



HAL
open science

Etude de l'expression et du rôle de molécules solubles de l'inflammation, la chimiokine CXCL14 et la protéine IL-18bp, dans le contexte des hépatites virales : nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques

Christelle Devisme

► To cite this version:

Christelle Devisme. Etude de l'expression et du rôle de molécules solubles de l'inflammation, la chimiokine CXCL14 et la protéine IL-18bp, dans le contexte des hépatites virales : nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B017 . tel-03351904

HAL Id: tel-03351904

<https://theses.hal.science/tel-03351904>

Submitted on 22 Sep 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Christelle DEVISME

Etude de l'expression et du rôle de molécules solubles de l'inflammation, la chimiokine CXCL14 et la protéine IL-18bp, dans le contexte des hépatites virales : nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques.

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 22/09/2020

Unité de recherche : UMR-U1085 INSERM – Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

Rapporteurs avant soutenance :

Françoise Bachelerie DR, Université Paris-Saclay
Anne-Marie Roque-Afonso MCU-PH, Université Paris Sud

Composition du Jury :

Président :	Matthieu Revest	PU-PH, Université de Rennes 1
Examineurs :	Hélène Fontaine	PH, Hôpital Cochin (Paris)
	Charaf Benarafa	PR, Université de Berne (Suisse)
	Françoise Bachelerie	DR, Université Paris-Saclay
	Anne-Marie Roque-Afonso	MCU-PH, Université Paris-Sud

Directeur de thèse : Michel Samson

DR, Université de Rennes 1

Avant-propos

« Ces cinquante dernières années, nous avons pu constater une croissance alarmante de l'émergence de nouveaux agents infectieux au sein des populations humaines. La lutte contre ces infections émergentes constitue une mission historique et un héritage scientifique exceptionnel. » - Institut Pasteur, décembre 2019.

Alors que des maladies infectieuses que l'on croyait contrôlées, comme la tuberculose ou la fièvre jaune, reviennent au centre des préoccupations de santé publique au niveau mondiale, on assiste également à l'apparition de nouveaux pathogènes, principalement des virus, responsables d'épidémie malgré les mesures sanitaires mises en place. Parmi ces nouveaux virus on peut citer les virus Ebola, Zika, et bien plus récemment le SARS-CoV-2 responsable de l'épidémie mondiale de la Covid-19. Le virus de l'hépatite C est également à l'origine d'épidémie dans certaines zones géographiques.

Les modifications environnementales, les mouvements de populations en augmentant le risque de transmission, ainsi que les changements démographiques concourent à l'émergence de ces nouvelles maladies. L'émergence de ces nouveaux pathogènes passe également par le développement, depuis une vingtaine d'année, des techniques d'identification et de biologie moléculaire. Mais également, par la mise en place de réseaux mondiaux de surveillance, comme par exemple le réseau sentinelle de la grippe développé suite à l'épidémie de grippe espagnole de 1918.

On comprend donc bien la place centrale de la recherche dans le développement de nouvelles techniques et technologies afin d'identifier ces nouveaux pathogènes, mais également afin de développer des traitements et/ou des vaccins préventifs. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces infections est primordiale afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le cas particulier des hépatites virales, les virus sont identifiés depuis de nombreuses années, cependant les traitements et vaccins, quand ils existent, n'ont que peu évolués.

Ces travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'expression et de la fonction de molécules solubles de l'inflammation dans le contexte des hépatites virales. Pour cela, un modèle d'étude de l'hépatite virale par l'inoculation du virus de l'hépatite murine (MHV) a été développé chez des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées pour les molécules d'intérêt. De

plus, des études mécanistiques ont été réalisées in vitro, afin de mieux comprendre les processus de régulation de l'expression des molécules cibles. Enfin, les travaux réalisés ont pour objectifs d'identifier de nouveaux biomarqueurs à ces hépatites virales afin d'en faire de nouvelles cibles thérapeutiques pour contrôler la propagation de cette pathologie virale.

Remerciements

Dans un premier temps je souhaite remercier la région Bretagne ainsi que l'INSERM pour avoir accepté de financer cette thèse sur les trois premières années. Je tiens également à remercier l'ANRS qui m'a permis de prolonger ma thèse sur une 4^{ème} année.

Je remercie l'ensemble des responsables de plateformes, les animaliers, les personnels des plateformes d'histologie, de cytométrie et du secteur de culture L3. Votre aide a été indispensable pour l'avancée de cette thèse.

Je souhaite remercier chaque membre de mon jury de thèse. Merci d'avoir accepté de juger mon travail et pour le temps que vous y consacrerez. Je tiens aussi à remercier les membres de mon Comité de Suivi Individuel (CSI), le Dr Céline Delaloy et le Dr Orlando Musso. Je vous remercie pour vos conseils et votre aide sur l'analyse des manip pendant ces quatre années de thèse.

Je remercie Michel de m'avoir accueillie à l'IRSET mais aussi dans son équipe, et en tant que doctorante sous sa direction. Merci pour ton encadrement et pour ton soutien, quand j'en ai eu le besoin, durant cette thèse. Merci aussi pour conseils qui ont été très constructifs et ton encadrement. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Je tiens aussi à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée.

Bien sûr Michel était mon directeur de thèse, mais je tiens aussi à te remercier Claire. Tu as toujours répondu présente malgré tes nombreuses responsabilités à l'UFR. Je te remercie pour ton accompagnement autant au niveau professionnel que personnel. Avec toi j'ai découvert l'expérimentation animale, moi qui ne voulais pas approcher une souris au début ! Et avec l'expé animale, j'ai aussi découvert les joies des longues journées (soirées ?) de cytométrie. De longues journées c'est sûr mais toujours dans la bonne humeur et l'entraide. C'est ça une équipe ! Désolé pour tes réveils tôt le matin sur ces journées de sacrifices au A3 accompagnées de cytométrie. Ça vaut bien un petit gâteau ? ;-)

Merci pour tout !

Comment parler de ces manip A3 sans te remercier Jacques. Merci mille fois pour ta présence, tes conseils dans la vie pro et la vie perso. Quand je pense à toi, le mot « Partage » me vient immédiatement. Partage des connaissances, Partage de conseils, Partage d'expériences, Partage tout simplement. Ah si j'oubliais... Partage de pause « goûter » et de chocolats ! C'est sûr, tes cookies vont me manquer mais si je repasse vers Rennes j'espère bien en avoir un ou deux ;-). Comme tu me l'as répété plusieurs fois, petit pas par petit pas pour avancer, et finalement terminer cette thèse comme il le fallait. Merci pour tes encouragements et ton aide dans les moments difficiles que j'ai rencontré. Encore une fois MERCI.

Merci aussi à toi Céline. Comme Claire et Jacques, tu es une collègue formidable. Je n'oublierai pas nos séances interminables d'analyse des données de cytométrie, même pendant le confinement en avril dernier !! Merci pour m'avoir accompagnée dans cette thèse, avec les hauts et les bas que j'ai rencontré. Merci pour tous tes conseils, tes encouragements et ta présence.

Je souhaite aussi remercier tous les membres de l'équipe 2, et je m'excuse par avance si j'en oublie. Merci Marie-Thérèse pour ta présence et ta joie de vivre qui aide tellement quand on a eu une dure journée ! Je n'oublierai pas ta bonne humeur et je regrette un peu de ne pas avoir échangé plus souvent avec toi. Merci à l'équipe « viro » pour votre aide précieuse dans les manips et la construction des papiers, Vincent et Charlotte. Je vous remercie pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées. Merci également à la « team HLA-G », Laurence, Nico et même Bastien. Nos pauses café resteront gravées dans ma mémoire. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci à l'équipe « parasito », Sarah, Christelle (M) et aussi Aurélien. Je vous remercie bien évidemment pour votre aide dans les manips mais aussi pour tous les bons moments que l'on a pu passer ensemble. Aurélien, tes blagues m'ont manqué sur cette 4ème année ! Je remercie les filles du bureau, Mélanie, Annaïg, Ghania, Pauline, Huma. Enormément de bons souvenirs me viennent en tête en pensant à vous toutes. Ne vous inquiétez pas je ne dévoilerai pas tout ici, tout ce qui se passe dans le bureau 327 reste dans le bureau 327 !

Je remercie chaleureusement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse et qui n'ont pas été cités (merci Ghania pour cette phrase) ;-).

Je remercie également Nathalie pour ton accompagnement qui a commencé avant même le début de ma thèse. En stage de Master 2 tu m'as fait découvrir, avec Vincent et Bassil, le monde de la recherche et cela a déclenché en moi une vraie passion. Merci à tous les 3 sans oublier Domi bien-sûr. Bassil et Domi, vous êtes des personnes en or, ne changez rien. Nathalie, merci au-delà de la thèse car tu as toujours été présente pour moi, pour m'encourager et m'aider. Merci. Un grand merci à Franck et à toute l'équipe pédagogique de M2 qui m'a permis de tous vous rencontrer.

Merci à tous les membres de l'IRSET pour votre sympathie et votre bonne humeur. Bien sûr un grand merci à toi Brigitte. Pendant ces 4 années et demie à l'IRSET tu as été formidable avec moi. J'admire ta joie de vivre et ta bonne humeur. Toujours au service des autres, tu es une personne vraiment top. Toujours un petit mot ou un petit message gentil, même pendant le confinement tu as pensé à tout le monde. Je te souhaite plein de bonheur et de profiter de ta retraite, tu l'as bien méritée. Prends bien soin de toi et j'espère continuer à avoir de tes nouvelles.

Alors maintenant, voilà le moment des « cas particuliers », ces collègues qui sont devenus des amis et qui ont toujours été là pendant ces 4 ans. Bien sûr je tiens à commencer par toi Mélanie, ma voisine de bureau après de multiples déménagements ! Ma voisine de parc de Bréquigny ! Il y a tant de choses pour lesquelles je souhaiterais te remercier mais tu sais déjà de quoi je veux parler donc pas obliger de l'écrire ici. Tu es une personne formidable, merci de m'avoir fait rire quand ça n'était pas la forme, merci de ta présence au quotidien. On a bravé des interdits pendant le confinement en avril mais c'était pour la bonne cause (petites caresses à Swi et Marsou au passage) et puis on était bien contentes de se voir. Merci pour tous les instants partagés, au labo quand tu restais jusque tard pour m'aider en cytométrie,

au bureau avec tous les bons moments passés, et surtout à l'extérieur (et pas que au DoMac !!!). Merci de t'être occupée de mes bébés quand mon cher Bauxite a décidé de me faire tomber et que je suis restée à l'hôpital. Ah oui je pense à un truc, si tu peux effacer certaines vidéos de moi à l'équitation ce serait top ;-). Un grand merci pour tout.

Ma lulu, je te remercie. Ta rencontre a été une vraie belle surprise. Tu es quelqu'un de formidable, toujours le sourire aux lèvres. Merci de m'avoir supportée à chanter du Ed Sheeran (avec l'accent hein !). *I found a love...for meeeeeeee*. Tu te souviens de notre séance d'hypnose, de nos fous rires ? Bien sûr je n'oublierai pas nos sorties nocturnes avec Marie et Noémie. Que de bons souvenirs. Un gros poutou à JP. J'espère t'avoir donné envie de continuer dans la recherche mais pas dans la génétique !!!

Je dois bien évidemment remercier mon cher esclave, Arnaud. Alors oui, dis comme ça, ça peut être bizarre mais tu comprendras ! Merci pour m'avoir supportée de nombreuses heures dans le L3. Merci pour les connaissances que tu m'as apportées. Avec Lulu vous m'avez raté une manip, une certaine extraction d'ARN si tu te souviens bien, mais je ne vous en veux pas. Tu as toujours été présent pour m'aider professionnellement et personnellement. Comme Jacques, tu m'as toujours encouragée à terminer ma thèse malgré les difficultés rencontrées. Merci pour les fous rires que l'on a partagé et qui m'ont tant changé les idées.

Annaïg et Ghania, la fine équipe du bureau 327, avec Mélanie et Pauline. On a bien rigolé, discuté dans ce bureau quand j'y repense. A nos discussions, à nos fous rires, à nos conneries tout simplement. Pour tout ça je vous remercie. Mais revenons un peu au labo. Ghania, je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse. Malgré les différents obstacles tu as toujours su trouver une solution pour t'en sortir. Alors ne te décourage pas et termine ta thèse en beauté ;-). Annaïg, jeune maman, j'espère qu'avec Jacques vous réussirez à faire quelque chose de vos souris MLKL et que les « allemands » arrêteront de vous embêter !! Je te souhaite plein de réussite. Enfin Sarah, même si tu ne faisais pas partie du bureau 327 (personne n'est parfait ;-)), je tenais à te remercier pour ta présence, tes nombreux conseils et tes encouragements en particulier quand la rédaction était difficile. Tu fais aussi partie des personnes que je n'oublierai pas et qui comptent énormément pour moi. Vous avez été ma 2^{ème} famille pendant ces 4 ans.

Je voudrais terminer en remerciant mes proches et mes amis. Cynthia, Etienne, Guillaume, malgré la distance, on ne s'est pas lâché et on s'est soutenu dans cette sacrée épreuve qu'est la thèse. C'est sûr qu'on ne se parlait plus aussi souvent mais votre soutien a été énorme. Tous dans le même bateau, chacun a réussi, on peut être fier de nous ?

Maman, Papa, merci pour votre soutien à toutes heures. Même si ce n'a pas été facile tous les jours, vous m'avez toujours apporté votre soutien. Grâce à vous j'ai pu faire les études qui me plaisaient pour en arriver jusqu'à la thèse aujourd'hui. Merci de m'avoir écoutée parler des heures de chimiokines, d'hépatites, de virus et j'en passe, en n'y comprenant pas grand-chose, mais vous étiez là. Poupouille

merci aussi d'être là. J'ai une chance immense de t'avoir comme frère. On partage la même passion des sciences, chacun dans son domaine, mais toujours à soutenir et à conseiller l'autre. A tous les 3, sans oublier Momo, merci d'avoir relu de près ou de loin ma thèse. Quand on parle de familles, je tiens aussi à remercier mes grands-parents et ma Tata qui sont un soutien infaillible pour moi, et j'espère vous rendre fière aujourd'hui en soutenant ma thèse. Vous êtes la famille dont j'ai toujours rêvé et je l'ai. Je vous aime. J'ai également une pensée pour toi, Tonton, parti si vite. Aujourd'hui tu serais si fier de me voir soutenir ma thèse, toi grand passionné de biologie. Je te dédie ma thèse, et j'espère que là où tu es tu es fier de moi.

Et puisqu'ils font aussi partis de la famille, un mot pour mes chiens Noucky et Pongo qui m'ont supporté nuit et jour. Vos bêtises me font tellement rire et l'amour que vous m'apporter est indescriptible. Rentrer chaque soir, après de longues (et difficiles) journées, et vous trouver m'a permis d'oublier tout le reste.

Comme on me l'a souvent dit "*fonce et profite*", c'est que j'ai fait et aujourd'hui je suis fière de soutenir ma thèse devant ma famille et mes proches.

« *La souris est un animal qui, tué en quantité suffisante et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat* » - Woody Allen

Liste des abréviations

aa : acides aminés	DD : Death Domain
AAD : Antiviraux à Action Directe	DMSO : DiMéthylSulfOxide
Ac : Anticorps	GC : Germinal Center
ACT : Activine	GDF : Growth and Differentiation Factors
ADAM17 : Adamalysine 17	HES : Hématoxiline-Eosine Safran
Ag : Antigène	HSC : Hepatic Stellate Cell
ALAT : ALanine Amino-Transférase	HSV : Virus de l'Herpès Simplex
ASAT : ASpartate Amino-Transférase	HVF : Hépatite Virale Fulminante
BCR : B Chain Receptor	ICAM-1 : IntraCellular Adhesion Molecule 1
BMP : Bone Morphogenic Protein	IFN : Interféron
BRAK : BReast And Kidney chemokine	IFNAR : Récepteur des interférons de type I
CCl4 : Tétrachlorométhane	IFNGR : Récepteur des interférons de type II
CC : Chimiokine de type CC	Ig : Immunoglobuline
CCR : Récepteur aux chimiokines CC	IL : Interleukine
CD : Cluster de Différenciation	IL-R : récepteur de l'IL
CHC : Carcinome Hépatocellulaire	IL-18bp : IL-18binding protein
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IL-18rap : IL-18 receptor accessory protein
ConA : Concanavaline A	INH : inhibine
CXCL : Chimiokine de type CXC	IP-10 : Interféron gamma-induced protein 10
CXCR : Récepteur aux chimiokines CXC	IRAK : IL-1 Receptor Associated Kinase
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes	JAK : Janus Kinase
CRP : C Reactive Protein	KC : Kupffer Cell
DC : Dendritic Cell	LAP : Latent Accessory Protein
cDC : classical Dendritic Cell	LB : Lymphocyte B
pDC : plasmacytoïd Dendritic Cell	LLC : Large Latent Complexe

LPS : Lipopolysaccharide bactérien

LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cell

LT : Lymphocyte T

LTc : Lymphocyte T cytotoxique

LTBP : Latent TGF Binding Protein

MEC : Matrice extracellulaire

MHV-3 : Murine Hepatitis Virus type 3

MIP1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 α

MMP : Matrix Metallo-Protease

MSC : Mesenchymal Stem Cell

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88

NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis

NK : Natural Killer cell

NKT : Natural Killer T cell

NF-kB : Nuclear Factor-Kappa B

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PB : Pulpe Blanche

PHH : hépatocytes primaires humains

PMH : hépatocytes primaires murins

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PR : Pulpe Rouge

PRR : Pattern Recognition Receptor

RANTES : Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SNC : Système Nerveux Central

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

ST2 : Suppression of Tumorigenicity 2

TACE : TNF Alpha Converting Enzyme

TCR : T Chain Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

TGFBR : Récepteur du TGF-beta

TIR : Toll-Interleukin 1 Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF α : Tumor Necrosis Factor-alpha

TNFR : Récepteur du TNF

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Protein 1

VHA : Virus de l'Hépatite A

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHD : Virus de l'Hépatite D

VHE : Virus de l'Hépatite E

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Avant-propos	0
Remerciements	2
Liste des abréviations	7
Table des matières	9
Liste des figures	13
Liste des tableaux	14
I. Introduction.....	17
1. Anatomie et physiologie du foie	17
A. Anatomie hépatique	17
B. Fonctions hépatiques.....	19
a. Détoxification	20
b. Synthèse et sécrétion de la bile	20
c. Métabolismes hépatiques	20
d. Régénération hépatique.....	21
2. Nature et fonctions des cellules hépatiques.....	22
A. Les hépatocytes	22
B. Les cellules étoilées hépatiques	23
C. Les cellules sinusoidales endothéliales	23
D. Les cellules de Kupffer	24
E. Les cellules dendritiques	24
F. Les lymphocytes intra-hépatiques	25
G. Les granulocytes	26
3. Les hépatites	26
A. Les hépatites virales	27
a. Le VHA.....	29
b. Le VHB	30

c.	Le VHC	31
d.	Le VHD	32
e.	Le VHE	33
f.	Le HSV	33
B.	Les formes d'hépatites virales	34
a.	Les hépatites aiguës	34
b.	Cas particulier : les hépatites fulminantes.....	36
c.	Les hépatites chroniques	37
4.	Molécules solubles de l'inflammation dans la réponse à l'infection virale	38
A.	Les cytokines	39
a.	Les interférons	40
b.	La famille du TNF	41
c.	La superfamille du TGF	42
B.	Les chimiokines	44
a.	La chimiokine CXCL14	47
b.	Fonctions de la chimiokine CXCL14	49
c.	Résultats préliminaires : CXCL14 et les hépatites.....	51
C.	Les interleukines	52
a.	Description de la voie IL-18	54
b.	Rôle de la protéine IL-18bp	56
c.	Travaux réalisés par l'équipe du Pr Casanova (IMAGINE, Paris)	57
5.	Modèles d'hépatite chez la souris	59
A.	Généralités	59
B.	Modèle d'étude des hépatites virales par l'inoculation du MHV-3	60
C.	Réponse immunitaire dans l'hépatite induite par le MHV-3	61
6.	Modèles d'études <i>in vitro</i> sur cellules primaires	62
A.	Les différentes lignées cellulaires hépatocytaires	64

B.	Travaux réalisés à partir d'hépatocytes primaires.....	64
7.	Réponse immunitaire à une infection systémique microbienne.....	66
A.	L'immunité innée.....	66
a.	Les barrières épithéliales.....	67
b.	Les neutrophiles et les monocytes/macrophages	67
c.	Les cellules Natural Killer (NK).....	68
d.	Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).....	69
e.	Le système du complément.....	70
f.	Les cytokines de l'immunité innée	70
g.	Rôle de l'immunité innée dans la stimulation de l'immunité adaptative.....	71
B.	L'immunité adaptative	72
a.	L'immunité humorale	73
b.	L'immunité cellulaire.....	75
C.	Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.....	78
D.	Les organes lymphoïdes secondaires (OLS).....	79
II.	Contexte et objectifs.....	83
III.	Matériel et méthodes	89
1.	Culture cellulaire et infection	89
A.	Isolement des hépatocytes primaires murins	89
B.	Isolement des hépatocytes primaires humains	89
C.	Purification et titration virale	90
a.	Amplification et titration du MHV-3	90
b.	Amplification et titration du HSV-1	91
D.	Infection virale des hépatocytes primaires.....	92
2.	Expérimentation animale.....	92
A.	Protocole d'infection par le MHV-3	92
B.	Gestion des échantillons	93

3.	Cytométrie en flux.....	93
A.	Extraction et immunomarquage des cellules immunitaires	93
B.	« Gating Strategy »	96
IV.	Résultats	103
1.	Article 1: Serum CXCL14 chemokine overexpression is associated with acute viral hepatitis.....	103
2.	Article 2: Antimicrobial activity and immune surveillance function of CXCL14.....	127
3.	Article 3: In MHV-3 induced murine fulminant hepatitis, IL-18bp is required to activate immune cells without having an effect on the development of hepatitis.....	144
V.	Discussion générale et perspectives	164
1.	Le rôle de la protéine IL-18bp au cours des hépatites virales fulminantes	164
2.	Rôle de la chimiokine CXCL14 dans la réponse antimicrobienne	169
	Résumé	176
	Abstract	177
	Références bibliographiques	180
	Annexes	198
1.	Article n°1	198
2.	Articles supplémentaires	203

Liste des figures

Figure 1 : Localisation du foie dans l'organisme humain.

Figure 2 : Organisation en lobes du foie.

Figure 3 : Système vasculaire du foie.

Figure 4 : Histologie du foie. A) Organisation du lobule hépatique. B) Espace porte hépatique.

Figure 5 : Schéma de l'organisation des différentes cellules hépatiques.

Figure 6 : Pourcentage de décès associés à chaque virus des hépatites virales dans le Monde entre les années 2000 et 2015.

Figure 7 : Coloration hématoxyline-Eosine-Safran (HES) d'un foie murin atteint d'une hépatite aiguë suite à l'injection de Concanavaline A.

Figure 8 : Coloration HES d'un foie murin atteint d'une hépatite fulminante suite à l'inoculation de MHV-3.

Figure 9 : Mécanisme d'action antiviral des interférons.

Figure 10 : Voies de signalisation du $TNF\alpha$.

Figure 11 : Représentation des diverses étapes de production du $TGF-\beta$.

Figure 12 : Rôles des chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL12 et CXCL14 et de leurs récepteurs (CXCR3, CXCR4 et CXCR7) dans l'immunité.

Figure 13 : Cellules sources et cellules cibles de la chimiokine CXCL14.

Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la chimiokine CXCL14.

Figure 15 : Rôle de la protéine IL-18bp sur les voies de signalisation induites par l'IL-18 et par l'IL-37 chez l'Homme.

Figure 16 : Structure de la protéine IL-18bp.

Figure 17 : Principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative.

Figure 18 : Rôles des différentes cytokines dans l'immunité innée.

Figure 19 : Les différents types d'immunité adaptative.

Figure 20 : Phases des réponses immunitaires humorales.

Figure 21 : Etapes d'activation des lymphocytes T.

Figure 22 : Structure des molécules du CMH de classe I et de classe II.

Figure 23 : Organisation tissulaire de la rate.

Figure 24 : Estimation du nombre de décès dus aux hépatites virales, au VIH, au paludisme et à la tuberculose dans le Monde entre les années 2000 et 2015.

Figure 25 : Détermination du titre viral par la méthode du « plaque assay » et une coloration au Crystal Violet.

Figure 26 : Stratégie d'acquisition du panel « classique ».

Figure 27 : Stratégie d'acquisition du panel « Lymphocyte B ».

Figure 28 : Stratégie d'acquisition du panel « myéloïde ».

Figure 29 : Déplétion en macrophages suite à l'inoculation du MHV-3. Immunomarquage et cytométrie des macrophages par l'utilisation de l'anticorps anti-F4/80.

Figure 30 : Voie de signalisation de l'IL-18 chez l'Homme et la souris en réponse à une infection virale.

Figure 31 : Coloration HES d'intestin de souris sauvages et des souris déficientes pour CXCL14. Les flèches noires mettent en évidence les plaques de Peyer.

Figure 32 : Schéma-bilan sur l'expression et le rôle de CXCL14.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des virus responsables des hépatites virales.

Tableau 2 : Le système METAVIR. A) Evaluation de l'activité nécrotique. B) Evaluation de la fibrose hépatique.

Tableau 3 : Principales caractéristiques des lignées cellulaires hépatocytaires et des hépatocytes primaires.

Tableau 4 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « classique ».

Tableau 5 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « lymphocyte B ».

Tableau 6 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « myéloïde ».

INTRODUCTION

I. Introduction

1. Anatomie et physiologie du foie

A. Anatomie hépatique

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, et pèse entre 1,5 et 2 kg chez un adulte. Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, sous le diaphragme et derrière les côtes (**Figure 1**). Il appartient au système digestif et assure de nombreuses fonctions essentielles à l'homéostasie de l'organisme. Il est relié à l'estomac, aux intestins, au pancréas et à la rate.

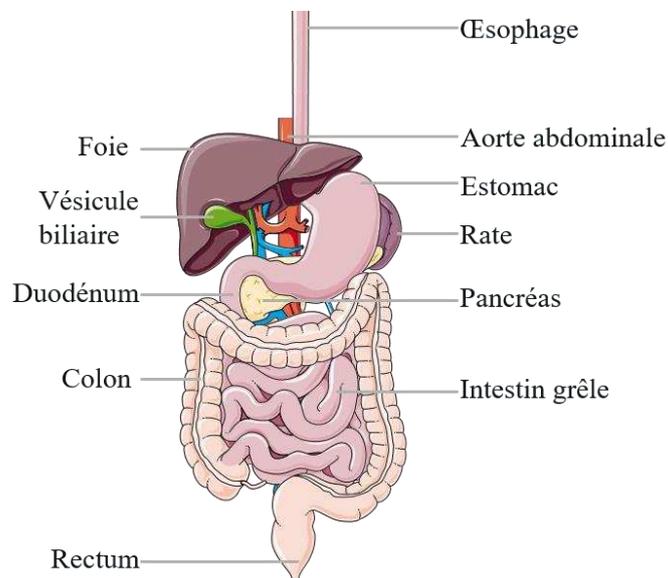


Figure 1 : Localisation du foie dans l'organisme humain.

Cet organe est divisé en différents lobes (**Figure 2**) : les lobes gauche et droit, et entre les deux, les lobes carré et caudé. Ces deux derniers lobes sont séparés par un sillon nommé « hile du foie », qui permet le passage de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires majeurs.

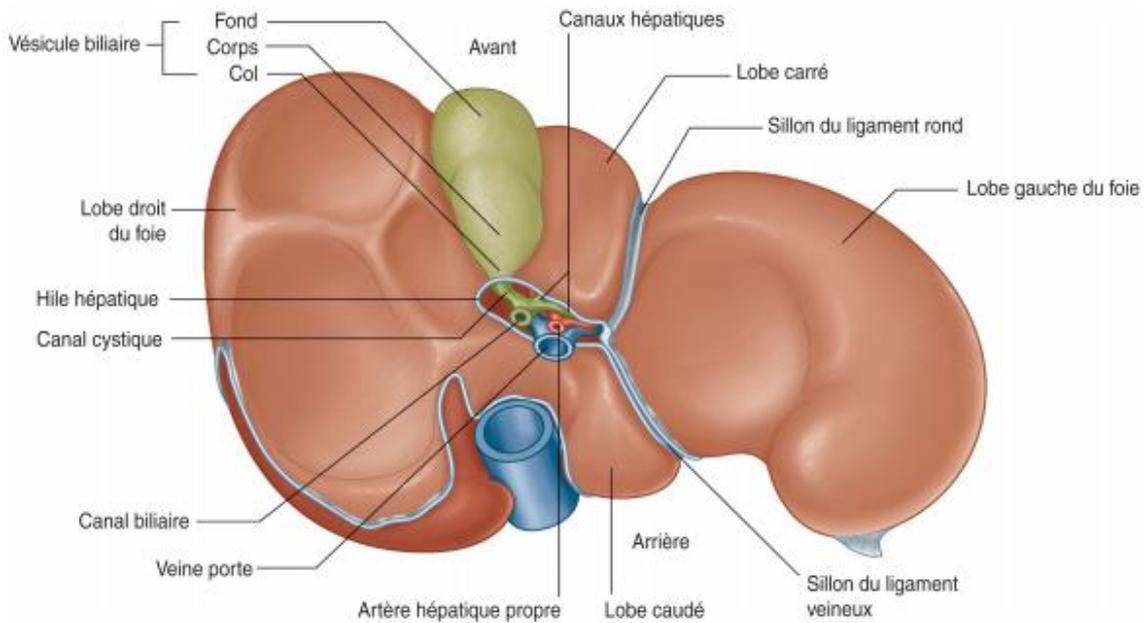


Figure 2 : Organisation en lobes du foie. Face viscérale. *D'après Les fondamentaux de la pathologie digestive © CDU-HGE/Editions Elsevier-Masson, 2014 Servier Medical Art.*

Le foie est l'un des organes les plus vascularisés du corps humain et contient plus de 10% du volume sanguin total (**Figure 3**). Il possède deux pédicules vasculaires (1) :

- Le pédicule hépatique ou pédicule inférieur afférent : comprenant les artères hépatiques gauche et droite et la veine porte. La veine porte assure environ 70% du débit sanguin hépatique et apporte le sang provenant du tube digestif, du pancréas et de la rate. Les artères hépatiques apportent du sang oxygéné représentant environ 20% du débit total, et assurent la vascularisation des voies biliaires.
- Le pédicule supérieur efférent veineux : constitué des trois veines hépatiques principales (gauche, moyenne et droite) qui se jettent dans la veine cave inférieure.

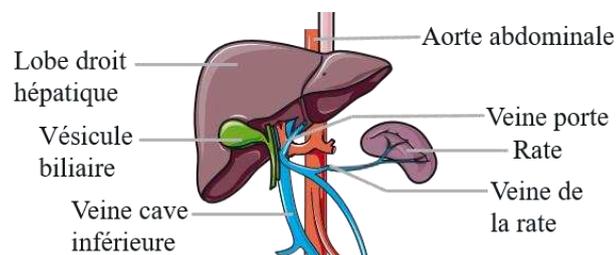


Figure 3 : Système vasculaire du foie.

