57**, 390–400
110. Glebe, D. & Urban, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.* **13**, 22–38 (2007).

111. Soussan, P. *et al.* In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J. Clin. Invest.* **105**, 55–60 (2000).
112. Duriez, M. *et al.* Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity. *J. Hepatol.* **67**, 687–699 (2017).
113. Patient, R., Hourieux, C. & Roingeard, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* **11**, 1561–1570
114. Valaydon, Z. S. & Locarnini, S. A. The virological aspects of hepatitis B. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **31**, 257–264 (2017).
115. Cooper, A. & Shaul, Y. Clathrin-mediated Endocytosis and Lysosomal Cleavage of Hepatitis B Virus Capsid-like Core Particles. *J. Biol. Chem.* **281**, 16563–16569 (2006).
116. Butler, E. K. *et al.* HBV serum DNA and RNA levels in nucleos(t)ide analogue-treated or untreated patients during chronic and acute infection. *Hepatology* **0**,
117. Lampertico, P. *et al.* EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **67**, 370–398 (2017).
118. Tang, L. S. Y., Covert, E., Wilson, E. & Kottlil, S. Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA* **319**, 1802–1813 (2018).
119. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049 (2012).
120. Levrero, M. & Zucman-Rossi, J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **64**, S84–S101 (2016).
121. Raffetti, E., Fattovich, G. & Donato, F. Incidence of hepatocellular carcinoma in untreated subjects with chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* **36**, 1239–1251
122. Suslov, A., Boldanova, T., Wang, X., Wieland, S. & Heim, M. H. Hepatitis B Virus Does Not Interfere With Innate Immune Responses in the Human Liver. *Gastroenterology* **154**, 1778–1790 (2018).
123. Zhang, E. & Lu, M. Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **204**, 11–20 (2015).
124. Luangsay, S. *et al.* Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **63**, 1314–1322 (2015).
125. Martinet, J. *et al.* Altered Functions of Plasmacytoid Dendritic Cells and Reduced Cytolytic Activity of Natural Killer Cells in Patients With Chronic HBV Infection. *Gastroenterology* **143**, 1586–1596.e8 (2012).
126. Woltman, A. M., Op den Brouw, M. L., Biesta, P. J., Shi, C. C. & Janssen, H. L. A. Hepatitis B Virus Lacks Immune Activating Capacity, but Actively Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Function. *PLoS ONE* **6**, (2011).
127. Xu, Y. *et al.* HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* **46**, 2640–2646 (2009).

128. Faure-Dupuy, S., Lucifora, J. & Durantel, D. Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts. *Viruses* **9**, 95 (2017).
129. Sato, S. *et al.* The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity* **42**, 123–132 (2015).
130. Verrier, E. R. *et al.* Hepatitis B virus evasion from cGAS sensing in human hepatocytes. *Hepatology* **0**,
131. van Montfoort, N. *et al.* Hepatitis B Virus Surface Antigen Activates Myeloid Dendritic Cells via a Soluble CD14-Dependent Mechanism. *J. Virol.* **90**, 6187–6199 (2016).
132. Lebossé, F. *et al.* Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **66**, 897–909 (2017).
133. Vincent, I. E. *et al.* Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS ONE* **6**, (2011).
134. Aa, E. van der, Buschow, S. I., Biesta, P. J., Janssen, H. L. A. & Woltman, A. M. The Effect of Chronic Hepatitis B Virus Infection on BDCA3+ Dendritic Cell Frequency and Function. *PLOS ONE* **11**, e0161235 (2016).
135. Pallett, L. J. *et al.* Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Med.* **21**, 591–600 (2015).
136. Isorce, N. *et al.* Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral Res.* **130**, 36–45 (2016).
137. Publicover, J. *et al.* An OX40/OX40L interaction directs successful immunity to hepatitis B virus. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaah5766 (2018).
138. Bertoletti, A. & Bert, N. L. Immunotherapy for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Gut Liver* doi:10.5009/gnl17233
139. Ferrari, C. HBV and the immune response. *Liver Int.* **35**, 121–128
140. Testoni, B., Durantel, D. & Zoulim, F. Novel targets for hepatitis B virus therapy. *Liver Int.* **37**, 33–39
141. Alter, H. J. & Blumberg, B. S. Further Studies on a 'New' Human Isoprecipitin System (Australia Antigen). *Blood* **27**, 297–309 (1966).
142. Maupas, P., Coursaget, P., Goudeau, A., Drucker, J. & Bagros, P. IMMUNISATION AGAINST HEPATITIS B IN MAN. *The Lancet* **307**, 1367–1370 (1976).
143. World Health Organization. Global Hepatitis Report WHO 2017. *WHO* (2017). Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=8510AEA7FF7FA68E70D3D42830D050A7?sequence=1>. (Accessed: 1st August 2018)
144. Dusséaux, M. *et al.* Viral Load Affects the Immune Response to HBV in Mice With Humanized Immune System and Liver. *Gastroenterology* **153**, 1647-1661.e9 (2017).

145. Lucifora, J. *et al.* Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–1228 (2014).
146. Lucifora, J. & Protzer, U. Attacking hepatitis B virus cccDNA – The holy grail to hepatitis B cure. *J. Hepatol.* **64**, S41–S48 (2016).
147. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. *J. Virol.* **79**, 1613–1622 (2005).
148. Volz, T. *et al.* The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **58**, 861–867 (2013).
149. Lütgehetmann, M. *et al.* Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* **55**, 685–694
150. Zlotnick, A. *et al.* Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res.* **121**, 82–93 (2015).
151. Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Zhao, J.-R., Zhang, J. & Yan, Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* **6**, 720–726 (2011).
152. Guo, Y. *et al.* Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions. *BMC Genomics* **13**, 563 (2012).
153. Soriano, V., Barreiro, P., Benitez, L., Peña, J. M. & Mendoza, C. de. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 843–851 (2017).
154. Berke, J. M. *et al.* Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e00560-17 (2017).
155. Klumpp, K. *et al.* Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection. *Gastroenterology* **154**, 652-662.e8 (2018).
156. Vaillant, A. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral Res.* **133**, 32–40 (2016).
157. Al-Mahtab, M., Bazinet, M. & Vaillant, A. Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naïve Bangladeshi Patients with HBsAg+ Chronic Hepatitis B Infection. *PLOS ONE* **11**, e0156667 (2016).
158. Isorce, N., Lucifora, J., Zoulim, F. & Durantel, D. Immune-modulators to combat hepatitis B virus infection: From IFN- α to novel investigational immunotherapeutic strategies. *Antiviral Res.* **122**, 69–81 (2015).
159. Niu, C. *et al.* Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 induces prolonged inhibition of HBV via a type I interferon-dependent mechanism. *J. Hepatol.* **68**, 922–931 (2018).
160. Agarwal, K. *et al.* Safety and Efficacy of Vesatolimod (GS-9620) in Patients with Chronic Hepatitis B Who Are Not Currently on Antiviral Treatment. *J. Viral Hepat.* **0**,
161. Gane, E. J. *et al.* The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **63**, 320–328 (2015).

162. Boni, C. *et al.* TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus–Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos(T)ide Analogues. *Gastroenterology* **154**, 1764–1777.e7 (2018).
163. Bengsch, B. & Thimme, R. For whom the interferons toll – TLR7 mediated boosting of innate and adaptive immunity against chronic HBV infection. *J. Hepatol.* **68**, 883–886 (2018).
164. Crispe, I. N. & Pierce, R. H. Killer T cells find meaningful encounters through iMATES. *Nat. Immunol.* **14**, 533–534 (2013).
165. Huang, L.-R. *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8⁺ T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat. Immunol.* **14**, 574–583 (2013).
166. Knolle, P. A., Böttcher, J. & Huang, L.-R. The role of hepatic immune regulation in systemic immunity to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **204**, 21–27 (2015).
167. Guo, F. *et al.* STING Agonists Induce an Innate Antiviral Immune Response against Hepatitis B Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1273–1281 (2015).
168. Korolowicz, K. E. *et al.* Antiviral Efficacy and Host Innate Immunity Associated with SB 9200 Treatment in the Woodchuck Model of Chronic Hepatitis B. *PLOS ONE* **11**, e0161313 (2016).
169. Trumpfheller, C. *et al.* Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J. Intern. Med.* **271**, 183–192
170. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
171. Kennedy, E. M. *et al.* Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* **476**, 196–205 (2015).
172. Ramanan, V. *et al.* CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.* **5**, 10833 (2015).
173. Seeger, C. & Sohn, J. A. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e216 (2014).
174. Liu, Y. *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res.* **152**, 58–67 (2018).
175. Hösel, M. *et al.* Hepatitis B virus infection enhances susceptibility toward adeno-associated viral vector transduction in vitro and in vivo. *Hepatology* **59**, 2110–2120
176. Jiang, C. *et al.* A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and *pcsk9* in vivo. *Cell Res.* **27**, 440–443 (2017).
177. June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S. & Milone, M. C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361–1365 (2018).
178. Krebs, K. *et al.* T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice. *Gastroenterology* **145**, 456–465 (2013).
179. Kruse, R. L. *et al.* HBsAg-redirected T cells exhibit antiviral activity in HBV-infected human liver chimeric mice. *Cytotherapy* **20**, 697–705 (2018).

180. Rao, M., Valentini, D., Dodoo, E., Zumla, A. & Maeurer, M. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int. J. Infect. Dis.* **56**, 221–228 (2017).
181. Durantel, D. New treatments to reach functional cure: Virological approaches. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **31**, 329–336 (2017).
182. Durantel, D. & Zoulim, F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J. Hepatol.* **64**, S117–S131 (2016).
183. Syedbasha, M. & Egli, A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
184. Dion, S., Bourguin, M., Godon, O., Levillayer, F. & Michel, M.-L. Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer Leads to Persistent Hepatitis B Virus Replication in Mice Expressing HLA-A2 and HLA-DR1 Molecules. *J. Virol.* **87**, 5554–5563 (2013).
185. Lucifora, J. *et al.* Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector. *Antiviral Res.* **145**, 14–19 (2017).
186. Thomas, H. Viral hepatitis: OX40 signalling mediates effective HBV immune responses. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2018). doi:10.1038/nrgastro.2018.31

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté et participé à l'évaluation de mon travail et de ma soutenance. Dans un premier temps, je remercie le Dr Lena ALEXOPOULOU et le Dr Ivan HIRSCH pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit en tant que rapporteurs. Dans un second temps, je souhaite remercier le Pr Mathias FAURE pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. Je remercie également le Dr Caroline ASPORD pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse en temps qu'examinatrice.

Je souhaite également remercier le Professeur Fabien ZOULIM pour m'avoir accueilli dans son unité ainsi que pour son travail en tant que directeur d'unité.

Je souhaite remercier bien évidemment le Dr David DURANTEL qui en sa qualité de directeur de thèse, m'a donné l'opportunité de faire mes preuves dans un domaine que j'affectionne tout particulièrement, l'interaction virus et immunité. Ton enthousiasme, ton énergie et ta passion pour la science, bien qu'entraînant des réunions interminables, forcent le respect. Je te souhaite le meilleur pour la suite avec l'équipe à venir et ton nouveau statut de DR2.

Je souhaite également remercier le Dr Julie LUCIFORA pour les discussions scientifiques, les parties de squash, et son dynamisme au sein du laboratoire. Merci infiniment de m'avoir associé au travail sur les agonistes de PRR. Et je te souhaite bien évidemment le meilleur pour la suite.

Merci au Dr Anna SALVETTI qui m'a permis de commencer à intégrer le monde de la recherche lyonnaise pendant mes deux années de Master. Même si la communication n'a pas toujours été facile du fait de l'autisme que tu m'as pronostiqué à mon arrivée... tu m'as permis à la fois d'intégrer la virologie, de grandir scientifiquement, de travailler avec des gens énergiques que je remercierai juste après, et enfin de m'indiquer que dans ton nouveau laboratoire un thésard était recherché sur un sujet virus et immunité. Si j'en suis là c'est aussi grâce à toi.

Un remerciement également aux Drs Hélène STRICK-MARCHAND et Marlène DREUX pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse, pour les discussions, conseils et encouragements que vous m'avez prodigués.

Je ne peux évidemment pas parler des gens qui m'ont permis de grandir dans le monde de la recherche mais aussi humainement sans parler du petit groupe du CIRI de l'époque. Pour les pauses café, les discussions, les soirées, le soutien moral, les randonnées, tout ce qui a compté

pour avoir l'impression d'appartenir à une seconde famille dans ce petit monde. Axel pour ton énergie explosive et inarrêtable, les discussions scientifiques du laboratoire jusqu'au bar, les excellents moments et le travail d'équipe que nous avons accompli. Merci ! Thibaut pour les grandes discussions sur la science, ton dynamisme, ton côté beauf aussi bien évidemment qui a toujours été très développé. Il est un peu parti mais il est encore bon, il est encore bon...Merci ! Grande sœur Chloé, ton soutien, ta gentillesse, les grandes discussions, les potins, les taquets concernant notre regard sur le monde de la recherche privée devant un amphithéâtre plein, ne change pour rien au monde ! Merci ! Sonia merci pour les discussions sur les pDC, les débats, les cafés, les pâtisseries orientales, ta gentillesse et toutes tes autres qualités, Heidi te remercie ! Vincent, pour les soirées, les discussions sur le monde de la science, tes colloqs de l'époque, ton dynamisme, ta joie de vivre que rien n'entache, les randonnées (avec des détours improbables...) les délires, les parties de Crash team racing et tout le reste, Merci bro !

Même si mon arrivée n'a pas été facile, les choses ont bien changé au sein du laboratoire et le groupe qui s'est constitué a été indispensable au bon déroulement de ma thèse, dans les bons ou les mauvais moments. On peut aller loin seul, mais à plusieurs on peut déplacer des montagnes.

Merci à toi Emma, pour ta joie de vivre, les kaameloteries, l'Ecosse, l'annexe à Varey ma nouvelle maison (je t'entends râler d'ici « C'est pas ta maison ! »), le soutien que tu m'as apporté dans les moments les plus difficiles que j'ai essayé de te rendre autant que possible, les balades en forêt, la campagne pour me ressourcer, ta poisse pour les avions, les discussions constructives ou pas, ta famille formidable (Yves, Françoise, François, Hugo) et leurs animaux, les cartes postales beaux... Bref je vais m'arrêter là et finir par un bon vieux « Ouai c'est pas faux ! ».

Un grand merci à Suzanne avec qui j'ai traversé en même temps cette épreuve qu'est la thèse. Dans les bons comme dans les mauvais moments, les incompréhensions, la faculté à supporter mes râleries, les craquages nerveux sur les foies jusqu'à 3/4h du matin, le soutien que tu as pu m'apporter, les taquets aussi qui font toujours plaisir. Tu es une personne formidable et je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras et d'atteindre les objectifs que tu t'es fixés (Oscar ou Prix Nobel ou les deux tant qu'à faire !).

Merci également à Laura, ma sœur, pour tout le soutien que tu m'as apporté, pour les discussions, l'aide, ton enthousiasme, ta bonne humeur, ton franc-parler, la vie au labo au jour le jour. Je te souhaite évidemment le meilleur et surtout j'attends mon neveu avec impatience !