Le tissu hépatique est organisé en lobules hépatiques, schématiquement hexagonaux avec un espace porte à chaque sommet (**Figure 4**). Chaque lobule est composé d'une veine centrolobulaire, d'hépatocytes organisés en travées séparées par des vaisseaux sinusoides bordés de cellules endothéliales et contenant les cellules de Kupffer et les cellules étoilées dans

l'espace de Disse (2). L'espace porte est constitué de tissu conjonctif contenant une branche de la veine porte, une ou deux branches de l'artère hépatique et enfin un canalicule biliaire bordé d'un épithélium cubique simple (fait de cholangiocytes).

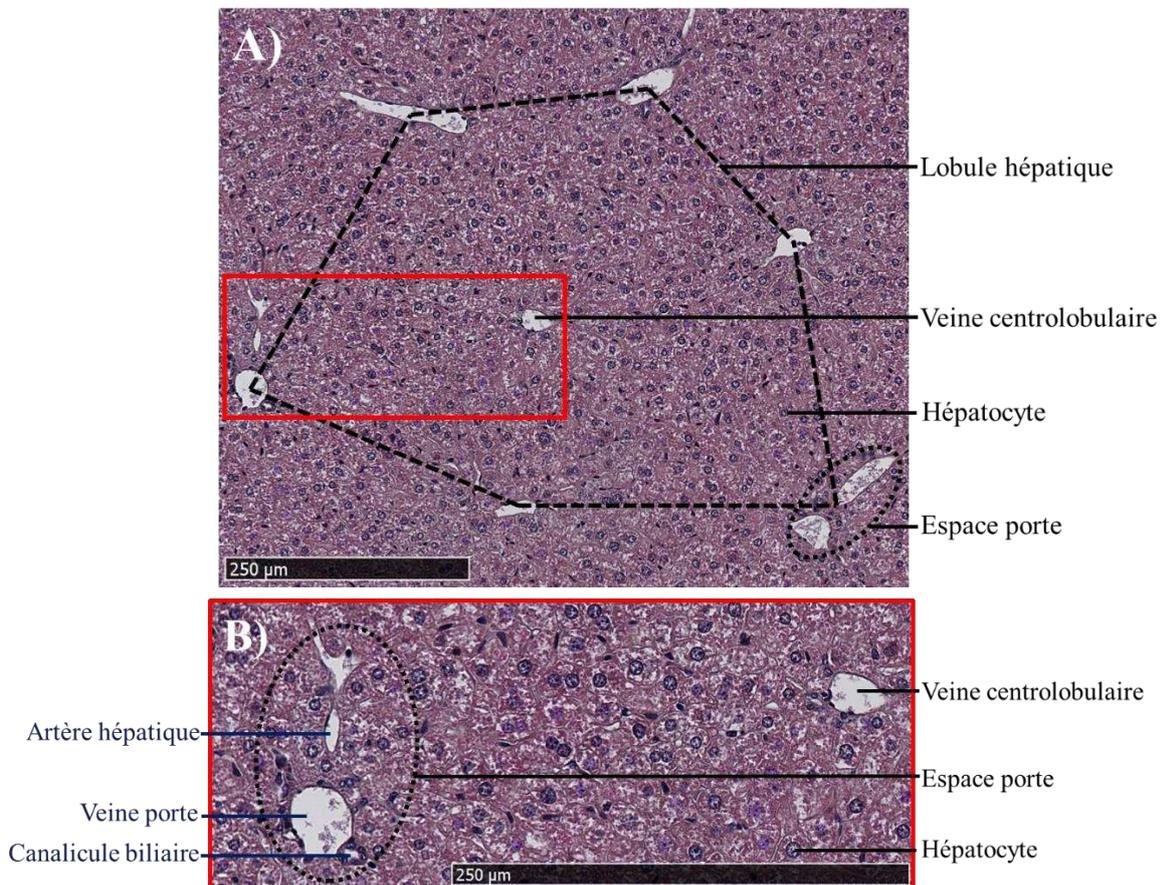


Figure 4 : Histologie du foie. A) Organisation du lobule hépatique. B) Espace porte hépatique. *Réalisé à partir de photographies de foie sain murin (clichés personnels).*

B. Fonctions hépatiques

Le foie assure des fonctions essentielles à l'organisme. Il joue un rôle dans la détoxification des toxines de l'organisme, dans la synthèse et la sécrétion de la bile, dans le métabolisme énergétique et dans les processus de régénération tissulaire. Chacune de ces fonctions sera brièvement expliquée dans les paragraphes présentés ci-dessous.

a. Détoxification

Le foie assure des fonctions de transport et de métabolisme de substances étrangères à l'organisme, comme des pathogènes. Le foie métabolise également les médicaments et autres toxiques comme l'alcool par un ensemble de réactions enzymatiques pour la biotransformation de molécules initiales insolubles en un ou des métabolites pouvant être éliminés par voie biliaire.

b. Synthèse et sécrétion de la bile

La formation de la bile permet au foie d'éliminer des produits de catabolisme, mais elle subit aussi une sécrétion exocrine essentielle aux fonctions de digestion et d'absorption du tube digestif. La production quotidienne de bile représente un volume d'environ 600 mL. Elle est constituée à 97% d'eau, mais aussi de composants non aqueux comme les acides biliaires (68%), les phospholipides (23%), le cholestérol (4%), la bilirubine (< 1%), et des protéines et des ions (5%) en particulier le bicarbonate.

La sécrétion de la bile intervient principalement lors de l'excrétion des produits de dégradation de l'hémoglobine (bilirubine) et de dérivés du cholestérol (acides biliaires). Elle intervient également dans l'élimination de nombreux métabolites des médicaments après avoir été transformés dans les hépatocytes.

La bile est produite par les hépatocytes en grande partie (75%) mais aussi par les cholangiocytes (25%) (3). La bile circule au sein du lobule dans le réseau des canalicules biliaires au pôle apical des hépatocytes. A proximité des espaces portes, la bile va rejoindre un système canalaire bordé de cellules biliaires ou cholangiocytes. La bile sort du foie au niveau du hile par le conduit hépatique commun.

c. Métabolismes hépatiques

- Métabolisme des acides aminés

Le foie assure aussi le métabolisme des acides aminés et des protéines. En effet, le foie synthétise de nombreuses protéines circulantes, indispensables à l'homéostasie de l'organisme dans divers domaines comme le transport cellulaire, l'hémostase mais aussi et surtout la réponse

inflammatoire et immunitaire. Par exemple, le foie produit de l'albumine, protéine de transport de la bilirubine et de nombreuses hormones, des apolipoprotéines impliquées dans le transport des lipides. Il produit également des facteurs modulant la coagulation et des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, comme la protéine C réactive (CRP), la ferritine et certaines globulines.

- Métabolisme des glucides

Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme du glucose afin de maintenir correctement sa concentration plasmatique. En effet, cet organe métabolise 30% du glucose absorbé lors des repas pour le stocker sous forme de glycogène ou le transformer en lipides. Entre les repas, le foie fournit l'essentiel du glucose nécessaire au métabolisme du système nerveux central (SNC).

- Métabolisme du fer

L'organisme humain contient environ trois grammes de fer qui se répartit en trois compartiments : un compartiment fonctionnel (75%) où il est présent sous forme d'enzymes (hémoglobine et myoglobine), un compartiment de stockage (environ 25%) sous forme de ferritine dans le foie et les macrophages, et un compartiment circulant (0,1%) lié à la transferrine.

d. Régénération hépatique

Le foie a une masse définie, proportionnelle à la masse corporelle totale. Dans une situation pathologique, le foie est capable de restaurer sa masse initiale via un processus d'hyperplasie, en respectant l'architecture microscopique mais sans reconstitution de la segmentation anatomique initiale.

Pour conclure sur les différentes fonctions hépatiques, cet organe assure donc des fonctions de glandes exocrines et endocrines. En effet, il permet la sécrétion de la bile et la production de facteurs de croissance, ce qui lui donne la fonction de glande exocrine. Mais il permet également la filtration du sang depuis le système digestif, ce qui lui procure la fonction de glande endocrine. Toutes ces fonctions sont assurées par un ensemble de cellules spécifiques du foie qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

2. Nature et fonctions des cellules hépatiques

Le foie est composé de deux types cellulaires majoritaires : les cellules parenchymateuses qui représentent 80% du volume hépatique, et les cellules non parenchymateuses (**Figure 5**). Les cellules parenchymateuses sont composées des hépatocytes et des cholangiocytes. Parmi les cellules non parenchymateuses, on retrouve les cellules sinusoidales endothéliales, les cellules étoilées hépatiques, les cellules de Kupffer et les lymphocytes intrahépatiques (4).

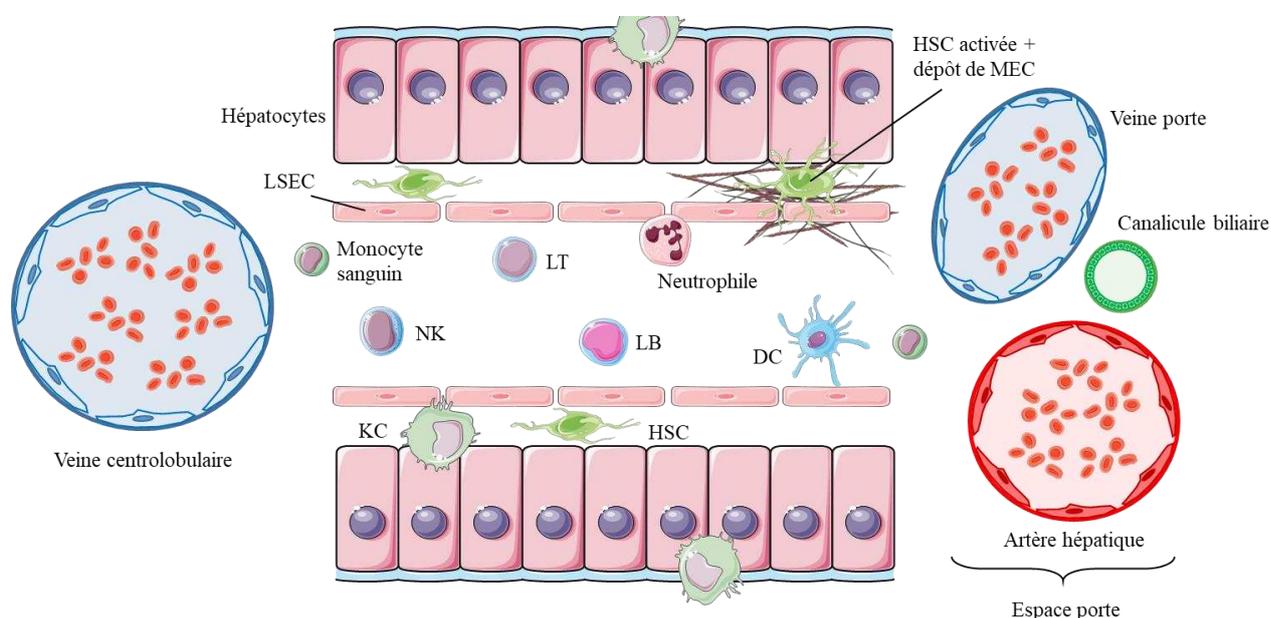


Figure 5 : Schéma de l'organisation des différentes cellules hépatiques.

A. Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent 70% des cellules du foie, ce sont des cellules polygonales de grande taille (30 μ m de diamètre), et organisées en travées (**Figure 5**). Elles assurent les principales fonctions métaboliques du foie. Elles permettent notamment le stockage et la libération du glucose.

Les hépatocytes ont la particularité de présenter un ou deux noyaux (5). Ce sont des cellules polarisées avec un pôle apical en contact de l'endothélium, et un pôle basal qui, par accolement des membranes, forme les canalicules biliaires. Le canalicule biliaire est un espace intercellulaire situé entre le pôle canaliculaire de deux ou trois hépatocytes. Cet espace est

délimité par des jonctions serrées entre les membranes plasmiques des hépatocytes, et draine la bile synthétisée par les hépatocytes jusqu'à l'espace porte.

B. Les cellules étoilées hépatiques

Les cellules étoilées (*Hepatic Stellate Cells*, HSC) sont des cellules mésenchymateuses spécifiques du foie qui sont situées au niveau de l'espace de Disse entre les cellules endothéliales et les hépatocytes (**Figure 5**). Elles ont pour fonction, à l'état basal, de stocker de la vitamine A dans leur cytosol, et ont un rôle important dans les processus de fibrose hépatique (6). En effet, ces cellules assurent la fibrogénèse lors de la régénération du tissu hépatique. Les HSC sont activées suite à une lésion hépatique, entraînant la mort de cellules immunitaires et/ou d'hépatocytes. Cette activation induit également leur différenciation en cellules myofibroblastiques capables de produire des composants de la matrice extracellulaire (MEC). Ce processus d'activation des HSC passe principalement *via* la production et la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF β , et cela a pour objectif de préserver le tissu de dommages supplémentaires.

Les HSC ont également la capacité d'amplifier la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , CCL2) pour jouer un rôle dans l'immunorégulation hépatique. Il faut noter que ces cellules expriment les récepteurs TLR (*Toll Like Receptor*) et appartiennent à la famille des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le rôle des CPA et des récepteurs TLR sera détaillé dans les chapitres suivants.

C. Les cellules sinusoidales endothéliales

Les cellules sinusoidales hépatiques (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) forment les sinusoides qui séparent les travées d'hépatocytes. Ces cellules reposent sur une fine trame conjonctive, différente d'une réelle lame basale (**Figure 5**). Elles exercent un rôle de barrière physique entre les cellules du système immunitaire de la circulation sanguine et les hépatocytes (7). Elles permettent l'adhésion des cellules immunitaires résidentes du tissu hépatique, comme les cellules de Kupffer, par l'expression de récepteurs de type intégrine à leur surface. Enfin, elles ont des capacités d'endocytose de glycoprotéines, de composants de la MEC et de complexes immuns pour permettre le passage de ces molécules de la lumière sinusoidale vers les hépatocytes.

Les LSEC sont des régulateurs clés de la réponse immunitaire hépatique. En effet, leur localisation stratégique leur permet de mettre en place des interactions avec les lymphocytes et les populations immunitaires résidentes. Comme cela sera détaillé dans le paragraphe dédié à l'étude de la réponse immunitaire systémique (paragraphe 7), les LSEC possèdent de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptor*, PRR), principalement les récepteurs TLR, qui les rendent sensibles et réactives lors d'infections hépatiques. De plus, les LSEC sont capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺ en présentant des antigènes.

D. Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer (*Kupffer cells*, KC) sont les macrophages résidents du foie et représentent 20% des cellules non parenchymateuses du foie. Elles se situent au niveau des sinusoides entre les LSEC (**Figure 5**). Elles jouent un rôle dans l'élimination des toxines, de cellules infectées ou mortes, et la dégradation des complexes immuns résiduels.

Les KC ont la capacité d'exprimer simultanément des marqueurs des macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) selon leur environnement cytokinique. Elles expriment de nombreux PRR permettant à ces cellules de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP). Après activation, les KC sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF α , l'IL-1 β , et expriment des molécules d'adhésion spécifiques (*IntraCellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1, *Vascular Cell Adhesion Protein-1*, VCAM-1) dont les récepteurs sont exprimés par les cellules cibles. Elles peuvent également, en cas de stimulation, sécréter de l'IL-10 qui inhibe les lymphocytes T. D'autres cytokines produites par les KC, notamment l'IL-12, permettent d'activer et de favoriser l'action cytotoxique des cellules Natural Killer (NK). Suite à des lésions hépatiques, les KC interagissent avec les HSC pour recruter les monocytes indispensables à la régénération du tissu hépatique (8).

E. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DC), peu nombreuses dans le foie, sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus spécialisées. Elles se situent généralement dans les régions portales et parfois dans le parenchyme hépatique (**Figure 5**). Elles possèdent la capacité de

capturer les antigènes rencontrés pour les présenter aux lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate et les ganglions. Ces DC sont divisées en deux sous-populations : le DC classiques (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC expriment fortement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et sont des CPA très efficaces. A l'inverse, les pDC expriment plus faiblement le CMH II et sécrètent des interférons (IFN) après une infection virale (9). Les cellules dendritiques peuvent sécréter de l'IL-12 pour stimuler l'immunité innée. Les DC sont capables d'activer les lymphocytes T (LT) naïfs qui deviennent alors des cellules effectrices cytotoxiques de type T_H1 ou T_H2 (9).

F. Les lymphocytes intra-hépatiques

Chez l'Homme, 65% des lymphocytes intra-hépatiques sont des cellules NK, des cellules NKT et les lymphocytes T non-conventionnels $\gamma\delta$ (**Figure 5**). Ces cellules peuvent être activées, puis proliférer dans des conditions pathologiques. Ce sont les effecteurs majeurs de la surveillance immunitaire hépatique.

La population lymphocytaire intra-hépatique majoritaire est représentée par les cellules NK. Elles sont naturellement activées dans le foie et stimulent l'inflammation hépatique par l'induction de chimiokines, comme CXCL9, permettant le recrutement de lymphocytes T dans le foie (10).

Les NKT sont une population de lymphocytes qui exprime à la fois des marqueurs des cellules NK mais aussi un répertoire restreint du récepteur T (TCR). Une fois activées, les NKT sécrètent de fortes quantités de cytokines de type T_H1 (comme le TNF α et l'IFN γ), de type T_H2 (comme l'IL-4 et l'IL-13) et de type T_H17 (comme l'IL-17 et l'IL-23).

Chez l'Homme, 15 à 25% des lymphocytes T (LT) intra-hépatiques sont des lymphocytes T $\gamma\delta$. Ces LT peuvent se différencier en LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ et infiltrer le tissu hépatique en cas d'inflammation. Les LT CD8⁺ sont des cellules cytotoxiques qui jouent un rôle majeur dans l'élimination de cellules tumorales mais surtout de cellules infectées. Elles agissent en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α et l'IFN γ , mais aussi des protéines cytolytiques, telles que les granzymes et les perforines (cf. paragraphe 7).

Enfin, les lymphocytes B (LB) représente 5% des lymphocytes intra-hépatiques. Vu leur faible proportion, peu d'études ont été réalisées sur cette population dans le foie. Cependant, il a été

démonstré que les LB matures exprimant l'immunoglobuline A (IgA) ont la capacité d'inhiber l'activation des LT cytotoxiques CD8⁺.

G. Les granulocytes

Les granulocytes sont des cellules possédant des noyaux polylobés. On distingue deux classes de granulocytes dans le foie : les neutrophiles et les éosinophiles (**Figure 5**).

Les neutrophiles représentent la population majoritaire dans la circulation sanguine. Ils sont indispensables au contrôle des infections microbiennes et ont la capacité de migrer vers le tissu hépatique, puis, dans le parenchyme hépatique durant l'inflammation (11). Pour migrer et pénétrer dans le tissu lésé, les neutrophiles doivent traverser la barrière endothéliale par des phénomènes de *rolling* et d'extravasation. Les mécanismes moléculaires permettant ces processus seront détaillés dans le paragraphe 7 dédié à l'immunité systémique. Au niveau du site de l'infection, les neutrophiles jouent un rôle de phagocytose des cellules mortes ou des déchets cellulaires, et vont sécréter diverses protéines comme des enzymes protéolytiques (élastase, cathepsine), des protéines bactéricides (défensines) ou des métalloprotéases (MMP-3, MMP-9).

Les éosinophiles peuvent être attirés en cas de lésions hépatiques et produire des cytokines pour stimuler l'activation du système immunitaire au niveau du site d'infection. Cependant, à l'heure actuelle, leur rôle dans le tissu hépatique reste peu étudié (12).

Pour conclure, l'ensemble de ces populations immunitaires joue un rôle important dans l'homéostasie du tissu hépatique. Elles constituent également la première ligne de défense face aux agressions extérieures que peut subir le tissu hépatique. Ces différents types cellulaires sont mobilisés dans le cas d'agression hépatique en particulier lors d'infection virale.

3. Les hépatites

Les hépatites désignent une inflammation aiguë ou chronique du foie qui entraîne l'apparition de lésions au niveau du tissu hépatique. Trois formes majeures d'hépatites sont décrites et peuvent survenir quelle que soit la cause de cette hépatite : la forme fulminante, la forme aiguë

et la forme chronique. Bien que la forme chronique, appelée plus communément fibrose voire cirrhose hépatique, soit la première cause de survenue du carcinome hépatocellulaire, dans ce manuscrit nous ne décrierons en détail que les formes fulminante et aiguë des hépatites.

Les hépatites peuvent avoir diverses origines comme les hépatites d'origine toxique (médicamenteuse ou alcoolique), les hépatites métaboliques, ou encore les hépatites auto-immunes (13). Mais l'étiologie virale est la plus fréquente dans le Monde (données de l'OMS), et nous allons par la suite décrire les différentes hépatites virales existantes en fonction du virus infectieux.

A. Les hépatites virales

Les hépatites virales se développent suite à l'infection de l'organisme par un des virus responsables des hépatites. A ce jour, cinq virus sont décrits pour induire des hépatites virales : les virus de l'hépatite A (VHA), de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), de l'hépatite D (VHD) et de l'hépatite E (VHE). Ces virus induisent différentes formes d'hépatites décrites dans le paragraphe 3.B. Au-delà de ces 5 virus, les virus de l'herpès simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 ou HSV-2, *herpes simplex virus*) sont capables de déclencher des formes fulminantes d'hépatites (**Figure 6**). Le **Tableau 1** résume les principales caractéristiques des virus des hépatites virales, qui seront détaillées dans les paragraphes suivants.

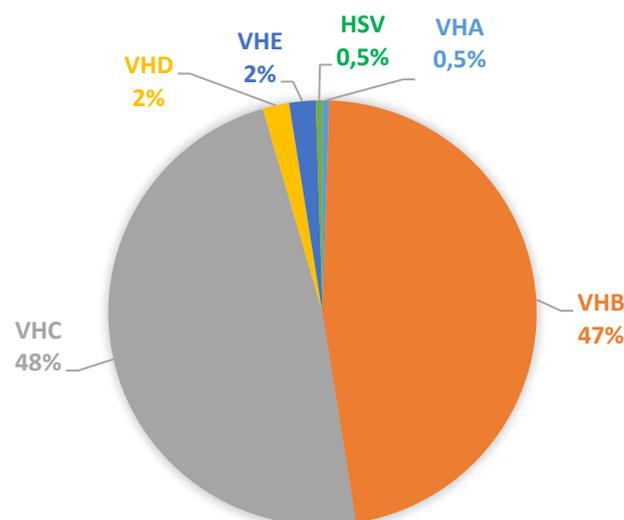


Figure 6 : Pourcentage de décès associés à chaque virus des hépatites dans le Monde. *Source OMS.*

Tableau 1 : Principales caractéristiques des virus responsables des hépatites virales.

Virus	Classification	Génome	Voies de contamination	Epidémiologie (OMS)	Forme d'hépatite	Traitement	Hépatolyse	Références
VHA	Famille : <i>picornaviridae</i> ; Genre : <i>hepatovirus</i>	ARN	Ingestion de boissons ou d'aliments contaminés	1,5 Million	Hépatite aiguë (fulminante chez les personnes immunodéprimées)	Prévention : vaccin Pas de traitement	Secondaire liée à l'action du système immunitaire	G.Yonghao, Int J of Infectious Diseases. 2020, (93): 163-167
VHB	Famille : <i>hepadnaviridae</i> ; Genre : <i>orthohepdnavirus</i>	ADN	Voie sanguine ou par tous les fluides biologiques, transmission mère-enfant	250 Millions	Hépatite fulminante à chronique	Prévention : vaccin Traitement antiviral (IFN)		M. Jefferies, World J Clin Cases. 2018 Nov 6; 6(13): 589-599
VHC	Famille : <i>falviviridae</i> ; Genre : <i>hepacivirus</i>	ARN	Voie sanguine	70 Millions	Hépatite aiguë asymptomatique puis hépatite chronique	Pas de vaccin Traitement antiviral (IFN + Ribavirine)		RH.Westbrook, J Hepatol. 2014; 61: S58-S68
VHD	Famille : <i>hepadnaviridae</i> ; Genre : <i>deltavirus</i>	ARN	Virus satellite, co-infection avec le VHB	20 Millions	Co-infection : Hépatite fulminante à chronique sévère	Pas de vaccin Traitement des formes chroniques (IFN)		E.PARLAK, Viral Hepatitis Journal. 2015; 21(3): 80-84
VHE	Famille : <i>hepeviridae</i> ; Genre : <i>hepevirus</i>	ARN	Ingestion de boissons ou d'aliments contaminés	20 Millions	Hépatite fulminante	Pas de vaccin ni de traitement		Y.Debing, Antiviral Research. 2014; 102: 106-118
HSV-1 et -2	Famille : <i>herpesviridae</i> ; Genre : <i>simplexvirus</i>	ADN	Par les fluides biologiques, transmission mère-enfant	3 Millions	Hépatite fulminante	Traitement antiviral (Aciclovir), greffe hépatique +++	Primaire liée à la réplication virale	C.Riediger, Clin Transplant. 2009, 23(21): 37-41

Les informations détaillées dans les paragraphes ci-dessous proviennent, pour la plupart, du site de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dédié aux hépatites virales.

a. Le VHA

L'infection par le VHA peut entraîner une hépatite virale bénigne, qui guérit en quelques semaines, ou fulminante et aboutissant au décès de la personne infectée (14). L'hépatite induite par le VHA n'évolue jamais vers la chronicité. Ce virus se transmet *via* l'ingestion de boissons (principalement l'eau) ou d'aliments contaminés, ou par contact direct avec une personne infectée *via* les fluides biologiques.

La plupart des personnes infectées par le VHA guérissent spontanément, et développent une immunisation face à ce virus, les protégeant pour le reste de leur vie. Cependant, chez quelques patients, on observe le développement d'une hépatite fulminante, en particulier chez les patients immunodéprimés ou âgés. Selon l'OMS, en 2016, l'infection par le VHA aurait engendré le décès de plus de 7 000 personnes, représentant 0,5 % de la mortalité due aux hépatites virales. Les épidémies durent longtemps et ont des conséquences économiques et sociales non négligeables dans les populations.

Le risque d'infection par le VHA est lié au manque d'accès à l'eau potable, à une mauvaise hygiène, mais aussi aux défauts de qualité des installations d'assainissement de l'eau. Cependant dans les pays développés, il est observé une augmentation du nombre de cas chez les hommes homosexuels, ainsi que chez les personnes consommant des drogues injectables. On observe une forte disparité mondiale concernant l'hépatite à VHA :

- Dans les pays sous-développés, où les conditions sanitaires sont insatisfaisantes, l'infection au VHA est courante et 90% des enfants ont été infectés avant l'âge de 10 ans, le plus souvent de façon asymptomatique. Dans ces zones, les épidémies sont rares car la plupart des individus sont immunisés.
- Dans les pays développés, où les conditions sanitaires sont bonnes, le taux d'infection est bas, et la maladie survient principalement dans des groupes à risque cités précédemment. La maladie touche en particulier les adolescents et les adultes.
- Dans les pays à revenu intermédiaire, les conditions sanitaires sont souvent variables, les enfants échappent fréquemment à l'infection pendant leur petite enfance et atteignent l'âge adulte sans avoir été immunisés. Malgré de meilleures conditions économiques et sanitaires, de nombreux adultes ne sont pas immunisés et sont donc plus susceptibles à

l'infection par le VHA. Ceci est responsable de l'apparition d'épidémies dans ces populations avec un taux de morbidité plus élevé.

Pour lutter contre les hépatites liées au VHA, un vaccin sûr et efficace a été développé. Il est recommandé pour tous les voyageurs se rendant dans les zones épidémiques, mais aussi aux hommes homosexuels et aux consommateurs de drogues. Mais les moyens les plus efficaces pour éviter ces infections au VHA sont : la disponibilité pour toutes et tous à une eau potable et à une sécurité sanitaire des aliments, l'amélioration des installations d'assainissement, et la sensibilisation aux mesures d'hygiène élémentaires. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement contre le VHA.

b. Le VHB

Le virus de l'hépatite B est responsable du développement d'atteintes hépatiques aiguës et chroniques, ce qui est un problème majeur de santé publique mondiale (15). En effet, il faut noter que les formes chroniques peuvent évoluer vers une cirrhose voire un carcinome hépatocellulaire (cancer majoritaire du foie). L'OMS estimait en 2015 que plus de 250 Millions de personnes vivaient avec une forme chronique de l'infection à VHB. Ces patients sont détectés positifs par la présence dans leur sang d'antigènes de surface du virus de l'hépatite B. On comptait en 2015 environ 800 000 décès dus aux complications de l'infection par le VHB, principalement la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. La prévalence de l'hépatite B est variable entre les continents. Ainsi, 6% des adultes vivant dans les régions du Pacifique et de l'Afrique sont infectés par ce virus, contre 2% en Europe et en Asie, et moins de 1% en Amérique.

La transmission mère-enfant de ce virus est très fréquente dans les régions à forte endémie, pendant la grossesse ou au cours de l'accouchement. La transmission du VHB passe également par le sang (tatouage, piercing, consommation de drogues injectables) et les fluides biologiques comme la salive ou le sperme. Le VHB peut également se transmettre par voie sexuelle chez des personnes non vaccinées, en particulier chez les hommes homosexuels ou chez les personnes ayant plusieurs partenaires sexuels.

L'évolution à la chronicité de l'hépatite B dépend de l'âge lors de l'infection. Les enfants âgés de moins de 6 ans lors de l'infection sont plus à risque de développer une hépatite chronique que des adultes. 90% des nourrissons infectés pendant leur 1^{ère} année de vie développeront une

hépatite B chronique, contre 50% chez les enfants âgés de 6 ans ou moins, et moins de 5% chez les adultes en bonne santé. Les adultes présentant une hépatite B chronique ont 20 à 30% de risque de développer une cirrhose évoluant par la suite vers un cancer du foie (16).

Un vaccin préventif et efficace protégeant à 98-100% a été développé. Il est administré en France de façon systématique depuis 2018 (17). A l'heure actuelle, il n'existe que des traitements symptomatiques pour les patients atteints d'hépatite B aiguë. Cependant les patients présentant une hépatite B chronique sont traités avec des antiviraux oraux. Le traitement a pour objectifs de ralentir la progression pathologique vers la cirrhose, de réduire l'incidence de cancer du foie et de prolonger l'espérance de vie des patients. Il faut noter que le traitement ne permet pas de guérir de la maladie mais seulement de réduire la réplication virale. Le diagnostic de la maladie étant très tardif, les patients ont déjà atteint le stade de cirrhose ou de cancer au moment du diagnostic. La progression du cancer du foie est très rapide et le taux de survie des patients très faible. En effet, les traitements proposés (chirurgie couplée à la chimiothérapie) ne sont que peu efficaces. Le succès de la transplantation hépatique est très variable chez ces patients mais demeure la seule stratégie thérapeutique efficace.

c. Le VHC

L'infection par le VHC est responsable de formes aiguës et chroniques d'hépatites, avec des formes bénignes à graves (18). L'hépatite C est la cause majeure de survenue du cancer du foie. Selon l'OMS, 70 Millions d'individus sont porteurs chroniques de l'hépatite C, et pour une grande partie d'entre eux la maladie évolue vers la cirrhose et le cancer du foie. En 2016, l'OMS a comptabilisé presque 400 000 décès suite à l'infection par le VHC, le plus souvent chez des patients présentant une forme chronique avancée. 70% des personnes infectées par le VHC présenteront une forme chronique de la maladie, avec un risque accru de 20% de développer une cirrhose hépatique chez ces individus.

C'est en Europe que la prévalence du VHC est la plus élevée et estimée à 2% en 2015. Mais l'infection par le VHC se concentre sur certaines populations à risque, notamment chez les individus consommant des drogues qui représentent 23% des nouvelles infections et 33% des décès liés au VHC (OMS).

Le VHC est transmis essentiellement par voie sanguine. Sa transmission est observée lors de la consommation de drogues injectables, de pratiques de soins à risque ou de transfusion sanguine

lorsqu'il n'y a pas eu de dépistage, mais aussi lors de pratiques sexuelles entraînant une exposition au sang. La transmission mère-enfant existe également pour le VHC, bien que plus rare.

Actuellement, il n'existe pas de vaccin efficace contre le VHC mais la recherche continue dans ce domaine. Des médicaments antiviraux, les AAD ou antiviraux à action directe, permettent de guérir plus de 95% des personnes présentant une hépatite C, mais l'accès au diagnostic et au traitement est limité.

d. Le VHD

Le virus de l'hépatite D a la particularité de nécessiter la présence du VHB pour se répliquer. Le VHD est responsable de formes aiguës (voire fulminantes) ou chroniques des hépatites virales. Le nombre total d'infection par le VHD diminue depuis les années 1980, principalement par le succès du programme mondial de vaccination contre le VHB. Cependant, la co-infection VHB-VHD est considérée comme la forme la plus grave des hépatites virales chroniques, évoluant rapidement vers une atteinte hépatique sévère et le développement d'un carcinome hépatocellulaire responsable du décès du patient.

L'OMS estime que 5% des sujets porteurs d'une hépatite B chronique sont également infectés par le VHD, ce qui donne un total d'environ 20 Millions de malades dans le Monde (19). Les zones de forte prévalence sont l'Afrique, l'Asie, les îles du Pacifique et l'Amérique du Sud. Cependant, les données mondiales sont incomplètes car de nombreux pays ne notifient pas la prévalence du VHD.

Les voies de transmission du VHD sont les mêmes que celles du VHB. Le VHD est donc transmis par le sang et quelques fois de la mère à l'enfant lors de l'accouchement.

Actuellement, le taux de guérison est faible et la prévention de l'infection par le VHD passe par la vaccination contre le VHB. Le traitement proposé repose sur l'administration d'interféron α . La transplantation hépatique peut être envisagée dans les cas d'hépatites fulminantes.

e. Le VHE

Le VHE est responsable du développement de formes fulminantes d'hépatite, aboutissant aux décès d'un certain nombre d'individus infectés. Il est principalement transmis suite à la consommation d'eau et d'aliments contaminés, mais la contamination par transfusion de produits sanguins infectés et la transmission mère-enfant sont également décrits (20).

Ce virus est retrouvé partout dans le Monde et se répartit selon deux schémas :

- Les zones à ressources limitées où la contamination de l'eau est fréquente. Dans ces zones, la maladie est courante, sous forme sporadique ou épidémique.
- Les zones disposant d'installations sanitaires et d'assainissement de l'eau satisfaisantes. Ici, les cas d'hépatite E sont peu fréquents, et essentiellement sous forme sporadique.

Le VHE cause principalement des formes aiguës d'hépatites évoluant parfois vers une forme fulminante. De très rares cas d'hépatite E chronique ont été signalés chez des individus immunodéprimés.

A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique de l'hépatite E. La prévention est l'approche la plus efficace pour lutter contre la maladie, notamment en respectant les normes de qualité pour les approvisionnements d'eau potable et en appliquant les pratiques d'hygiène élémentaires. En Chine, en 2011, un vaccin a été produit pour lutter contre l'hépatite E, mais n'a pas été homologué dans d'autres pays dont la France.

f. Le HSV

Les virus de l'herpès simplex de type 1 (herpès labial) et de type 2 (herpès génital) sont capables d'induire le développement d'hépatite. L'hépatite herpétique est rare mais responsable de cas graves d'hépatites virales fulminantes dans le Monde (21). Ces cas sont souvent diagnostiqués chez des patients immunodéprimés lors d'une primo-infection par le virus de l'herpès.

L'état immunitaire de l'hôte influence énormément le développement d'une hépatite suite à une primo-infection par le virus de l'herpès. En effet, les hépatites herpétiques sont plus sévères voire fulminantes chez les individus immunodéprimés, chez les femmes enceintes ou encore chez les personnes recevant un traitement de chimiothérapie.

La transmission de ce virus se fait essentiellement par contact direct avec une personne infectée, en particulier par les fluides biologiques. La transmission mère-enfant existe également, en particulier dans les cas d'infection par le virus de l'herpès de type 2.

Dans le cas d'hépatites à herpès, l'atteinte hépatique est très importante ce qui entraîne une défaillance hépatique sévère. Ainsi, le virus de l'herpès représente la moitié des indications de transplantation hépatique pour les hépatites virales fulminantes, soit 7,5% des indications de transplantation. Le diagnostic de l'hépatite herpétique n'est réalisé avant le décès que chez moins de 25% des patients. Il repose sur une biopsie montrant une nécrose massive du parenchyme hépatique accompagnée d'une hémorragie et une faible infiltration immunitaire. Sans traitement, la mortalité des hépatites herpétiques est supérieure à 80%. Ce traitement repose sur l'utilisation de l'acyclovir par voie intraveineuse dans un premier temps, et si nécessaire, d'une greffe hépatique.

B. Les formes d'hépatites virales

Comme vu précédemment, les virus responsables des hépatites sont capables d'induire des formes variables d'hépatites, allant des hépatites aiguës de courte durée aux hépatites chroniques évoluant vers le cancer du foie. Ces 2 formes d'hépatites peuvent être contrôlées et mettent rarement en jeu le pronostic vital du patient à court terme, contrairement aux formes fulminantes des hépatites dont le seul traitement efficace reste la greffe hépatique.

a. Les hépatites aiguës

Les hépatites aiguës sont caractérisées par une inflammation importante du parenchyme hépatique avec l'apparition de lésions hépatocytaires (22). La principale conséquence à ceci est une élévation de certains enzymes hépatiques, notamment les transaminases ASAT (aspartate amino-transférase) et ALAT (alanine amino-transférase) avec des valeurs dix fois supérieures à la limite normale soit environ 500 UI/L.

Les hépatites aiguës sont classifiées ainsi car elles guérissent en moins de six mois. L'étiologie principale de ces hépatites est l'infection virale, devant les hépatites toxiques d'origine médicamenteuse ou alcoolique, et les hépatites auto-immunes. Les hépatites aiguës surviennent également lorsque le foie subit des dommages secondaires, comme lors d'atteintes biliaires ou

de problèmes cardiaques. Enfin, l'apparition de métastases au niveau du foie, principalement lors des cancers colorectaux, entraîne le plus souvent le développement d'une hépatite aiguë.

Les hépatites virales aiguës peuvent survenir suite à l'infection par l'un des cinq virus de l'hépatite mais également suite à l'infection par d'autres virus non-hépatotropes comme le virus d'Epstein-Barr (responsable de la mononucléose) et les virus de la famille des *herpesviridae* (le cytomégalovirus, l'Herpès simplex virus), etc... Les autres hépatites aiguës non virales sont principalement dues à la surconsommation de médicaments, en particulier le paracétamol, et d'alcool.

Au niveau histologique, l'hépatite aiguë est représentée par des zones de nécrose des hépatocytes plus ou moins étendues selon l'atteinte hépatique, et la présence d'infiltrats immunitaires constitués principalement de neutrophiles et de macrophages (**Figure 7**). Cependant la quantité de cellules immunitaires infiltrantes et l'aspect des hépatocytes dépendent de l'étiologie de l'hépatite.

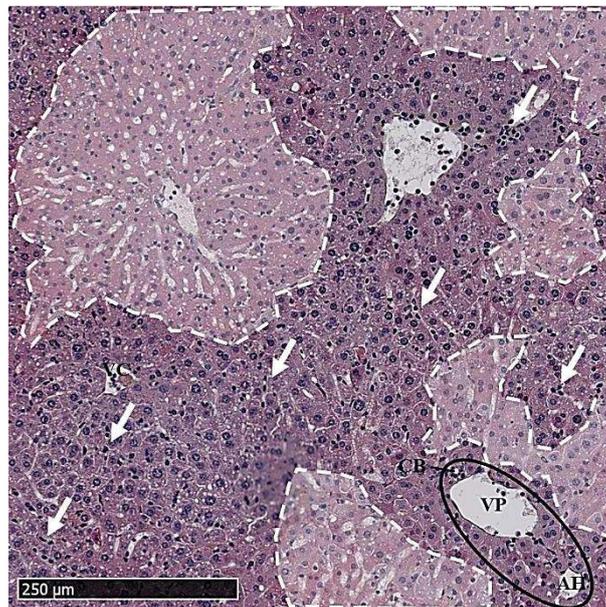


Figure 7 : Coloration hématoxyline-Eosine-Safran (HES) d'un foie murin atteint d'une hépatite aiguë suite à l'injection de Concanavalline A. Entourées en pointillés blancs : zones de nécrose hépatocytaire.

Flèches : infiltrats immunitaires. Entouré en noir : espace porte, CB : Canalicule Biliaire, VP : Veine Porte, AH : Artère hépatique. VC : Veine Centrolobulaire. (*clichés personnels*)

b. Cas particulier : les hépatites fulminantes

Les hépatites fulminantes sont caractérisées par le développement d'une atteinte hépatique sévère accompagnée d'une encéphalopathie (23). Comme pour les hépatites aiguës, diverses étiologies peuvent engendrer le développement de formes fulminantes d'hépatites, telles que les causes médicamenteuses, mais l'étiologie virale reste prédominante.

Chez les patients atteints d'une hépatite fulminante, on observe le développement rapide d'une atteinte hépatique générant une insuffisance fonctionnelle de l'organe, mais aussi une encéphalopathie dans les deux semaines suivant le début de la maladie marquée par l'atteinte hépatique. L'encéphalopathie se caractérise notamment par l'apparition d'un œdème cérébral.

Les hépatites fulminantes font partie des formes prédominantes dans l'indication d'une greffe hépatique. En effet, la nécrose hépatocytaire est telle qu'une régénérescence hépatique est impossible chez ces patients. Sans greffe, le taux de survie des patients est inférieur à 15%.

Comme décrit précédemment, plusieurs virus peuvent induire l'apparition d'une forme fulminante d'hépatite, en particulier le VHA, le VHB et le HSV, et ceci dépend de l'état immunitaire de l'hôte au moment de l'infection. Les patients sous traitement immunosuppresseur ou infectés par le VIH sont plus susceptibles de développer des formes sévères et fulminantes d'hépatites virales.

Au niveau histologique, les zones de nécrose hépatocytaire sont très étendues et responsables du dysfonctionnement hépatique, alors que les infiltrats de cellules immunitaires sont peu visibles (**Figure 8**).

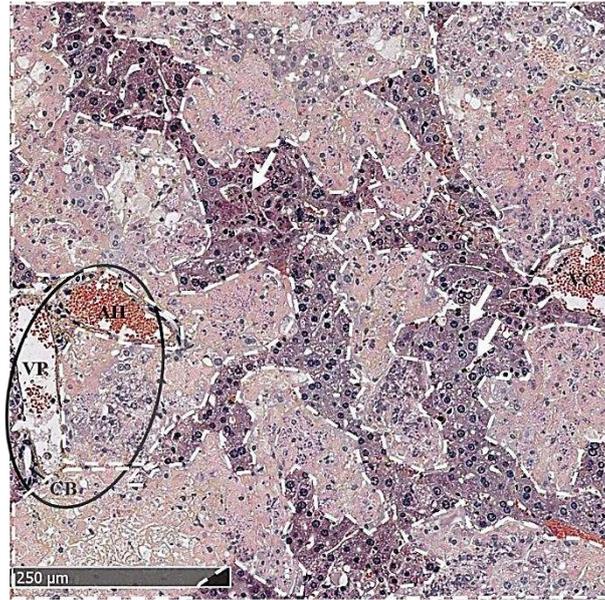


Figure 8 : Coloration HES d'un foie murin atteint d'une hépatite fulminante suite à l'inoculation de MHV-3. Entourées en pointillés blancs : zones de nécrose hépatocytaire. Flèches : infiltrats immunitaires. Entouré en noir : espace porte, CB : Canalicule Biliaire, VP : Veine Porte, AH : Artère hépatique. VC : Veine Centrolobulaire. (*clichés personnels*)

c. Les hépatites chroniques

Cette partie sur les formes chroniques des hépatites sera brièvement explicitée n'étant pas le sujet d'étude principal de cette thèse.

Les hépatites chroniques surviennent principalement suite à une infection par les virus de l'hépatite B et C (24). Sans traitement, les hépatites chroniques évoluent en fibrose dont le stade ultime, la cirrhose, est la première cause de survenue du carcinome hépatocellulaire. Les hépatites sont classifiées de chroniques lorsqu'elles durent plus de six mois.

L'état d'avancement de l'hépatite chronique est classifié de façon histologique en suivant le système METAVIR, qui évalue l'activité nécrotique ainsi que le niveau de fibrose hépatique observé (25) comme cela est résumé dans le **Tableau 2**. L'activité nécrotique, évaluée par les scores de A0 à A3, est représentative de l'activité du système immunitaire pour éliminer les cellules infectées et les débris cellulaires. La fibrose hépatique, annotée par les stades F0 à F4, est évaluée par la quantité et l'organisation de collagène et plus généralement de matrice extracellulaire produites par les cellules étoilées activées (**Figure 5**).

A)	Score	Description
	A0	Hépatite chronique sans activité histologique
	A1	Hépatite chronique avec activité histologique légère
	A2	Hépatite chronique avec activité histologique modérée
	A3	Hépatite chronique avec activité histologique sévère

B)	Score	Description
	F0	Absence de fibrose
	F1	Fibrose portale et épriportale sans septum fibreux
	F2	Fibrose portale et épriportale avec de rares septum fibreux
	F3	Fibrose portale et épriportale avec de nombreux septum fibreux
	F4	Cirrhose hépatique

Tableau 2 : Le système METAVIR.

A) Evaluation de l'activité nécrotique. B) Evaluation de la fibrose hépatique.

4. Molécules solubles de l'inflammation dans la réponse à l'infection virale

Suite à l'entrée du virus dans l'organisme, celui-ci va rapidement passer dans la circulation sanguine. Comme décrit précédemment (cf. paragraphe 1.A), le foie est un organe très vascularisé, donc les virus sont fortement susceptibles de circuler par cet organe. Nous avons également vu qu'il existait un lien *via* la circulation sanguine et lymphatique entre le foie et la rate.

La rate, un organe lymphoïde secondaire (OLS), contient de nombreuses cellules immunitaires mobilisées lors d'infections microbiennes, notamment des lymphocytes (B et T), des cellules NK, des macrophages et des cellules dendritiques. Il a été décrit qu'il existait un dialogue immunitaire entre le foie et la rate lors d'infection hépatique (26). En effet, les hépatocytes et autres cellules hépatiques lésées par le virus, qui constituent la première barrière de défense face à l'infection virale, vont produire un certain nombre de molécules solubles appelées cytokines afin d'induire le recrutement de cellules immunitaires spléniques. Les mécanismes moléculaires mis en place pour l'activation et le recrutement de cellules immunitaires seront détaillés dans le paragraphe 7. Dans ce chapitre nous nous consacrerons aux différentes familles de facteurs solubles produits en réponse à l'infection virale.

A. Les cytokines

Le système immunitaire joue un rôle important dans le développement et le contrôle des hépatites virales. En effet, certaines populations, en particulier les cellules de Kupffer, ont été identifiées comme étant la 1^{ère} ligne de défense du foie face aux infections virales par leur production de cytokines et de chimiokines (27, 28). Lors de la réponse immunitaire et suite à une infection virale, les cellules parenchymateuses infectées et les cellules immunitaires vont produire un certain nombre de cytokines, afin de stimuler le système immunitaire pour éradiquer l'infection (29).

Les cytokines sont de petites molécules solubles de 8 à 50 kDa, qui jouent le rôle de signaux permettant aux cellules d'agir à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles ont donc un rôle essentiel dans la communication intercellulaire. Elles agissent en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques, de manière paracrine (sur des cellules proches), endocrine (sur des cellules ou tissus à distance) ou autocrine (sur la cellule productrice). Leur rôle de communication intercellulaire est important dans de nombreux processus physiologique comme l'embryogénèse, la reproduction, l'hématopoïèse, mais aussi lors de conditions pathologiques telles que l'inflammation et la réponse immunitaire (en particulier les hépatites virales et les infections au VIH, et les maladies inflammatoires chroniques), les cancers, ou les réactions auto-immunes (30).

Les cytokines sont sécrétées par de nombreux types cellulaires, tels que les cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (cf. paragraphe 7). Mais elles sont également produites par les cellules de type épithélial et les cellules endothéliales, en réponse à la reconnaissance d'antigènes comme les virus. Les cellules cibles de ces cytokines sont majoritairement les cellules immunitaires, qui expriment les récepteurs de ces facteurs solubles. Comme décrit précédemment, le spectre d'action des cytokines est large, et parfois redondant. En effet, des cytokines différentes peuvent avoir la même fonction et agir en coopération (30).

Le terme de cytokine regroupe une grande famille de molécules solubles avec des sous-familles qui ont chacune des récepteurs spécifiques :

- Les interférons (IFN)
- La famille du facteur de nécrose tumorale (TNF)
- Les facteurs de croissance de transformation (TGF)
- Les interleukines (IL)
- Les chimiokines

a. Les interférons

Ce sont de puissantes molécules antivirales qui agissent comme des inhibiteurs de la réplication virale (31). C'est une famille de cytokines inductibles dont la fonction biologique principale est de lutter contre les infections virales. On distingue deux types d'IFN : les IFN de type I et les IFN de type II. Les IFN de type I, dont l'expression est induite par la présence d'un virus dans l'organisme, regroupent l'IFN α produit par les leucocytes, l'IFN β produit par les fibroblastes, et l'IFN ω (32). Alors que l'expression des IFN de type II, également appelé IFN γ , est induite par la présence d'un antigène dans l'organisme et leur production est essentiellement d'origine immunitaire. En effet, seul un groupe restreint de cellules immunitaires est capable de produire et sécréter cet IFN γ , telles que les cellules NK, les L_TH1 et les L_Tc (cf. paragraphe 7). Récemment, une nouvelle famille d'IFN a été caractérisée : les interférons lambda (IFN λ), comprenant les IFN λ 1, 2 et 3, aussi appelés respectivement IL-29, IL-28A et IL-28B (33). Bien qu'ils ne possèdent que peu d'homologies de séquence avec les IFN α et β , la synthèse de ces IFN λ est également induite en réponse à un stimulus comme l'infection virale ou la stimulation des récepteurs TLR. Comme les IFN de type I, ils ont pour fonction de déclencher une réponse immunitaire antivirale.

Les IFN sécrétés agissent en se fixant à des récepteurs spécifiques, conservés et similaires chez de nombreuses espèces dont l'Homme et la souris. Les IFN de type I se fixent sur un même récepteur constitué de 2 sous-unités appelées IFNAR-1 et IFNAR-2, alors que l'IFN γ se fixe sur un récepteur qui lui est spécifique et composé de 2 sous-unités : la sous-unité principale IFNGR-1 et la sous-unité accessoire IFNGR-2. La fixation de l'IFN sur son récepteur est responsable de son hétérodimérisation pour le rendre fonctionnel et induire des voies de signalisation intracellulaires.

Comme cela sera détaillé dans le paragraphe 7, l'IFN γ joue un rôle important dans l'immunité innée mais aussi dans l'immunité adaptative par son action dans la réponse antivirale à long terme. Les voies de signalisation induites par la liaison de l'IFN sur son récepteur passent majoritairement par la voie impliquant les protéines JAK-STAT et activant les réponses immunitaires innées antivirales par la stimulation de la prolifération cellulaire et la production de protéines antivirales (**Figure 9**).

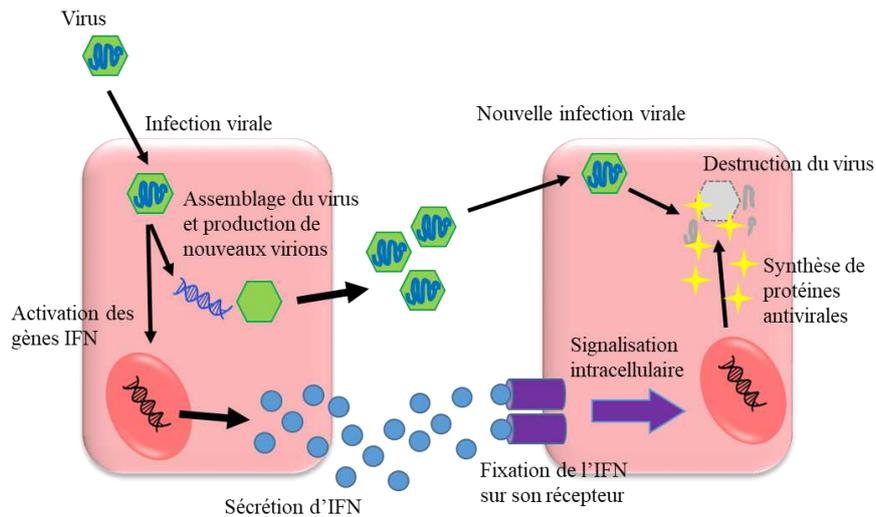


Figure 9 : Mécanisme d'action antiviral des interférons. *D'après Samuel. 2001.*

b. La famille du TNF

Elle regroupe 30 récepteurs et 19 protéines-ligands qui leur sont associés (34).

Le $\text{TNF}\alpha$ est un médiateur pro-inflammatoire avec un rôle central dans l'immunité innée en particulier dans l'induction de cytokines et l'activation de molécules d'adhésion (les intégrines). Il stimule la prolifération de cellules normales et l'activité cytolytique des cellules tumorales, et est responsable de la réponse inflammatoire et antivirale.

Ce $\text{TNF}\alpha$ est sécrété dans un premier temps par les macrophages activés, même si d'autres types cellulaires peuvent en produire comme les monocytes sanguins, les LT, les mastocytes, les cellules NK et les fibroblastes. Il est produit sous une forme de précurseur transmembranaire de 26 kDa, puis transporté jusqu'à la membrane cellulaire où il est lié de façon non covalente en trimère. Il peut ensuite être clivé par l'action de métalloprotéases telle que l'enzyme TACE ou l'ADAM17, ce qui entraîne la production d'une forme soluble homotrimérique du $\text{TNF}\alpha$ de 17 kDa.

C'est la forme homotrimérique du $\text{TNF}\alpha$ qui se fixe sur son récepteur pour induire des voies de signalisations intracellulaires. Le $\text{TNF}\alpha$ possède 2 récepteurs : le récepteur du TNF de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2). Ces 2 récepteurs ne sont pas exprimés par les mêmes cellules : le TNFR1 est ubiquitaire alors que le TNFR2 est principalement exprimé par les leucocytes et les cellules endothéliales. Les fonctions pro-inflammatoires du $\text{TNF}\alpha$ semblent être majoritairement liées à sa liaison au TNFR1. Les récepteurs TNFR1 et TNFR2 sont des

glycoprotéines transmembranaires qui partagent presque 30% d'homologie dans leur domaine extracellulaire avec des domaines riches en cystéines et un domaine de liaison au ligand. Le TNFR1 présente un domaine de mort intracellulaire (*Death Domain*, DD) du côté C-terminal, contrairement au TNFR2, permettant d'activer des voies d'inflammation et de mort cellulaire. Il faut également noter que les formes membranaires et solubles du TNF α sont capables de se lier au TNFR2 et d'induire des voies de signalisation intracellulaires (**Figure 10**).

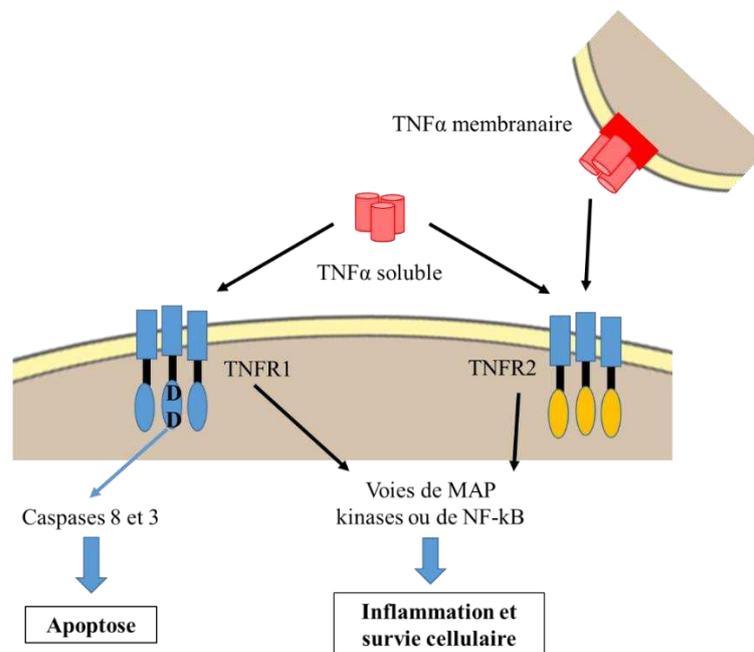


Figure 10 : Voies de signalisation du TNF α . D'après Turner et al. 2014.

c. La superfamille du TGF

C'est une famille de cytokines comprenant divers facteurs de croissance polypeptidiques tels que des protéines impliquées dans la morphogénèse osseuse (*bone morphogenic protein*, BMP), les facteurs de croissances et de différenciation (*growth and differentiation factors*, GDF), les activines (ACT) et les inhibines (INH) (35). Ces membres de la superfamille du TGF ont des rôles dans le développement et la différenciation tissulaire chez les vertébrés, dans le contrôle de la réponse immunitaire, et dans la réparation tissulaire (36).

Les polypeptides de cette famille ont un rôle important dans le contrôle de l'activité et du métabolisme cellulaire, principalement dans le contexte de la cicatrisation tissulaire : ils ont un effet sur la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC), sur la production de composants de la matrice extracellulaire, et sur la chimioattraction de

cellules immunitaires impliquées dans les phénomènes de cicatrisation et liées à la réponse inflammatoire.

Le TGF- β 1, composant majoritaire de cette famille, est présent sous une forme active homodimérique, constituée de deux chaînes polypeptidiques reliées par une liaison disulfure et formant un complexe de 25 kDa. Les polypeptides de la famille du TGF- β sont synthétisés sous forme de pré-pro-TGF- β , un monomère de 55 kDa. Au cours de leur synthèse, ils subissent plusieurs étapes de protéolyse, de dimérisation de deux monomères avec la formation de liaison disulfure aboutissant à la formation d'un pro-TGF- β . Le détail des différentes étapes de production du TGF- β est résumé dans la **Figure 11**. Le TGF- β est sécrété par les cellules sous la forme d'un large complexe latent (ou LLC) constitué d'un homodimère de TGF- β associé de façon non covalente à deux chaînes peptidiques (ou LAP), et par une liaison disulfure à la protéine LTBP (*latent TGF- β binding protein*). Une fois sécrété, ce complexe inactif se lie à des composants de la matrice extracellulaire, via le domaine N-terminal de la protéine LTBP, tels que la fibronectine et le collagène. Ce LLC se lie également à des protéines d'adhésion cellulaire, les intégrines. Cette liaison permet le relargage de la forme mature et active du TGF- β , sans protéolyse et suite à un changement conformationnel.

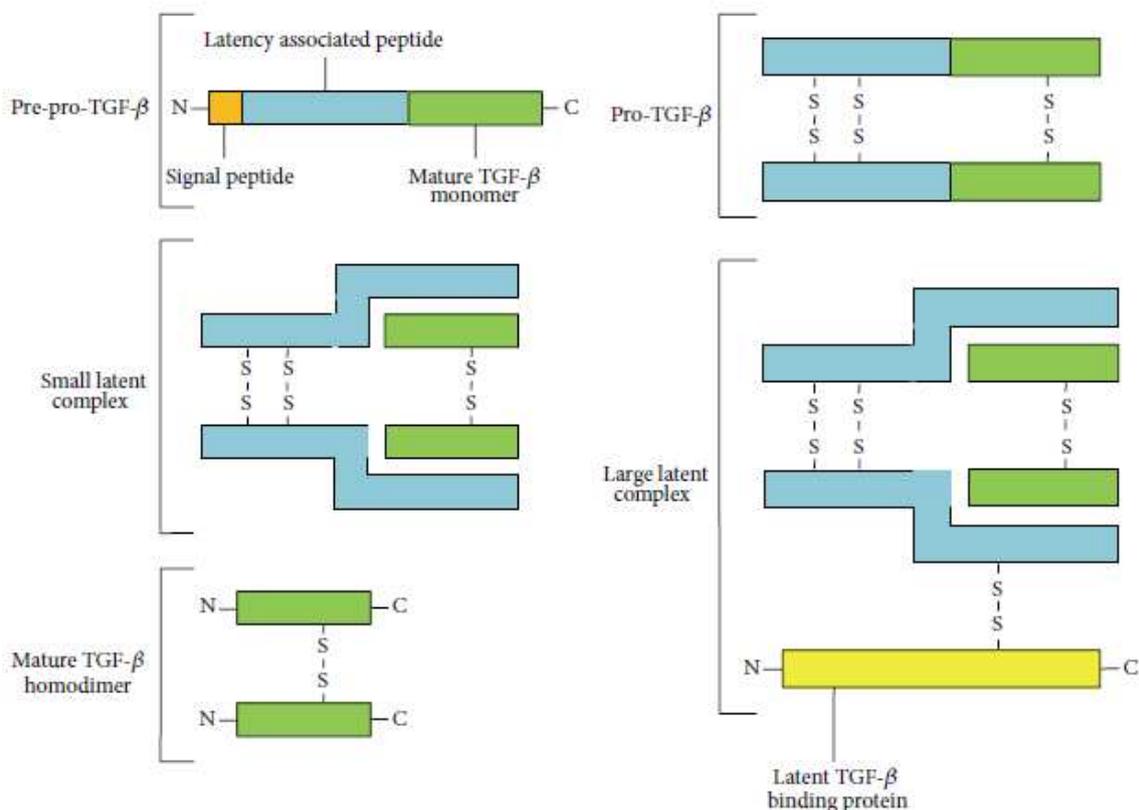


Figure 11 : Représentation des diverses étapes de production du TGF- β . Issu de Poniatowki et al.

Après cette libération, le TGF- β actif se lie à son récepteur, présent sous forme de complexe hétérotétramérique avec deux sous-unités de type I (ou TGFBR1) et deux sous-unités de type II (ou TGFBR2). Les sous-unités de type I et de type II sont des glycoprotéines transmembranaires avec un domaine N-terminal de reconnaissance au ligand et un domaine C-terminal cytosolique permettant la transduction du signal en intracellulaire. Ce signal est relégué par des protéines cytoplasmiques de la famille des Smad (37).