Marco un grand merci à toi pour l'aide, les discussions scientifiques, les blagues (dont certaines resteront dans les annales) sans parler de ta bonne humeur et des agacements sur le P2 de l'enfer. L'aventure sur le papier TLR9 a été un sacré défi et je suis heureux d'avoir partagé ce travail avec toi qui a fini par payer avec nos deux noms en tête d'affiche. Et je n'oublie pas que les routes vers l'enfer sont pavées de bonnes intentions.

Hélène, merci pour ton soutien également, pour les Figolus et les Chamonix, les discussions, les pizzas et les pains perdus. On se suit depuis le M2 dans les bon comme dans les mauvais moments. Tu mérites d'arriver au bout de ton aventure toi aussi et sache que même si je pars un peu en avance, je te souhaite tout le courage nécessaire pour réussir à tenir ta barque jusqu'au bout.

Marion aka l'otarie, je te remercie pour ton enthousiasme, ta folie, ta joie de vivre, ta passion pour la science, ta gentillesse, ta compassion, les cinémas, la montagne, les excursions diverses et variées, la musique, les séries, le riz, l'accueil à la colloc avec Sarah et surtout merci infiniment pour ce que tu as fait pour moi ! Désolé qu'on t'abandonne en cours de route au laboratoire, mais tu es tout aussi capable que nous autres d'y arriver ! Ne perd jamais confiance en toi, ta persévérance fera le reste ! Et n'oublie pas, ça passe toujours !

La petite bande des champions, avec qui on a passé du temps en festival et en terrasse. Loïc « l'âne bête » et éternel champion deux, parce qu'en tant que second tu fais parfaitement le boulot ! A nos vadrouilles, les pauses dans les bouchons, la descente extrêmement pénible en kayak avec un mec qui ramait pas un brin (oups !), les délires nombreux et variés, les discussions sur la science et la vie en général, bref tu connais déjà tout ça ! Merci Loulou Ch'tai ! Maelle pour les délires, la synchronisation des T-shirts, les soirées, les concerts, ton énergie inépuisable, les olives à toute heure de la journée. Fleur, pour ton innocence naturelle qui est toujours source de rire mais aussi toujours rafraichissante. Votre bonne humeur, les rires et les pleurs qu'on a partagés valent tout l'or du monde. Et pourvu que ça dure !

Les autres personnes du laboratoire avec qui on a pu se soutenir dans les bon comme les mauvais moments. Romain confrère du Centre, pour le Loiret, la pétanque, ta gentillesse, le vin, la prune et la cerise. Merci pour tout ! Aurore, la charité, merci de répandre continuellement la langue dont tu es l'unique gardienne, l'aurorien. Les délires et les expressions nouvelles, la chacha, bref tout ce qui fait que tu es toi ! Il ne faut pas confondre les loutres et les léopards quand même ! Damien, pour le Vinatier, pour Gaïa, pour la horde, mais ce n'est pas une histoire que

raconte les Jedi, mais merci quand même ! Audrey merci infiniment pour ta bonne humeur, ton franc-parler, tes coups de gueules si rafraichissants !

Merci également aux autres annexiens et membre du laboratoire, nouveaux et anciens, sans qui l'environnement du laboratoire ne serait pas aussi agréable. Merci aux autres membres de l'équipe JAD, Serena, Brioux, Manon, Héloïse, Valentina, Rayan, Caroline, Thomas et Adrien en souhaitant bonne chance à ceux qui ont entamé leur aventure récemment et à ceux pour qui elle va arriver à son terme ou continuer. Un petit clin d'œil à Serena pour les discussions de vieux aigris tard le soir au laboratoire et pour les Westerns pour lesquels j'ai été ravi de t'assister ! Merci également à Océane, Janet, Laeticia pour l'important travail de lutin de Noël offrant chaque année au laboratoire un moment convivial et chaleureux extrêmement précieux. Merci également à Jennifer, Maud et Judith pour les moments de rigolades, les conseils, le travail précieux auquel elles participent au sein du laboratoire. Merci à Marie-Agnès pour son aide et sa patience envers un boulet de l'administration. Merci également à Françoise et Isabelle pour l'important travail qu'elles fournissent pour le commun du laboratoire et sans qui celui-ci ne tournerait pas rond (déjà que...bref). Merci, Léa ma collègue de Master, qui a fini par débarqué en thèse dans le même laboratoire. Ne passe pas trop de temps au P3 (pas plus de 12h quand même). Alexia, petite Nat, Annaëlle, Moms, merci pour votre gentillesse et votre écoute et surtout bon courage à vous pour la suite !

A mes collègues de Master, qui ont énormément compté pour moi et qui comptent toujours même si on arrive beaucoup moins à se voir ces derniers temps... Alex, Vincent (loulou 1^{er} du nom), Sylvain, Popo et Julien merci infiniment à vous !

Merci également aux premiers autistes, la famille de Tours, Clem, Micka, Nat, Pauline, Claire, Max et les dernières pièces rajoutées. Merci pour les petits neveux Louis, Léandre et Eliot. Il faudrait que j'arrive à venir voir les deux p'tits derniers d'ailleurs.

Merci à l'équipe de l'ENS, Clémence, Julie, Steven, Manon, Marion, Anissa, Delphine, Jo, Flore, Léa, Léo, Séverin... c'est toujours un plaisir d'être en votre compagnie et le soutien qui émane de cette troupe a été bien souvent indispensable ! Aux anciens du lycée également, Gaga, Greg, les solangeois même si on ne se voit pas très souvent, chaque retrouvaille, chaque petit message est une bouffée d'oxygène venant du plus profond du Berry.

Merci également à ceux qui m'ont fait faire mes premières armes dans le milieu des laboratoires et de la recherche. Le laboratoire d'Agnès à Sancoins, qui m'a témoigné une confiance et une gentillesse pour mon premier stage en laboratoire que je n'oublierai jamais... Merci à toi là où

tu reposes en paix désormais. Un énorme merci au laboratoire d'analyse de l'hôpital Jacques Cœur de Bourges de m'avoir accueilli à bras ouvert lors de mes différents stages, pour les discussions, les cafés, ce petit job d'été en votre compagnie sans oublier ce petit surnom de « petit Prince de l'Hémato » qui me fait toujours autant rire. Merci au laboratoire Mutabilis, et à Erwann Lerouzic pour l'enthousiasme, la rigueur et l'engouement scientifique qu'il m'a apporté.

Un grand, grand merci également à ceux rencontrés dans mon autre monde et qui m'ont permis de tenir le coup quand j'étais perdu dans l'enfer parisien. Les membres de la ULF avec qui les soirées passées seul ne l'ont jamais été, Tatsu, Fiso, Chacal, Dus, Crow, Corleone, Arukai... A ceux de la TCC et de la GOE, Lucio, deadly, ma p'tite Audrey, Clara, Sookie, et surtout mon bon vieux marseillais Nosk ! Merci également pour cette rencontre en or dans le monde réel, Tatsu et tous les compères du sud, Océane, Camille, Romain, Mélina, Fiso... Votre accueil à bras ouverts alors que je n'étais qu'une connaissance virtuelle, a ravi chacun de mes étés depuis. Du virtuel, au réel les liens qui se créent sont tout aussi forts.

Merci également à la famille, à mes parents, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Merci à papi Robert et mamie Chouquette pour avoir été là également. Merci à mes oncles Pascal, Laurent, Fred, dont la bonne humeur et la gentillesse sont affreusement contagieuses lors des repas de familles. Un merci ne suffirait pas à leur témoigner toute la reconnaissance que je leur dois. A mes grands-parents papi Dédé et mamie Jeanine qui ont énormément contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. J'aurai aimé que vous assistiez à ça et je ferais tout mon possible pour honorer vos mots et votre fierté.

J'oublie probablement de citer et de remercier des personnes qui ont pu contribuer de près ou de loin à ce petit chemin parcouru jusque-là. Mais même si les noms passent, les mots, les idées et les émotions restent. Alors merci !!!!

Annexe

Annexe 1 : Interference of Hepatitis B Virus (HBV) with liver macrophage function promotes hepatocyte infection

Suzanne Faure-Dupuy ¹ , Marion Delphin ¹ , Ludovic Aillot ¹ , Laura Dimier ¹ , Fanny Lebossé ^{1,2} , Judith Fresquet ¹ , Romain Parent ¹ , Michel Rivoire ³ , Nathalie Bendriss-Vermare ¹ , Angela Lam ^{4,\$} , Klaus Klumpp ^{4,\$} , Fabien Zoulim ^{1,2,5,\$} , David Durantel ^{1,5,*} , and Julie Lucifora ^{1,*}

1 INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, France ;

2 Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France;

3 INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

4 Novira therapeutics; part of the Janssen Pharmaceutical Companies;

5 DEVweCAN Laboratory of Excellence, Lyon, France;

\$ et * Contribution égale

Interference of Hepatitis B Virus (HBV) with liver macrophage function promotes hepatocyte infection

Suzanne Faure-Dupuy¹, Marion Delphin¹, Ludovic Aillot¹, Laura Dimier¹, Fanny Lebossé^{1,2}, Judith Fresquet¹, Romain Parent¹, Michel Rivoire³, Nathalie Bendriss-Vermare¹, Angela Lam^{4,5}, Klaus Klumpp^{4,5}, Fabien Zoulim^{1,2,5,6}, David Durantel^{1,5,*}, and Julie Lucifora^{1,*}

¹INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, France ;

²Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France;

³INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

⁴Novira therapeutics; part of the Janssen Pharmaceutical Companies;

⁵DEVweCAN Laboratory of Excellence, Lyon, France;

⁶Equal contribution

* Equal contribution

Corresponding authors:

Dr. Julie Lucifora and Dr. David Durantel

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), UMR Inserm 1052 - CNRS 5286, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France ; Phone: + 33 4 72 68 19 70 ; Fax : +33 4 72 68 19 71 ; E-mail: julie.lucifora@inserm.fr and david.durantel@inserm.fr

Words count: 4360

Abstract

Words count: 238 / 250

Objective: Liver macrophages can be involved in pathogens clearance or pathogenesis. Our aim was to further characterize the interplay between HBV and macrophages as well as to determine their roles in the establishment of HBV infection in hepatocytes.

Design: Primary human liver macrophages or primary blood monocytes ex-vivo differentiated either into pro-inflammatory or anti-inflammatory macrophages (M1-MDM or M2-MDM respectively) were exposed to HBV and their activation followed by ELISA or RT-qPCR. Liver biopsies from HBV infected patients were analysed by RT-qPCR or immunohistochemistry. Viral parameters in HBV-infected primary human hepatocytes (PHH) and differentiated HepaRG cells (dHepaRG) were followed by ELISA, qPCR and RT-qPCR analyses.

Results: We observed lower levels of pro-inflammatory mRNAs (IL-6 and IL-1 β) and higher markers of anti-inflammatory macrophages (CD68, CD163) in livers biopsies from HBV-infected patients compared to non-infected ones. Moreover, primary liver macrophages ex vivo exposed to HBV secreted less pro-inflammatory cytokines and had higher levels of anti-inflammatory cytokines mRNAs. Upon exposure to HBV during differentiation and activation, M1-MDM secreted less IL-6 and IL-1 β , whereas M2-MDM exposed to HBV during activation secreted more IL-10. Finally, cytokines produced by M1-MDM, but not the one produced by HBV-exposed M1-MDM, decreased HBV infection of hepatocytes.

Conclusion: Altogether, our data showed that HBV can modulate the liver innate immunity to favour its establishment. Indeed, it escapes the antiviral effect of pro-inflammatory liver macrophages by interfering with their differentiation as well as by promoting the activation of anti-inflammatory macrophages.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

50

Summary Box:

- What is known about this subject?

No detectable immune response is generally observed when naïve macrophages are *ex vivo* exposed to HBV. This fits with the stealthy character of this virus. The mechanism of this absence of response is still debated. Contradicting results have proposed that HBV would be either not recognized by macrophage sensing machinery or, on the contrary, would readily inhibit cell innate immune responses triggered by its potential detection.

- What are the new findings?

We found that HBV promotes its establishment in hepatocytes by interfering with the differentiation of monocytes into pro-inflammatory macrophages as well as the activation of liver macrophages and thereby reducing the secretion of the antiviral pro-inflammatory cytokines. Moreover, we observed that HBV favours IL-10 secretion by anti-inflammatory macrophages and thereby probably liver tolerance. Our data support the hypothesis that HBV has evolved strategies to counteract innate responses.

- How it impacts on clinical practice in the future?

Phenotype switch from anti- to pro-inflammatory macrophages might induce a boost in local pro-inflammatory cytokines secretion, leading to a direct inhibition of HBV replication in hepatocytes and to a potent activation of innate and adaptive immune responses against the virus.

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) chronically infects around 250 million people worldwide (WHO data, 2016). Current treatments of CHB patients, mainly based on nucleos(t)ide analogues, reduce serum levels of infectious virus to undetectable levels in the majority of patients, but do not achieve full replication inhibition and virus elimination from the liver [1]. The persistence of HBV replication in CHB patients increases their risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2]. New treatments are needed to eliminate HBV infection in these patients.

HBV is a small DNA virus that persists as a covalently-closed-circular DNA (cccDNA) within the nucleus of liver parenchymal cells (hepatocytes). Viral RNAs, including mRNAs and the pre-genomic RNA (pgRNA) are transcribed from the cccDNA. PgRNA is encapsidated within the nucleocapsid and converted into relaxed-circular DNA (rcDNA) by an HBV polymerase-mediated reverse-transcription step. Different viral products circulate in the blood of infected patients including HBe antigens (HBeAg), Dane particles (infectious particles), HBV RNA containing particles and empty (i.e., nucleocapsid free) enveloped subviral particles (SVPs). The latter three have envelope proteins at their surface and are indistinctly detected as HBs antigens (HBsAg) [1]. SVPs, which are produced in large excess compared to virions, are thought to play an important role in terms of immune subversion [3].

Several pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β and TNF α) and interferons (IFN α and IFN γ) were shown to induce a direct antiviral effect on HBV replication in hepatocytes [4,5], with IL-1 β being one of the most efficient at inhibiting already established HBV infections *in vitro* [4]. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine produced upon inflammasome activation [6]. In the liver, it is mostly produced by macrophages (M Φ) since hepatocytes do not possess functional inflammasomes [7]. Liver resident M Φ , named Kupffer cells (KC), represent 80% of the macrophage count in the body at steady state [8]. They are specialized in the detection of pathogens coming from the enteric circulations, as well as in the elimination of aging blood cells, through their high phagocytic capacity [8]. Upon inflammation, monocytes from the

1
2
3 78 blood circulation can be recruited in the liver and differentiate locally into MΦ that are called
4
5 79 monocyte-derived-macrophages (MDM) [9]. KC and MDM have different embryonic origins
6
7 80 and functions [10]. *In vivo*, a wide range of different phenotypes of MΦ exists depending on
8
9 81 their origin, activation status, localization, and their micro-environment [11]. Inflammatory
10
11 82 MΦ, commonly called M1, which are phenotypically described as CD40⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺,
12
13 83 are characterized by their capacity to secrete pro-inflammatory cytokines/chemokines, such
14
15 84 as IL-1β, produce various antimicrobial factors, including nitric oxide (NO), and are therefore
16
17 85 implicated in inflammation and elimination of pathogens [12][11]. Anti-inflammatory MΦ,
18
19 86 commonly called M2, secrete anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGFβ, as well
20
21 87 as angiogenic factors, such as VEGF, and express the arginase 1, mannose receptors, and
22
23 88 the high affinity scavenger receptor CD163 [11]. M2 MΦ are involved in the resolution of
24
25 89 inflammation and in tolerance mechanisms [11]. They are also abundantly found in tumour
26
27 90 microenvironment and are called tumour-associated MΦ (TAM) [13].
28
29
30 91 Several studies showed that HBV can influence the phenotype and biology of MΦ [14], but
31
32 92 few have been performed using liver resident or infiltrating primary human cells. To
33
34 93 determine the role of liver MΦ in the establishment of HBV infection in hepatocytes, we
35
36 94 utilized highly relevant model such as primary human liver MΦ, pro-inflammatory/M1-like or
37
38 95 anti-inflammatory/M2-like MΦ differentiated *in vitro* from primary blood monocytes, liver
39
40 96 biopsies, primary human hepatocytes, and differentiated HepaRG cells.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

HBV affects the phenotype of liver macrophages in CHB patients.