Suite à une agression tissulaire telle qu'une infection virale, on observe trois étapes incluant une phase pro-inflammatoire, une phase de réparation tissulaire, et enfin une phase de remodelage tissulaire. Pendant ces trois phases, de nombreuses interactions cellulaires ont lieu et sont régulées par les cytokines. Les membres de la superfamille du TGF- β ont principalement un rôle dans les deux dernières étapes, comme cela a été décrit précédemment.

Le TGF- β est localisé dans l'espace extracellulaire, il est sécrété par de nombreux types cellulaires dont les fibroblastes. Il possède un rôle de chémoattraction mais aussi de prolifération et de différenciation de certaines cellules immunitaires, tels que les monocytes, les macrophages et les LT, au niveau du site inflammatoire.

Les deux dernières sous-familles de cytokines, les interleukines et les chimiokines, seront détaillées par la suite.

B. Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines possédant des fonctions chimioattractantes sur les leucocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (38). Ce sont de petites protéines à faible poids moléculaire compris entre 8 et 20 kDa, fortement conservées entre les espèces. A l'heure actuelle on dénombre environ 50 chimiokines et 20 récepteurs. Les chimiokines sont constituées de 80 à 130 acides aminés et possèdent des homologies de structure comprenant des feuilletts β reliés par des liaisons disulfures entre les résidus cystéines. Ainsi, elles sont classifiées en quatre sous familles selon la position de leurs résidus cystéine : les chimiokines CXC et CC qui sont les deux groupes majoritaires, et les chimiokines C et CX₃C qui sont minoritaires (39).

Selon leur fonction, les chimiokines peuvent être classifiées d'homéostatiques ou d'inflammatoires. Les premières sont constitutivement exprimées et jouent des rôles dans des processus cellulaires physiologiques, alors que l'expression des chimiokines inflammatoires est

induite par un stimulus pro-inflammatoire. Ces protéines jouent donc des rôles indispensables dans la défense antimicrobienne, et en particulier dans la réponse antivirale, par la stimulation et l'activation des réponses innées et adaptatives. Au-delà de leur rôle dans l'immunité, elles sont impliquées dans les processus de cicatrisation, d'embryogénèse, et d'angiogénèse.

Les chimiokines agissent suite à la liaison à leur récepteur spécifique, les récepteurs couplés à une protéine G (ou RCPG) à sept domaines transmembranaires, présents sous la nomenclature CXCR ou CCR. Ces récepteurs sont le plus souvent présents sous la forme d'homodimère, et plus rarement sous forme d'hétérodimère. Ils sont associés aux protéines G formées des sous-unités α , β et γ , dont les deux dernières permettent la transmission du signal intracellulaire (40). Concernant les chimiokines inflammatoires, il existe une certaine forme de redondance car plusieurs récepteurs peuvent reconnaître une même chimiokine, et plusieurs chimiokines peuvent se lier à un même récepteur. Ceci n'a pas été décrit pour les chimiokines homéostatiques. Les chimiokines peuvent également se lier à des molécules de la matrice extracellulaire telles que les protéoglycanes, ou à la membrane cellulaire sur des récepteurs non spécifiques, ce qui bloque leurs activités chémoattractantes et établit un certain gradient.

Ces chimiokines jouent un rôle primordial entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les lésions tissulaires suite à une lyse cellulaire entraînent la production de chimiokines sous forme de gradient dans le compartiment sanguin. Ce gradient permet de guider les cellules de l'immunité innée, en particulier les neutrophiles, sur le site inflammatoire (41). L'immunité adaptative est médiée par des chimiokines homéostatiques et inflammatoires qui vont se lier à leurs récepteurs présents à la surface de LT ou LB naïfs, et induire leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

Les chimiokines et leurs récepteurs associés appartiennent au réseau de médiateurs inflammatoires permettant le recrutement de cellules immunitaires. Dans le contexte de la réponse antivirale, les chimiokines majoritairement exprimées sont les chimiokines CC, comme par exemple la chimiokine CCL3 (*macrophage inflammatory protein 1 α* , MIP1 α) et CCL5 (*regulated upon activation normal T cell-expressed and secreted*, RANTES) (37, 40). Cependant, certaines chimiokines CXC sont également surexprimées dans de nombreuses infections virales chez l'Homme et la souris, comme la chimiokine CXCL10 (*interferon γ inducible protein of 10 kDa*, IP-10). Dans la littérature, il est décrit que l'expression des chimiokines CXCL9 et CXCL10 est associée à l'inflammation observée dans les hépatites virales (43).

Il a déjà été démontré au sein de l'équipe que l'expression de certaines chimiokines, CXCL10, CXCL11 et CXCL12 était fortement induite lors d'hépatites aiguës, dont les hépatites virales (44). CXCL10 et CXCL11 sont deux chimiokines bien décrites dans les pathologies hépatiques, et sont toutes deux inductibles par l'IFN γ , lui-même impliqué dans les hépatites virales. Elles partagent le même récepteur, CXCR3, à la surface des lymphocytes T, ce qui leur suggère un rôle dans la réponse immunitaire antivirale. CXCL12, quant à elle, interagit avec son récepteur CXCR4 pour attirer sur le site inflammatoire les lymphocytes. Cette voie CXCL12/CXCR4 a déjà été décrite comme étant impliquée dans les pathologies hépatiques (45), avec une surexpression de CXCL12 et de CXCR4 chez les patients infectés par les virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite C (VHC). Ces trois chimiokines et leurs récepteurs jouent donc des rôles centraux dans l'immunité avec notamment le recrutement des macrophages et des lymphocytes T (**Figure 12**). Dans ce projet, une nouvelle chimiokine a été étudiée, la chimiokine CXCL14. Les détails de cette étude et les publications qui en sont issues sont présentés dans les Article n°1 et n°2.

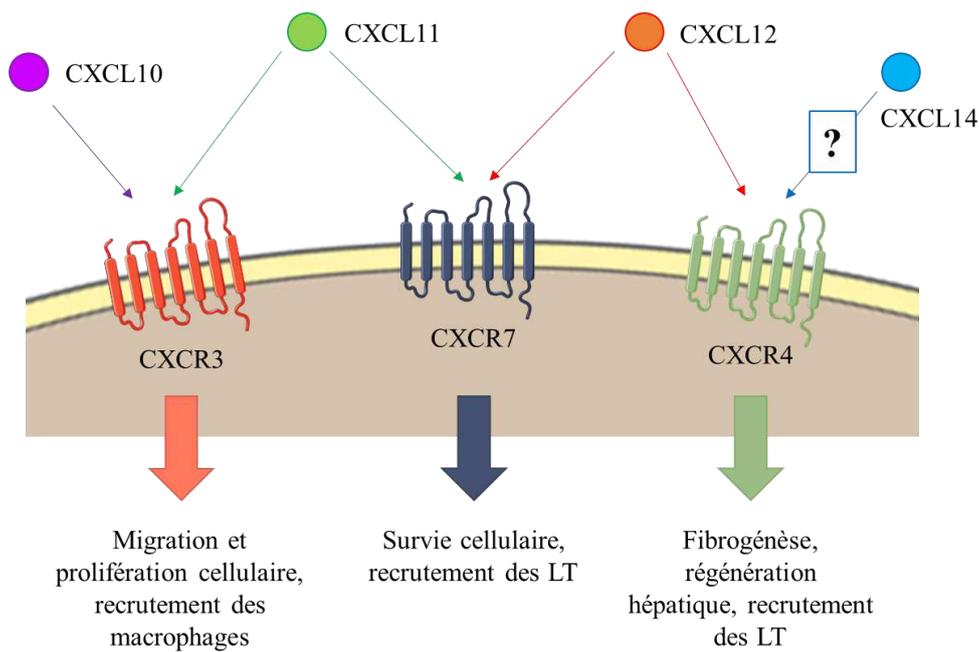


Figure 12 : Rôles des chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL12 et CXCL14 et de leurs récepteurs (CXCR3, CXCR4 et CXCR7) dans l'immunité.

a. La chimiokine CXCL14

CXCL14, aussi appelée BRAK (*breast and kidney expressed chemokine*) par sa découverte chez des patients atteints de cancers du rein ou du sein, est une chimiokine encore peu étudiée (46). En effet, son récepteur spécifique n'est pas identifié. Cependant, dans la littérature il est reporté que la chimiokine CXCL14 possède un rôle de chimioattraction en conditions physiologiques sur différentes cellules immunitaires telles que les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK (47–50). Au-delà de sa fonction de chimiotactisme, il est décrit dans la littérature que CXCL14 est également capable d'induire l'activation de ses cellules cibles, principalement les monocytes et les cellules dendritiques (46, 49).

C'est une chimiokine très conservée chez différentes espèces, et sa séquence varie de seulement deux acides aminés entre l'Homme et la souris (47). La chimiokine CXCL14 diffère au niveau de sa structure des autres chimiokines. En effet, celle-ci possède une région N-terminale très courte comparée aux autres chimiokines, et constituée de seulement treize acides aminés. Cette région N-terminale est importante pour la transmission du signal intracellulaire et pour la régulation de l'activité de la chimiokine par son clivage (52).

CXCL14 est exprimée à l'état basal dans de nombreux tissus et organes dont la peau, les reins, le cerveau, les organes lymphoïdes secondaires (tels que la rate et les ganglions), et le foie. Son expression est très élevée dans les tissus sains, et fortement réduite dans les cellules cancéreuses (53). Elle peut être exprimée par des cellules immunitaires ou non, de façon constitutive ou suite à un stimulus inflammatoire (**Figure 13**) (47). En effet, l'ARN messager de CXCL14 est exprimé par les monocytes et les lymphocytes B suite à une stimulation par le lipopolysaccharide bactérien (LPS), mais pas par les lymphocytes T. A l'état basal, les cellules dendritiques immatures sont capables de sécréter la chimiokine CXCL14 à de faibles concentrations, et cette sécrétion peut être augmentée suite à la stimulation par l'activine A (54). Toutes ces populations immunitaires exprimant CXCL14 sont également chimioattraitées par cette même chimiokine, ce qui suggère un rôle pour CXCL14 d'immunosurveillance (53, 54). Parmi les cellules non immunitaires qui expriment CXCL14, on retrouve les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales du derme, mais également les cellules de la lamina propria de l'intestin. En particulier, l'expression cutanée de CXCL14 est fortement corrélée au recrutement de précurseurs des cellules dendritiques qui se différencient ensuite en cellules de Langerhans (49). De plus, les fibroblastes exprimant CXCL14 sont le plus souvent retrouvés à proximité de macrophages, suggérant ainsi un rôle de cette chimiokine dans le développement

des macrophages (48). Les sources cellulaires de CXCL14 se situent donc à des lieux stratégiques pour la surveillance immunitaire de l'organisme tels que la circulation sanguine et les barrières cutanées, suggérant ainsi un rôle central de CXCL14 dans la réponse immunitaire innée, et adaptative dans un second temps, face à l'intrusion de pathogène.

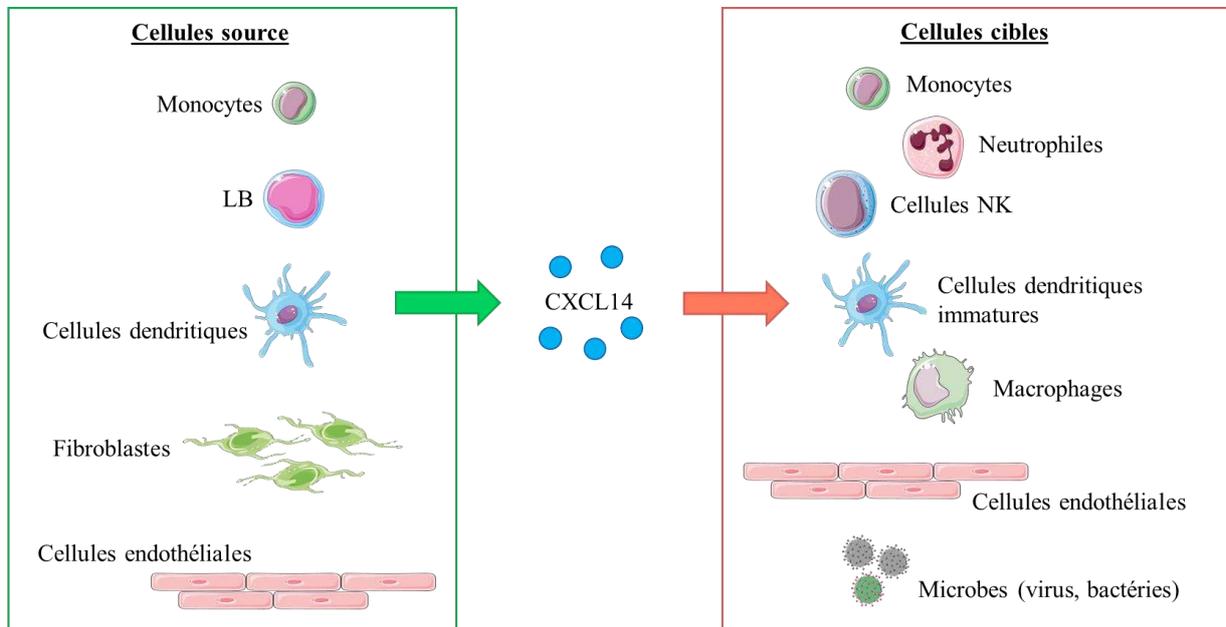


Figure 13 : Cellules sources et cellules cibles de la chimiokine CXCL14. *D'après Lu et al.*

La régulation de l'expression de CXCL14 et ses fonctions restent, à l'heure actuelle, peu étudiées. Cependant, il a été montré que CXCL14 est surexprimée dans des pathologies inflammatoires comme l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde (55, 56). Une autre étude a également démontré que CXCL14 était surexprimée au niveau des vaisseaux sanguins de cochons obèses nourris avec un régime riche en lipide, suggérant un rôle pour CXCL14 dans l'athérosclérose (59).

L'absence de récepteur identifié pour la chimiokine CXCL14 rend plus difficile l'étude de ses fonctions, cependant trois axes de recherches concernant la fonction de CXCL14 émanent de la littérature scientifique.

b. Fonctions de la chimiokine CXCL14

- Fonction dans les cancers

Dans de nombreux cancers, il est observé une diminution de l'expression de la chimiokine CXCL14. Dans la plupart des carcinomes de la tête et du cou, l'absence de CXCL14 au sein des tumeurs, par comparaison à l'expression observée dans les tissus péri-tumoraux, entraîne un faible recrutement et une faible infiltration des cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo* (51). Une autre étude a démontré un rôle de chimioattraction de CXCL14 sur les cellules NK (60). L'absence de CXCL14 dans les tissus tumoraux induit donc un manque de recrutement et d'infiltration de cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques et les cellules NK, et une croissance tumorale non contrôlée.

Dans le contexte du carcinome hépatocellulaire (CHC), il a été mis en évidence un rôle antitumoral *in vitro* et *in vivo* de la chimiokine CXCL14 (59, 60). Dans des lignées cellulaires de CHC, l'étude de Wang *et al.* montre une diminution significative de l'expression de CXCL14 dans ces cellules, et une surexpression de CXCL14 par l'utilisation de lentivirus dans ces lignées de CHC induit une diminution de la viabilité de ces cellules par l'induction des voies de l'apoptose. Dans cette même étude, il est démontré par immunohistochimie que CXCL14 est significativement moins exprimée dans les sections tumorales hépatiques par rapport au tissu hépatique péri-tumoral. Enfin la surexpression de CXCL14 permet l'inhibition de la croissance tumorale chez la souris.

- Fonction antimicrobienne

La chimiokine CXCL14 est fortement exprimée au niveau des tissus épithéliaux, et en particulier au niveau de la peau et des tractus respiratoire et gastro-intestinal.

Il a été démontré au niveau du tractus respiratoire que CXCL14 était capable d'agir contre les infections bactériennes à *P. aeruginosa* ou *S. pneumoniae* (52). CXCL14 a également démontré une fonction bactériostatique face à l'infection à *S. pneumoniae*. L'activité bactéricide de CXCL14 passe par une action directe de la chimiokine sur la dépolarisation et la perméabilisation de la membrane bactérienne. Au niveau de la peau et du tractus gastro-intestinal, une étude a mis en évidence que la chimiokine CXCL14 était capable d'éliminer les bactéries Gram-positives et Gram-négatives telles que *E. coli* ou *S. aureus*, ainsi que les champignons comme *C. albicans* (63) en conditions physiologiques.

La fonction bactéricide de CXCL14 est associée à son peptide N-terminal constitué des acides aminés 1 à 13 (**Figure 14**), alors que les liaisons disulfures ne semblent pas nécessaires à cette fonction. De même, le corps de la chimiokine, constituée des aa 14 à 54, et la partie C-terminale, comprenant les aa 55 à 77, ne sont pas impliqués dans la fonction antimicrobienne de CXCL14.

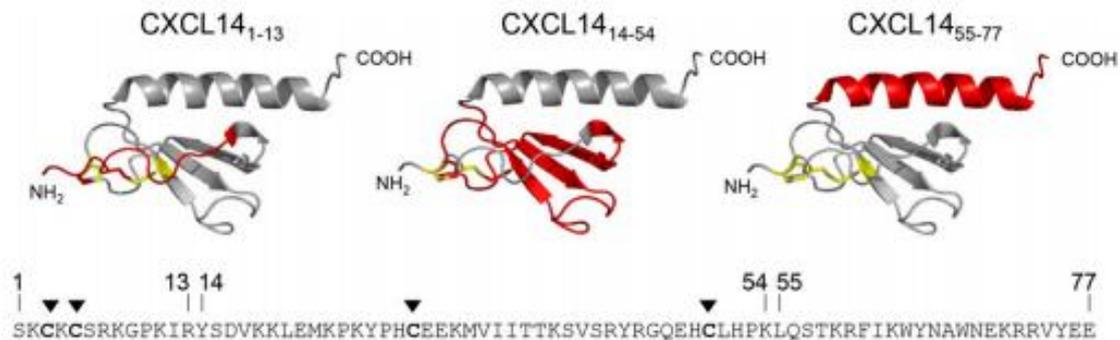


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la chimiokine CXCL14. Issu de Dai et al.

A l'heure actuelle, la fonction antimicrobienne de CXCL14 a été étudiée essentiellement contre les infections bactériennes et fongiques. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à la possible action antivirale de la chimiokine CXCL14 du fait de sa localisation stratégique au niveau des barrières cutanées et des tractus respiratoire et gastro-intestinal.

- Fonction *via* la liaison au récepteur CXCR4

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de récepteur identifié pour la chimiokine CXCL14. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que les fonctions de CXCL14 pourraient passer par sa liaison au récepteur CXCR4, partagé par la chimiokine CXCL12 (64, 65). D'une part, il a été démontré, *in vitro*, que CXCL14 agissait comme un inhibiteur de la voie CXCL12/CXCR4 en se fixant sur le récepteur, et en bloquant la migration de cellules de la lignée THP-1 (lignée de monocytes). D'autre part, la fixation de CXCL14 sur le récepteur CXCR4 permettrait de stimuler la migration de lymphocytes induite par la voie CXCL12/CXCR4 (66).

Dans le contexte des hépatites, la voie de signalisation induite par la fixation de la chimiokine CXCL12 sur son récepteur CXCR4 est impliquée dans le développement de la fibrose hépatique (65, 66). En effet, la chimiokine CXCL12 est surexprimée dans les foies de patients présentant une hépatite chronique due à l'infection par le VHC. Cette chimiokine est une des chimiokines homéostatiques les plus exprimées dans le foie, et possède un rôle chimioattractant sur les lymphocytes (43, 67). Au-delà de son rôle de chimiotactisme, CXCL12 est impliquée dans la

régénération hépatique par le recrutement de précurseurs au niveau de la moelle osseuse, exprimant le récepteur CXCR4, jusqu'au site de l'infection. Enfin, la voie CXCL12/CXCR4 permet l'activation et la prolifération des cellules étoilées hépatiques aboutissant au dépôt de matrice extracellulaire observé lors des hépatites chroniques à VHC. Mais à l'heure actuelle, aucune étude n'a mis en évidence le rôle de CXCL14 sur la voie CXCL12/CXCR4 dans le contexte des hépatites.

c. Résultats préliminaires : CXCL14 et les hépatites

Comme décrit précédemment, CXCL14 est exprimée par des cellules de la circulation sanguine et des barrières cutanées, lui suggérant un rôle de surveillance immunitaire (47). Le foie appartient également à la liste des organes participant à l'immunosurveillance de l'organisme. En effet, par sa vascularisation importante il est rapidement mis en contact avec les pathogènes présents dans la circulation sanguine ou transportés par les cellules du compartiment sanguin (1). Le foie est donc un organe immunitaire à part entière, et appartient à la première ligne de défense contre les infections.

Cependant, dans la littérature il n'existe que peu d'informations concernant l'expression de CXCL14 dans le foie. Il a été rapporté que CXCL14 était surexprimée chez les patients présentant un carcinome hépatocellulaire d'origine virale, suite à une infection le VHB ou le VHC (68, 69). Une étude menée par Li et *al.* a démontré que l'ARNm de CXCL14 était surexprimé dans le modèle d'hépatite aiguë toxique murine induite par l'injection de tétrachlorométhane (CCl₄) (72). Dans cette étude, l'utilisation d'anticorps bloquant CXCL14 entraîne une diminution de l'atteinte hépatique induite par l'injection de CCl₄ avec une diminution significative des zones de nécrose hépatocytaire. Dans ce contexte, il a également été observé une diminution de la mortalité des animaux suite à la défaillance hépatique provoquée par l'administration de CCl₄. Dans ce travail, des expériences de surexpression de CXCL14 ont été menées par l'utilisation d'un plasmide recombinant. La surexpression de CXCL14 dans ce modèle CCl₄ entraîne une aggravation de l'atteinte hépatique avec une nécrose hépatocytaire augmentée et une inhibition de la prolifération hépatocytaire permettant la régénération du tissu hépatique. Ces différentes données suggèrent donc que CXCL14 aurait un rôle dans les pathologies hépatiques.

Cependant, dans toute la littérature, aucune information concernant la production et la sécrétion de la chimiokine CXCL14 dans le contexte des hépatites n'est mentionnée.

Dans l'équipe, une étude préliminaire dans le modèle d'hépatite aiguë virale par l'injection du virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV-3) a été réalisée. Dans cette expérience, des souris ont été infectées par ce virus et l'expression de 350 gènes de l'inflammation a été évaluée, et parmi les gènes surexprimés se trouvait *cxcl14*. Ces résultats encourageants ont permis de poursuivre les expériences menées pendant ma thèse, et qui seront présentées dans la partie Résultats.

Par ailleurs, dans l'équipe, la concentration sérique des chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL12 et CXCL14 a été mesurée chez des patients présentant une hépatite aiguë de diverses étiologies (44). Le rôle des 3 premières chimiokines est relativement bien connu dans le contexte des hépatites, comme décrit précédemment. Cependant, c'est la première fois que la concentration sérique de CXCL14 était évaluée dans une cohorte de patients. De cette étude, nous avons observé que la concentration de CXCL14 était significativement augmentée chez les patients présentant une hépatite aiguë d'origine virale ou reliée à une cause vasculaire.

Ces premiers résultats obtenus dans l'équipe nous ont donc permis de continuer les expériences afin d'étudier l'expression et le rôle de la chimiokine CXCL14 dans le contexte des hépatites virales aiguës. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'Article n°1 dans le chapitre Résultats.

Comme décrit précédemment, CXCL14 possède également des fonctions antimicrobiennes lui suggérant un rôle dans la surveillance immunitaire systémique. Les résultats présentés dans l'Article n°2 traitent ainsi du rôle antimicrobien de la chimiokine CXCL14.

C. Les interleukines

Les interleukines sont des cytokines sécrétées qui se fixent à des récepteurs spécifiques et qui jouent un rôle dans la communication entre les cellules immunitaires (73). Elles sont classifiées en plusieurs familles selon des homologies de séquence, mais aussi selon leurs récepteurs ou fonctions similaires. Ainsi on distingue la famille de l'IL-1 comprenant 11 membres dont l'IL-18, qui sera détaillée par la suite, la famille de l'IL-2, la famille de l'IL-10, la famille de l'IL-12, la famille de l'IL-17.

Les interleukines ont majoritairement des fonctions pro-inflammatoires, mais peuvent aussi jouer des fonctions anti-inflammatoires comme c'est le cas pour les cytokines appartenant à la famille de l'IL-10. L'IL-10 est un facteur anti-inflammatoire qui régule de nombreuses réponses

immunitaires (74). Elle est produite par les monocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques. Elle est sécrétée sous forme d'homodimère constitué de deux sous-unités de 178 acides aminés chacune, avec un poids moléculaire d'environ 18 kDa. Le récepteur de l'IL-10 est constitué de deux chaînes, l'IL-10R1 et l'IL-10R2. En se fixant sur ses récepteurs, l'IL-10 a une action directe sur l'activité des monocytes et des macrophages en induisant la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II (75). L'IL-10 inhibe également l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et de leurs récepteurs (76). Enfin, l'IL-10 induit des voies de signalisation de survie, de prolifération et de différenciation des LB, ainsi que l'augmentation de la production des IgG. De nombreux modèles murins ont démontré l'importance de l'IL-10 dans la régulation de la réponse inflammatoire. Les autres membres de la famille de l'IL-10, tels que l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26 possèdent des homologies de structure et de récepteurs avec l'IL-10 mais leurs fonctions sont distinctes (73).

La famille de l'IL-12 comprend quatre membres dont l'IL-12, l'IL-23, l'IL-27 et l'IL-35 qui partagent le même récepteur et présentent des structures similaires. Cependant, leurs fonctions et leurs sources cellulaires diffèrent. L'IL-12 est le membre majeur de cette famille de cytokines. C'est une cytokine qui a été décrite comme étant un facteur de stimulation des cellules NK. C'est un hétérodimère constitué d'une chaîne légère de 35 kDa (p35) et d'une chaîne lourde de 40 kDa (p40) (77). Elle est produite par les monocytes activés, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. L'hétérodimère se lie sur son récepteur constitué de deux chaînes l'IL-12R β 1 et l'IL-12R β 2 (78), exprimé par les LT activés et les cellules NK. L'IL-12 stimule la réponse immunitaire de type T_H1 en induisant la production d'IFN γ . Cette interleukine est donc impliquée dans des réponses immunitaires antimicrobiennes par son action sur les cellules NK (79).

La famille de l'IL-1 comprend, à l'heure actuelle, onze membres (80). L'IL-1 a été la première interleukine décrite et à ce jour on distingue l'IL-1 α de l'IL-1 β qui sont différentes au niveau de leurs séquences et de leur source cellulaire, mais qui présentent des homologies de fonction (81). L'IL-1 β est sécrétée sous une forme de pro-IL-1 β sans activité biologique, clivée par la suite par la caspase 1 pour devenir active. L'IL-1 β se fixe sur son récepteur l'IL-1R1 pour induire des voies de signalisation intracellulaires, mais elle peut également se fixer sur le récepteur IL-1R2 qui agit comme un récepteur leurre qui n'induit pas de signalisation. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire qui a plusieurs fonctions dont la prolifération, la différenciation et l'activation de cellules immunitaires. Parmi les membres de la famille de l'IL-

1 qui ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire aux infections virales, on trouve l'IL-18, dont la voie de signalisation sera détaillée dans le chapitre suivant, mais aussi l'IL-33 (82).

L'IL-33 induit une réponse immunitaire pro-inflammatoire en se fixant sur son récepteur ST2, ce qui induit une homodimérisation du récepteur et le recrutement de la protéine accessoire IL-1RacP (83). Cette interleukine induit une réponse de type T_H2 , et l'expression du récepteur ST2 est augmentée dans de nombreux pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et l'asthme. La voie de l'IL-33 est régulée naturellement par la sécrétion d'une forme soluble de son récepteur ST2 par les fibroblastes, les macrophages et les monocytes en présence de LPS ou de $TNF\alpha$. La fraction soluble de ST2 va se lier à une fraction de l'IL-33 produite, sans induire de signaux pro-inflammatoires.

Un autre membre important dans la famille de l'IL-1 est l'interleukine-37, aussi nommée IL-1F. Cette cytokine est exprimée au niveau d'organes lymphoïdes tels que les ganglions, le thymus et la moelle osseuse, mais aussi au niveau des poumons, des testicules et de l'utérus (84). L'IL-37 est majoritairement produite par les monocytes. On distingue cinq variants appelés IL-1F7a-e. L'isoforme b est la forme majoritaire et présente de nombreuses homologies de séquence avec l'IL-18. L'IL-1F7b peut se lier au récepteur de l'IL-18 sans induire la production d' $IFN\gamma$, permettant ainsi de réguler la voie de l'IL-18 (85). Le $TGF-\beta$ ainsi que plusieurs ligands des TLR induisent sa production à forte concentration par les monocytes sanguins. De plus, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-18, l'IL-1 β et l' $IFN\gamma$ stimulent sa production (86), ce qui lui confère un rôle certain dans les infections virales. Il faut également noter que l'IL-37 n'est pas exprimée chez la souris (87).

a. Description de la voie IL-18

L'IL-18 appartient à la famille de l'IL-1, et est aussi appelée « *IFN-gamma inducing factor* ». Comme l'IL-1 β , l'IL-18 est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif de 24 kDa, dont l'activation nécessite l'action de la caspase 1. Le précurseur de l'IL-18 est constitutivement exprimé dans de nombreux tissus chez de nombreuses espèces, dont l'Homme et la souris. Il est notamment exprimé par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Le précurseur de l'IL-18 est également produit par les macrophages péritonéaux et de la rate, en condition physiologique (88). Cette cytokine est impliquée dans des processus de la réponse immunitaire mais aussi dans l'inflammation (89). L'IL-18 a été

initialement découverte par son rôle dans l'induction de la production d'IFN γ . Cependant l'IL-18 seule n'induit la production d'IFN γ qu'à de faibles concentrations, une production plus forte d'IFN γ par les LT nécessite la collaboration entre l'IL-12 et l'IL-18 (90).

Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules capables de sécréter l'IL-18 sous sa forme active. L'IL-18 agit en se fixant à son récepteur, l'IL-18R1 (ou IL-18R α). Cette interaction induit le recrutement d'une protéine accessoire, l'IL-18 *receptor accessory protein* (IL-18rap ou IL-18R β), et la production d'une protéine régulatrice, l'IL-18 *binding protein* (IL-18bp) (**Figure 15**). Le complexe formé de l'IL-18 et de ces récepteurs α et β permet la transduction du signal intracellulaire. La formation du complexe induit le recrutement de la protéine MyD88 qui se fixe sur les domaines TIR (Toll-IL-1 Receptor) des récepteurs à l'IL-18. On observe également de protéines complémentaires, telles que les protéines IRAK et TRAF-6, qui vont permettre l'activation de la voie NF- κ B (91). Le récepteur α de l'IL-18 est exprimé à la surface de la plupart des cellules, alors que le récepteur β n'est exprimé que par certaines cellules dont les lymphocytes T et les cellules dendritiques, et il n'est presque pas exprimé par les cellules mésenchymateuses.

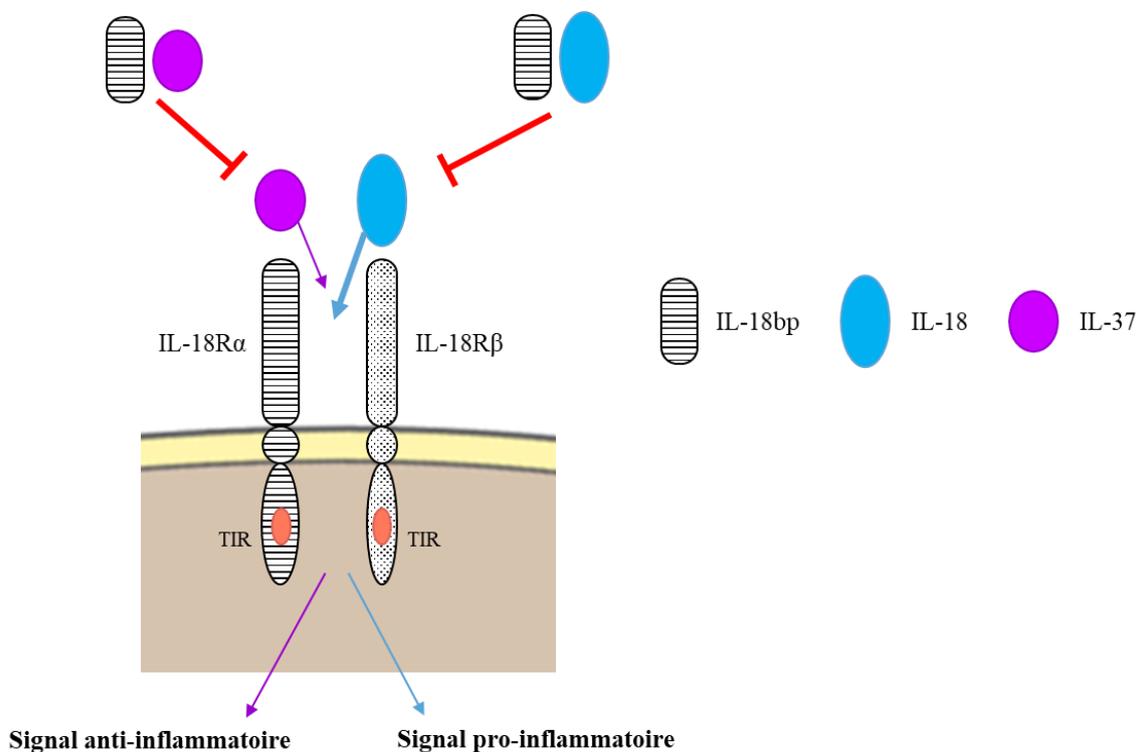


Figure 15 : Rôle de la protéine IL-18bp sur les voies de signalisation induites par l'IL-18 et par l'IL-37 chez l'Homme. D'après Dinarello et al.

L'expression de l'IL-18 a été décrite dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (89). De plus, il a été décrit que des souris déficientes pour l'IL-18 étaient plus susceptibles aux infections bactériennes par *L. major* et *S. aureus* en comparaison à des souris sauvages (92). L'induction de la production d'IFN γ par l'IL-18 est essentiel dans la lutte de l'organisme contre les pathogènes, elle a notamment un rôle de protection dans les infections virales (91, 92). Dans un modèle murin d'infection au HSV-1, l'injection d'IL-18 permet d'augmenter le taux de survie des souris. Dans l'étude menée par Fujioka *et al.* (95), il a été mis en évidence que le rôle de l'IL-18 en tant qu'agent antiviral fonctionnait par l'action de l'IFN γ . De plus, il a été démontré que l'expression de l'IL-18 est stimulée par la présence de virus *in vitro* et *in vivo* (94, 95). Cependant, certains virus de la famille des *Poxvirus*, ont mis en place des mécanismes d'échappement de la réponse antivirale induite par l'IL-18 en stimulant la production de son inhibiteur naturel, la protéine IL-18bp.

b. Rôle de la protéine IL-18bp

L'IL-18bp permet de contrôler l'activité biologique de l'IL-18, en se liant à celle-ci et en empêchant ainsi sa fixation sur le récepteur IL-18R1 (91). C'est la balance IL-18/IL-18bp qui permet de réguler cette voie (**Figure 15**). On observe souvent une perturbation de cette balance dans des conditions pathologiques, où l'IL-18 se trouve libre à de fortes concentrations dans la circulation sanguine (91).

L'IL-18bp est une protéine constitutivement sécrétée, et présentant une très forte affinité pour l'IL-18 (Kd = 400 pM) (98). On la trouve à une concentration 20 fois plus élevée que la cytokine IL-18 dans le sérum humain (99). Chez un sujet sain, la concentration plasmatique de l'IL-18bp est d'environ 2 000 pg/mL et celle de l'IL-18 d'environ 100 pg/mL. La protéine IL-18bp partage une structure immunoglobuline similaire à la chaîne α du récepteur de l'IL-18, elle fonctionne ainsi comme un récepteur leurre. Le rôle de l'IL-18bp dans la réponse immunitaire est, en se liant à l'IL-18, de diminuer la réponse de type T_H1 et donc la production d'IFN γ (100). L'ensemble des pathologies mobilisant l'action de l'IFN γ est impacté par la balance IL-18/IL-18bp.

Chez l'Homme, l'IL-18bp est également capable de se lier à l'IL-37, une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires, dont l'activité biologique peut être affectée par son interaction avec l'IL-18bp (**Figure 15**) (101). L'IL-37 n'est pas exprimé naturellement chez la souris. Des

études d'expression de cette cytokine chez les souris ont démontré une résistance de ces souris à développer plusieurs pathologies inflammatoires telle qu'une colite (102).

L'expression de l'IL-18bp est finement régulée et notamment *via* l'IFN γ (103). L'interféron-gamma produit en réponse à une forte concentration d'IL-18 va ainsi stimuler la production de l'IL-18bp pour effectuer un rétrocontrôle négatif de la voie IL-18. Comme décrit précédemment, l'IFN γ joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire antivirale. Naturellement, l'IL-18 et la protéine IL-18bp se trouvent également impliquées dans cette réponse antivirale. Cependant, à l'heure actuelle, peu de travaux se sont intéressés au rôle de la voie de l'IL-18 et de l'IL-18bp dans le contexte des infections virales.

c. Travaux réalisés par l'équipe du Pr Casanova (IMAGINE, Paris)

L'équipe du Pr JL Casanova de l'Institut IMAGINE de l'Hôpital Necker à Paris s'est intéressée au rôle de la voie IL-18 dans les hépatites virales fulminantes (104). En effet, cette équipe a réalisé le séquençage de génome de différentes familles dans lesquelles des cas d'hépatites virales fulminantes (HVF), dues à l'infection par le VHA ou le VHE majoritairement, sont survenus afin de déterminer s'il existait des prédispositions génétiques au développement d'HVF.

Le résultat de ces séquençages a montré que, chez les patients ayant développé une HVF, il existait une mutation à l'état homozygote du gène *il18bp*. Le transcrypt non muté de l'IL-18bp contient cinq exons et code pour une protéine de 194 aa de structure bien définie (**Figure 16**). Dans sa partie N-terminale, les aa 1 à 30 forment le peptide signal, alors que les aa 31 à 166 forment un domaine *immunoglobulin(Ig)-like* permettant l'interaction avec l'IL-18.

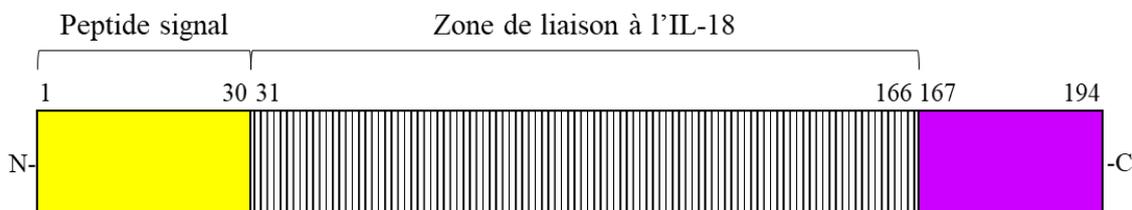


Figure 16 : Structure de la protéine IL-18bp. D'après Belkaya et al.

La mutation observée chez les patients entraîne un épissage alternatif aboutissant à l'absence d'une partie des nucléotides de l'exon 5 et affectant la formation du domaine *Ig-like* et le domaine C-terminal de la protéine. *In vitro*, il a été démontré que la mutation chez ces patients entraîne la production d'une IL-18bp non fonctionnelle, ne permettant pas de bloquer la voie de l'IL-18 et la production d'IFN γ .

Des marquages par immunohistochimie ont également été réalisés sur les foies de patients présentant une HVF avec la mutation sur le gène *il18bp*, en comparaison avec des foies contrôles. Dans les foies de patients présentant la mutation *il18bp*, une forte infiltration immunitaire a été observée, avec la présence de LT, de cellules NK, de LB, de macrophages, par rapport au tissu sain. De plus, chez ces patients, une forte expression d'IL-18 a été retrouvée dans les macrophages et les hépatocytes en comparaison à ce qui est observé dans le foie sain. L'absence de l'IL-18bp chez les patients présentant la mutation entraîne donc une réponse immunitaire antivirale très forte avec la production exacerbée d'IL-18 et le recrutement de nombreuses cellules immunitaires pro-inflammatoires.

Enfin, dans cette étude, il a été démontré que l'IL-18 présentait une certaine toxicité sur les hépatocytes en induisant le recrutement et l'activation des cellules NK et les LT cytotoxiques. *In vitro*, l'équipe a démontré que les cellules NK activées par l'IL-18 tuaient de façon importante les hépatocytes, et que l'ajout d'IL-18bp permettait d'inhiber cette hépatotoxicité de l'IL-18.

L'ensemble de l'étude menée par l'équipe du Pr Casanova a donc permis de mettre en évidence un rôle de l'IL-18bp dans le contexte des hépatites virales fulminantes, en contrôlant la voie de l'IL-18. C'est dans ce contexte que nous avons étudié le rôle de la protéine IL-18bp dans un modèle murin d'HVF induite par l'injection du virus MHV-3, dont l'ensemble des résultats sont présentés dans l'Article n°3 de la partie Résultats.

Afin d'étudier le rôle de la chimiokine CXCL14 et de la protéine IL-18bp, nous avons entre-autre utilisé des modèles murins d'hépatites, dont nous allons expliquer l'intérêt dans le chapitre suivant.

5. Modèles d'hépatite chez la souris

A. Généralités

Les modèles murins permettant l'étude des maladies hépatiques aiguës ou chroniques sont nombreux dans la littérature. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle parfait. Chacun présente des avantages et des inconvénients, ne permettant pas toujours de transposer les résultats obtenus à ceux observés dans la pathologie humaine.

Dans le cadre de cette thèse, toutes les expérimentations réalisées *in vivo* ont été réalisées sur des souris (*mus musculus*) qui est un des modèles de recherche le plus utilisé, puisque les souris représentent 59% des animaux de laboratoire, devant les poissons (16%) et les rats (9%) (105).

Les souris utilisées appartiennent à la lignée des C57Bl/6 qui est une des lignées les plus décrites dans la littérature scientifique. L'ensemble des expérimentations a été réalisé exclusivement sur cette lignée de souris afin de pouvoir comparer les résultats entre les différentes manipulations. En effet, chaque lignée de souris (ex : C57Bl/6, Balb/C, etc...) possède des variations d'expression de gènes et notamment concernant les gènes codant pour des composants du système immunitaire (106).

Nous avons, au sein de cette lignée C57Bl/6, également distingué les souris C57Bl/6J des souris C57Bl/6N qui ont des systèmes immunitaires différents, à l'état de base et en réponse à une infection (107). Pour cette thèse, des souris génétiquement modifiées, déficientes pour la chimiokine CXCL14 ou la protéine IL-18bp ont été utilisées. Les souris de la souche CXCL14 appartiennent à la lignée C57Bl/6N, alors que les souris déficientes pour l'IL-18bp sont des C57Bl/6J.

Chez la souris, plusieurs modèles d'étude des hépatites sont décrits et fréquemment utilisés en fonction du type d'hépatite que l'on veut étudier. Par exemple, il est possible de modéliser chez la souris, *via* une alimentation adaptée et riche en lipides et en hydrates de carbone, une hépatite métabolique de type NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*) (82). De même les hépatites toxiques peuvent être modélisées par l'administration de paracétamol ou de tétrachlorométhane (CCl₄), par l'ajout d'alcool dans l'eau de boisson, et les hépatites de type auto-immune par l'injection d'une protéine, la concanavaline A (ConA) (108). Enfin, pour modéliser les hépatites virales, le modèle le plus utilisé est celui de l'inoculation du virus de l'hépatite murine (MHV) qui sera détaillé dans le chapitre suivant.

Ces différents modèles ne sont pas exactement identiques à la pathologie humaine, mais ils permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents afin d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques, voire de tester de nouveaux composés pharmacologiques.

B. Modèle d'étude des hépatites virales par l'inoculation du MHV-3

Le virus MHV-3 permet, chez la souris, d'étudier les hépatites d'origine virale afin de mieux comprendre les mécanismes immunitaires mobilisés lors de la réponse antivirale. Ce virus à ARN simple brin appartient à la famille des *coronavirus*. 25 souches différentes de MHV ont été identifiées, mais le MHV-3 est le plus virulent d'entre eux. Le MHV-3 a un tropisme majoritairement hépatocytaire, mais il est également capable d'infecter les macrophages et d'accéder au SNC (109).

Par son action au niveau hépatique mais aussi cérébral, il induit chez la souris une hépatite fulminante avec le décès des souris observé entre cinq et sept jours post-inoculation, en utilisant une dose suboptimale. Cette dose permet d'induire une hépatite avec la mobilisation des cellules immunitaires pour tenter de résoudre l'infection, sans que les souris ne meurent trop rapidement de cette hépatite. Différents paramètres sont pris en compte pour évaluer l'hépatite chez la souris, dont certains sont aussi utilisés chez l'Homme. Le premier paramètre évalué est le niveau d'activités des transaminases hépatiques (aspartate amino-transférase, ASAT et alanine amino-transférase, ALAT). Suite à l'inoculation du MHV-3, l'augmentation de l'activité des ASAT et des ALAT témoignent de l'infectiosité du virus et du début de l'atteinte hépatique (82). D'autres paramètres comportementaux sont également pris en compte comme l'isolement social et le manque de prise de nourriture des souris malades. Enfin, quelques heures avant leur décès, les souris qui n'ont pas contrôlé l'infection présentent un pic de fièvre avec une baisse significative de la température corporelle de l'animal.

Comme décrit dans le chapitre précédent, chaque lignée de souris possède des réponses immunitaires qui lui sont propres. Si bien que la dose de virus injectée aux souris a été adaptée selon la souche. Les souris C57Bl/6N ont montré une sensibilité accrue au virus par rapport aux souris C57Bl/6J. Pour nos expérimentations, et comme cela sera détaillé dans le paragraphe « Matériel et méthodes », les souris de la souche CXCL14 déficiente ont reçu une dose plus faible de MHV-3 que les souris de la souche IL-18bp déficiente.

L'utilisation du virus MHV-3 permet donc l'étude des réponses immunitaires lors d'une hépatite virale, comme cela fonctionne chez l'Homme. Cependant, les mécanismes d'action du MHV-3 ne sont pas transposables aux différents virus de l'hépatite humaine (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE). En effet, le MHV-3 est un virus cytolytique entraînant une lyse primaire des hépatocytes infectés. Les virus des hépatites humaines, eux, ne sont pas cytolytiques et la lyse hépatocytaire observée dans ces infections est secondaire et liée à l'action des cellules du système immunitaire comme les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, le virus de l'herpès simplex (HSV), capable de déclencher une hépatite fulminante chez l'Homme, présente des mécanismes d'action similaires à ceux du MHV-3 avec l'induction d'une lyse hépatocytaire primaire.

Pour conclure, le MHV-3 est le seul modèle, à l'heure actuelle, nous permettant de modéliser *in vivo* une hépatite virale aiguë chez la souris. Les résultats obtenus chez les souris infectées par le MHV-3 nous permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mobilisés pour lutter contre l'infection virale. Cependant, cela reste délicat de comparer les résultats obtenus chez la souris à ceux observés chez l'Homme au cours d'une infection virale du fait des différents mécanismes d'action des virus.

C. Réponse immunitaire dans l'hépatite induite par le MHV-3

Comme décrit dans le paragraphe précédent, le MHV-3 est le modèle le plus utilisé *in vivo* pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse immunitaire antivirale.

Le foie est un organe riche en cellules NK et NKT. Ces cellules, qui jouent un rôle de première défense immunitaire, ont également été décrites comme participant à la réponse immunitaire suite à l'infection par le MHV-3. Les cellules NK et NKT sont en effet recrutées au niveau hépatique suite à l'inoculation du virus, et une déplétion de ces cellules est observée au niveau des organes lymphoïdes tels que la rate (110). Les cellules NK retrouvées au niveau hépatique présentent une activité cytotoxique importante contre les cellules hépatiques infectées. Il a également été démontré que le MHV-3 était capable d'infecter les cellules NK et les cellules NKT, ce qui induit leur lyse.

Cependant d'autres cellules hépatiques, telles que les cellules endothéliales (LSEC) et les cellules de Kupffer (KC) sont permissives à l'infection par le MHV-3 et vont donc intervenir dans la médiation de la réponse immunitaire antivirale (111). Le rôle de ces cellules dans la

réponse antivirale passe par les cytokines que chacune des populations cellulaires peut produire. Ainsi, chez les souris infectées par le MHV-3 une faible production de cytokines hépatiques anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, le TGF β et la prostaglandine-E₂, a été observée, et est associée à une augmentation du nombre de LSEC et de KC en apoptose. L'absence de ces cytokines anti-inflammatoires au niveau du foie induit un microenvironnement hépatique très inflammatoire et favorable à l'apoptose de nombreuses cellules. Les macrophages, suite à la fixation du MHV-3 sur leur TLR2, vont produire un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α .

Dans la littérature, l'équipe du Pr Lamontagne (UQAM, Montréal) a également décrit que l'infection par le MHV-3 est accompagnée d'une immunodéficience en lymphocytes B et T dans la rate, trois à cinq jours post-inoculation (109, 110). Cette immunodéficience en lymphocytes dans la rate entraîne une atrophie de l'organe et des lésions observables au niveau histologique. Cette déplétion en LT et LB est due à la réplication du MHV-3 au sein de ces cellules lymphoïdes entraînant par la suite la lyse cellulaire. De ce fait, l'infection par le MHV-3 ne s'accompagne pas d'un recrutement de ces cellules au niveau hépatique.

Pour compléter les résultats obtenus *in vivo* par l'inoculation du MHV-3 chez la souris concernant l'étude de l'expression et du rôle de la chimiokine CXCL14, nous avons travaillé sur des modèles cellulaires primaires *in vitro*.

6. Modèles d'études *in vitro* sur cellules primaires

Afin d'étudier les mécanismes cellulaires responsables de l'expression et de la sécrétion de la chimiokine CXCL14, nous avons réalisés des études *in vitro* en complément des études réalisées *in vivo* chez la souris, comme décrit précédemment.

Concernant ces études *in vitro*, plusieurs choix étaient possibles : soit le travail sur des lignées de cellules hépatiques, soit un travail avec des cellules primaires hépatiques. Chacune de ces possibilités présente des avantages et des inconvénients, comme nous allons le discuter par la suite et comme cela est résumé dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Principales caractéristiques des lignées cellulaires hépatocytaires et des hépatocytes primaires.

Cellules	Origine	Avantages	Inconvénients	Références
Huh-7	Carcinome hépatocellulaire humain	Sensibilité accrue au VHC Prolifération +++	Forte hétérogénéité cellulaire Mutation sur le gène p53 Très peu différenciées Pas d'expression des CYP450 Peu de métabolismes hépatocytaires	S. Choi, Xenobiotica. 2009 Mar; 39(3): 205-217
HepG2	Carcinome hépatocellulaire humain	Métabolismes des protéines Production de bile Prolifération +	Faible niveau de différenciation Faible expression des CYP450	WM.Westerink, Toxicol In Vitro. 2007 Dec;21(8):1581-91
HepaRG	Carcinome hépatocellulaire humain	Différenciation ++ Métabolismes similaires aux PHH Expression classique des CYP450 Faible hétérogénéité cellulaire	Faible prolifération DMSO nécessaire à la différenciation	C.Aninat, Drug Metab Dispos. 2006 Jan;34(1):75-83
PHH	Foie sain péri-tumoral	Cellules de référence Différenciation +++ Expression des CYP450 Métabolismes classiques	Grande variabilité interindividus Pas de prolifération <i>in vitro</i> en 2D	H. H. J. Gerets, Cell Biol Toxicol. 2012 Apr; 28(2): 69-87

A. Les différentes lignées cellulaires hépatocytaires

La plupart des études menées *in vitro* sont réalisées à partir de lignées cellulaires. Parmi les lignées cellulaires hépatocytaires les plus utilisées, des moins différenciées au plus différenciées, on retrouve les Huh7, les HepG2 et les HepaRG.

Les Huh7, cellules peu différenciées en hépatocytes, ont l'avantage de proliférer rapidement ce qui facilite le nombre d'expérimentations réalisées. Cependant, du fait qu'elles soient peu différenciées, celles-ci n'expriment pas tous les récepteurs et les cytochromes spécifiques des hépatocytes (114). Les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces cellules ne permettent pas une extrapolation à des hépatocytes.

Les HepG2 possèdent une morphologie de type épithéliale et sont une lignée immortalisée issue d'un carcinome hépatocellulaire. Ces cellules ont la capacité de produire certaines protéines hépatocytaires telles que l'albumine et les protéines de la phase aiguë (le fibrinogène, le plasminogène etc...). Ce sont des cellules polarisées avec un pôle basal et un pôle apical où l'on retrouve des structures proches des canalicules biliaires (115), ce qui fait qu'elles sont très utilisées dans les études concernant le métabolisme hépatique. Cependant elles sont peu utilisées dans les expérimentations sur les infections virales hépatiques car elles n'expriment pas tous les récepteurs membranaires des hépatocytes et notamment le récepteur au virus de l'hépatite B.

Les HepaRG, quant à elles, ont la capacité d'être différenciées en cellules dites « hépatocyte-like » en présence de Diméthylsulfoxyde (DMSO) dans le milieu de culture (116). Ainsi, leur architecture tridimensionnelle est proche de celle des hépatocytes. De plus, au cours de leur différenciation il a été décrit qu'elles exprimaient les récepteurs spécifiques des hépatocytes et étaient capables de sécréter des protéines spécifiques aux hépatocytes, comme l'albumine ou la lactate déshydrogénase. Cependant, l'utilisation de DMSO dans le milieu de culture peut fortement influencer les mécanismes de signalisation intracellulaires. De plus, une fois différenciées, ces cellules ne prolifèrent presque plus et leur temps de vie en cellules différenciées est limité dans les modèles de culture classique en 2 dimensions.

B. Travaux réalisés à partir d'hépatocytes primaires

Comme vu précédemment, les lignées cellulaires hépatocytaires ont un inconvénient majeur qui est qu'elles n'expriment pas tous les récepteurs spécifiques des hépatocytes. Elles n'ont pas

non plus toute la machinerie intracellulaire des hépatocytes primaires ce qui limite les conclusions quant aux résultats obtenus avec ces cellules. C'est pour cela que nous avons fait le choix de travailler exclusivement avec des hépatocytes primaires humains et murins.

Il faut cependant noter que les hépatocytes primaires sont des cellules difficiles à conserver en culture classique (2 dimensions, 2D) car elles se différencient assez rapidement et perdent donc leurs fonctions d'hépatocytes. Leur temps d'utilisation est donc assez court, huit jours pour les hépatocytes humains et jusque quinze jours pour les hépatocytes murins en culture 2D. Des équipes travaillent actuellement sur des modèles de culture 3D afin d'optimiser l'environnement de culture des cellules primaires, se rapprochant des conditions physiologiques. En effet, dans ces modèles 3D, les cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire (de collagène ou de matrigel) comme dans le foie (110, 111).

De plus, ces cellules primaires ne prolifèrent pas. Nous avons donc un nombre restreint de cellules qui doit être optimisé pour réaliser un ensemble d'expérimentation. Ceci complique particulièrement les expérimentations sur les hépatocytes humains. En effet, ceux-ci sont isolés à partir d'une biopsie de foie sain chez un patient ayant un cancer colorectal avec des métastases hépatiques. Ces patients ont été opérés au sein de l'hôpital de Rennes et la purification des hépatocytes humains a été réalisée par la société Biopredic à St-Grégoire (Ille-et-Vilaine). Ces opérations restent rares (1 à 2 par semaine), et le nombre d'hépatocytes ainsi que leur qualité sont assez variables d'une purification à l'autre.

Concernant les hépatocytes murins, nous avons développé dans l'équipe, une technique de purification de ces cellules à partir de foie de souris en réalisant une perfusion hépatique avec une solution de collagénase. Ici aussi, le rendement (quantité et qualité) de cellules est assez variable, mais l'avantage est de réaliser un plus grand nombre d'expérimentations car la programmation de l'obtention de ces cultures est à la demande, et, par ailleurs, nous pouvons avoir accès à des hépatocytes déficients dans certains gènes dès lors que nous disposons au laboratoire de la lignée de souris déficientes pour ce gène au niveau hépatocytaire.

Ainsi, nous avons débuté nos expérimentations concernant l'expression de la chimiokine CXCL14 sur des hépatocytes murins. L'avantage majeur d'utiliser des cellules primaires est que ces cellules sont physiologiquement très proches que celles de l'organisme entier, ainsi les résultats obtenus *in vitro* peuvent plus facilement être extrapolés aux résultats obtenus *in vivo*.

7. Réponse immunitaire à une infection systémique microbienne

Les principales fonctions du système immunitaire (SI) sont de prévenir les infections et d'éradiquer les infections déclarées. Pour cela, deux composantes du SI ont été décrites (**Figure 17**) : l'immunité innée qui consiste en la protection initiale contre les infections, et l'immunité adaptative qui consiste en une défense tardive mais plus efficace de lutte contre les infections. Chez un individu dont l'immunité acquise n'est pas complètement opérationnelle conduit à une augmentation de l'individu aux infections environnantes.

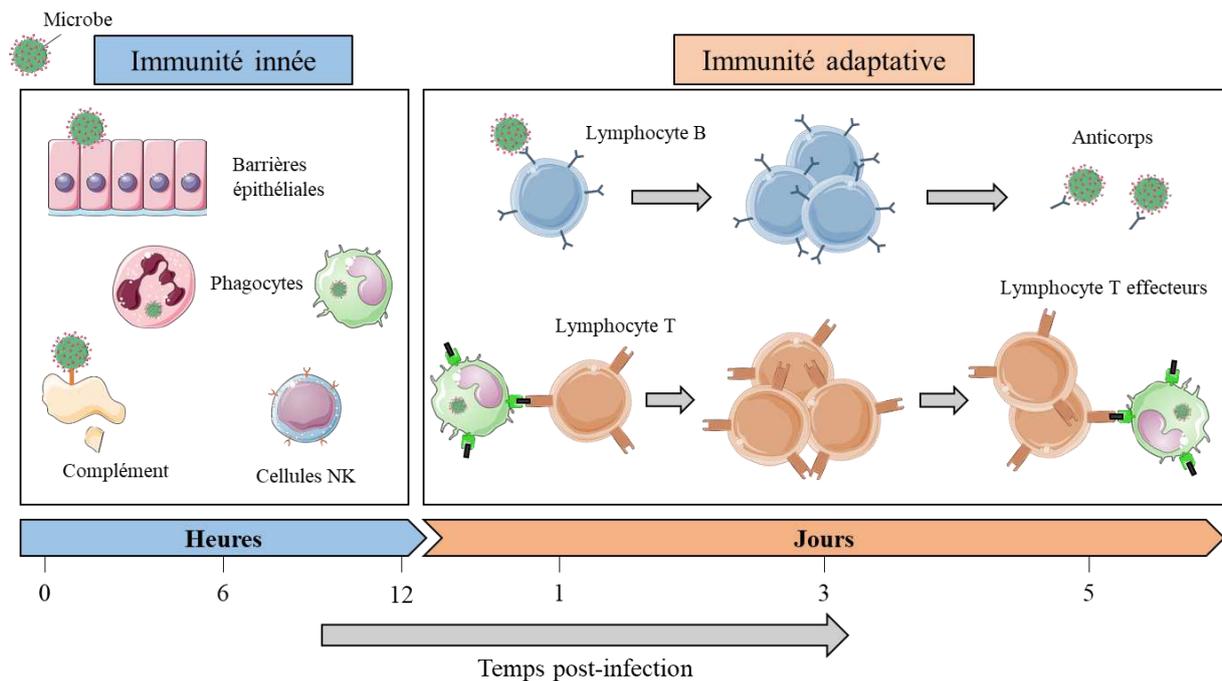


Figure 17 : Principaux mécanismes et acteurs de l'immunité innée et adaptative. D'après de *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, A.ABBAS.

Les infections microbiennes peuvent survenir n'importe où dans l'organisme, et certains pathogènes infectieux sont capables d'infecter et de vivre à l'intérieur des cellules de l'hôte. Parmi ces pathogènes infectieux qui survivent à l'intérieur des cellules, on trouve les virus qui infectent des cellules et vivent dans le cytoplasme de ces cellules.

A. L'immunité innée

C'est un mécanisme de défense précoce et puissant capable de contrôler et d'éradiquer les infections avant que l'immunité adaptative ne soit activée. Son rôle est également d'informer

et d'activer l'immunité adaptative pour des réponses plus efficaces en cas de nouvelle infection. Elle ne présente pas de mémoire immunologique.

L'action de l'immunité innée passe par la reconnaissance de structures partagées par différentes classes de microbes (comme les champignons, les bactéries, les parasites et les virus) appelées PAMP ou « *Pathogen Associated Molecular Pattern* » reconnus par des récepteurs spécifiques appelés PRR ou « *Pattern Recognition Receptor* ». Ces récepteurs sont exprimés sur toutes les cellules d'une lignée particulière comme par exemple les macrophages, permettant la reconnaissance d'un même microbe par un grand nombre de cellules (119).

L'immunité innée est constituée des épithéliums qui forment la première barrière de défense naturelle aux microbes, des phagocytes comme les macrophages et les cellules Natural Killer (NK), et enfin des protéines plasmatiques comme les constituants du complément et les cytokines.

a. Les barrières épithéliales

Les épithéliums continus comme la peau, le tractus respiratoire et le tractus gastro-intestinal composent ces barrières épithéliales. Elles interagissent physiquement avec les microbes et produisent des molécules antibactériennes peptidiques. On retrouve dans ces épithéliums des lymphocytes particuliers appelés lymphocytes intraépithéliaux (ou $LT\gamma\delta$) qui ont un rôle de sentinelle, mais aussi les LB-1 dans la cavité péritonéale qui jouent le même rôle de sentinelle et qui agissent par la production d'immunoglobulines particulières, les IgM.

b. Les neutrophiles et les monocytes/macrophages

Ces cellules sanguines sont recrutées au niveau des sites d'infection pour reconnaître les microbes et les phagocyter.

- Les neutrophiles

Leur concentration sanguine est comprise entre 4 000 et 10 000 cellules/cm³ de sang. En cas d'infection, leur production est activée dans la moelle osseuse et leur nombre augmente rapidement pouvant dépasser les 20 000 cellules/cm³ de sang. Leur rôle est d'ingérer le microbe pour stopper l'infection (120).