To initiate our analysis and set the physiologic relevance, we used liver biopsies from a cohort of 24 HBV patients and 31 control patients with different aetiologies (**Table S1**) in order to analyse the liver mRNAs expression levels of two prototypic pro-inflammatory cytokines (*IL-6* and *IL-1 β*) and two prototypic anti-inflammatory cytokines (*IL-10* and *VEGF*). Mean *IL-6* and *IL-1 β* mRNA levels were significantly lower (84 and 88% reduction respectively) in the HBV patient group as compared to controls (**Figure 1A**). Even though not significant, mean *IL-10* mRNA level was slightly higher in the HBV patient group as compared to controls, while there was no difference in *VEGF* mRNA level between the two groups (**Figure 1A**). No correlation was found between the levels of these four types of mRNA and the levels of HBV mRNA (**Table S1** and data not shown).

To assess the consequences of HBV infection on the number of pro-inflammatory and anti-inflammatory liver M Φ , we analysed liver biopsies of another cohorts of patients by immunochemistry. For immune staining, CD68 was used as a marker for total amount of M Φ , whereas iNOS and CD163 identified respectively pro-inflammatory and anti-inflammatory M Φ [11]. The cohort of 18 patients was divided into four groups (**Table S2**): non-infected controls (HC; not infected by HBV), HBeAg-positive/high-viremia (HBe+/HV), HBeAg-negative/high-viremia (HBe-/HV), and HBeAg-negative/low-viremia (HBe-/LV). As expected, signals for CD68, CD163, and iNOS were detected in the sinusoidal space (i.e., between hepatocytes where myeloid cells are), and no signals were observed with control antibodies (**Figure S1**). No correlation between the levels of CD68, iNOS or CD163 expression was observed for any of the viral parameters available or ALT levels (data not shown). The mean intensity levels of CD68 staining were found lower in the HBe-/LV (-25%, $p=0.049$) and HBe+/HV (-28%, $p=0.001$) groups of HBV infected patients, as compared to HC (**Figure 1B**). The numerical reduction of mean CD68 staining signal in the HBe-/HV group (-14%) was not significant.

1
2
3 123 Among the whole population of CD68⁺ MΦ, the mean CD163 staining signal of anti-
4
5 124 inflammatory MΦ was higher in the HBe+/HV group (+48%, $p = 0.047$) (**Figure 1B**). Mean
6
7 125 CD163 intensity difference was not significantly different to HC in the other groups of HBV
8
9 126 patients and iNOS intensity did not differ between HC and any groups of HBV patients.
10
11 127 Altogether, these data suggest that HBV may affect liver MΦ phenotype.

12
13 128 We therefore performed several *ex vivo* analyses presented thereafter to investigate the
14
15 129 influence of HBV on liver cells with a focus on liver MΦ that include Kupffer cells (KC) and
16
17 130 monocyte derived MΦ (MDM).
18
19

20
21 131

22 23 132 **HBV inhibits the activation of primary liver MΦ**

24
25 133 First we investigated the impact of HBV on the secretion of cytokines by non-parenchymal
26
27 134 primary human liver mononuclear cells (LMNC) freshly isolated from hepatic resections [15]
28
29 135 (5 donors). The cytokine levels in non-stimulated LMNC from individual donors determined in
30
31 136 three biological replicates per donor are shown in **Figure S2A**. These cells were exposed for
32
33 137 24 hours to HBV immediately after their isolation and two prototypic cytokines, IL-1β and IL-
34
35 138 10, dosed in the supernatant (**Figure 2A**). The mean concentration of secreted IL-1β was
36
37 139 25% lower in the LMNC preparations that had been exposed to HBV as compared to control
38
39 140 LMNC (**Figure 2A**). The mean IL10 level was 64% higher in the HBV exposed LMNC as
40
41 141 compared to control cells.
42
43

44
45 142 Purified primary liver MΦ exposed to HBV or not were next stimulated with synthetic PAMPs;
46
47 143 LPS was used to stimulate TLR4 and NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain
48
49 144 containing 3) inflammasome [16], whereas LPS + poly(dA:dT)) was used to stimulate TLR4
50
51 145 and AIM-2 (absent in melanoma 2) inflammasome [7] (**Figure S2B**). The mean level of
52
53 146 secreted IL-1β was 31% lower in LPS-stimulated primary liver MΦ exposed to HBV, as
54
55 147 compared to not exposed condition (**Figure 2B**). Similar results were obtained with LPS and
56
57
58
59
60

poly(dA:dT) stimulated primary liver MΦ, for which mean level of secreted IL-1β was 35% lower when exposed to HBV as compared to control cells (Figure S3). Interestingly, the expression of *HIF1α*, a protein tightly associated to IL-1β production and secretion in macrophages [17], was also 70% lower in LPS-stimulated-liver MΦ exposed to HBV as compared to control cells (Figure S4A). While the mean level of secreted IL-10 was not affected by HBV with both types of stimulations in our experimental conditions (Figure 2B and S3), the expression of *VEGF*, an angiogenic factor expressed by anti-inflammatory cells [18], was 56% higher in LPS-stimulated-liver MΦ exposed to HBV, as compared to control cells (Figure S4A). It is worth noting that UV-inactivated HBV also decreased IL-1β secretion of exposed liver MΦ (Figure S5), and that HBV-exposed liver MΦ or MDM did not secrete HBeAg or HBsAg (Figure S6), highlighting that the effects of HBV on MΦ is independent of viral replication within cells. Altogether these data suggest that HBV may interfere with the activation of primary liver MΦ.

HBV interferes with blood monocyte differentiation and activation

During viral infections, a high quantity of immune cells, among which monocytes, are recruited to the inflammation/injury site to mount a strong pro-inflammatory response and contribute to infection control [19]. This response is subsequently limited by an anti-inflammatory response in order to start the scarring processes and prevent chronic inflammation (19). Infiltrating monocytes differentiate into MΦ within the tissue (13) and, in the case of the human liver, cannot be fully distinguished from resident MΦ.

To assess the effect of HBV on MΦ that resemble those derived from liver infiltrating monocytes, monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from healthy individuals and differentiated, with well-established polarizing *in vitro* conditions, into M1-like MΦ (M1-MDM) upon GM-CSF or M2-like MΦ (M2-MDM) upon M-CSF stimulation [20]. The differentiation process is schematically presented in Figure 3A.

1
2
3 174 M1-MDM cells derived from peripheral monocytes expressed and secreted pro-inflammatory
4
5 175 cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α (**Figure S2C**). *In vitro* differentiated M2-MDM cells
6
7 176 expressed only residual levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α , but secreted high level of the anti-
8
9 177 inflammatory cytokine IL-10 (**Figure S2C**). Upon exposure to HBV during differentiation and
10
11 178 activation (i.e., 6 days exposure to HBV) (**Figure 3A**), GM-CSF-treated monocytes (i.e.,
12
13 179 intended to be differentiated into M1-MDM) activated with low LPS stimulation, secreted 34%
14
15 180 and 60% less IL-6 and IL-1 β respectively, as compared to cells not exposed to HBV (**Figure**
16
17 181 **3B**). Accordingly, decreased level of *HIF1 α* mRNA was detected (**Figure S4B**). No significant
18
19 182 effect of HBV incubation under this protocol was observed on the level of secreted TNF- α
20
21 183 (**Figure 3B**). M2-MDM exposed to HBV during differentiation and activation secreted similar
22
23 184 level of IL-10 than non-exposed cells, but expressed lower *VEGF* mRNAs levels (**Figure**
24
25 185 **S4B**).

26
27 186 We further investigated the effect of HBV on the activation of already differentiated M1-MDM
28
29 187 or M2-MDM in response to low LPS stimulation (**Figure 4A**). No difference was observed in
30
31 188 the mean levels of secreted IL-6, IL-1 β , or TNF- α (**Figure 4B**). In contrast, lower mean
32
33 189 mRNA level of *HIF1- α* was observed. Differentiated M2-MDM cells showed a 2-fold increase
34
35 190 of mean secreted IL-10 levels and an increase of mean *VEGF* mRNA level in the presence of
36
37 191 HBV (**Figure 4C & S4C**). These results were confirmed with different donors and duration of
38
39 192 exposure to HBV (**Figure S7**).

40
41
42 193 We also investigated if the secretion of viral components by infected cells could interfere with
43
44 194 M1-MDM differentiation and M2-MDM activation in a similar way as observed with cell-free
45
46 195 virus preparations. For these experiments monocytes, which were intended to differentiate
47
48 196 into M1-MDM and M2-MDM, were co-cultured with either non-infected HepG2-NTCP cells
49
50 197 (as HBV negative control cells) or with HBV-producing HepAD38 cells during their respective
51
52 198 differentiation (for M1-MDM) or activation (for M2-MDM) (**Figure 5A**). When monocytes were
53
54 199 co-cultured with HBV-producing cells during their differentiation into M1-MDM, they secreted
55
56 200 between 46 and 85% lower mean levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α (**Figure 5B**). When M2-

MDM were co-cultured with HBV producing cells during their activation, they secreted 2.25-fold more IL-10 (**Figure 5B**).

Altogether these results suggest that exposure of peripheral monocytes to either cell-free HBV or cell-transmitted HBV components can interfere with their differentiation into M1-MDM, as indicated by the significantly reduced secretions of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β . Moreover, an exposure to HBV during M2-MDM activation led to an increased secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Pro-inflammatory cytokines reduce the establishment of HBV infection in hepatocytes.

We previously showed that pro-inflammatory cytokines can directly block HBV replication in cells chronically infected *in vitro* and IL-1 β was the most efficient one[4]. To investigate the effects of M Φ -derived cytokines on the establishment of HBV infection in hepatocytes, dHepaRG cells or primary human hepatocytes (PHH) were treated 24h before and during the inoculation of cells with HBV with various recombinant pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18), anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF β), as well as with MCP-1, which is known to be secreted by both M1- and M2-M Φ (**Table S3**) [21]. IL-1 β treatment led to a 70-80% decrease of HBeAg and HBsAg secretion, HBV mRNA, and cccDNA formation, under conditions where cell viability of dHepaRG cells and PHH were not affected (**Figure 6**). Of note, a 24h pre-treatment with IL-1 β , followed by a removal when HBV is inoculated for 24h, was sufficient to decrease HBeAg and HBsAg secretion and HBV mRNA by 75% in dHepaRG (**Figure S8A**). In addition, treatment with IL-6 and TNF- α before and during HBV inoculation resulted in an approximately 50% decrease of HBeAg, HBV RNA, and cccDNA formation. HBsAg was lowered by ~50% with TNF- α and by ~25% with IL-6 treatment (**Figure S8B**). IL-18 had no effect on the establishment of HBV infection under these conditions (**Figure S8B**). Upon IL-10 treatment, we observed a slight increase of mean HBeAg and HBsAg levels in the supernatant of dHepaRG cells, but not in PHH. HBV RNA

was modestly reduced in PHH treated with IL-10 before and during infection (**Figure 6B**). Other tested cytokines, TGF- β and MCP-1, had no significant effect on the establishment of HBV infection (**Figure S8B**). Importantly, if the level of NTCP (sodium-taurocholate cotransporting polypeptide), the HBV receptor, was decreased in dHepaRG after 24h or 48h of treatment with IL-1 β (**Figure S9A**), it was not affected in PHH (**Figure S9B**), thus indicating that the measured anti-HBV effect was not uniquely due to hNTCP expression modulation. Collectively, these data indicate that pro-inflammatory cytokines, and IL-1 β in particular, are very efficient to inhibit the establishment of HBV infection in hepatocytes. We next investigated whether cell culture supernatants from M1-MDM cells exposed or not with HBV would interfere with the establishment of HBV infection in hepatocytes. Treatment of dHepaRG cells with supernatants from differentiated M1-MDM cells (**Table S4**) efficiently inhibited HBV infection, by reducing mean HBeAg and HBsAg levels by ~25% and reducing cccDNA formation by ~50% (**Figure 7A, (no-HBV M1-MDM)-CM**). Accordingly, dHepaRG treated with concentrated supernatants from M1-MDM exposed to HBV during activation, that contained similar amounts of pro-inflammatory cytokines to non-exposed M1-MDM (**Figure 4B and Table S4**), showed a 40% decrease of secreted HBV antigens and a 60% decreased of cccDNA amounts (**Figure 7A, (HBV stim M1-MDM)-CM**). In contrast, dHepaRG treated with concentrated supernatants from M1-MDM exposed to HBV during differentiation, containing less pro-inflammatory cytokines (**Figure 3B and Table S4**), showed similar levels of HBV markers to those measured in non-treated dHepaRG (**Figure 7A, (HBV diff M1-MDM)-CM**).

HBV impairs lymphocyte activation

Finally, as IL-10 is known to impair lymphocyte activation [22], we assessed if the increase of IL-10 secretion induced by HBV (**Figure 4**) would further impair this activation. Total lymphocytes were purified from peripheral blood and exposed to M2-MDM conditioned media for 2h before their activation with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) + ionomycine. Even

1
2
3 254 though not significant, total lymphocytes exposed to M2-MDM supernatants secreted 17%
4 255 less TNF- α than the non-exposed ones (Figure 7B, (no-HBV M2-MDM)-CM). Supernatants
5
6 256 from M2-MDM exposed to HBV during their activation containing higher amounts of IL-10
7
8 257 (Figure 4C and Table S5, (HBV stim M2-MDM)-CM) significantly decreased TNF- α
9 258 secretion (30%) by total lymphocytes (Figure 7B).
10
11
12
13
14
15

16 260 Discussion

17
18
19 261 Dendritic cells and M Φ in the liver are thought to play a major role in the orchestration of
20
21 262 adaptive responses and can also produce cytokines that may directly affect HBV replication
22
23 263 in hepatocytes [23]. We confirmed here that cytokines secreted by pro-inflammatory M Φ
24
25 264 (including IL-1 β and IL-6) strongly inhibit the establishment of HBV infection in hepatocytes.
26
27 265 These results are in agreement with our previously reported data showing antiviral effects of
28
29 266 these cytokines in already infected human hepatocytes [4] and emphasize the potential direct
30
31 267 role of pro-inflammatory cytokines in the control of HBV replication in hepatocytes. Of note,
32
33 268 even though we observed a decrease in the level of NTCP in dHepaRG treated with IL-1 β as
34
35 269 previously reported [24], NTCP levels were not changed by IL-1 β treatment in primary human
36
37 270 hepatocytes (PHH) under conditions that were sufficient for HBV inhibition. These results
38
39 271 suggest that IL-1 β can inhibit HBV establishment through an NTCP-independent but still
40
41 272 unknown mechanism.
42

43
44 273 Considering the antiviral potential of liver M Φ derived cytokines, the main scope of this study
45
46 274 was to investigate if HBV could interfere with such macrophage pro-inflammatory functions to
47
48 275 facilitate the establishment of hepatocyte infection. Using human cells, we observed (i) lower
49
50 276 levels of IL-1 β and IL-6 mRNAs in liver biopsies from HBV-infected patients compared to
51
52 277 non-infected ones, (ii) that primary liver M Φ *ex vivo* exposed to HBV secreted less pro-
53
54 278 inflammatory cytokines upon synthetic PAMP stimulations confirming our previously
55
56 279 published data (8), (iii) that M1-MDM also secreted less IL-1 β and IL-6 upon activation if
57
58
59
60

1
2
3 280 exposed to HBV during differentiation and (iv) that the antiviral effect of M1-MDM conditioned
4
5 281 medium was lost when cells were differentiated in the presence of HBV. These results are in
6
7 282 accordance with those from previously published studies using animal models or
8
9 283 macrophage cell lines that reported an ability of HBV to inhibit macrophage responses
10
11 284 [25,26], and further demonstrate that HBV has evolved strategies to interfere with innate
12
13 285 immunity, in particular in myeloid cells.

14
15 286 The recent elegant study by Suslov and colleagues showed that the stimulation with
16
17 287 synthetic PAMPS (including TLR4 ligands) was not antagonized in *ex vivo* cultivated HBV-
18
19 288 positive biopsies [27]. However, the concentration of TLR4 ligands used in this study was far
20
21 289 higher to what used here (20 µg/mL versus 10 to 100 ng/mL) and probably beyond
22
23 290 physiologic conditions. Moreover, despite the commendable effort of this study to work with
24
25 291 highly relevant biological materials, the viability of hepatocytes in these *ex vivo* maintained
26
27 292 biopsies was limited and the viability and functionality of other liver cells such as liver
28
29 293 macrophages was not assessed. Moreover, following the hypothesis that HBV-induced
30
31 294 phenotype changes could be due to a constant interaction between viral components and the
32
33 295 targeted cell, purification procedure and *ex vivo* conditions cultures in the absence of
34
35 296 circulating HBV component might reverse the HBV-inhibitory phenotype. Our data showing
36
37 297 an increased inhibition of the secretion of pro-inflammatory cytokines by M1-MDM upon
38
39 298 constant exposure to HBV via co-cultures with HBV-producing cells compared to a single
40
41 299 exposure to concentrated virus support the latest hypothesis. It would therefore be important
42
43 300 to test if the addition of HBeAg/HBsAg/HBV virions in the culture medium of *ex vivo* cultured
44
45 301 liver biopsies would recapitulate the inhibitory phenotype we described here.

46
47 302 Importantly, we observed an increase of anti-inflammatory MΦ markers (CD68⁺ CD163⁺
48
49 303 cells) in liver biopsies from HBV-infected patients compared to those from non-infected
50
51 304 patients and an increase in the levels of IL-10 secreted by M2-MDM upon exposure to HBV
52
53 305 during activation after *ex vivo* differentiation. These data suggest that HBV may reinforce the
54
55 306 already described liver immune tolerance (39) to establish and/or maintain its infection. This
56
57
58
59
60

1
2
3 307 is in accordance with studies reporting an increase of anti-inflammatory cytokine secretion
4
5 308 (especially IL-10) induced by HBV in animal models and patients [28,29] and a positive role
6
7 309 of anti-inflammatory liver MΦ in HBV persistence [28]. Here, we observed that HBV-induced
8
9 310 increase of IL-10 secretion by M2-MDM might impair the activation of lymphocytes. As others
10
11 311 had previously described [28,29], the increased IL-10 expression during HBV infection could
12
13 312 favour a tolerogenic environment and the inhibition of functional adaptive immune response,
14
15 313 compromising HBV elimination. As these anti-inflammatory MΦ are also implicated in
16
17 314 cancerisation processes (through the secretion of angiogenic factors, such as VEGF, and the
18
19 315 impairment of an anti-oncogenic response by the secretion of regulatory mediators, such as
20
21 316 IL-10 [30]), it should be investigated if the HBV-induced modification of MΦ phenotypes may
22
23 317 also play a role in HCC initiation and promotion.

24
25 318 We did not determine which viral components and by which mechanisms HBV influences the
26
27 319 secretion of cytokines by MΦ yet. Few data suggest that HBV can be internalized by MΦ
28
29 320 [31,32]. HBeAg [33], HBsAg [7,34] and the HBV capsid protein [35] have been suggested to
30
31 321 contribute to the inhibition of MΦ responses. Of note, the use of recombinant viral proteins
32
33 322 may be suboptimal, as post-transcriptional modifications associated to a given protein
34
35 323 produced in a given cell system (bacteria, yeast or mammalian cells) could be different as
36
37 324 compared to those found in viral proteins from infected hepatocytes and therefore have a
38
39 325 different effect on immune cells. In addition, these modifications may vary during the different
40
41 326 phases of HBV infection, giving the numerous functions of the viral proteins. HBV probably
42
43 327 interferes with the activation of MΦ (and thereby cytokine secretion) at different levels.
44
45 328 Indeed down-regulation of innate sensors such as TLR [36–38] or inhibition of cell different
46
47 329 signaling pathways [25,34,39] have been reported. Epigenetic modulations induced by the
48
49 330 fixation of one viral protein to gene promoters, as we reported in hepatocytes [35] and as
50
51 331 also reported for other viruses[40] might also be implemented in MΦ even though HBV do
52
53 332 not replicate in those cells.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 333 Of note, in our different experimental settings, we did not detect any cytokine secretion by
4
5 334 LMNC, primary human liver macrophages or MDM exposed to cell-culture-produced HBV
6
7 335 inocula or co-cultured with HBV producing cells (data not shown). This is in sharp contrast
8
9 336 with chronic HCV or HIV infections that induces strong host responses [41–44] but in
10
11 337 accordance with studies that reported an absence of measurable innate immune responses
12
13 338 in patients, animal or *in vitro* models upon primary HBV infection [27,41,43,44] and
14
15 339 contributed to define HBV as a stealth virus [45]. Of note, several groups have reported an
16
17 340 induction of innate responses following exposure to HBV [31,46–48]. The quality of the HBV
18
19 341 inoculum used to perform the *ex vivo* analyses is probably very different from one study to
20
21 342 the other since no standard inocula are available and only very few manuscripts reported the
22
23 343 characterization of their inocula as we did here (**Figure S10**). Indeed, different HBV
24
25 344 producing cells, different culture conditions and concentration procedures may lead to
26
27 345 different ratios of viral antigens, subviral particles and Dane particles as well as
28
29 346 contaminating non-enveloped nucleocapsids, recognized by TLR2 [46] or endotoxins,
30
31 347 recognized by TLR4 [49] in the inocula and may explain the discrepancies between the
32
33 348 studies.

34
35 349 From a therapeutic point of view, we confirmed here that IL-1 β is very efficient to inhibit HBV
36
37 350 establishment and replication in hepatocytes. However, recombinant IL-1 β cannot be used
38
39 351 systemically without risking severe side effects such as cytokine storms. New anti-HBV
40
41 352 therapeutic options should aim at inducing the local and endogenous secretion of IL-1 β to
42
43 353 induce an antiviral activity and prevent the development of pathogenesis. Different strategies
44
45 354 may be considered to promote pro-inflammatory over anti-inflammatory phenotype in liver
46
47 355 resident and infiltrating M Φ . For instance, the delivery of GM-CSF in cancerous tissue has
48
49 356 been shown to induce tumour regression [50] by promoting pro-inflammatory macrophages.
50
51 357 Inversely, a monoclonal antibody against CSF-1R (colony stimulating factor 1 receptor)
52
53 358 showed promising results in reducing the number of anti-inflammatory and tumour
54
55 359 associated macrophages [13]. Alternatively, inhibitors of glutaminolysis, that modify the

1
2
3 360 succinate/ α -ketoglutarate balance in macrophages [51] or specific inflammasome and/or
4
5 361 PRR inducers could be evaluated [52].
6

7 362 In summary, we showed that HBV can modulate the resident and transiting-macrophage
8
9 363 phenotypes to favour its establishment, and likely its maintenance in the liver. On the one
10
11 364 hand, HBV escapes the antiviral effect of pro-inflammatory liver resident and infiltrating M Φ
12
13 365 by interfering with their activation or differentiation respectively. And, on the other hand, it
14
15 366 promotes the activation of anti-inflammatory M Φ to favour tolerance. Our data also suggest
16
17 367 that therapeutic strategies promoting the differentiation of pro-inflammatory liver M Φ over
18
19 368 anti-inflammatory ones should be tested to reverse immune tolerance and help functionally
20
21 369 curing of chronic HBV infections.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

370 **Acknowledgments:**

371 The authors would like to thank Maud Michelet, Lydie Lefrançois, Jennifer Molle, Océane
372 Floriot, Anaëlle Dubois for their help with the isolation of primary human hepatocytes, as well
373 as the staff from Prof Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection. We
374 also thank the medical staff of Prof. Zoulim, as well as Dr.Bancel and Dr Subic (Croix Rousse
375 Hospital, Lyon) for collecting tissue material. We thank the French blood institute (EFS) and
376 all the donors that consented to give their blood. This work was supported by grants from
377 ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis), FINOVI
378 (Foundation for innovation in infectiology), ARC (French Agency for Research against
379 Cancer), Novira Therapeutics and INSERM. This work was also supported by the
380 DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) of the "Université de Lyon", within the program
381 "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research
382 Agency (ANR).

383

384 **Author contributions statements:**

- 385 - study concept and design: SFD, DD, JL
- 386 - acquisition of data: SFD, MD, LA, LD, JF
- 387 - analysis and interpretation of data: SFD, AL, KK, DD, JL
- 388 - drafting of the manuscript: SDF, DD, JL
- 389 - critical review of the manuscript: RP, NBV, AL, KK, FZ
- 390 - statistical analyses: SFD
- 391 - material support: FL, RP, MR, NBV, FZ

392

393 **Competing financial interest:**

394 SFD, MD, LA, LD, JF, FL, RP, MR, NBV have nothing to declare. FZ, JL, and DD received a
395 research grant from Novira Therapeutics to perform experiments. AL and KK were
396 employees of Novira Therapeutics.

References:

- 1 Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol* 2016;**64**:S117–31. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.016
- 2 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, *et al.* Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;**126**:1750–8.
- 3 Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, *et al.* Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010;**2**:1394–410. doi:10.3390/v2071394
- 4 Isorce N, Testoni B, Locatelli M, *et al.* Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2016;**130**:36–45. doi:10.1016/j.antiviral.2016.03.008
- 5 Xia Y, Stadler D, Lucifora J, *et al.* Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 2016;**150**:194–205. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.026
- 6 Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:407–20. doi:10.1038/nri.2016.58
- 7 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
- 8 Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017;**17**:306–21. doi:10.1038/nri.2017.11
- 9 Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, *et al.* Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* 2016;**7**:10321. doi:10.1038/ncomms10321
- 10 Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 2016;**44**:439–49. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024
- 11 Hume DA. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front Immunol* 2015;**6**:370. doi:10.3389/fimmu.2015.00370
- 12 O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:553–65. doi:10.1038/nri.2016.70
- 13 Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, *et al.* Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* 2014;**25**:846–59. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.016
- 14 Yuan F, Zhang W, Mu D, *et al.* Kupffer cells in immune activation and tolerance toward HBV/HCV infection. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ* 2017;**26**:739–45. doi:10.17219/acem/62759
- 15 Faure-Dupuy S, Vegna S, Aillot L, *et al.* Characterisation of Pattern Recognition Receptors (PRR) expression and functionality in liver primary cells and derived cell lines. submitted. 2018.