- Les monocytes et macrophages

La concentration sanguine des monocytes se situe entre 500 à 1 000 cellules/mm³ de sang. Leur rôle principal est d'ingérer les microbes du sang et des tissus. Les monocytes peuvent rester dans les tissus pendant de longues périodes où elles se différencient en macrophages.

Les macrophages résidents sont présents dans les tissus et vont produire, suite à leur activation après l'entrée d'un microbe dans l'organisme, des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 (121). Ces cytokines agissent au niveau des cellules endothéliales qui s'activent et expriment alors des molécules d'adhésion qui vont reconnaître des récepteurs à la surface des neutrophiles et des monocytes circulants qui se retrouvent fixés sur les endothéliums. Les cellules endothéliales activées vont également produire des chimiokines, qui seront présentes en gradient dans la circulation sanguine. Ces dernières permettent une augmentation de l'affinité des intégrines, récepteurs membranaires à la surface des neutrophiles et monocytes, pour leur récepteur présent à la membrane des cellules endothéliales ce qui permet de bloquer les leucocytes sur un site bien précis. Enfin les chimiokines vont stimuler la migration des leucocytes sanguins vers un site d'infection extravasculaire : c'est l'extravasation (122).

Les neutrophiles et les macrophages reconnaissent les microbes présents dans le sang et les tissus extravasculaires par l'intermédiaire de récepteurs de surface spécifiques. On trouve par exemple la famille des TLR qui sont spécifiques de différents constituants des microbes. On peut citer, entre autres, le TLR-4 qui reconnaît le LPS bactérien, ou les TLR-3 et 7 qui reconnaissent l'ARN viral. Les signaux générés par la reconnaissance du TLR à sa cible activent le facteur de transcription NF- κ B qui stimule la production de cytokines, d'enzymes et d'autres protéines participant aux fonctions antimicrobiennes des phagocytes activés (119, 121). À côté de la fonction de phagocytose, les macrophages produisent des cytokines qui jouent le rôle de médiateurs des défenses immunitaires de l'hôte, et des facteurs de croissance et enzymes indispensables au remodelage du tissu lésé. Enfin ils participent à l'immunité cellulaire de l'immunité adaptative par leur dialogue avec les lymphocytes T (LT) (121).

c. Les cellules Natural Killer (NK)

Ces cellules appartiennent à la classe des lymphocytes qui répondent aux microbes intracellulaires en tuant les cellules infectées, et en produisant une cytokine particulière, l'interféron- γ (IFN- γ) qui a la particularité d'activer les macrophages.

Elles représentent environ 10% des lymphocytes sanguins et des organes lymphoïdes secondaires (OLS). On retrouve dans leur cytoplasme de nombreux granules riches en molécules ayant la capacité de créer des pores dans les cellules infectées et induisant leur mort par apoptose. Certaines cytokines produites et sécrétées par les macrophages ayant phagocytés un microbe, comme l'IL-12 et l'IL-18, favorisent l'activation des cellules NK. Une fois activées, les cellules NK vont synthétiser et sécréter de l'IFN- γ qui active les macrophages afin d'augmenter leur efficacité à détruire les microbes phagocytés. On peut donc dire qu'il existe une réelle coopération entre les cellules NK et les macrophages pour l'élimination des microbes intracellulaires tels que les virus (123).

d. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Ces cellules sont présentes au niveau des barrières naturelles de l'organisme. Leur fonction est de capturer les antigènes (Ag) et de les transporter jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (OLS), lieu de contact avec les lymphocytes de l'immunité adaptative. Parmi les CPA, on retrouve principalement les cellules dendritiques et les macrophages qui vont capturer les Ag protéiques microbiens pour les présenter aux LT dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et induire leur activation (120, 123).

Dans les épithéliums, ces CPA sont qualifiées de cellules « immatures » car elles ne sont pas capables de stimuler la réponse immunitaire médiée par les LT. La production de TNF et d'IL-1 par les cellules épithéliales ou les macrophages activés entraîne la migration des CPA vers les organes lymphoïdes, durant laquelle elles effectuent une maturation afin d'être en capacité d'activer les LT. Cela se traduit notamment par l'augmentation de la synthèse et de l'expression des molécules du CMH présentant l'Ag aux LT (9, 121).

Dans le cas des infections virales, les CPA participent à l'initiation des réponses de l'immunité adaptative *via* les lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺, cf. chapitre sur l'immunité adaptative) contre les antigènes microbiens intracellulaires. Les mécanismes mis en jeu dans ce type de réaction immunitaire ne sont pas très bien décrits par la littérature scientifique. Cependant, l'un des mécanismes vraisemblables est que les CPA vont ingérer les cellules de l'hôte infectées pour présenter les antigènes se trouvant dans les cellules infectées afin qu'ils soient reconnus par les LT CD8⁺. Ce processus porte le nom de présentation croisée, où les CPA présentent les Ag d'autres cellules infectées pour stimuler les LT naïfs et induire une réponse immunitaire (124).

Le rôle des CPA n'est pas exclusivement la présentation des peptides afin qu'ils soient reconnus par les LT, mais en réponse à des microbes elles expriment des « seconds signaux » pour l'activation des LT. Parmi ceux-ci, on retrouve l'expression de molécules de costimulation par les CPA ainsi que la sécrétion de cytokines reconnues par leur récepteur à la surface des LT. Ils ont pour objectif de stimuler la prolifération et la différenciation des LT (121, 123, 124).

e. Le système du complément

C'est un ensemble de protéines circulantes et associées aux membranes qui jouent un rôle dans la défense de l'organisme contre les microbes. Parmi les protéines, un certain nombre d'entre-elles sont des enzymes protéolytiques qui permettent l'activation du complément.

La cascade du complément peut être activée par l'une des trois voies suivantes (126) : la voie alterne, la voie classique ou la voie des lectines. Il faut retenir que les trois voies du complément diffèrent quant à leur activation initiale mais partagent les mêmes étapes tardives de cascades protéolytiques effectrices. Les protéines du complément fonctionnent comme des enzymes protéolytiques qui vont cliver d'autres protéines du complément. La protéine centrale du complément est la protéine plasmatique C3, clivée dans les étapes initiales par des enzymes qui vont produire le fragment C3a et le fragment principal C3b. Ce fragment C3b recouvre la surface du microbe pour permettre la liaison des phagocytes exprimant le récepteur du C3b. Des produits de dégradation enzymatique, comme le C3a, sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes, favorisant ainsi l'inflammation au niveau du site d'infection.

f. Les cytokines de l'immunité innée

Suite à l'entrée des microbes dans l'organisme, les macrophages vont sécréter des cytokines qui ont un rôle de médiateurs dans un grand nombre de réactions cellulaires de l'immunité innée (**Figure 18**) (33, 126).

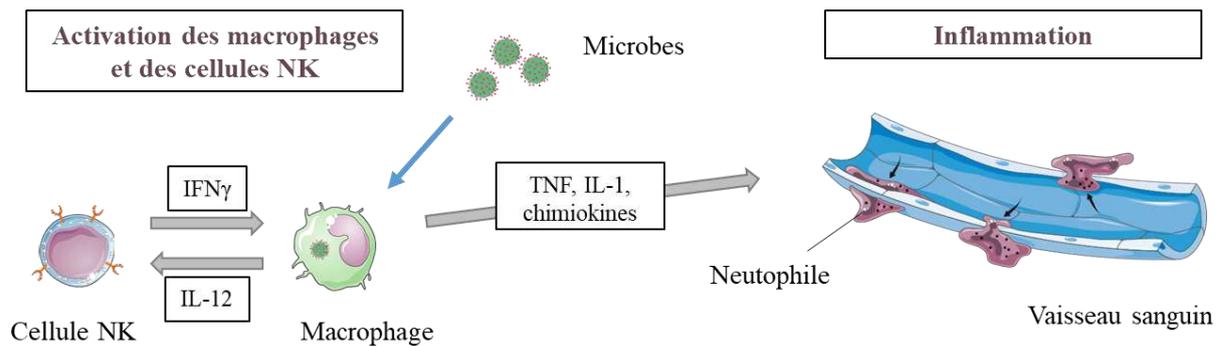


Figure 18 : Rôles des différentes cytokines dans l'immunité innée. D'après de *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, A.ABBAS.

Comme décrit précédemment, les cytokines se lient à des récepteurs de haute affinité présents sur les cellules cibles. Dans l'immunité innée, les cytokines assurent des fonctions variées dans les défenses de l'hôte, c'est ainsi que l'on peut définir différentes familles de cytokines selon leurs cellules de production, leurs cellules cibles et leur rôle. Le TNF, les cytokines de la famille de l'IL-1 et les chimiokines sont les principales cytokines participant au recrutement des neutrophiles et des monocytes sanguins vers le site d'infection (30). Dans le contexte des infections virales, les macrophages et les autres cellules infectées produisent des cytokines spécifiques : les interférons de type I. Ils ont pour rôle de bloquer la réplication virale et empêcher la propagation de l'infection aux cellules non infectées (128).

g. Rôle de l'immunité innée dans la stimulation de l'immunité adaptative

La réponse immunitaire innée génère la production et la sécrétion de molécules qui assurent la fonction de « seconds signaux » pour activer les lymphocytes B et T. Le premier signal est constitué du microbe (ou de l'antigène lui-même) qui active les réponses immunitaires innées qui vont à leur tour, et après activation, générer des seconds signaux. Ces seconds signaux sont dépendants de l'antigène et assurent que les lymphocytes répondent aux agents infectieux et non à des substances inoffensives.

Par exemple, l'IFN γ produit par les cellules NK en réponse à la présence de microbes stimule les cellules de l'immunité innée (comme les macrophages et les cellules dendritiques) qui vont produire à leur tour des seconds signaux pour activer les LT. Dans un premier temps, les macrophages et les cellules dendritiques expriment, à leur surface, des molécules de costimulation se liant à des récepteurs présents à la membrane des LT naïfs pour les activer. Par

la suite, les macrophages et les cellules dendritiques sécrètent de l'IL-12 qui a pour but de stimuler la différenciation des LT naïfs en cellules effectrices de l'immunité adaptative à médiation cellulaire (123).

D'autre part, les microbes présents dans la circulation sanguine activent le système du complément par la voie alterne. Le C3b produit au cours de l'activation du complément se fixe de manière covalente aux microbes, et ce complexe est reconnu par les LB circulants induisant leur différenciation en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps (126).

B. L'immunité adaptative

Elle est essentiellement composée des lymphocytes qui constituent l'immunité cellulaire, et des anticorps (Ac) produits par ces lymphocytes qui forment l'immunité humorale (**Figure 19**). Elle est très spécifique aux Ag distincts et possède la capacité de mémoire à une exposition précédente à l'Ag. Cette réponse mémoire est plus forte que la réponse mise en place suite à la première exposition au microbe ou l'Ag (129).

La spécificité de cette immunité adaptative repose sur le fait qu'un nombre important de clones différents de lymphocytes sont capables de reconnaître plus d'un milliard d'Ag différents. L'expansion clonale correspond à la division rapide de clones ayant reconnu un Ag. Cela permet la production de cellules effectrices qui ont pour fonction d'éliminer les Ag (= phase effectrice), mais également la production de cellules mémoire. Ces dernières interviennent lors d'expositions répétées à un même Ag. C'est sur ce principe que sont basés les vaccins (129).

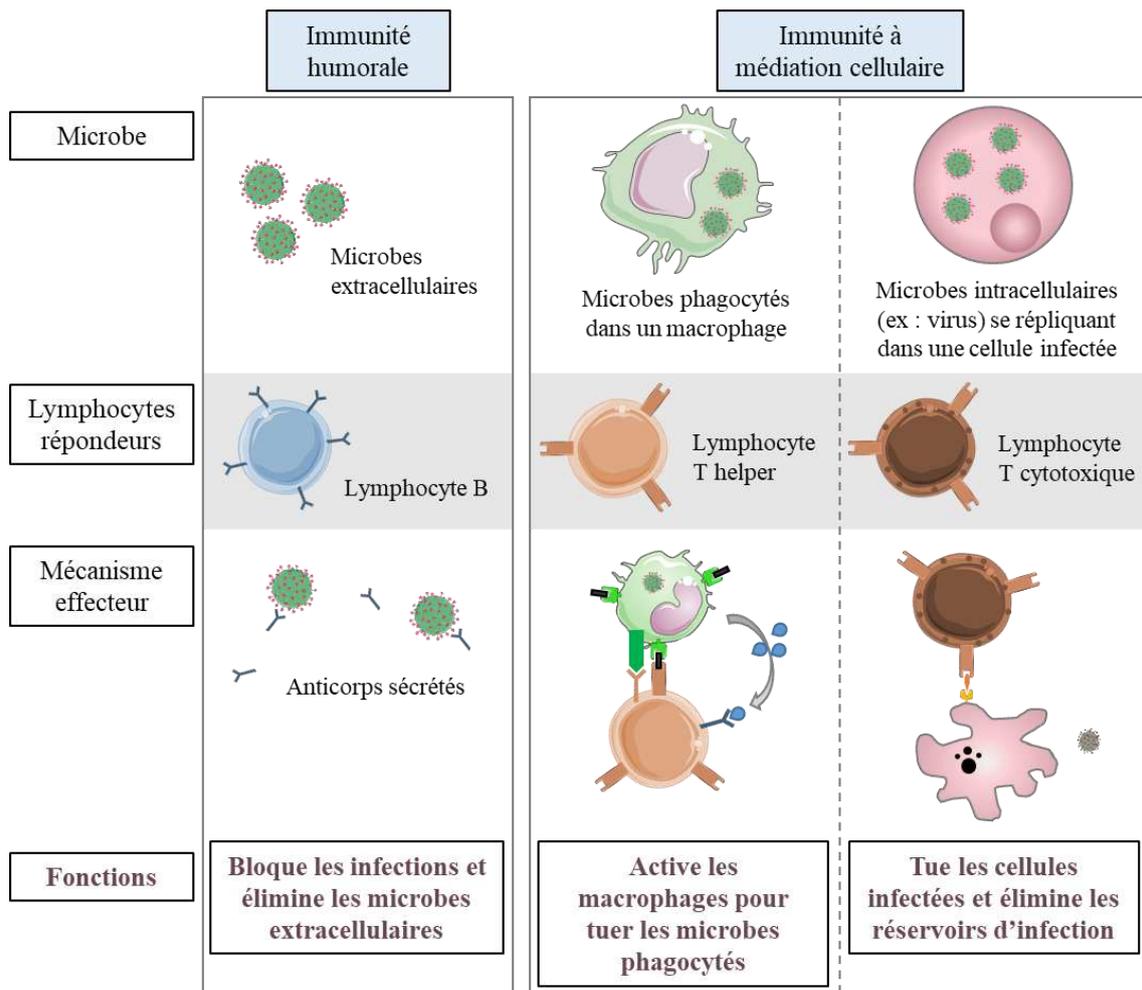


Figure 19 : Les différents types d'immunité adaptative. *D'après de Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, A.ABBAS.*

a. L'immunité humorale

Elle est constituée par les Ac produits par les LB différenciées en plasmocytes. Ces Ac ont la capacité de reconnaître les microbes afin de les stopper avant qu'ils n'atteignent leurs cellules cibles, dans le but de prévenir l'infection (130).

Les LB naïfs reconnaissent les Ag mais ne secrètent pas directement les Ac (**Figure 20**). Il est nécessaire d'activer ces cellules afin d'induire leur différenciation en plasmocytes. Les LB naïfs expriment 2 classes d'immunoglobulines (Ig) liées à la membrane : les IgM et les IgD, qui jouent le rôle de récepteurs aux Ag. L'activation des LB entraîne la prolifération des cellules spécifiques de l'Ag, c'est l'expansion clonale, ainsi que leur différenciation en plasmocytes. Les Ac sécrétés présentent la même spécificité que les récepteurs membranaires des LB naïfs. Au cours de leur différenciation, les LB peuvent produire des Ig de différentes classes afin

d'assurer la lutte contre les différents types de microbes, c'est la commutation isotypique. Lorsqu'un organisme est exposé de façon répétitive à un Ag spécifique cela entraîne la production d'Ac ayant une affinité croissante pour l'Ag donné, c'est ce que l'on appelle la maturation d'affinité, qui a pour objectifs de neutraliser les microbes plus efficacement (131).

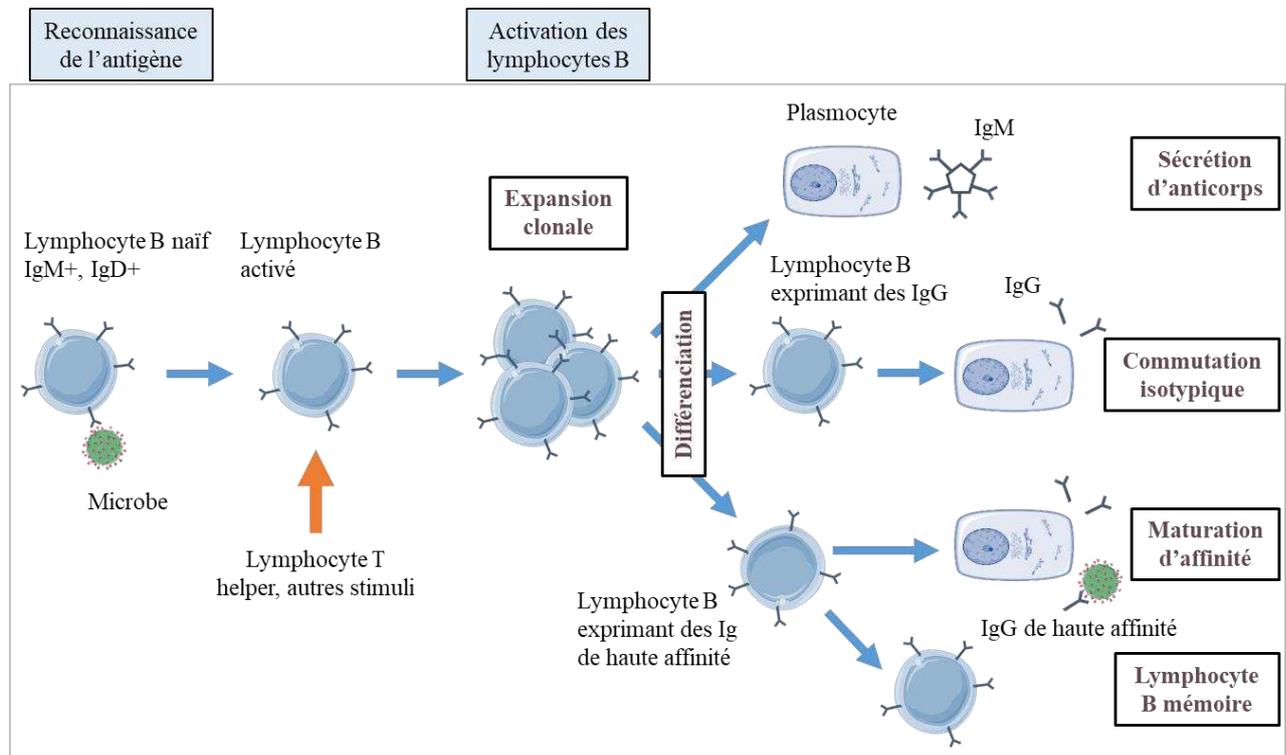


Figure 20 : Phases des réponses immunitaires humores. D'après de *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, A.ABBAS.

Les réponses immunitaires humores sont initiées lorsque les LB spécifiques d'un Ag, se trouvant dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires, reconnaissent les antigènes. Dans ce cas, les antigènes sont transportés par la circulation sanguine et concentrés dans les follicules riches en LB. Ainsi, les LB spécifiques d'un antigène utilisent leurs immunoglobulines pour reconnaître l'Ag ce qui déclenche des voies de signalisation initiant l'activation des LB.

Les IgM et les IgD membranaires des LB naïfs reconnaissent les Ag mais ne peuvent pas, eux-mêmes, transduire de signaux intracellulaires. Ainsi ils sont liés aux protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ afin de former le complexe du récepteur des lymphocytes B (BCR). C'est par l'intermédiaire des domaines cytoplasmiques des protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ que les signaux vont circuler à l'intérieur de

la cellule pour conduire à l'activation de gènes codants pour des protéines impliquées dans la prolifération et la différenciation des LB (131). L'activation des LB induit l'augmentation de la production et la sécrétion d'IgM. De plus, cette activation entraîne la diminution de l'expression de récepteurs aux chimiokines présentes dans les follicules lymphoïdes et qui ont pour rôle de maintenir le LB à l'intérieur de ces follicules (132). La maturation d'affinité est le processus par lequel l'affinité des anticorps produits en réponse à un Ag protéique augmente suite à une exposition prolongée ou répétée à ce même antigène. Celle-ci survient dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Elle résulte de la sélection des LB de haute affinité pour l'Ag présenté par les cellules folliculaires dendritiques (131).

b. L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est la branche de l'immunité adaptative qui a pour rôle de combattre les infections provoquées par des microbes intracellulaires tels que les virus, et elle fonctionne par l'intermédiaire des LT. Dans le cas des infections virales, les virus sont capables de se lier à des récepteurs présents sur un grand nombre de cellules, d'être en mesure de les infecter puis de se répliquer dans leur cytoplasme. Les cellules non phagocytaires n'ont généralement pas les mécanismes intracellulaires nécessaires à l'élimination du virus (133).

Les réponses des LT contre les Ag microbiens associés aux cellules se composent de plusieurs étapes consécutives entraînant l'augmentation du nombre de LT spécifiques de l'Ag et à la conversion de LT naïfs en cellules effectrices (**Figure 21**). Les LT naïfs expriment des récepteurs d'antigènes mais sont incapables d'assumer les fonctions effectrices nécessaires à l'élimination des microbes. La différenciation des LT naïfs en cellules effectrices est initiée par la reconnaissance des antigènes présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Suite à la reconnaissance de l'Ag, les LT vont sécréter certaines cytokines qui ont pour fonction de stimuler la prolifération de LT spécifiques de l'antigène, c'est l'expansion clonale. Les LT se différencient en cellules effectrices qui vont éliminer les microbes soit au niveau des organes lymphoïdes, soit sur le site d'infection après migration. Les autres LT ayant répondu à la présentation de l'antigène vont se différencier en LT mémoire (133).

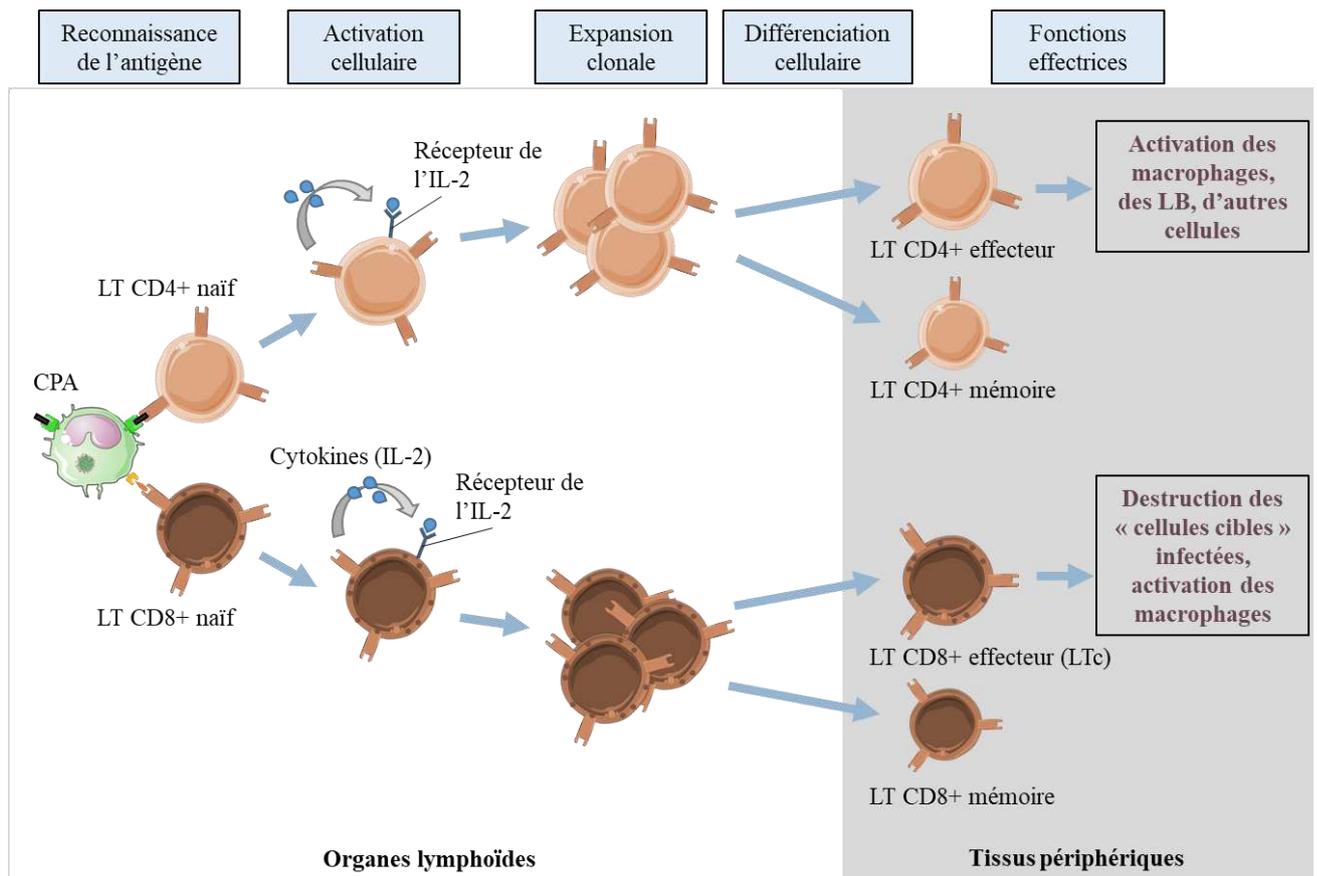


Figure 21 : Etapes d'activation des lymphocytes T. *D'après de Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, A.ABBAS.*

Le TCR et le corécepteur CD4 ou CD8 reconnaissent le complexe formé par les antigènes et les molécules du CMH à la surface des CPA. Chaque LT exprime un corécepteur, soit un CD4, soit un CD8, qui agit en coopération avec le TCR en reconnaissant les molécules du CMH. Les signaux intracellulaires conduisant à l'activation du LT sont déclenchés par la formation du complexe du TCR avec son corécepteur (CD4 ou CD8). Ce TCR est associé de manière non covalente à un complexe appelé CD3, et à une autre protéine de signalisation appelé chaîne ζ . Le TCR, le CD3 et la chaîne ζ forment le complexe du TCR (133, 134).

L'activation des LT CD8⁺ est stimulée par la reconnaissance des peptides présentés par les molécules du CMH, puis nécessite une stimulation auto-induite ou par l'intermédiaire des LT CD4⁺. Les LT CD8⁺ reconnaissent des protéines cytoplasmiques, comme les protéines virales, dans n'importe quelle cellule hôte. Un grand nombre des réponses induites par l'activation des LT est assuré par la production de cytokines qui vont agir sur les LT eux-mêmes et sur un grand nombre de cellules de l'hôte participant aux défenses immunitaires (135). En réponse à un Ag,

les LT CD4⁺, sécrètent rapidement plusieurs types de cytokines qui jouent le rôle de médiateurs de l'immunité et de l'inflammation. L'une des cytokines produites est l'IL-2 dont la principale fonction est de stimuler la prolifération des LT. Cette prolifération entraîne une expansion des clones spécifiques de l'antigène permettant la production d'un grand nombre de LT spécifiques de l'Ag à partir desquels des lymphocytes effecteurs seront générés (134). Les lymphocytes effecteurs vont alors quitter les organes lymphoïdes secondaires pour rejoindre le site d'infection où ils seront en contact avec l'Ag microbien (136). Sur le site d'infection, on observe la sécrétion de cytokines par les macrophages en réponse à la présence d'antigènes. Les deux cytokines principalement produites sont le TNF et l'IL-1, elles agissent sur l'endothélium afin d'augmenter l'expression des sélectines, et des ligands aux intégrines présentes à la surface des LT. Globalement, ce sont les mêmes séquences de migration pour les lymphocytes que ceux expliqués pour les neutrophiles et les monocytes (137).

- Les lymphocytes helper CD4⁺

Les LT CD4⁺ se différencient en lymphocytes effecteurs répondant à l'Ag en produisant des molécules de surface et des cytokines dont la fonction est d'activer les macrophages et les LB. Ces cellules peuvent se différencier en sous-populations de cellules effectrices qui produisent différents groupes de cytokines afin d'assumer des fonctions variées. Les LT CD4⁺ sont donc classifiés en populations T_H1 ou T_H2. Le développement des LT CD4⁺ en T_H1 et T_H2 est régulé par les stimuli reçus lorsque les LT CD4⁺ sont encore naïfs. L'IL-12 produite par les CPA favorise la différenciation des LT en sous-population T_H1. Lorsque le pathogène n'induit pas l'activation des CPA et la production d'IL-12, ce sont les LT CD4⁺ eux-mêmes qui vont produire de l'IL-4 pour induire leur propre différenciation en sous-population T_H2 (133, 138).

Les LT CD4⁺ de la sous-population T_H1 produisent majoritairement de l'IFN γ , cytokine importante dans la lutte contre les infections virales en activant les macrophages qui ont phagocytés les microbes. La sous-population des lymphocytes T_H2 agit pour limiter les conséquences nocives de l'activation des macrophages *via* notamment la production de plusieurs cytokines telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Cette sous-population a donc pour rôle de limiter les lésions tissulaires qui accompagnent souvent les réponses immunitaires de type T_H1.

- Les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺

Les LT CD8⁺, activés par l'Ag et les molécules de costimulation, se différencient en LT cytotoxiques (LTc) qui ont la capacité de tuer les cellules infectées exprimant l'Ag (133). Les LT CD8⁺ différenciés reconnaissent les complexes peptides-molécules du CMH à la surface des cellules infectées par leur TCR et le corécepteur CD8. Les LTc adhèrent fortement aux cellules grâce aux intégrines se liant à leurs ligands présents sur les cellules infectées. Les LTc activés sont capables de tuer toute cellule infectée et dans n'importe quel tissu (136).

La reconnaissance de l'Ag par les LTc effecteurs déclenche l'activation des voies de transduction de signaux intracellulaires qui conduisent à l'exocytose du contenu des granules des LTc au niveau de la zone de contact avec les cellules infectées. Le contenu des granules crée des pores dans la membrane des cellules cibles par l'intermédiaire de la perforine. Parallèlement, les LTc sécrètent des enzymes, appelés granzymes, qui entrent dans la cellule cible pour cliver et donc activer les caspases. L'activation des caspases induit la mort des cellules cibles par apoptose.

C. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du CMH sont des protéines membranaires se trouvant sur les CPA. Le locus du CMH contient deux ensembles de gènes hautement polymorphes : les gènes de classe I et de classe II du CMH. Les protéines de classe I et de classe II du CMH sont des protéines membranaires qui contiennent chacune un site de liaison au peptide en forme de « poche ». Bien que la composition des sous-unités soit différente entre les deux classes, leur structure reste similaire (**Figure 22**) (139).