- 1
- 2
- 3 435 16 Yi Y-S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular
- 4 436 lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology*
- 5 437 2017;**152**:207–17. doi:10.1111/imm.12787
- 6
- 7 438 17 O'Neill LAJ. A broken krebs cycle in macrophages. *Immunity* 2015;**42**:393–4.
- 8 439 doi:10.1016/j.immuni.2015.02.017
- 9
- 10 440 18 Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, *et al*. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1
- 11 441 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 2014;**17**:109–18. doi:10.1007/s10456-
- 12 442 013-9381-6
- 13
- 14 443 19 Brempeis KJ, Crispe IN. Infiltrating monocytes in liver injury and repair. *Clin Transl Immunol*
- 15 444 2016;**5**:e113. doi:10.1038/cti.2016.62
- 16
- 17 445 20 Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin VV, *et al*. The impact of interferon-regulatory factors to
- 18 446 macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology* Published Online
- 19 447 First: 5 October 2017. doi:10.1016/j.imbio.2017.10.005
- 20
- 21 448 21 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, *et al*. The chemokine system in diverse forms of macrophage
- 22 449 activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;**25**:677–86. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
- 23
- 24 450 22 Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, *et al*. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit
- 25 451 cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;**146**:3444–51.
- 26
- 27 452 23 Crispe IN. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011;**54**:357–65.
- 28 453 doi:10.1016/j.jhep.2010.10.005
- 29
- 30 454 24 Le Vee M, Gripon P, Stieger B, *et al*. Down-regulation of organic anion transporter expression in
- 31 455 human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug Metab*
- 32 456 *Dispos Biol Fate Chem* 2008;**36**:217–22. doi:10.1124/dmd.107.016907
- 33
- 34 457 25 Wu J, Meng Z, Jiang M, *et al*. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate
- 35 458 immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatol Baltim Md*
- 36 459 2009;**49**:1132–40. doi:10.1002/hep.22751
- 37
- 38 460 26 Huang L-R, Wohlleber D, Reisinger F, *et al*. Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local
- 39 461 proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection.
- 40 462 *Nat Immunol* 2013;**14**:574–83. doi:10.1038/ni.2573
- 41
- 42 463 27 Suslov A, Boldanova T, Wang X, *et al*. Hepatitis B Virus Does Not Interfere with Innate Immune
- 43 464 Responses in the Human Liver. *Gastroenterology* Published Online First: 2 February 2018.
- 44 465 doi:10.1053/j.gastro.2018.01.034
- 45
- 46 466 28 Xu L, Yin W, Sun R, *et al*. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral
- 47 467 immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatol Baltim Md* 2014;**59**:443–52.
- 48 468 doi:10.1002/hep.26668
- 49
- 50 469 29 Li H, Zheng H-W, Chen H, *et al*. Hepatitis B virus particles preferably induce Kupffer cells to
- 51 470 produce TGF-β1 over pro-inflammatory cytokines. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital*
- 52 471 *Assoc Study Liver* 2012;**44**:328–33. doi:10.1016/j.dld.2011.11.005
- 53
- 54 472 30 Tang X, Mo C, Wang Y, *et al*. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated
- 55 473 macrophages. *Immunology* 2013;**138**:93–104. doi:10.1111/imm.12023
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
- 2
- 3 474 31 Boltjes A, van Montfoort N, Biesta PJ, *et al.* Kupffer cells interact with hepatitis B surface antigen
- 4 475 in vivo and in vitro, leading to proinflammatory cytokine production and natural killer cell
- 5 476 function. *J Infect Dis* 2015;**211**:1268–78. doi:10.1093/infdis/jiu599
- 6
- 7 477 32 Tohidi-Esfahani R, Vickery K, Cossart Y. The early host innate immune response to duck hepatitis
- 8 478 B virus infection. *J Gen Virol* 2010;**91**:509–20. doi:10.1099/vir.0.015529-0
- 9
- 10 479 33 Yu X, Lan P, Hou X, *et al.* HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β
- 11 480 production via suppressing the NF- κ B pathway and ROS production. *J Hepatol* 2017;**66**:693–702.
- 12 481 doi:10.1016/j.jhep.2016.12.018
- 13
- 14 482 34 Wang S, Chen Z, Hu C, *et al.* Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-
- 15 483 induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *J*
- 16 484 *Immunol Baltim Md* 1950 2013;**190**:5142–51. doi:10.4049/jimmunol.1201625
- 17
- 18 485 35 Gruffaz M, Testoni B, Luangsay S, *et al.* The nuclear function of Hepatitis B capsid (HBc) protein is
- 19 486 to inhibit IFN response very early after infection of hepatocytes. *Hepatol. Baltim. Md.*
- 20 487 2013;**;**276A.
- 21
- 22 488 36 Huang Y-W, Lin S-C, Wei S-C, *et al.* Reduced Toll-like receptor 3 expression in chronic hepatitis B
- 23 489 patients and its restoration by interferon therapy. *Antivir Ther* 2013;**18**:877–84.
- 24 490 doi:10.3851/IMP2630
- 25
- 26 491 37 Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJV, *et al.* Regulation of Toll-like receptor-2 expression in
- 27 492 chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatol Baltim Md* 2007;**45**:102–10.
- 28 493 doi:10.1002/hep.21482
- 29
- 30 494 38 Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, *et al.* Intrahepatic innate immune response pathways are
- 31 495 downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2017;**66**:897–909.
- 32 496 doi:10.1016/j.jhep.2016.12.024
- 33
- 34 497 39 Jiang M, Broering R, Trippier M, *et al.* Toll-like receptor-mediated immune responses are
- 35 498 attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen. *J Viral Hepat*
- 36 499 2014;**21**:860–72. doi:10.1111/jvh.12216
- 37
- 38 500 40 Adhya D, Basu A. Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. *J*
- 39 501 *Biosci* 2010;**35**:647–63.
- 40
- 41 502 41 Wieland S, Thimme R, Purcell RH, *et al.* Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus
- 42 503 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:6669–74. doi:10.1073/pnas.0401771101
- 43
- 44 504 42 Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*
- 45 505 2014;**61**:S14–25. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.035
- 46
- 47 506 43 Stacey AR, Norris PJ, Qin L, *et al.* Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak
- 48 507 viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and
- 49 508 delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 2009;**83**:3719–33.
- 50 509 doi:10.1128/JVI.01844-08
- 51
- 52 510 44 Fletcher SP, Chin DJ, Ji Y, *et al.* Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic
- 53 511 hepatitis B. *Hepatol Baltim Md* 2012;**56**:820–30. doi:10.1002/hep.25730
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
- 2
- 3 512 45 Wieland SF, Chisari FV. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *J Virol*
- 4 513 2005;**79**:9369–80. doi:10.1128/JVI.79.15.9369-9380.2005
- 5
- 6 514 46 Cooper A, Tal G, Lider O, *et al.* Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages
- 7 515 is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J Immunol Baltim Md 1950*
- 8 516 2005;**175**:3165–76.
- 9
- 10 517 47 Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, *et al.* Not interferon, but interleukin-6 controls early gene
- 11 518 expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology Baltim Md 2009*;50:1773–82.
- 12 519 doi:10.1002/hep.23226
- 13
- 14 520 48 Cheng X, Xia Y, Serti E, *et al.* Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but
- 15 521 activates cytokine production by macrophages. *Hepatology Baltim Md 2017*;66:1779–93.
- 16 522 doi:10.1002/hep.29348
- 17
- 18 523 49 Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*
- 19 524 2013;**45**:e66. doi:10.1038/emm.2013.97
- 20
- 21 525 50 Mastrangelo MJ, Maguire HC, Eisenlohr LC, *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding
- 22 526 virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther 1999*;6:409.
- 23 527 doi:10.1038/sj.cgt.7700066
- 24
- 25 528 51 Liu P-S, Wang H, Li X, *et al.* α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through
- 26 529 metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol 2017*;18:985–94. doi:10.1038/ni.3796
- 27
- 28 530 52 Demento SL, Eisenbarth SC, Foellmer HG, *et al.* Inflammasome-activating nanoparticles as
- 29 531 modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine 2009*;27:3013–21.
- 30 532 doi:10.1016/j.vaccine.2009.03.034
- 31
- 32 533
- 33
- 34 534
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

Legends:

Figure 1: Pro and anti-inflammatory markers in HBV-infected liver MΦ. (A) Total RNAs were extracted from HBV-infected (n=24) or non-infected (n=31) liver biopsies and the levels of indicated mRNA assessed by RT-qPCR. Horizontal bars represent the mean of values and data were submitted to Mann Whitney test. *p<0.05, ns = not significant. (B) Liver biopsies from healthy controls (HC), HBeAg-negative patients with low viremia (HBe-/LV), HBeAg-negative patients with high viremia (HBe-/HV), and HBeAg-positive patients with high viremia (HBe+/HV) were stained by IHC for the expression of CD68 (total macrophage), iNOS (M1 macrophage) and CD163 (M2 macrophage) and quantification of the levels of CD68, iNOS and CD163 are presented. Each colour represents one patient. Horizontal bars represent the mean of values and data were submitted to Kruskal Wallis test. *p<0.05, **p<0.01, ns = not significant.

Figure 2: Levels of pro-inflammatory markers decreased in liver MΦ exposed to HBV. (A) Total LMNC were isolated and exposed or not to HBV for 24h. Supernatants were collected and the levels of secreted IL-1β and IL-10 assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the median of five independent experiments (with five different donors) each performed with three biological replicates. (B) Liver MΦ were isolated, exposed or not to HBV for 24h before stimulation with 100 ng/ml of LPS for 24h. Supernatants were collected and the levels of secreted IL-1β and IL-10 assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the median of five independent experiments (with five different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. *p<0.05, **p<0.01, ***p>0.005, ns = not significant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

560 **Figure 3: HBV interfered with M1-MDM differentiation.** Monocytes were purified from
561 peripheral blood mononuclear cells, differentiated into (B) M1-MDM (upon GM-CSF culture)
562 or (C) M2-MDM (upon M-CSF culture) in the presence or not of HBV before stimulation with
563 10 ng/ml of LPS for 3 hours. (A) Schematic representation of the experiment. Medium
564 change is indicated by dotted arrows. (B-C) Levels of the indicated secreted cytokines were
565 assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the mean of six
566 independent experiments (with six different donors) each performed with three biological
567 replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis
568 test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.

569
570 **Figure 4: HBV increased M2-MDM activation.** Monocytes were purified from peripheral
571 blood mononuclear cells, differentiated into (B) M1-MDM (upon GM-CSF culture) or (C) M2-
572 MDM (upon M-CSF culture) and stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 hours in the presence
573 or not of HBV. (A) Schematic representation of the experiment. Medium change is indicated
574 by dotted arrows. (B-C) Levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA
575 and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the mean of six independent
576 experiments (with six different donors) each performed with three biological replicates.
577 Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test.
578 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.

579
580 **Figure 5: HBV-producing cells impaired M1-MDM differentiation and enhanced M2-
581 MDM activation.** Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells,
582 differentiated into M1-MDM (upon GM-CSF culture) or M2-MDM (upon M-CSF culture) and
583 stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 hours, in the presence of non-infected HepG2-NTCP
584 (HBV- cells) or HepAD38 (HBV+ cells). (A) Schematic representation of the experiment.
585 Medium change is indicated by dotted arrows. (B) Levels of the indicated secreted cytokines

1
2
3 586 were assessed by ELISA and analysed as ratio to cells exposed to HBV- cells. Results are
4
5 587 the median of two to four independent experiments (with two to four different donors) each
6
7 588 performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data
8
9 589 were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.
10

11 590

12
13
14 591 **Figure 6: IL-1 β strongly inhibited establishment of HBV infection in hepatocytes.** (A)
15
16 592 dHepaRG cells or (B) PHH were treated with 1 ng/ml of recombinant IL-1 β or 20 ng/ml of
17
18 593 recombinant IL-10, 24h before and during the infection with HBV. Seven days post infection,
19
20 594 supernatants were collected and levels of HBeAg and HBsAg quantified by ELISA. Cells
21
22 595 were harvested, total RNA or DNA extracted, and levels of HBV RNAs and cccDNA
23
24 596 quantified by RT-qPCR or qPCR analysis. Cell viability was assessed by neutral red uptake
25
26 597 assay. Results, presented as ratio to non-treated cells, are the mean $\pm$ standard deviation
27
28 598 of three independent experiments (three batches of dHepaRG cells and three donors of
29
30 599 PHH) each performed with three biological replicates. Data were submitted to Kruskal Wallis
31
32 600 test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$.
33

34 601

35
36
37 602 **Figure 7: HBV prevented the antiviral effect of M1-MDM on HBV establishment and**
38
39 603 **conferred more immunosuppressive properties to M2-MDM.** (A) dHepaRG cells were
40
41 604 treated 24h before and during HBV infection with concentrated supernatants from LPS-
42
43 605 stimulated M1-MDM exposed to HBV during their differentiation or during their stimulation
44
45 606 (CM; conditioned medium pooled from at least five independent experiments). Seven days
46
47 607 post infection, supernatants were collected and levels of HBeAg and HBsAg quantified by
48
49 608 ELISA. Cells were harvest, total DNA was extracted and levels of cccDNA quantified by
50
51 609 specific qPCR analysis. Cell viability was assessed by neutral red uptake assay. Results,
52
53 610 presented as ratio to non-treated cells (mock), are the mean $\pm$ standard deviation of three
54
55 611 independent experiments each performed with three biological replicates. (B) Lymphocytes
56
57
58
59
60

1
2
3 612 were purified from peripheral blood mononuclear cells and exposed to media (mock) or LPS-
4
5 613 stimulated M2-MDM in the presence or not of HBV during their stimulation (CM; conditioned
6
7 614 medium) for 2h before stimulation with 20 ng/ml of PMA and 500 ng/ml of ionomycine.
8
9 615 Supernatants were collected 22h later and the levels of TNF- α assessed by ELISA. Results,
10
11 616 presented as ratio to non-treated cells (mock), are the mean +/- standard deviation of three
12
13 617 independent experiments (lymphocytes from three different donors) each performed with
14
15 618 three biological replicates. Data were submitted to Kruskal Wallis test. *p<0.05, **p<0.01,
16
17 619 ***p>0.005, ns= not significant.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

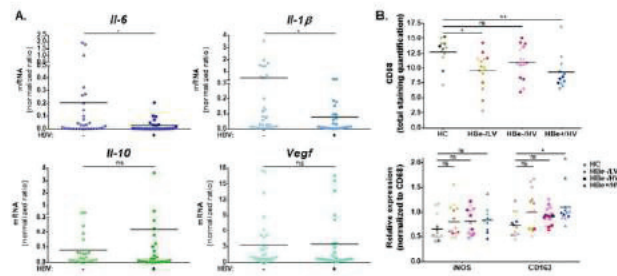


Figure 1: Pro and anti-inflammatory markers in HBV-infected liver MΦ. (A) Total RNAs were extracted from HBV-infected (n=24) or non-infected (n=31) liver biopsies and the levels of indicated mRNA assessed by RT-qPCR. Horizontal bars represent the mean of values and data were submitted to Mann Whitney test. *p<0.05, ns = not significant. (B) Liver biopsies from healthy controls (HC), HBeAg-negative patients with low viremia (HBe-/LV), HBeAg-negative patients with high viremia (HBe-/HV), and HBeAg-positive patients with high viremia (HBe+/HV) were stained by IHC for the expression of CD68 (total macrophage), iNOS (M1 macrophage) and CD163 (M2 macrophage) and quantification of the levels of CD68, iNOS and CD163 are presented. Each colour represents one patient. Horizontal bars represent the mean of values and data were submitted to Kruskal Wallis test. *p<0.05, **p<0.01, ns = not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

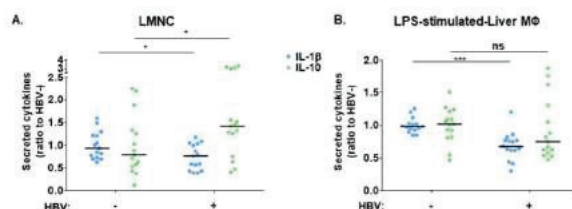


Figure 2: Levels of pro-inflammatory markers decreased in liver MΦ exposed to HBV. (A) Total LMNC were isolated and exposed or not to HBV for 24h. Supernatants were collected and the levels of secreted IL-1 β and IL-10 assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the median of five independent experiments (with five different donors) each performed with three biological replicates. (B) Liver MΦ were isolated, exposed or not to HBV for 24h before stimulation with 100 ng/ml of LPS for 24h. Supernatants were collected and the levels of secreted IL-1 β and IL-10 assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the median of five independent experiments (with five different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

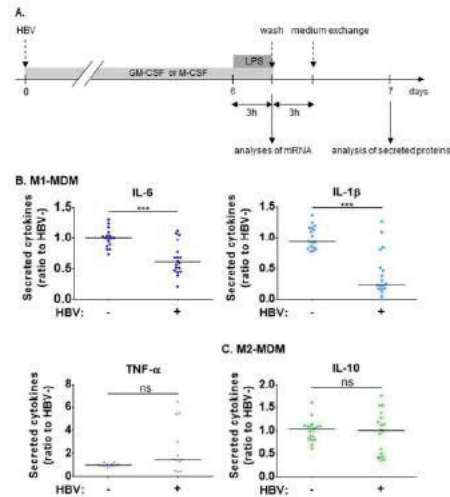


Figure 3: HBV interfered with M1-MDM differentiation. Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells, differentiated into (B) M1-MDM (upon GM-CSF culture) or (C) M2-MDM (upon M-CSF culture) in the presence or not of HBV before stimulation with 10 ng/ml of LPS for 3 hours. (A) Schematic representation of the experiment. Medium change is indicated by dotted arrows. (B-C) Levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the mean of six independent experiments (with six different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, ns = not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

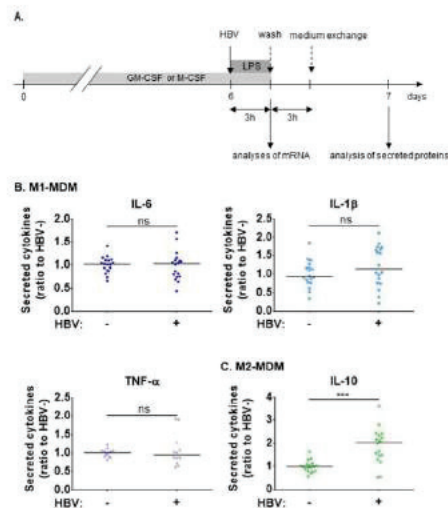


Figure 4: HBV increased M2-MDM activation. Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells, differentiated into (B) M1-MDM (upon GM-CSF culture) or (C) M2-MDM (upon M-CSF culture) and stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 hours in the presence or not of HBV. (A) Schematic representation of the experiment. Medium change is indicated by dotted arrows. (B-C) Levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA and analysed as ratio to non-exposed cells. Results are the mean of six independent experiments (with six different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