Chaque molécule de classe I est composée d'une chaîne α liée de façon non-covalente à une protéine β_2 -microglobuline. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule du CMH I forment le site de liaison au peptide en forme de poche capable d'accueillir des peptides de 8 à 11 acides aminés (aa). Le domaine $\alpha 3$ contient des sites de liaison au corécepteur CD8 des LT. Les molécules de classe II sont composées de deux chaînes appelées α et β . Les régions N-terminales de ces deux chaînes, appelées $\alpha 1$ et $\beta 1$, forment une poche permettant de reconnaître des peptides de 10 à 30 aa. Le domaine $\beta 2$ contient le site de liaison au corécepteur CD4 des LT. Les molécules de classe I sont exprimées sur toutes les cellules, alors que les molécules de classe II sont essentiellement exprimées par les CPA.

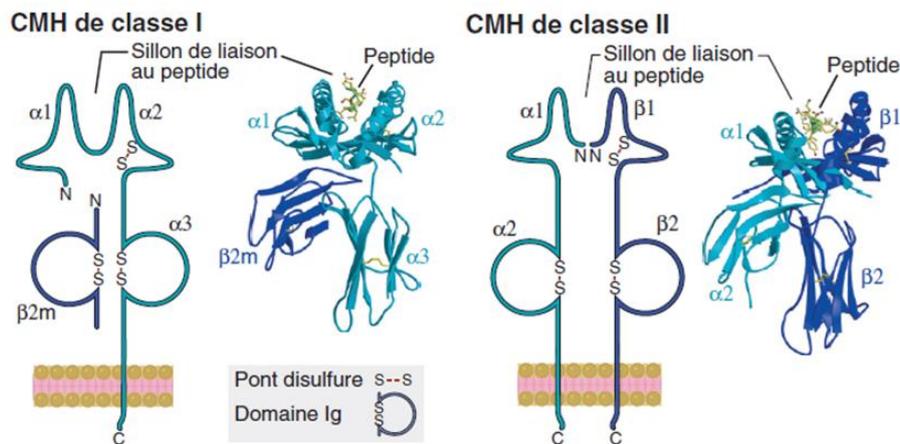


Figure 22 : Structure des molécules du CMH de classe I et de classe II. *Issu de Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, A.ABBAS.*

D. Les organes lymphoïdes secondaires (OLS)

Différents organes sont qualifiés d'OLS comme les ganglions lymphatiques, la rate, les systèmes immunitaires muqueux et cutanés. Dans ces OLS, on retrouve une forte concentration de lymphocytes, de CPA et d'Ag ce qui permet d'optimiser les interactions entre les différents constituants et développer l'immunité adaptative (140).

Les ganglions lymphatiques sont des agrégats nodulaires de tissus lymphoïdes situés le long des voies lymphatiques de l'organisme. Ils constituent la réponse immunitaire dédiée aux Ag présents dans la lymphe. La rate est un organe abdominal qui présente un rôle identique aux ganglions mais pour les Ag présents dans la circulation sanguine. Les systèmes lymphoïdes cutanés et muqueux sont situés sous les épithéliums de la peau et des tractus respiratoire et gastro-intestinal. On retrouve par exemple comme système lymphoïde muqueux les amygdales et les plaques de Peyer de l'intestin. Ils constituent la réponse immunitaire aux Ag pénétrant dans l'organisme par le biais des épithéliums.

Dans l'ensemble de ces OLS, on observe une organisation spécifique des tissus avec notamment une pulpe blanche (PB) riche en lymphocytes. On retrouve les LB présents dans des follicules à la périphérie des organes, où l'on peut distinguer des centres germinatifs (GC) des lymphocytes B après un contact avec un Ag. A côté de cela, toujours dans la PB, on retrouve les LT dans des manchons lymphoïdes péri-artériolaires. Ces OLS sont également composés

d'un tissu extra-folliculaire riche en macrophages, en cellules dendritiques et en hématies appelé pulpe rouge (PR) (**Figure 23**).

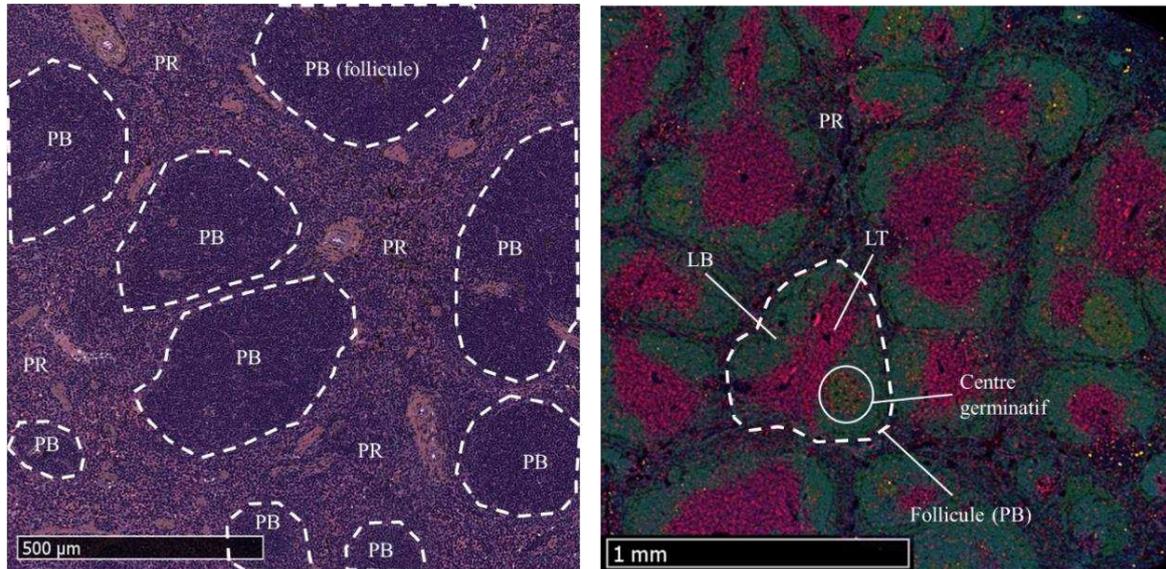


Figure 23 : Organisation tissulaire de la rate. Photographies réalisées à partir de rates de souris C57Bl/6J (Clichés personnels). PR : pulpe rouge contenant les hématies, les phagocytes, les cellules NK. PB : pulpe blanche contenant les follicules riches en lymphocytes B (LB) et en lymphocytes T (LT) et en centres germinatifs.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

II. Contexte et objectifs

Ces travaux de thèse se sont consacrés à l'étude de l'expression et du rôle de molécules solubles de l'inflammation, la chimiokine CXCL14 et la protéine IL-18bp, au cours des hépatites virales.

Les hépatites virales constituent un problème de santé publique international, tant au niveau économique que pour la qualité de vie des patients, comparable à d'autres maladies transmissibles comme le VIH/SIDA ou le paludisme. Ainsi, une stratégie au niveau mondial de lutte contre les hépatites virales, et dirigée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a été mise en place sur la période 2016-2021 et sera reconduite pour les 5 prochaines années à venir (141). Celle-ci permet de mettre en place des mesures de santé publique cohérentes à l'international. En 2013, les hépatites virales étaient la septième cause de mortalité dans le Monde, responsable d'environ 1,4 Million de décès par an liés aux hépatites aiguës mais aussi aux cancers du foie et aux cirrhoses. Ce chiffre est comparable à ceux du VIH et de la tuberculose, et bien supérieur à celui du paludisme (**Figure 24**). Actuellement, et malgré l'existence d'un traitement, le nombre de personnes atteintes d'hépatite C dans le Monde est en hausse. Une lutte au niveau mondial est donc indispensable. Cependant, comme cela a été décrit précédemment, les différents virus des hépatites ont des modes de transmission qui diffèrent : le plan d'action efficace dans la lutte contre les hépatites virales comporte donc des mesures communes mais aussi des mesures spécifiques à chaque virus.

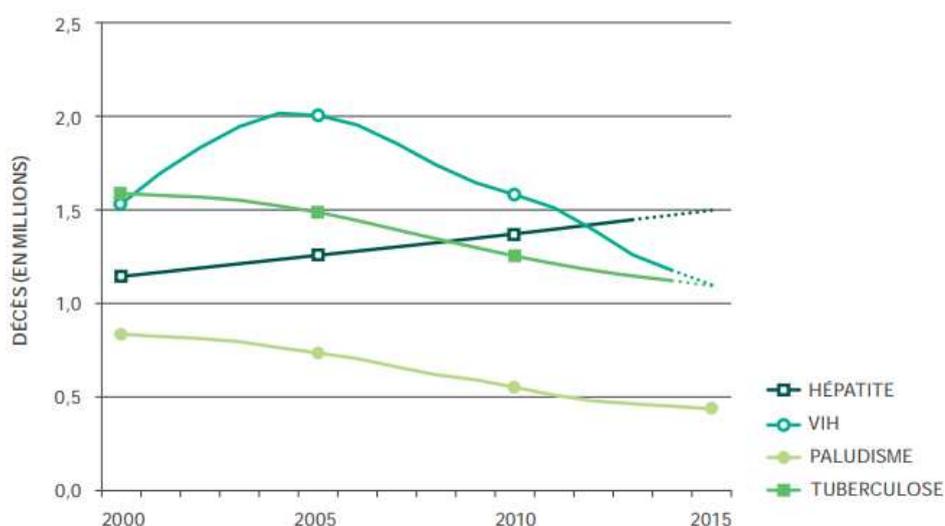


Figure 24 : Estimation du nombre de décès dus aux hépatites virales, au VIH, au paludisme et à la tuberculose dans le Monde entre les années 2000 et 2015. *Source OMS.*

Suite à l'entrée du virus dans l'organisme, que ce soit par le sang (les fluides biologiques en général) ou les barrières épithéliales, le système immunitaire est mobilisé afin de contrôler la multiplication du virus et d'éradiquer l'infection. L'immunité innée, par les macrophages, les cellules NK et les neutrophiles, constitue la première ligne de défense de l'organisme face à l'infection virale. Ces cellules vont phagocyter le virus ou les cellules infectées, comme les hépatocytes, puis produire des molécules solubles afin de stimuler et de recruter les cellules de l'immunité adaptative. En effet, les réponses humorales, par la production d'anticorps, joue un rôle central dans la neutralisation des particules virales circulantes. Cependant, pour les particules virales intracellulaires, c'est l'immunité cellulaire, par l'activation des LT cytotoxiques, qui permet de les contrôler en détruisant la cellule infectée (142). Ce sont les cytokines, sécrétées par les différents types cellulaires impliqués, qui assurent les communications intercellulaires afin d'éradiquer efficacement l'infection. Les cellules de l'immunité innée produisent de grandes quantités de cytokines, en particulier les chimiokines et les interleukines, pour activer les cellules de l'immunité adaptative spécifique de l'antigène (127).

Parmi les interleukines produites en grande quantité, on retrouve l'IL-12 mais aussi l'IL-18 produite par les cellules NK qui permet l'activation des LT_{H1} (90), qui coopèrent pour stimuler la production d' $IFN\gamma$, un puissant antiviral. L'IL-18 agit en se fixant à son récepteur, ce qui induit la production de l'IL-18 binding protein (IL-18bp), par différents types cellulaires dont les hépatocytes. Cette IL-18bp permet de contrôler la voie de signalisation induite par l'IL-18, en se liant à l'IL-18 et en empêchant ainsi sa fixation sur son récepteur IL-18R1 (91). L'IL-18, à forte dose, peut être toxique pour le tissu infecté, et le rôle de régulation de l'IL-18bp semble être une piste de recherche intéressante dans la réponse antivirale hépatique.

D'autres cytokines, en particulier les chimiokines, exercent un rôle prépondérant dans les réponses immunitaires antivirales puisqu'elles permettent d'attirer les cellules immunitaires au niveau du site de l'infection. L'une d'entre elle, la chimiokine CXCL14, semble être intéressante dans le contexte des pathologies hépatiques. En effet, il a été décrit dans la littérature, une augmentation significative de l'expression de CXCL14 dans le foie de patients présentant un carcinome hépatocellulaire d'origine viral, suite à une infection par le VHB ou le VHC (86). Mieux comprendre l'expression et le rôle de la chimiokine CXCL14 dans le contexte des hépatites virales pourrait permettre à l'avenir de développer de nouvelles thérapies ciblées.

Ces travaux de thèse avaient donc différents objectifs. D'une part, de caractériser l'expression et la fonction de la chimiokine CXCL14 au cours des hépatites virales humaines et dans le

modèle murin d'hépatite induite par l'inoculation du MHV-3, ainsi qu'à étudier les voies de régulation de l'expression de cette chimiokine à l'aide de modèles *in vitro* d'hépatocytes primaires en culture. D'autre part, d'étudier la fonction de la protéine IL-18bp dans le modèle d'hépatite virale induite par le MHV-3 afin de mieux comprendre la physiopathologie observée chez les patients ayant une mutation sur le gène *il18bp*.

Ainsi, mes travaux de thèse se sont orientés autour de 3 axes de recherches principaux :

- **Caractérisation de l'expression de la chimiokine CXCL14 dans les hépatites virales.**

Comme décrit dans la littérature scientifique, *cxcl14* est surexprimé chez les patients présentant une hépatite à VHB ou VHC. Cependant, à l'heure actuelle, aucune information concernant l'expression et le rôle de la chimiokine n'est décrite dans les hépatites virales. Les objectifs de ce travail étaient (1) d'étudier la régulation de l'expression et de la sécrétion de la chimiokine CXCL14 par les hépatocytes *in vitro*, (2) d'étudier l'expression de la chimiokine CXCL14 *in vivo* chez la souris suite à l'infection par le MHV-3, et (3) d'évaluer la concentration sérique de CXCL14 chez des patients ayant une hépatite aiguë virale. Ces travaux sont présentés dans un article *soumis pour publication*.

- **Etude de la fonction de la chimiokine CXCL14 dans la réponse immunitaire systémique.**

Au-delà du rôle de la chimiokine dans le contexte particulier de l'hépatite virale, nous avons étudié son rôle dans la réponse immunitaire systémique chez des souris déficientes pour CXCL14 (CXCL14 KO) en comparaison à des congénères sauvages (WT). Pour cet axe, l'objectif était de comprendre le rôle de la chimiokine CXCL14 sur (1) la mobilisation des cellules du système immunitaire, (2) l'activation et la différenciation des lymphocytes B spléniques, (3) la production d'immunoglobulines dans la réponse antimicrobienne, et (4) la réponse immunitaire associée aux muqueuses en particulier au niveau des plaques de Peyer intestinales. Ces travaux sont présentés dans un article *en cours de préparation*.

- **Rôle de la protéine IL-18bp au cours des hépatites virales fulminantes humaines et murines.**

Afin d'étudier le rôle de la protéine IL-18bp au cours des hépatites virales chez la souris et pour compléter les résultats observés chez l'Homme par l'équipe du Pr Casanova (Imagine, Paris), des souris déficientes pour cette protéine ont été challengées avec le virus MHV-3. L'objectif de ce projet était de déterminer le rôle de la protéine IL-18bp au cours du développement de la réponse hépatique antivirale. Ces travaux sont présentés dans un article *en cours de préparation*.

MATERIEL
ET METHODES

III. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire et infection

A. Isolement des hépatocytes primaires murins

Les hépatocytes murins ont été isolés à partir de foies de souris C57Bl/6J sauvages. Pour cela, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de xylazine et kétamine (10 mg/kg et 60 mg/kg, respectivement). Par la suite une perfusion hépatique a été réalisée à partir de la veine cave inférieure des souris avec une solution de collagénase afin de digérer la matrice extracellulaire hépatique et débiter la dissociation des hépatocytes (143). Les foies ont ensuite été récupérés et placés dans une boîte de Pétri en présence de milieu de culture Leibowitz et une dissociation mécanique a été réalisée afin de casser la capsule hépatique. Après filtration sur nylon 70 μ m et décantation, les hépatocytes ont été séparés des autres cellules hépatiques par la réalisation d'une centrifugation en gradient de Percoll à 12%.

Les hépatocytes purifiés ont par la suite été placés sur des boîtes de culture coâtées avec du collagène de type I pour favoriser l'adhérence cellulaire. La densité cellulaire d'ensemencement a été déterminée afin d'optimiser les infections virales, ainsi les cellules ont étéensemencées à une densité de 10⁵ cellules/cm². Les cellules ont été placées dans un milieu enrichi en albumine sérique bovine (BSA) et en dexaméthasone pour maintenir les cellules dans un état différencié. Il faut noter que ce milieu ne contient pas de SVF qui pourrait perturber les expérimentations réalisées par la suite sur ces cellules.

B. Isolement des hépatocytes primaires humains

Les hépatocytes humains ont été isolés à partir de biopsies de foies de patients admis à l'hôpital de Rennes, et opérés pour une hépatectomie suite à l'apparition de métastases hépatiques d'un cancer colorectal. La société Biopredic (St-Grégoire, France) récupère un échantillon sain de ces biopsies afin de réaliser une perfusion hépatique et de récolter les hépatocytes. Le protocole de perfusion est très similaire à celui réalisé sur les foies de souris, même si dans ce cas la perfusion se fait via l'un des vaisseaux sanguins de l'échantillon.

Comme pour les hépatocytes murins, les cellules humaines sontensemencées sur des plaques coâtées en collagène I et à une densité bien définie de 2.10⁵ cellules/cm² dans un milieu

contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2% et de l'hydrocortisone à 0,02% pour maintenir l'état de différenciation des hépatocytes humains.

C. Purification et titration virale

a. Amplification et titration du MHV-3

Afin d'obtenir une solution enrichie en particules virales du MHV-3 pour l'ensemble des expérimentations réalisées *in vivo* pour cette thèse, des souris ont été infectées avec une solution précédente de MHV-3 à une dose de 1000 particules virales infectieuses *in vitro* par souris. Cette inoculation de virus a permis une amplification *in vivo* du virus au sein des foies murins. 72h après inoculation, les souris ont été euthanasiées et les foies récupérés puis écrasés et filtrés sur des tamis de nylon de 70µm, en présence de milieu RPMI stérile. L'éluat de filtration a, par la suite, été centrifugé afin d'éliminer les cellules et débris cellulaires présents. Le surnageant a été récupéré, il constitue la fraction enrichie en particules virales, et stocké à -80°C.

Afin d'isoler de la fraction enrichie en particules virales infectieuses, des cellules pulmonaires de rat, les cellules L2, ont été infectées par cette solution. La lyse a été suivie toutes les 12 heures par microscopie et l'infection stoppée lorsque 80% des cellules étaient lysées. Par la suite, 2 cycles de congélation-décongélation ont eu lieu afin de casser les membranes cellulaires et de libérer les particules virales infectieuses intracellulaires, puis une centrifugation a été réalisée. Le surnageant a été récupéré et constitue la solution enrichie en particules infectieuses purifiées du MHV-3. C'est cette solution qui sera inoculée pour les expérimentations réalisées *in vitro* et *in vivo*.

Le titre viral de cette solution a été évalué par la méthode du « plaque assay » (144). Cette méthode consiste à infecter des cellules permissives à un virus lytique, ici les cellules L2 et le MHV-3, par des doses décroissantes de solutions virales pour déterminer la dose optimale. Ceci se fait en présence d'une couche de carboxyméthylcellulose (CMC) qui se pose sur les cellules L2 suite à l'ajout de la solution virale. Elle a pour but de limiter la dissémination du virus de cellules en cellules et ainsi de permettre l'observation de « spots » ou zones de mort cellulaire suite à une coloration au Crystal Violet (CV) (**Figure 25**). 3 jours après avoir ajouté la solution virale, la couche de CMC est éliminée et les cellules fixées puis colorées au CV. Sur les plaques sont ainsi dénombrés les spots (ou plaques) afin de déterminer le titre viral en pfu/mL avec la formule suivante :

$$\text{Titre viral (pfu/mL)} = \frac{\text{moyenne du nombre de plaques}}{D \times V}$$

Où D représente la dilution pour laquelle on dénombre ce nombre de plaques, et V le volume de solution virale ajoutée.

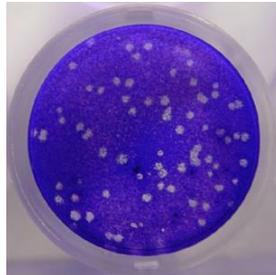


Figure 25 : Détermination du titre viral par la méthode du « plaque assay » et une coloration au Crystal Violet. (*clichés personnels*)

Par exemple, dans la **Figure 25**, la dilution est de 10^{-7} et le volume de $500\mu\text{L}$, avec une moyenne de 74 plaques/puits à cette dilution. On trouve un titre viral de notre solution de MHV-3 d'environ $1,5 \cdot 10^6$ pfu/mL. Cela signifie qu'il y a environ 1,5 million de particules virales infectieuses dans 1 mL de la solution purifiée. Ce titre nous permet d'ajuster la dose et la concentration de particules virales à inoculer pour nos expérimentations.

b. Amplification et titration du HSV-1

Concernant le virus de l'herpès de type 1, celui-ci a été récupéré au niveau de lésions labiales de patients du CHU de Pontchaillou (Rennes, France) dans le service du Pr V. Thibault. Les lésions récupérées ont été mises en culture sur des cellules permissives à ce virus lytique, les cellules MRC5 qui sont des fibroblastes pulmonaires humains. La lyse des cellules a été suivie au microscope et lorsque 80% des cellules ont été lysées par le virus l'infection a été arrêtée. Par la suite, et comme pour le virus MHV-3, deux cycles de congélation-décongélation ont eu lieu suivis d'une centrifugation afin de récupérer une solution enrichie en particules virales infectieuses du HSV-1. Le même protocole de titration que celui du MHV-3 a été utilisé pour le virus HSV-1 sur les cellules MRC5, et la solution utilisée dans les expérimentations présentait un titre viral de $2 \cdot 10^5$ pfu/mL.

D. Infection virale des hépatocytes primaires

Vingt quatre heures après ensemencement, les hépatocytes murins ont été infectés avec le virus MHV-3 à un ratio cellules:virus déterminé, qui sera nommé par la suite MOI pour *Multiplicity Of Infection*. Par la suite, toutes les 12 heures, la progression de l'infection est suivie au microscope, puis, toutes les 24 heures (entre le jour 2 et le jour 5 post-inoculation), les milieux conditionnés et les lysats cellulaires sont collectés et stockés à -80°C pour des analyses en RT-qPCR, en Western-Blot et par ELISA.

Concernant les hépatocytes humains, ceux-ci ont été infectés par le virus HSV-1 trois jours après leur ensemencement afin de travailler avec des cellules bien différenciées. Il faut également noter que le milieu d'infection virale est identique au milieu d'entretien mais le SVF a été retiré du milieu pour ne pas interférer dans les expérimentations. Le MOI a été déterminé suite à la titration virale, puis toutes les 12 heures la lyse cellulaire a été observée par microscope et les milieux conditionnés et lysats cellulaires ont été récupérés et stockés pour des analyses ultérieures en RT-qPCR, en Western-Blot et par ELISA.

2. Expérimentation animale

A. Protocole d'infection par le MHV-3

Après génotypage, les souris âgées de 8 à 12 semaines et ayant un poids supérieur à 18g ont été incluses dans les protocoles d'infection par le MHV-3. Dans cette procédure, la solution virale précédemment titrée a été diluée dans du PBS stérile afin d'obtenir la concentration souhaitée et la dose de virus suboptimale. Chaque souris a reçu une injection de 200µL pour 20g par voie intrapéritonéale, soit de PBS stérile pour les souris contrôles non infectées, soit de PBS contenant la solution virale pour les souris infectées.

Comme expliqué précédemment, la dose de particules virales inoculée a été ajustée selon la lignée de souris. Ainsi, et après réalisé des tests, les souris de la lignée CXCL14 ont reçu une dose équivalente à 5 particules virales infectieuses *in vitro*, et les souris de la lignée IL-18bp 3 particules virales infectieuses *in vitro*. Il est important de préciser « infectieuses *in vitro* », car lors de nos tests réalisés *in vitro* et *in vivo*, nous avons observé que les particules virales étaient bien plus virulentes *in vivo* chez la souris qu'*in vitro* sur les cellules L2. C'est pourquoi, les doses inoculées aux souris sont faibles comparées aux doses utilisées *in vitro*.

Suite à l'inoculation du MHV-3, toutes les 12 heures pendant 5 jours, un suivi des souris a été réalisé, comprenant la mesure du poids des souris ainsi que l'évaluation de leur comportement dans le but de repérer tout signe de souffrance des animaux et de les euthanasier si nécessaire. Selon le protocole établi, des groupes de souris sauvages (WT) et de souris déficientes pour la protéine d'intérêt (KO) ont été sacrifiés après 2, 3 ou 5 jours post-inoculation du virus.

B. Gestion des échantillons

A chaque sacrifice, différents prélèvements étaient réalisés tels que :

- Le prélèvement de sang par la voie rétro-orbitale, afin de mesurer les transaminases hépatiques ainsi que la concentration des cytokines pro-inflammatoires et des immunoglobulines dans le sérum.
- Le prélèvement de la rate, pour réaliser des analyses histologiques et par cytométrie en flux.
- Le prélèvement du foie, pour observer son organisation tissulaire par histologie et analyser la réponse immunitaire à l'infection par le MHV-3 par cytométrie en flux. Des mesures de l'expression de cytokines inflammatoires par qPCR ont également été réalisées.

Le détail des méthodes d'extraction des cellules immunitaires spléniques et hépatiques pour l'analyse en cytométrie en flux seront détaillées dans le paragraphe suivant.

3. Cytométrie en flux

A. Extraction et immunomarquage des cellules immunitaires

Après avoir récupéré la rate, le sang présent dans le foie a été éliminé par une perfusion hépatique à l'aide de PBS stérile. Cette étape est nécessaire et indispensable afin de n'extraire des foies que des cellules immunitaires résidentes et d'éliminer les cellules immunitaires circulantes. Deux protocoles différents ont été utilisés entre le foie et la rate afin d'optimiser l'extraction cellulaire.

Concernant les foies, ceux-ci ont d'abord été écrasés sur des tamis de nylon 70 μ m en présence de PBS enrichi en sérum de veau fœtal (SVF), puis une sédimentation d'une heure a été réalisée

afin de séparer les cellules immunitaires des cellules parenchymateuses. L'extraction et la purification des cellules immunitaires s'est faite par une centrifugation en gradient de Percoll à 35%. Les rates, quant à elles, ont été écrasées sur des tamis de 40µm afin de casser la capsule splénique et d'extraire les cellules immunitaires. Les étapes suivantes sont similaires pour les 2 organes. Suite à la purification des cellules immunitaires, une lyse des globules rouges a été réalisée par l'utilisation du réactif Erythrocyte-lising reagent Easylyse (Dako).

Après avoir lysé les globules rouges et compter les cellules immunitaires pour chaque organe, les marquages immunofluorescents ont pu être réalisés. Premièrement, les cellules ont été marquées par un marqueur de viabilité/mortalité, puis elles sont incubées en présence de l'anticorps anti-CD16/CD32 pour bloquer les liaisons non spécifiques avec les anticorps couplés aux fluorochromes décrits dans les tableaux 4, 5 et 6. Trois panels ont été mis en place dans le cadre de cette thèse afin d'analyser différentes populations cellulaires :

- Un panel dit « classique » permettant d'analyser un grand nombre de populations immunitaires telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T4 et T8, les cellules NK et NKT, les neutrophiles et les macrophages. L'ensemble des anticorps conjugués aux fluorochromes utilisés dans ce panel est présenté dans le **Tableau 4**.
- Un panel appelé « lymphocyte B » qui nous a permis d'analyser les sous-populations de LB telles que les LB-1 et LB-2, les plasmocytes, les plasmablastes et des marqueurs de surface des LB comme les IgM et les IgD reflétant l'état d'activation et de différenciation de ces cellules (**Tableau 5**).
- Un panel nommé « myéloïde » pour analyser les populations et sous-populations immunitaires de la branche myéloïde telles que les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques, et les sous-populations de macrophages selon leur état d'activation (**Tableau 6**).

La fluorescence des cellules marquées et l'acquisition de ces données ont été réalisées sur le cytomètre LSR Fortessa x20™ (BD Biosciences) et le logiciel d'analyse Flowlogic (MACS Miltenyi Biotec). La stratégie utilisée pour déterminer les populations cellulaires sera détaillée dans la partie suivante.

Antigène (conjugué)	Clone	Référence
GR1 (efluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PercepCy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
NK1.1 (PEfluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™

Tableau 4 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « classique ».

Antigène (conjugué)	Clone	Référence
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PercepCy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD5 (APCR700)	53-7.3	#565505, BD Pharmingen™
CD138 (BB515)	281-2	#566207, BD Pharmingen™
IgM (BUV395)	II/41	#743329, BD Pharmingen™
IgD (PE)	11-26.2a	#405706, Biolegend

Tableau 5 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « lymphocyte B ».

Antigène (conjugué)	Clone	Référence
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PerCPy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
F4/80 (PE)	BM8	#12-4801-82, eBiosciences
NK1.1 (BV421)	PK136	#562921, BD Pharmingen™
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD11c (PE-CF594)	HL3	#562454, BD Pharmingen™
CD3 (BUV496)	145.2.C11	#564661, BD Pharmingen™
IA/IE (FITC)	2G9	#553623, BD Pharmingen™
CD169 (APC)	3D6.112	#142418, Biolegend
Ly6G (APCH7)	1A8	#565369, BD Pharmingen™

Tableau 6 : Anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans le panel « myéloïde ».

B. « Gating Strategy »

Pour les trois panels, les cellules mortes et les doublets ont été exclus respectivement avec le marqueur Live/Dead (LD) et la fenêtre « structure » (SSC-A/SSC-H). Cette dernière nous a également permis de sélectionner les cellules immunitaires selon leur taille et leur structure. Un marqueur d'activation, le CD69, des cellules immunitaires a également été ajouté dans l'ensemble des panels.

Concernant le panel « classique », la stratégie utilisée pour définir chaque population cellulaire est présentée dans la **Figure 26** et détaillée ci-dessous :

- Les lymphocytes B : CD19⁺/CD3⁻.
- Les lymphocytes T : CD19⁻/CD3⁺/NK1.1⁻/TCRβ⁺, avec la distinction des LT4 et LT8 respectivement CD4⁺ et CD8⁺.
- Les cellules NKT : CD19⁻/CD3⁺/NK1.1⁺.
- Les cellules NK : CD19⁻/CD3⁻/NK1.1⁺.
- Les neutrophiles : CD19⁻/CD3⁻/NK1.1⁻/Gr1^{high}/CD11b^{high}.
- Les macrophages : CD19⁻/CD3⁻/NK1.1⁻/Gr1⁻/CD11b^{high}.