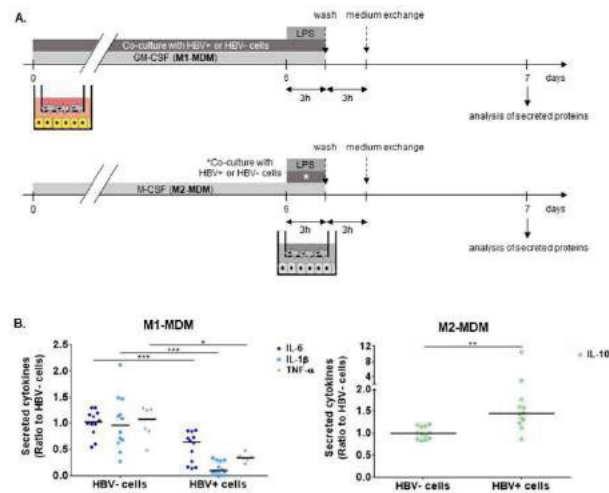


Figure 5: HBV-producing cells impaired M1-MDM differentiation and enhanced M2-MDM activation. Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells, differentiated into M1-MDM (upon GM-CSF culture) or M2-MDM (upon M-CSF culture) and stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 hours, in the presence of non-infected HepG2-NTCP (HBV- cells) or HepAD38 (HBV+ cells). (A) Schematic representation of the experiment. Medium change is indicated by dotted arrows. (B) Levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA and analysed as ratio to cells exposed to HBV- cells. Results are the median of two to four independent experiments (with two to four different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, ns = not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

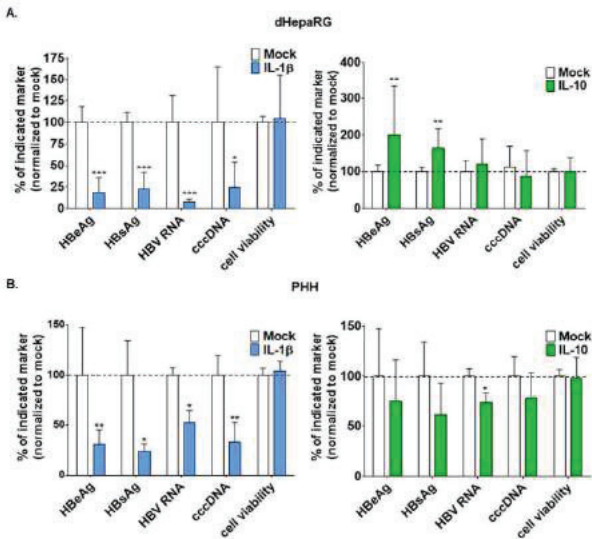


Figure 6: IL-1 β strongly inhibited establishment of HBV infection in hepatocytes. (A) dHepaRG cells or (B) PHH were treated with 1 ng/ml of recombinant IL-1 β or 20 ng/ml of recombinant IL-10, 24h before and during the infection with HBV. Seven days post infection, supernatants were collected and levels of HBeAg and HBsAg quantified by ELISA. Cells were harvested, total RNA or DNA extracted, and levels of HBV RNAs and cccDNA quantified by RT-qPCR or qPCR analysis. Cell viability was assessed by neutral red uptake assay. Results, presented as ratio to non-treated cells, are the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments (three batches of dHepaRG cells and three donors of PHH) each performed with three biological replicates. Data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$.

254x190mm (96 x 96 DPI)

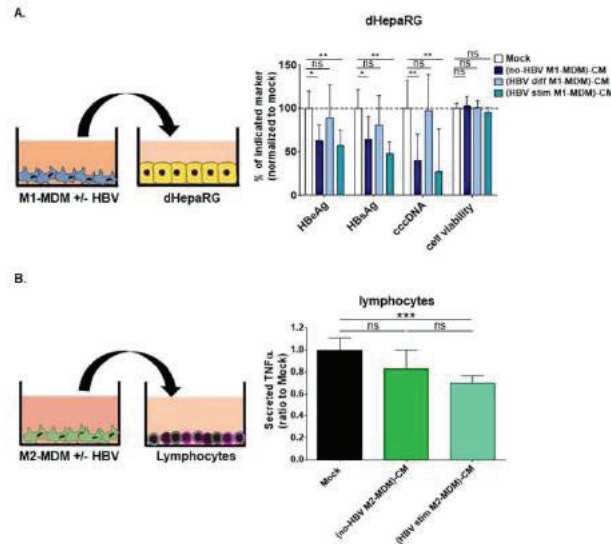


Figure 7: HBV prevented the antiviral effect of M1-MDM on HBV establishment and conferred more immunosuppressive properties to M2-MDM. (A) dHepaRG cells were treated 24h before and during HBV infection with concentrated supernatants from LPS-stimulated M1-MDM exposed to HBV during their differentiation or during their stimulation (CM; conditioned medium pooled from at least five independent experiments). Seven days post infection, supernatants were collected and levels of HBeAg and HBsAg quantified by ELISA. Cells were harvest, total DNA was extracted and levels of cccDNA quantified by specific qPCR analysis. Cell viability was assessed by neutral red uptake assay. Results, presented as ratio to non-treated cells (mock), are the mean +/- standard deviation of three independent experiments each performed with three biological replicates. (B) Lymphocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells and exposed to media (mock) or LPS-stimulated M2-MDM in the presence or not of HBV during their stimulation (CM; conditioned medium) for 2h before stimulation with 20 ng/ml of PMA and 500 ng/ml of ionomycin. Supernatants were collected 22h later and the levels of TNF- α assessed by ELISA. Results, presented as ratio to non-treated cells (mock), are the mean +/- standard deviation of three independent experiments (lymphocytes from three different donors) each performed with three biological replicates. Data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns= not significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Interference of Hepatitis B Virus (HBV) with liver MΦ function promotes hepatocyte infection

Suzanne Faure-Dupuy¹, Marion Delphin¹, Ludovic Aillot¹, Laura Dimier¹, Fanny Lebossé^{1,2}, Judith Fresquet¹, Romain Parent¹, Michel Rivoire³, Nathalie Bendriss-Vermare¹, Angela Lam^{4,5}, Klaus Klumpp^{4,5}, Fabien Zoulim^{1,2,5,§}, David Durantel^{1,5,*}, and Julie Lucifora^{1,*}

¹INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, France ;

²Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France;

³INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

⁴Novira therapeutics; part of the Janssen Pharmaceutical Companies;

⁵DEVweCAN Laboratory of Excellence, Lyon, France;

[§]Equal contribution

* Equal contribution

Supplementary informations

Material and methods

Primary cells purification and cells culture. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from blood donors were isolated by Ficoll gradient (Histopaque®-1077, Sigma) as previously described (55). Lymphocytes were separated from total PBMC by a Percoll gradient and further cultured in macrophage medium (RPMI medium supplemented with 10% of decompartmented FBS and 50 U/ml of penicillin/streptomycin). Monocytes were purified by Percoll gradient followed by a negative selection with the Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) and cultured in macrophage medium. Monocytes were exposed during 6 days to 50 ng/ml of GM-CSF (R&D) or 50 ng/ml of M-CSF from (Peprotech) for M1-MDM or M2-MDM differentiation respectively. MDM were activated by a 3-hours stimulation with 10 ng/ml of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
LPS (Invivogen). Cells were washed three times with PBS and cultured in fresh medium for another 3 hours before a last medium exchange. Supernatants and cells were collected 24 h post stimulation (i.e. 18h accumulation). Liver cells were isolated from hepatic resections obtained in collaboration with three surgical departments of Lyon (Centre Léon Bérard, Hôpital de la Croix Rousse and centre hospitalier Lyon-Sud) with the French ministerial authorizations (AC 2013-1871, DC 2013 – 1870, AFNOR NF 96 900 sept 2011). After a two-step collagenase perfusion, the liver extract was filtered and centrifuged, as previously described (56). Primary Human Hepatocytes (PHH) were cultured on collagen layer and maintain in PHH medium (Williams medium supplemented with 5% of fetal clone II serum, 50 U/ml of penicillin/streptomycin, 1X glutamax, 5 µg/ml of bovine insulin, 5×10^{-5} M of hydrocortisone, and 2% of DMSO). Liver mononuclear cells (LMNC) or only liver MΦ were purified from the non-parenchymal cells mixture by respectively Ficoll gradients or a two phase iodixanol gradient (57). Liver MΦ were isolated by negative selection using pan monocyte isolation kit (Miltenyi Biotec) and cultured in macrophage medium. HepaRG cells were cultured and differentiated as previously described (58).

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Viral infection. Differentiated HepaRG (dHepaRG) or PHH were cultured and infected by HBV as previously described (59). Blood monocytes, LMNC and liver MΦ were exposed to HBV at a multiplicity of infection of 1000 vge/mL. HBV inocula are prepared by concentrating supernatant from HepAD38 (60) by ultrafiltration (Merk Millipore; UFC710008). All virus preparations were tested for the absence of endotoxin (Lonza) and characterized by analyses of the fractions from a 5.6-56% iodixanol gradient and analysed by ELISA, dot blot with HBV dig labelled probe (61) and western-blot (DAKO, B0586) (Figure S10). Virus was inactivated by a 30 min exposition to UVB.

Cytokine treatment. Cytokines references and used concentration are indicated in Table S3.

Quantification of secreted proteins by ELISA. HBeAg and HBsAg secretion were quantified using chemiluminescence immunoassay kit (Autobio) following the manufacturer's

instructions. Cytokines secretion were analysed using DuoSet ELISA (R&D system) following manufacturer's instructions.

RNA extraction and RT-qPCR. Total mRNA from hepatocytes or MΦ were extracted with NucleoSpin® RNA II or NucleoSpin® RNA XS respectively (Macherey-Nagel). cDNA were synthesized using the SuperScript®III Reverse Transcriptase (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. qPCR analyses were performed using "Express SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal" (Invitrogen). mRNA expression was assessed by comparative cycle threshold (Ct) method ($2^{-\Delta Ct}$); GUS and RPLP0 were used as housekeeping genes for hepatocytes and MΦ respectively. Primers sequences are presented in **table S6**.

DNA extraction and cccDNA quantification. Total DNA were extracted using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Total intracellular DNA was digested for 45 min at 37°C with T5 exonuclease (epicentre) to remove rcDNA (relaxed circular HBV DNA) followed by a 30 min heat inactivation. cccDNA amount was quantified by qPCR analyses as previously described (2).

Cytotoxicity assay. Seven days post treatments, hepatocytes cell viability was assessed by quantification of neutral red uptake by living cells, as previously described (4).

Lymphocytes activation. Lymphocytes were cultured in different M2-MDM conditioned media at a density of 300,000 cells/cm² for 2 hours. Cells were activated by a 22h exposition to 20 ng/ml of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (Sigma) and 500 ng/ml of Ionomycine. Activation was measured by assessment of TNF-α secretion.

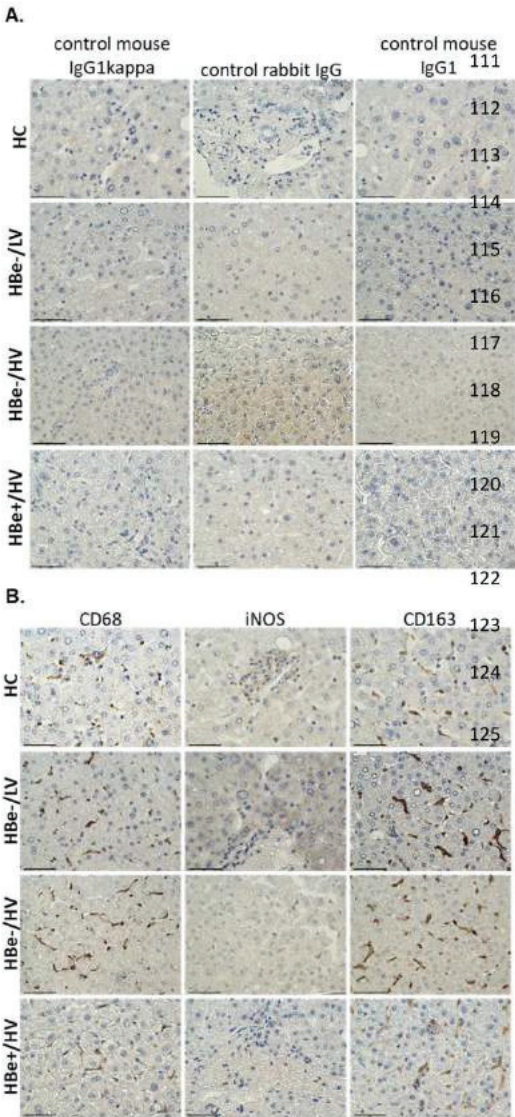
Macrophage supernatants concentration. M1- or M2-MDM supernatants from at least five different donors were pooled and concentrated by ultrafiltration (using 10 kDa Amicon ultra-15 column; Merk-Millipore) following the manufacturer's instruction. Cytokines concentration of the concentrated supernatants were assessed by ELISA before dilution to 1/100 in hepatocyte media. Final concentration are presented in **Table S4**.

Immunohistochemistry. Paraffin was removed from FFPE samples by successive alcohol bathes and epitopes were unmasked as previously described (62). Endogen peroxidases were blocked by a 15 min exposition at room temperature with Dual Endogenous enzyme Block (DAKO S2003). Saturation was performed by two successive incubations at RT of 20 min with horse serum (VECTOR S-2012 Za0328) and 15 min with DAKO antibody diluent (DAKO S3022). Antibodies (iNOS (ab15323), CD163 (ab74604), and CD68 (ab955)) were incubated overnight at 4°C in DAKO antibody diluent. Samples were incubated for 15 min at RT with secondary antibodies (Anti-Rabbit IgG/HRP (P0448; DAKO) and anti-mouse IgG/HRP (P0447; DAKO)). Coloration was performed with DAB substrate (DAKO K3468) and counterstaining with haematoxylin (SIGMA MHS1). Negative controls were performed using control IgGs (IgG rabbit (cell signalling 27295), IgG 1 mouse (Biolegend 400143), IgG 1 mouse (ab18448)), and no staining was observed (**Figure S1**). Optical density (OD=log (max intensity/mean intensity)) of the DAB staining was quantified using Fiji (ImageJ) and the results are presented as 1/OD.

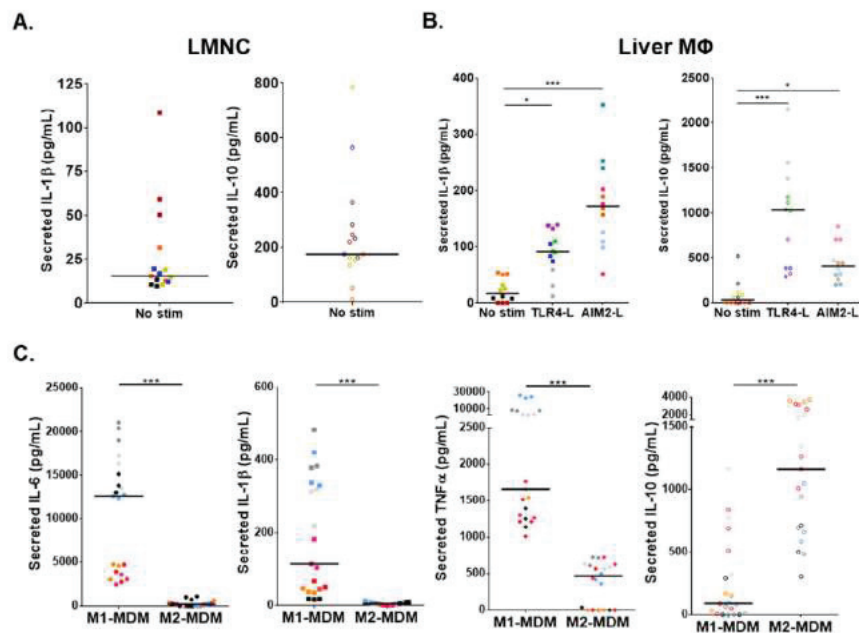
Patients' samples. Samples were used under the French IRB 'CPP Sud-Est IV' approval #11/040 (2011) from the 'Biobanque INSERM CRCL Hépatologie (U1052)', France #DC2008-235. Written informed consent was obtained from each patient. Patients' characteristics are presented in **table S1** for biopsies mRNA analysis, **table S2** for IHC staining cohort.

Flow cytometry. Cells were washed extensively with PBS and removed from plate with 150 µl of versene-EDTA at 37°C for 5 min before centrifugation at 1300 rpm for 5 min at 4°C. Cells were incubated for 30 min at 4°C with primary antibody (ab175289, 1/50). After extensive washes, cells were incubated with secondary antibody in the dark for 30 min at 4°C. After another wash, staining was measured by Flow Cytometry (BD FACSCALIBUR).

Statistical analysis. Results are presented as mean ± standard deviation and analysed for statistical significance using Prism software. Significance is represented as follow: p<0.05: *; p<0.01: **; p<0.005: ***; ns: not significant.

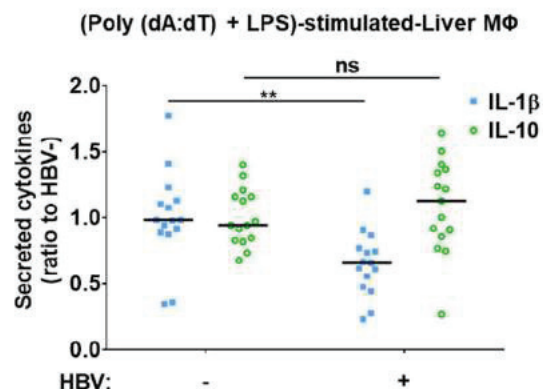


Supplementary figure 1:
Photos of the staining with control or target specific antibodies. Liver biopsies from healthy controls (HC), HBeAg negative with low viral load (HBe-/LV), HBeAg negative with high viral load (HBe-/HV) and HBeAg positive with high viral load (HBe+/HV) patients were stained by with control or target specific antibodies. Photo are representative of the obtained staining.



126

Supplementary figure 2: Levels of cytokines secreted by LMNC, liver MΦ, and MDM from different donors. (A) Total LMNC were isolated from liver resection and cultivated for 24h. (B) Liver MΦ were isolated from liver resection and stimulated 24h later with 100 ng/ml of LPS (TLR4-L) or 100 ng/ml of LPS + 100 ng/ml of Poly (dA:dT) (AIM2-L) for another 24h. (C) Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells, differentiated in M1-MDM (GM-CSF treated) or M2-MDM (M-CSF treated) for 6 days, stimulated with 10 ng/mL LPS for 3h, washed and further cultured for 24h with a medium exchange 3h after washing. (A, B, C) Supernatant were collected and the levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA. For each cell type, three biological replicates per donors (one colour per donor) have been analysed. Horizontal bars represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$, ns = not significant.



138

139 **Supplementary figure 3: Levels of IL-1β decreased in liver macrophages exposed to**140 **HBV.** Liver MΦ were isolated, exposed or not to HBV for 24h before stimulation with 100

141 ng/ml of LPS and 100 ng/mL of poly(dA:dT) for 24h. Supernatants were collected and the

142 levels of secreted IL-1β and IL-10 were assessed by ELISA and analysed as ratio to non-

143 exposed cells. Results are the median of five independent experiments (with five different

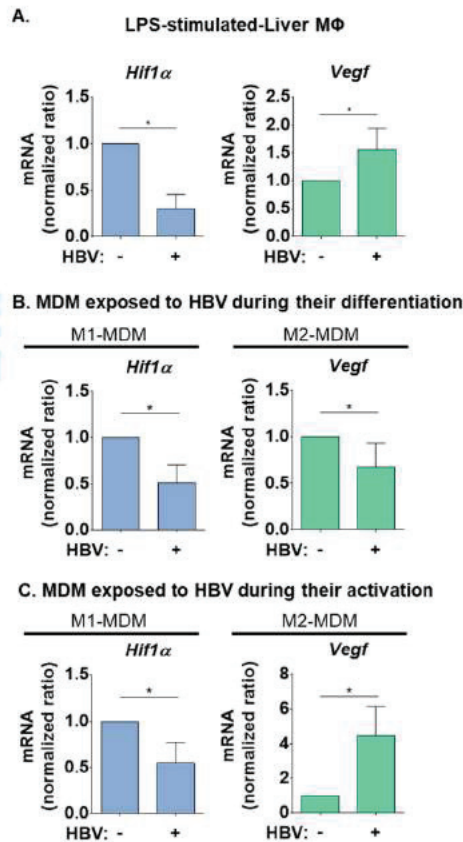
144 donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars represent the

145 median and data were submitted to Kruskal Wallis test. *p<0.05, **p<0.01, ***p>0.005, ns =

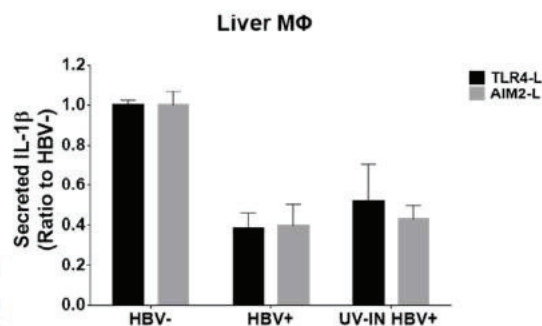
146 not significant.

147

148



Supplementary figure 4: Levels of HIF1 α and VEGF mRNAs in liver MΦ, and MDM exposed to HBV. (A) Liver MΦ were isolated, exposed or not to HBV for 24h before stimulation with 100 ng/ml of LPS for 3h. (B-C) Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells, differentiated into M1-MDM (upon GM-CSF culture) or M2-MDM (upon M-CSF culture) in the presence or not of HBV (B) during differentiation or (C) during stimulation with 10 ng/ml of LPS for 3 hours. (A, B, C) Cells were harvested, total RNA were extracted and the levels of the indicated mRNA were assessed by RT-qPCR. Results represent the mean of three independent experiments (three different donors). Data were submitted to Mann Whitney test. * $p < 0.05$, ns= not significant.

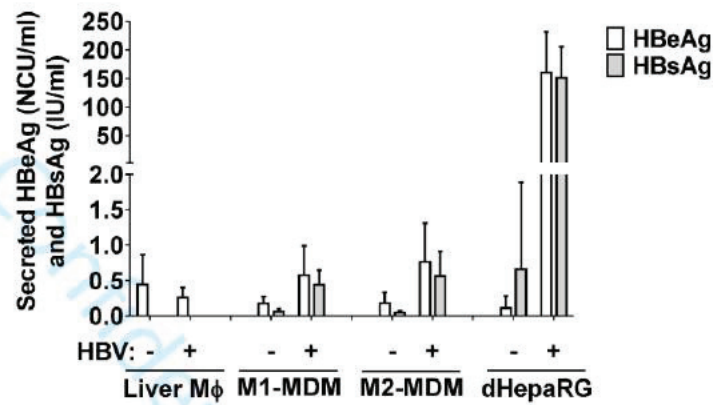


158

159 **Supplementary figure 5: UV-inactivated HBV has similar effect as HBV on IL-1 β**
 160 **secretion by liver MΦ.** Liver MΦ were isolated from liver resection, exposed to medium
 161 (HBV-), HBV (HBV+) or to an UV-inactivated HBV (UV-IN HBV+) for 24h, and stimulated with
 162 100 ng/ml of LPS (TLR4-L) or 100 ng/ml of LPS + 100 ng/ml of Poly (dA:dT) (AIM2-L) for
 163 another 24h. Levels of IL-1 β were assessed by ELISA and analysed as ratio to non-
 164 exposed cells. Results are the mean $\pm$ standard deviations of one experiment performed
 165 with three biological replicates.

166

167

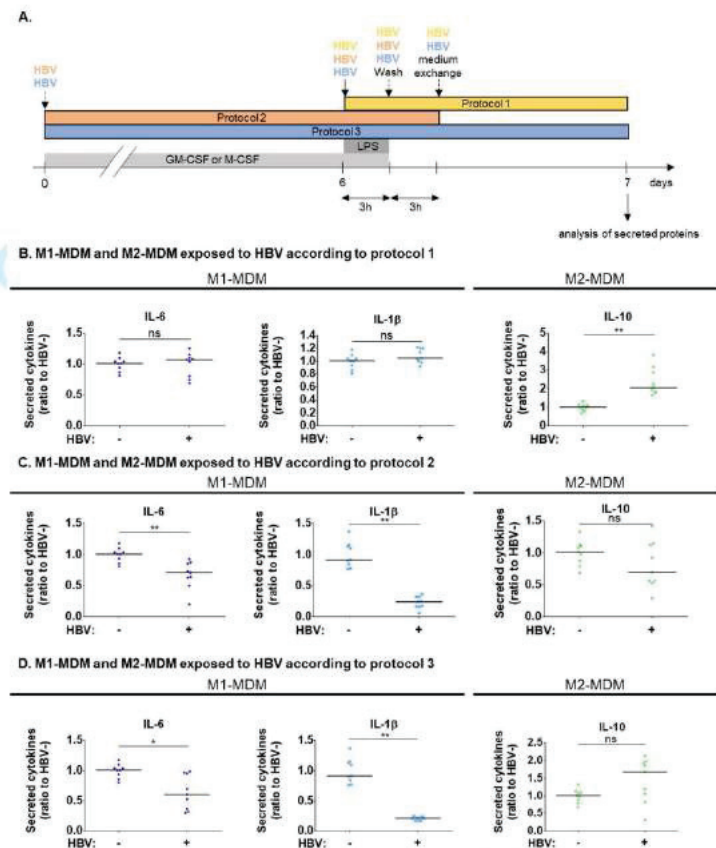


168

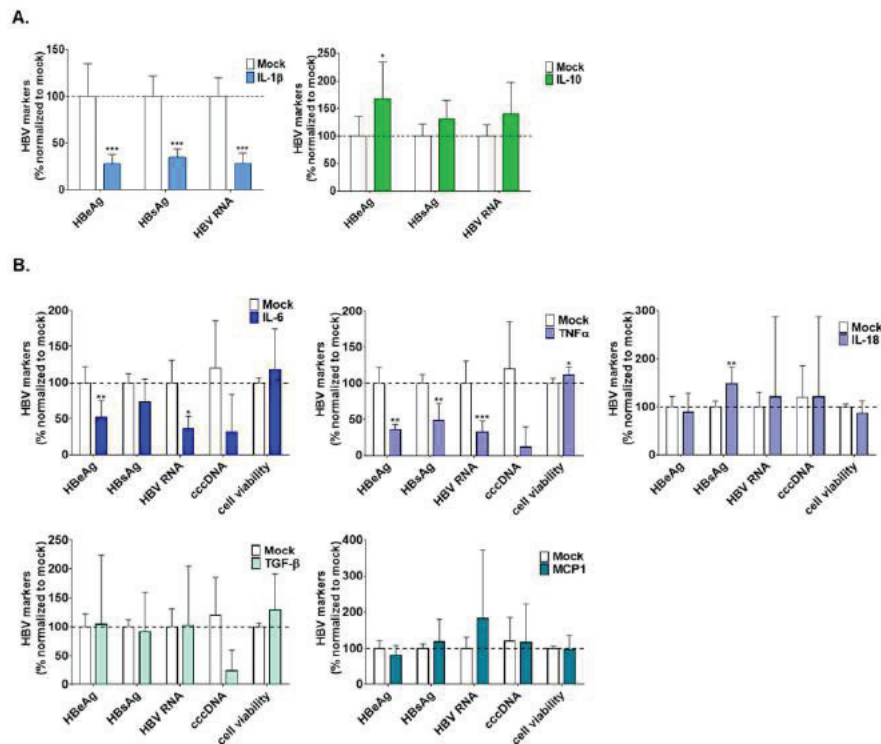
169 **Supplementary figure 6: HBV did not replicate in macrophages.** Liver Mφ and dHepaRG
 170 were exposed to HBV for one day and M1-MDM and M2-MDM for six days. Supernatant
 171 were collected and levels of HBeAg and HBsAg were determined by ELISA seven days post
 172 exposure. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of three independent
 173 experiments (three batches of dHepaRG and three different donors) each performed in three
 174 biological replicates.

175

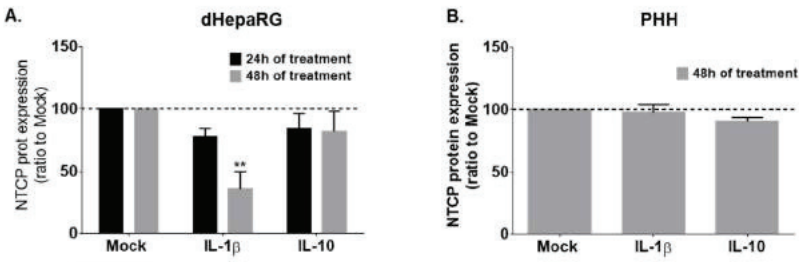
176



177 **Supplementary figure 7: HBV interfere with M1-MDM differentiation and increase M2-**
178 **MDM activation.** Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells,
179 differentiated into M1-MDM (upon GM-CSF culture) or M2-MDM (upon M-CSF culture) and
180 stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 hours, and HBV was added at different time points. (A)
181 Schematic representation of the experiment. Media removals are indicated by dotted arrows.
182 (B-D) Levels of the indicated secreted cytokines were assessed by ELISA and analysed as
183 ratio to non-exposed cells. Results are the mean of three independent experiments (with
184 three different donors) each performed with three biological replicates. Horizontal bars
185 represent the median and data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
186 *** $p > 0.005$, ns = not significant.



Supplementary figure 8: Effect of recombinant cytokines on the establishment of HBV infection. dHepaRG cells were treated with the indicated recombinant cytokines (A) 24h before or (B) 24h before and during infection with HBV. Seven days post infection, supernatants were collected and levels of HBeAg and HBsAg were quantified by ELISA. Cells were harvest, total RNA or DNA were extracted and levels of HBV RNAs and cccDNA were quantified by RT-qPCR or qPCR analyses. Cell viability was assessed by neutral red uptake assay. Results, presented as ratio to non-treated cells, are the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments each performed with three biological replicates. Data were submitted to Kruskal Wallis test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

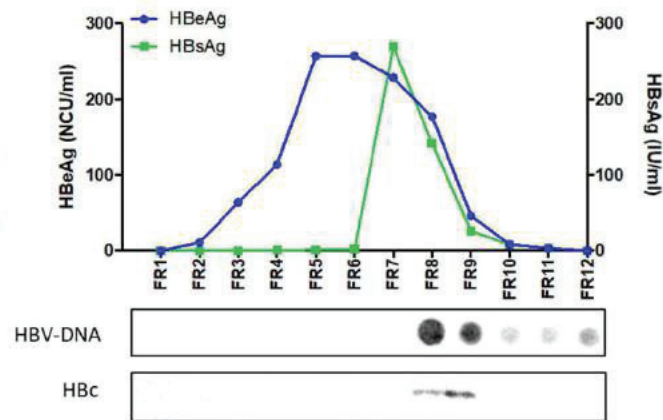


198

199 **Supplementary figure 9: NTCP levels in dHepaRG and PHH treated with IL-1 β .** (A)
200 dHepaRG cells were treated with recombinant IL-1 β , and IL-10 for 24h or 48h. (B) PHH were
201 treated with recombinant IL-1 β , and IL-10 for 48h. (A-B) NTCP protein expression was
202 analysed by flow cytometry. Results are presented in percentage normalised to the non-
203 treated cells. Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments (three
204 batches of dHepaRG cells and three donors of PHH). Data were submitted to Kruskal Wallis
205 test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$.

206

207



Supplementary figure 10: Characterization of HBV inoculum. Supernatants from HepAD38 were concentrated by ultracentrifugation and characterized by analysis of the fractions from a 5.6-56% iodixanol gradient. Viral parameters were assessed in each fractions by ELISA (HBeAg and HBsAg), dot blot (HBV DNA), and western-blot (HBc) analyses. Representative characterization of one of the HBV inoculum used for this study.

ID	HBV status	Type	Age	Sex	Hbv mRNA (2 ^{-Δ} ΔCT)	inflammation	score fibrose	IL-6 mRNA (2 ^{-Δ} ΔCT)	IL-1β mRNA (2 ^{-Δ} ΔCT)	IL-10 mRNA (2 ^{-Δ} ΔCT)	Vegf mRNA (2 ^{-Δ} ΔCT)
P#1	POSITIVE		44	M	1.2612	1	3	0.0018	0.0118	0.0002	0.4939
P#2			62	M	5.3926	2	3	0.0006	0.0314	0.0052	0.6301
P#3			37	M	78.5729	3	3	0.0340	0.1533	0.1219	3.5286
P#4			45	M	3.2916	1	2	0.2058	0.3816	0.5063	8.2914
P#5			23	M	1.0073	1	2	0.0013	0.0063	0.0035	0.3960
P#6			43	M	0.0510	1	2	0.0287	0.0960	0.0480	0.7457
P#7			32	M	14.0500	1	2	0.1016	0.6465	3.6577	9.0906
P#8			63	M	0.4765	0	2	0.0036	0.0612	0.0361	3.6375
P#9			42	M	22.1076	2	2	0.0026	0.0357	0.0243	1.9459
P#10			56	M	1.5789	0	1	0.0710	0.1793	0.2287	15.7058
P#11			54	M	1.7238	1	1	0.0174	0.0692	0.0757	0.8622
P#12			15	M	10.7613	1	1	0.0007	0.0049	0.0027	1.2968
P#13			68	M	0.5162	0	1	0.0014	0.0163	0.0082	0.6805
P#14			42	M	9.6725	1	1	0.0982	0.3810	0.1044	13.7163
P#15			50	F	0.1198	0	1	0.0010	0.0151	0.0113	0.3834
P#16			17	M	0.4993	1	0	0.0004	0.0035	0.0020	0.2462
P#17			M		0.0031			0.0033	0.0104	0.0155	0.5262
P#18			M		1.8628			0.0019	0.0136	0.0128	2.8710
P#19			54	M	0.0744			0.0486	0.1877	0.2818	16.6380
P#20			68	M	0.3611	1	4	0.0001	0.0066	0.0237	0.2793
P#21			M		1.8024	1	4	0.0315	0.0938	0.1791	0.6080
P#22			M		0.0000	0	4	0.0030	0.0086	0.0052	0.6812
P#23			62	M	0.0057			0.0005	0.0025	0.0027	0.3412
P#24			M		0.1525			0.0011	0.0030	0.0040	0.1999
P#25	NEGATIVE	metabolic syndrome	50	M	0	0	0	0.0006	0.0080	0.0013	0.7907
P#26			45	M	0		0	0.0328	0.1375	0.0644	17.5915
P#27			43	M	0		0	0.0121	0.0728	0.0614	0.9790
P#28			32	M	0		0	0.2731	1.4822	0.9540	6.2778
P#29			30	M	0		0	0.2008	0.6520	0.2466	2.3703
P#30			51	M	0		0	0.2623	1.4828	2.4196	0.0610
P#31			41	M	0		0	0.0025	0.0136	0.0139	0.9601
P#32			50	M	0		0	0.3240	1.7095	1.7376	4.8164
P#33			64	M	0		0	0.1005	0.4609	0.3868	0.9564
P#34			44	M	0		0	0.0438	0.1251	0.0866	5.1597
P#35			34	M	0		0	0.0015	0.0079	0.0122	1.0378
P#36			45	M	0		0	1.9293	1.9685	7.3501	17.3497
P#37		alcoholic	51	M	0		0	0.0274	0.0789	0.0674	13.2938
P#38			58	M	0		0	0.0014	0.0079	0.0055	0.5531
P#39			47	M	0		1	0.0001	0.0038	0.0030	0.3648
P#40		auto-immun	45	M	0		1	0.0040	0.0185	0.0180	0.7914
P#41			30	M	0	0	1	0.0224	0.0570	0.0162	0.1616
P#42			40	M	0	1	1	0.0053	0.0254	0.0243	2.8957
P#43			17	M	0	0	1	0.0054	0.0297	0.0299	2.5218
P#44			30	M	0	0	1	0.0032	0.0272	0.0605	0.6246
P#45	other		26	M	0	0	2	0.0326	0.0826	0.1895	0.8319
P#46			49	M	0	1	2	0.0021	0.0150	0.0149	1.0689
P#47			48	M	0		2	1.0130	3.5396	6.0162	1.5715
P#48			49	M	0		0	0.0753	0.5392	0.1492	8.7835
P#49			30	M	0		0	0.0458	0.2007	ND	0.1320
P#50			62	M	0		0	0.0144	0.0315	0.0350	5.1586
P#51			26	M	0		0	0.0020	0.0144	0.0116	1.4334
P#52			25	M	0		0	0.0028	0.0157	0.4022	0.3248
P#53			45	M	0		0	0.1475	0.1136	ND	0.3005
P#54			33	M	0		0	1.7972	1.5441	3.5068	2.9964
P#55			30	M	0		0	0.0007	0.0086	0.0077	0.6816

Table S1. Patients' characteristic (livers biopsies analyzed by RT-qPCR)

ID	Group	Age	Sex	Treatment	HBsAg (IU/mL)	HBsAg (N or P)	HBV DNA (IU/mL)	cccDNA/cell	Total HBV DNA/cell	Replicative activity	ALAT (IU/mL)	Fibrosis (1 to 4)	Necro-inflammatory activity
P#1	Healthy control (HC)	54	F	None	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P#2		66	M	None	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P#3		76	M	None	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P#4		49	M	None	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P#5	HBsAg negative with Low Viral load (HBe-/HIV)	23	F	None	6511	N	31	0.02	0.74	0.72	11.59	1	1
P#6		36	M	None	1555	N	50	0.09	12.09	11.99	127.86	42	1
P#7		42	F	None	53.13	N	86	0.03	0.71	0.68	20.50	35	0
P#8		59	M	None	5926	N	440	0.02	1.89	1.87	89.17	27	1
P#9	HBsAg negative with High Viral load (HBe-/HIV)	40	M	None	10681	N	541	0.08	5.54	5.45	65.07	65	1
P#10		42	M	None	3250	N	25 238	0.41	3.09	2.68	6.58	78	1
P#11		42	M	None	1052	N	27 343	0.80	38.57	37.76	46.93	47	1
P#12		45	M	None	1205	N	17 263	0.18	2.13	2.15	11.74	62	1
P#13	HBsAg positive with High Viral load (HBe+/HIV)	32	M	None	26910	N	93 709	0.13	11.12	10.98	82.79	115	1
P#14		60	M	None	7170	N	1 511 762	0.34	3.75	3.41	10.12	45	1
P#15		28	M	None	8069	P	32 000 000	6.35	4005.87	3995.52	629.75	68	1
P#16		34	M	None	10539	P	139 181	0.18	28.61	28.43	155.61	61	1
P#17	HBsAg positive with High Viral load (HBe+/HIV)	32	M	None	68620	P	68 275 329	2.04	1975.58	1975.55	968.95	106	1
P#18		30	M	None	8051	P	15 800 000	4.47	5734.49	5730.02	1281.31	75	2

Table S2. Patients' characteristic (livers biopsies analyzed by IHC)

Cytokine	Reference	Concentration
TNF α	Life Technologies PHC3016	50 ng/ml
IL-1 β	MBL International Corporation JM4128-10	1 ng/ml
IL-6	R&D Systems 206-IL/CF	10 ng/ml
IL-18	MBL International Corporation B003-5	10 ng/ml
IL-10	Biovision # 4155-10	20 ng/ml
TGF- β 1	Biovision # 4342-5	5 ng/ml
MCP-1	R&D 279-MC-010	1 ng/ml

Table S3. Recombinant cytokine references and working concentration

MDM	M1		
	HBV -	HBV + protocol 1	HBV + protocol 2
Cytokines (pg/ml)			
IL-6	1063	585	828
IL-1 β	41	4	42
TNF α	1829	1492	1749
IL-10	39	26	40

228

229 **Table S4.** Supernatant from LPS-activated M1-MDM from at least five different donors were
 230 pooled, concentrated by ultrafiltration and diluted in dHepaRG medium to the final
 231 concentration indicated.

232

233

MDM	M2	
	HBV -	HBV + protocol 2
Cytokines (ng/ml)		
IL-6	0	0
IL-1 β	0,02	0,03
IL-12	0	0
TNF α	0	0
IL-10	3,3	5,7

234

235 **Table S5.** Supernatant from LPS-activated M2-MDM from one donor was collected and the
 236 indicated cytokines were determined by ELISA.

237

238

GENE	FORWARD	REVERSE
GUS	CGTGGTTGGAGAGCTCATTGGAA	ATTCCCAGCACTCTCGTCGGT
HBV	GGAGGGATACATAGAGGTTCTTGA	GTTGCCCGTTTGCTCTAATTC
HBV cccDNA	ATGGTGAGGTGAACAATGCT	GACTCTCTCGTCCCCTTCTC
RPLP0	CACCATTGAAATCCTGAGTGATGT	TGACCAGCCCAAAGGAGAAG
HIF1α	CCACCTCTGGAATTGCCTTT	CTCCATGGTGAATCGGTCCC
VEGF	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA

Table S6. Primers sequences

Annexe 2 : Sensor expression primary cells and cell lines. Derived from Study 1
Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018 (page 99).

Primary Human Hepatocytes (PHH)

steady state		
	mRNA	protein
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
MDA5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
STING	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR4	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR5	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR6	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TIM3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
PD-L1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018

differentiated HepaRG cell (dhepaRG)			
	steady state		
	mRNA	protein	
NLRP1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NLRP4	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NOD1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
RIP2	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Caspase 1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IFI16	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
DHX36	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX9	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX41	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
MRE11	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Ku70	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX3	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
LGP2	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
MDA5	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
RIGI	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
STING	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
B-catenin	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR1	- (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
TLR2	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
TLR3	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
TLR4	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
TLR5	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
TLR6	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
Mye88	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
Tlr1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	
Tlr4	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Tlr6	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF3	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF7	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs3	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
PD-L1	+ (qPCR) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB) Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	

HepG2				
	steady state			
	mRNA		protein	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
MDA5	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
RIGI	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
STING	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results		Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR2	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR4	- (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR5	- (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR6	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	ND	
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIRAP	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCS1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	

HuH7.5				
	steady state			
	mRNA	protein		
NLRP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
cGAS	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX41	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR2	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR4	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR10	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIRAP	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
PD-L1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results

HuH7				
	steady state			
	mRNA		protein	
NLRP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NOD1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX41	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
RIGI	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR2	- (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR4	- (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
TLR5	+ (qPCR)	Luangsay, Ait- Goughoulte et al., J Hepatol, 2015	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIRAP	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARD9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOCs3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
PD-L1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results

Kupffer cells (KC) = total liver macrophages (KC + infiltrating)

	steady state	
	miRNA	protein
NLRCAIPAF	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
NLRP3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
NOD2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
cdAS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IFI16	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
MRE11	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DAI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
CARDIFMANS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
LGp2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
MDA5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
STING	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR3	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR7	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR8	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Mincle	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Dectn-1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
SYK	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
SOCs1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TIM3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TIM4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Gal9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
PD-1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
PD-L1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018

THP1			steady state	
	mrna	protein		
NLRP3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
AIM2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
cGAS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
IFI16	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
MRE11	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
LGp2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
MDA5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
STING	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2019
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR5	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR6	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TLR8	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Tif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
CARD9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Dectin-1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Syk	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
SOC33	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
TIM3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
Gal9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND	
PD-L1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	-/+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018

iKC (immortalized Kupffer cells)		steady state	
	mRNA	protein	
NLRP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
NLRP3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
AIM2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
NOD1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
NOD2	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
cGAS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
IFI16	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
MRE11	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
LRFFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
LGP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
MDA5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
STING	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TLR1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)
TLR2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	- (WB)
TLR3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
TLR5	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
TLR6	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
Tif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TIRAP	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
CARD9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
SOCs1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
SOCs3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
PD-L1	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	+ (WB)
		Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	

Hepatic stellate cells (HSC)				
		steady state		
	mRNA		protein	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
cGAS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
LRRIIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
CARDIF/MAVS	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
LGP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
STING	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TLR3	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR7	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR8	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Dectn-1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
SOCs1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
SOCs3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
PD-L1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018

Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC)			steady state	
	mRNA		protein	
NLRP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
NLRP3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
NLRP4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
AIM2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IFI16	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
DAI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
MDA5	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
STING	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
B-catenin	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TLR1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	- (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR6	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TLR7	- (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
TLR8	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Trif	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018
Tram	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
Decitn-1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
TIM4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
Gal9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	ND	
PD-L1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018	+ (WB)	Faure-Dupuy, Vegna et al., J Innate Immunity, 2018

TRP3			
	steady state		
	mRNA		protein
RIP2	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
ASC	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Caspase 1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IFI16	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
DHX36	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
DHX9	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
LRRFIP1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Ku70	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
DDX3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
RIGI	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
STING	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TLR1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TLR3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
TLR4	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
Myd88	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF1	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF3	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND
IRF7	+ (qPCR)	Faure-Dupuy, Vegna et al., unpublished results	ND