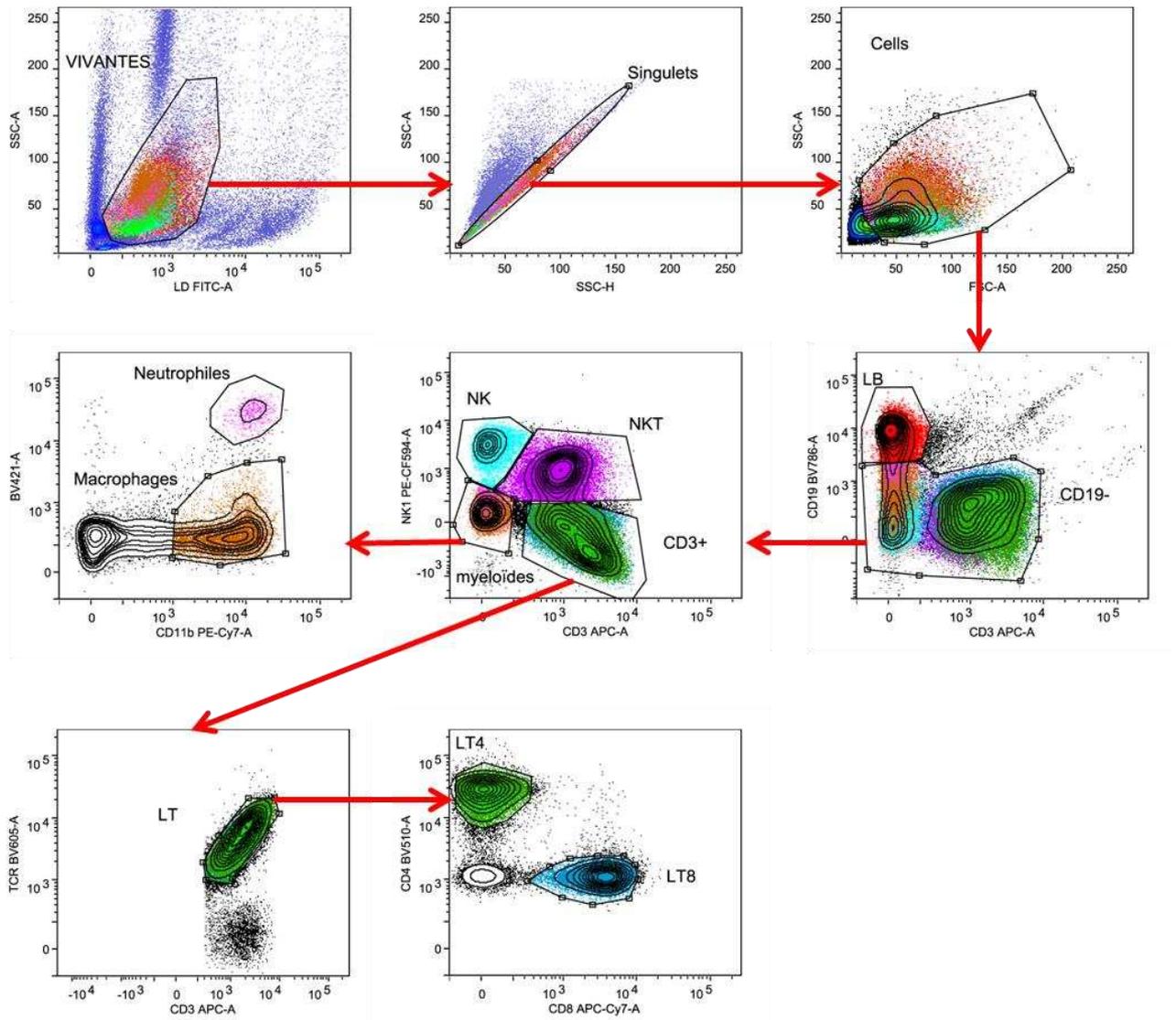


Figure 26 : Stratégie d'acquisition du panel « classique ».

Concernant le panel « LB », la stratégie utilisée est présentée dans la **Figure 27** et détaillée ci-dessous :

- Les lymphocytes B : CD19⁺/CD3⁻, où l'état de différenciation cellulaire a été évaluée par l'expression d'immunoglobulines membranaires, les IgM et les IgD.
- Les LB-1 : CD19⁺/CD3⁻/CD5⁺.
- Les LB-2 : CD19⁺/CD3⁻/CD5⁻.
- Les plasmablastes : CD19^{low}/CD3⁻/CD138⁻.
- Les plasmocytes : CD19^{low}/CD3⁻/CD138⁺.

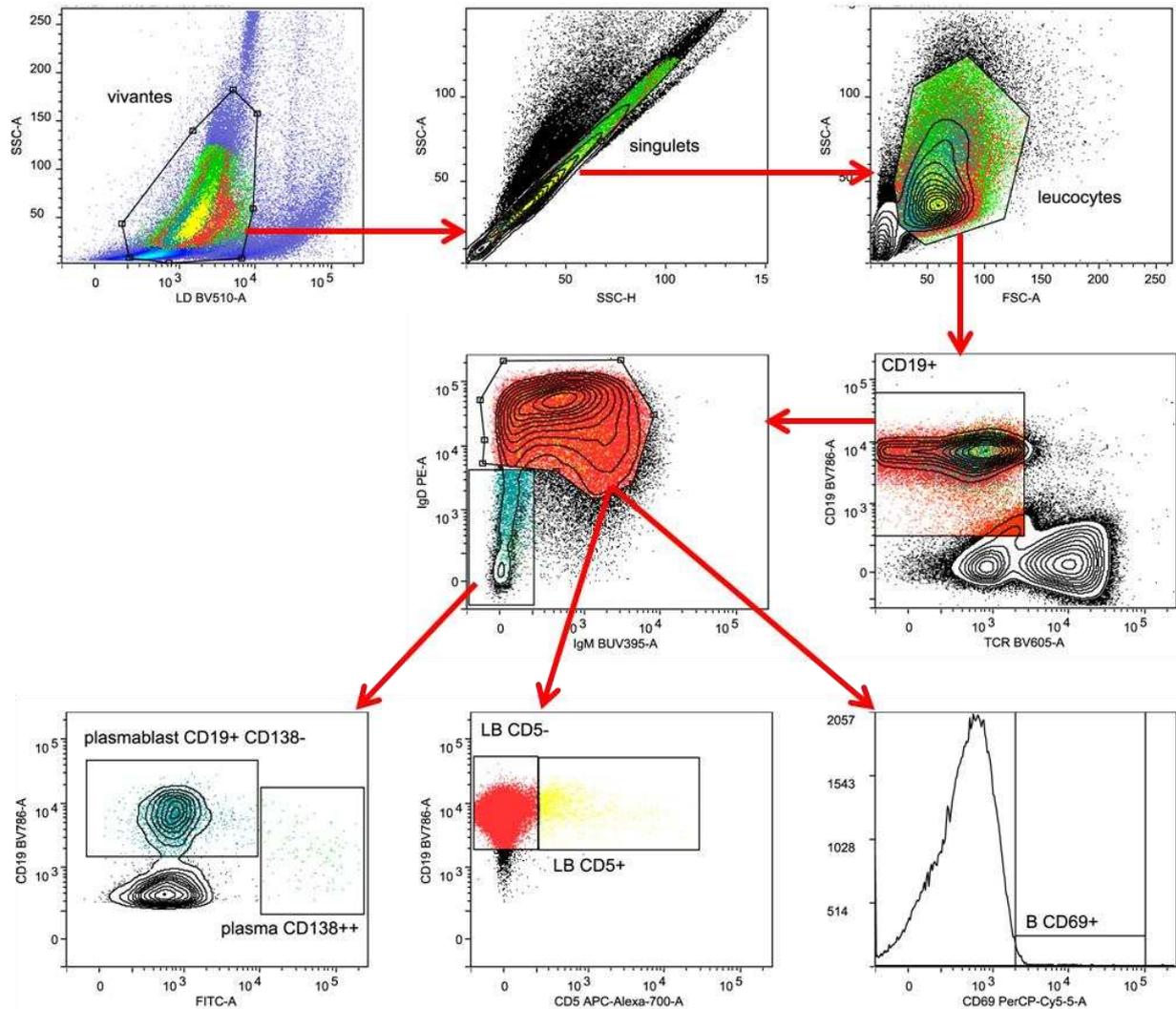


Figure 27 : Stratégie d'acquisition du panel « lymphocyte B ».

Concernant le panel « myéloïde », la stratégie utilisée est présentée dans la **Figure 28** et détaillée ci-dessous :

- Les cellules myéloïdes : CD19⁻/CD3⁻.
- Les neutrophiles : CD19⁻/CD3⁻/Gr1^{high}/CD11b^{high}.
- Les macrophages : CD19⁻/CD3⁻/Gr1⁻/CD11b^{high}/F4/80⁺
- Les macrophages spléniques sous-capsulaires : CD19⁻/CD3⁻/Gr1⁻/CD11b^{high}/CD169⁺
- Les cellules dendritiques : CD19⁻/CD3⁻/IA-IE⁺/CD11c⁺

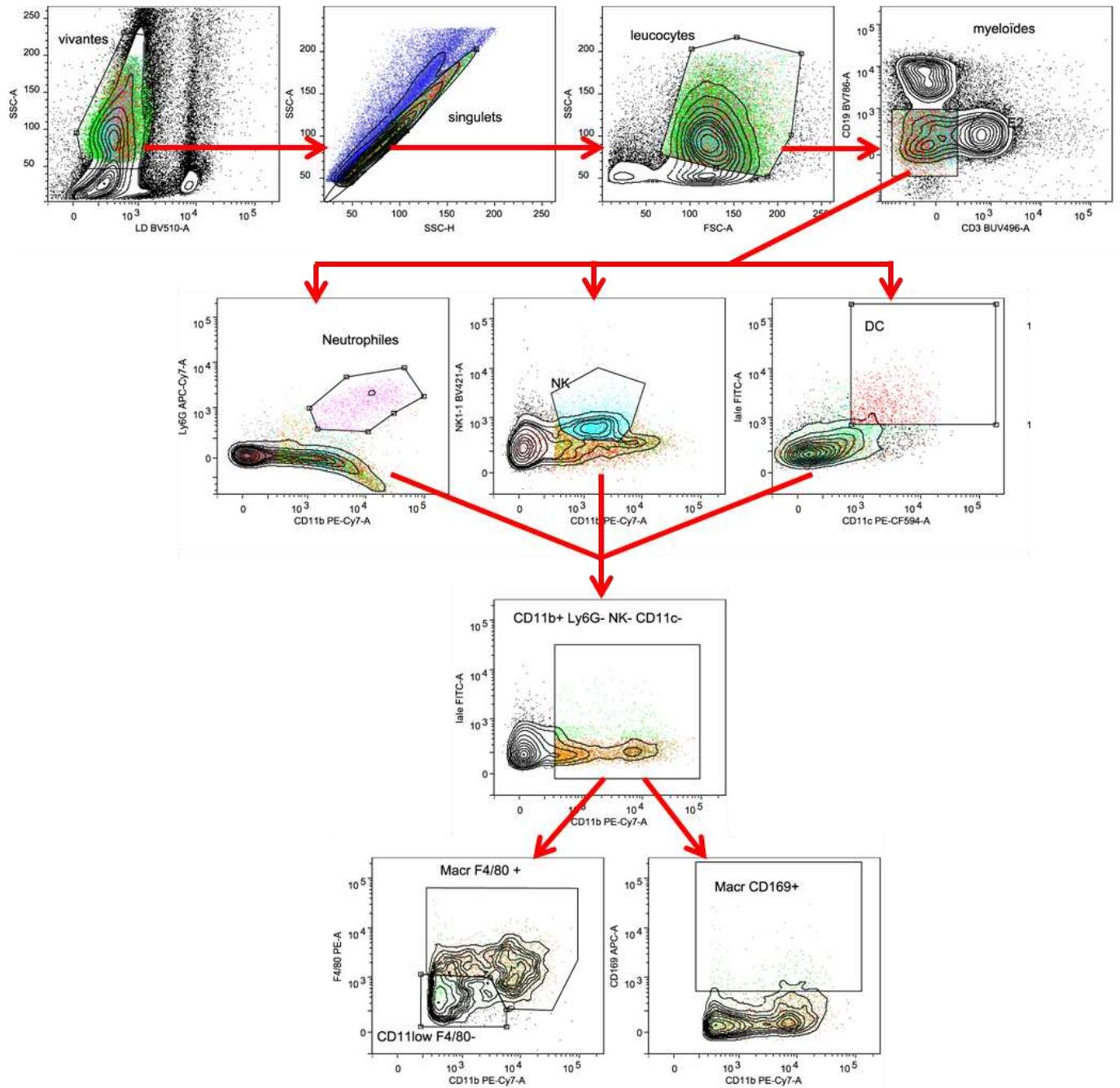


Figure 28 : Stratégie d'acquisition du panel « myéloïde ».

RESULTATS

IV. Résultats

1. Article 1: Serum CXCL14 chemokine overexpression is associated with acute viral hepatitis.

Christelle Devisme, Arnaud Chalin, Benjamin Lefevre, Charlotte Pronier, Muhammad Farooq, Vincent Thibault, Jacques Le Seyec, Céline Raguenes-Nicol, Charaf Benarafa, Claire Piquet-Pellorce and Michel Samson.

Mots clés : Chimiokine CXCL14, réponse immunitaire, hépatite virale aiguë, cohorte humaine, model animal.

Dans le Monde, le nombre de cas d'hépatite aiguë d'origine virale ne cesse d'augmenter, ainsi que la mortalité associée, ce qui en fait un problème majeur de santé publique. L'hépatite est caractérisée par une inflammation, ainsi que par le recrutement et l'activation d'acteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire. Les cytokines jouent un rôle central dans le contrôle de l'infection virale. Dans le foie, les macrophages résidents (cellules de Kupffer) produisent de nombreuses cytokines comme le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6. Les interférons ont également une place centrale pour lutter contre la propagation du virus. Enfin, on trouve la famille des chimiokines, qui sont de petites molécules solubles ayant pour fonction de recruter les cellules immunitaires depuis la circulation sanguine vers le foie afin de résoudre l'infection. CXCL14, aussi appelée BRAK, est une chimiokine constitutivement exprimée dans de nombreux tissus et organes tels que le rein, la peau, le cerveau et le foie. CXCL14 a été décrite comme étant chémoattractantes pour les monocytes, les cellules dendritiques immatures et les cellules NK, et sa production semble être corrélée avec des processus inflammatoires.

Un modèle expérimental d'hépatite virale aiguë a été développé chez la souris suite à l'inoculation du virus MHV-3 (Murine Hepatitis Virus-3). Ce modèle a été utilisé afin d'étudier l'expression et le rôle de la chimiokine CXCL14 dans le contexte de l'hépatite virale. De plus, des modèles d'infections virales sur cultures primaires d'hépatocytes ont été développés afin d'étudier la régulation de l'expression de la chimiokine CXCL14. Enfin, une cohorte de patients présentant une hépatite aiguë virale a été mise en place, et les données obtenues concernant l'expression de CXCL14 ont été comparées à celles obtenues dans le groupe de donneurs sains.

Avec l'infection *in vitro* sur culture primaire d'hépatocytes, nous avons mis en évidence que la sécrétion de CXCL14 était induite par la lyse issue de l'infection virale. De plus, nous avons démontré que des stimulations par des cytokines pro-inflammatoires permettent une augmentation de l'expression de CXCL14. Les infections réalisées *in vivo* chez la souris nous ont permis de mettre en évidence que la chimiokine CXCL14 était surexprimé dans ce modèle ainsi que relarguée dans le sérum des souris. Des infections par le MHV-3 réalisées sur des souris déficientes pour CXCL14 n'ont pas permis de mettre en évidence de rôle spécifique à la chimiokine dans ce modèle. Enfin, la cohorte de patients a démontré une concentration élevée de CXCL14 chez les patients présentant une hépatite virale, en comparaison aux valeurs obtenues dans le groupe contrôle.

L'ensemble de ces données nous permettent de conclure que CXCL14 est surexprimée dans le contexte des hépatites virales humaines et murines. Ainsi, nous pouvons en déduire que CXCL14 serait un nouveau biomarqueur de ces hépatites.

Article soumis pour publication.

Serum CXCL14 chemokine overexpression is associated with acute viral hepatitis.

Christelle Devisme¹, Arnaud Chalin¹, Benjamin Lefevre¹, Charlotte Pronier^{1,2}, Muhammad Farooq¹, Vincent Thibault^{1,2}, Jacques Le Seyec¹, Céline Raguénès-Nicol¹, Charaf Benarafa^{3,4}, Claire Piquet-Pellorce¹ and Michel Samson^{1,*}

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

² Univ Rennes, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France.

³ Institute of Virology and Immunology, 3147 Mittelhäusern, Switzerland.

⁴ Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, 3012 Bern, Switzerland.

* corresponding author : Inserm-U.1085, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), Université de Rennes, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex, France. Tel: +33 22 323 5927; Fax: +33 22 323 4794; E-mail: michel.samson@inserm.fr

Abstract

The prevalence of viral hepatitis continues to increase worldwide, associated with high mortality and a lack of early biomarker. We aimed to determine the expression and function of a novel chemokine, CXCL14, in acute viral hepatitis. We used a mouse model of fulminant acute hepatitis induced by inoculation of murine hepatitis virus-type 3 (MHV-3), a lytic virus, to show that CXCL14 is overexpressed in the livers and sera of infected mice. However, CXCL14-deficient mice had similar sensitivity to our model of murine fulminant viral hepatitis as CXCL14 wild-type littermate. Nevertheless, we show that hepatocytes are the main hepatic source of CXCL14 using cultures of primary murine and human hepatocytes purified from the liver and infected with lytic hepatotropic viruses and that this chemokine is released into the blood during hepatocyte lysis, as illustrated by a significant positive correlation between the levels of hepatic transaminases and of CXCL14. Moreover, pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF α , are able to induce expression of CXCL14 in hepatocytes. Finally, we show that CXCL14 is overexpressed in the sera of patients infected with HAV, HBV, HEV, and HSV-1, and a positive correlation between CXCL14 and ALT levels in the sera of patients with herpetic acute hepatitis, suggesting that hepatocyte lysis is necessary for the release of CXCL14. Overall, these data highlight that CXCL14 expression is associated with the occurrence of fulminant viral hepatitis and could be used as a biomarker.

Keywords: CXCL14 chemokine, immune response, acute viral hepatitis, human cohort, animal study.

Introduction

The number of people infected by hepatitis viruses continues to increase worldwide, as well as the mortality associated with the transmission of these viruses, which represents a major global public health and economic problem (1). Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are the main causes of viral liver infection, with 325 million people affected, as estimated by the World Health Organization in 2017 (2). HCV and HBV generally

cause chronic hepatitis, characterized by persistence of the virus and fibrosis, culminating in hepatocellular carcinoma (HCC). However, HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, and herpes simplex viruses (HSV-1 or HSV-2) are also responsible for acute liver failure or fulminant hepatitis, which are infrequent but induce a potentially fatal clinical syndrome of severe impairment of liver function. Patients rapidly develop liver failure, associated with encephalopathy, which appears over a few

weeks (3), with only one treatment option, liver transplantation.

An experimental model system of acute hepatitis has been developed in mice by infection with mouse hepatitis virus (MHV) (4, 5). MHV type 3 (MHV-3) produces a clinically relevant model of acute hepatitis in infected mice, resulting in fulminant hepatitis, liver failure associated with substantial hepatocyte necrosis, and death five to seven days after infection (6, 7). MHV infection can therefore serve as a model to decipher the viral and immunological events of acute hepatitis (5, 8, 9).

Viral hepatitis is characterized by inflammation and the mobilization and activation of molecular and cellular actors of the immune system. Thus, cytokines play a key role in controlling the viral load or the infection. In the liver, resident immune macrophages, called Kupffer cells, are responsible for the release of cytokines, such as TNF α , IL-1 β , and IL-6 (10, 11). In acute hepatitis, innate immune cells, in particular NK and NKT cells, constitute the major immune cell population of lymphocytes in the liver and play a particularly important role in the pathogenesis of viral hepatitis (12). Various types of IFNs, type I, represented by IFN- α and - β , type II by IFN- γ , and type III, comprising IFN- λ , are cytokines produced by immune cells and hepatocytes and are involved in inhibition the replication of hepatitis virus in the liver (13, 14). In addition, chemokines, a large family of cytokines, are involved in hepatitis by recruiting immune cells from the blood to the liver and then activating them in the liver (15, 16).

CXCL14, also called BRAK (breast and kidney expressed chemokine), is a relatively recent member in the family of homeostatic chemokines (17). The amino-acid composition of CXCL14 is well conserved between many species (18). Murine CXCL14 has 97.4% sequence homology with human CXCL14, differing by only two amino-acid residues (19). The CXCL14 receptor has not yet been identified and thus its intracellular signaling pathway and functions are not fully understood for any species. CXCL14 is constitutively expressed in several tissues and organs, such as breast, kidney, lung, skin, and liver (20). Such basal expression suggests that CXCL14 plays a role in homeostasis and immune surveillance (18, 21). Furthermore, it has been shown to be a chemoattractant for blood monocytes (22), macrophages, immature dendritic cells (23), and NK cells (24). Minimally, CXCL14 expression appears to correlate with inflammatory processes and this chemokine has been shown to have direct antimicrobial activity (22, 25, 26).

Here, we aimed to study the expression and role of the CXCL14 chemokine during viral hepatitis using various approaches combining *in vitro* assays of

primary hepatocyte cultures infected by lytic viruses and *in vivo* assessment of CXCL14 in murine model of viral hepatitis and a human cohort.

Materials and methods

Human cohort

The study protocol was approved by the ethics committee of the Pontchaillou University Hospital (Rennes, France) and written informed consent was obtained from participants. Inclusion criteria were any acute liver injury (ALI) with ALT activity > 129 IU/L (equivalent to three times the upper normal limit, considered in this study to be 43 IU/L). Patients with acute-on-chronic liver injury were excluded or if another source of ALT activity was suspected (rhabdomyolysis, myocardial infarction, etc.). None of the patients had HCC. A control group consisting of 36 healthy volunteers from the French Blood Institute (Rennes, France), who were negative for HBV, HCV, and Human Immunodeficiency Virus (HIV), and had normal ALT activity (< 43 IU/L), were also included. Serum was obtained in separator tubes at the time of inclusion in the study, centrifuged at 2000 x g at 4°C for 10 min, aliquoted, and stored at -80°C until analysis.

Animal model and ethics statement

All experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the institution's guidelines for animal welfare (authors were authorized to conduct animal experimentation by "La direction des Services Vétérinaires" (license M Samson, #A3523840). The project was authorized by the "Comité Régional d'Éthique d'Expérimentation Animal" [CREAA] and the license given by the "Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche", #21301-2019062102252380). CXCL14-deficient mice and control littermates in C57BL/6J background were provided from the Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern (Switzerland) (22). Mice were maintained in temperature-controlled housing with a 12 h light/12 h dark cycle and provided with food and water *ad libitum*.

Amplification and titration of viruses

Mice were inoculated with 1,000 Murine Hepatitis Virus type-3 (MHV-3) particles (provided by Prof. Lucie Lamontagne, Canada) per mouse to amplify the virus *in vivo*. All mice were euthanized 72 h post-inoculation (hpi) and the liver collected, crushed, and filtered over 70- μ m nylon filters in sterile RPMI medium. The flow-through was centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 30 min. The supernatant containing the MHV-3 was collected, aliquoted, and stored at -80°C. Virus was amplified *in vitro* on L2 rat pulmonary cells in RPMI medium (Gibco®, Life Technologies) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-

Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), and 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies). Cells were plated at 80 % of confluence and the virus at MOI 0.5, 1 or 2 added 24 h later. The progression of lysis was checked every 12 h and the infection stopped when 80% of the cells were lysed. Then, the cells were subjected to two freeze-thaw cycles and the supernatant collected, centrifuged at 5,000 rpm for 15 min at 4°C, aliquoted, and stored at -80°C. MHV-3 was titrated on L2 cells in 96-microwell plates by the method of TCID50 (Tissue Culture Inhibit Dose 50). The viral titer was determined by the Reed and Muench method (27). HSV-1 virus (Herpes Simplex Virus type 1) was harvested from patients with labial herpes infections at the CHU Pontchaillou (Prof. V. Thibault, Rennes, France) and cultured on MRC5 human pulmonary fibroblasts. HSV-1 was amplified and titrated on MRC5 cells in MEM medium (Gibco®, Life Technologies) with 10% FBS (HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), and 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies). The same protocols as those used for MHV-3 amplification and titration were used.

MHV3-induced acute murine hepatitis

C57Bl/6J wildtype (WT) or CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice, aged between 8 and 12 weeks, were inoculated with a suboptimal dose of MHV-3. Virus was diluted in sterile Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco®, Life Technologies) and 200 µL injected by the intraperitoneal route per 20 g mouse bodyweight. Control mice were injected with sterile DPBS only. The weight and behavior of all mice were checked every 12 h for five days. At 48 hpi, 72 hpi, and 5 days post infection (dpi), a batch of mice was euthanized and blood samples collected by the retro-orbital route in the presence of heparin. Serum was obtained following centrifugation at 3,500 rpm at 4°C for 15 min. Serum alanine (ALT) and aspartate (AST) aminotransferase transaminase levels were measured according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine primary reference procedures using an Olympus AU2700 Autoanalyzer (Olympus Optical) at the CHU Pontchaillou (Rennes, France). The liver and spleen were collected for analysis by qPCR, western blotting, ELISA, and immunohistochemistry.

Primary culture of murine hepatocytes, viral infection, and cytokine stimulation

Primary mouse hepatocytes were recovered from C57Bl/6J WT mice. Mice were anesthetized with a mix of xylazine and ketamine (10 mg/kg and 60 mg/kg, respectively) and the liver was first washed and then perfused by the inferior cava vein route with a solution of collagenase, as previously described (28). The liver was placed in Leibowitz medium and the liver capsule broken using two

pipettes to release the cells. After nylon filtration and decanting, hepatocytes were separated from other hepatic cells using a 12% Percoll gradient. Hepatocytes were seeded onto collagen I-coated culture plates at a density of 10⁵ cells/cm² in seeding medium: William's E medium (Gibco®, Life Technologies) completed with 10% FBS (HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies), and 0.1% insulin (15500, Sigma®). Four hours later, the seeding medium was replaced by maintenance medium: William's E medium (Gibco®, Life Technologies) with 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies), 0.1% insulin (Sigma® 15500), 0.3% bovine serum albumin (BSA, 30% HALALBOIOP, Eurobio®), and 0.02% dexamethasone (D8893, Sigma®). Twenty-four hours after seeding, cells were infected by MHV-3 at an multiplicity of infection (MOI) of 1 (virus:cell ratio of 1:1) and 4 h later, the infection medium was replaced by fresh medium (without virus). MHV-3 induced lysis was checked every 24 h from day 2 to day 5 by microscopy. The supernatant and cell lysates were then collected to perform analysis by RT-qPCR, western blotting, and ELISA. 24h after seeding cells were also stimulated with the pro-inflammatory cytokines, IL-6 or TNFα at 5 ng/mL each. Supernatants and cell lysates were then collected every 12 h to perform analysis by RT-qPCR, western blotting, and ELISA.

Primary culture, viral infection, and cytokine stimulation of human hepatocytes

Primary human hepatocytes were recovered from patients of the CHU Pontchaillou (Rennes, France). These patients had undergone a hepatectomy following hepatic metastases of colorectal cancer. Human hepatocytes were seeded onto collagen-I-coated plates at a density of 2.10⁵ cells/cm² in seeding medium: William's E medium (Gibco®, Life Technologies) with 10% FBS (HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), 0.5% Gentamycin (Gibco®, Life Technologies), 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies), and 0.1% insulin (Sigma® 15500). Twelve hours later, the seeding medium was replaced with maintenance medium: William's E medium (Gibco®, Life Technologies) with 10% FBS (HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), 0.5% Gentamycin (Gibco®, Life Technologies), 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies), 0.1% insulin (Sigma® 15500), 2% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma®), and 0.02% hydrocortisone hemi-succinate at 0.1 µg/mL (UPJOHN®). Three days after seeding, cells were infected with HSV-1 at a MOI of 1. Every 12 hpi, lysis induced by HSV-1 was checked by microscopy and

the supernatants and cell lysates collected to perform analysis by RT-qPCR, western blotting, and ELISA. 3 days after seeding, cells were also stimulated with a cocktail of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF α , IFN γ , Oncostatin M (OSM), and IL-1 β) at 5 ng/mL each, and supernatants and cell lysates taken every 12 h to perform analysis by RT-qPCR, western blotting, and ELISA.

RT-qPCR from cells in culture or liver tissue

Liver tissue was homogenized using an Ultra Turrax® T25 digital homogenizer in Nucleospin RNA lysis buffer (#740955, Macherey-Nagel) with 0.1% beta-mercaptoethanol. After infection or *in-vitro* stimulation, hepatocytes were lysed in the same buffer. RNA extraction was performed as recommended by the manufacturer. Total RNA was loaded onto the column in 70% ethanol. DNA was eliminated by incubation with DNase for 15 min at room temperature (RT). Finally, RNA was eluted in 50 μ L ultra-pure RNase- and DNase-free water (Gibco®, Life Technologies). The total RNA concentration was determined by spectrophotometry using a NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer). cDNA was synthesized from 1 μ g RNA by reverse transcription using a commercial kit (Applied biosystems® High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) in the presence of dNTPs (50 mM), random primers, and MultiScribe® reverse transcriptase. The volume was adjusted to 20 μ L with ultra-pure RNase- and DNase-free water (Gibco®, Life Technologies) and the reaction carried out 2 h at 37°C, followed by inactivation of the enzyme at 95°C for 5 min. To analyze target gene expression, real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using specific primers at 1 μ M (Supplementary data 1), Sybr Green dye (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems®), and the CFX384 Touch™ Real-time PCR detection system (Bio-Rad®). Each measurement was performed in triplicate. Relative gene expression was normalized against that of the 18S gene. Absolute quantification of MHV-3 was made by using a recombinant plasmid for MHV-3 with known concentration, and specific primers for MHV-3 capsid.

Western-blot

Hepatic tissues were homogenized using an Ultra Turrax® T25 digital in RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate) with protease inhibitors (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail, Roche) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP™, Roche). Cultured hepatocytes were lysed in the same buffer. Extracts were sonicated on ice and centrifuged at 12,500 rpm at 4°C for 15 min. Supernatants were collected and stored at -20°C. Protein concentrations were determined using the Bradford

assay (Bradford Reagents from Bio-Rad). Protein extracts (30 μ g) were loaded onto 12 % acrylamide gels and the proteins separated in Tris-glycine buffer with 1 % SDS at 100 V for 1 h. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Protran® 0.45 μ m, GE Healthcare) in Tris-glycine buffer at 20 V for 1 h. Membranes were blocked in TBS-0.1 % Tween-1 % BSA for 1 h. Membranes were then incubated with a primary antibody against CXCL14 (ab137541, Abcam, rabbit, 1/2,000) overnight at 4°C. Membranes were washed and incubated in a secondary antibody (Goat anti-rabbit Horseradish peroxidase (HRP), Dako, 1/2000) for 1 h at RT. Revelation was performed by chemiluminescence (ChemiDoc XRS+, Biorad) using ECL (Pierce™ ECL Western-Blotting Substrate, Thermo Scientific). β -actin was used as a housekeeping protein. Membranes were incubated with a primary antibody against β -actin (A3854, Sigma, mouse, 1/5,000) for 1 h at RT. After washing, membranes were incubated in a secondary antibody (Goat-anti mouse HRP, Dako, 1/5,000) for 45 min at RT (Supplementary data 2A).

Histological analysis

Fragments of human and murine tissues were fixed in 4% paraformaldehyde before being embedded in paraffin for immunohistochemistry. For histopathology, 4 μ m liver sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) to investigate inflammation and MHV3-induced lysis. Immunohistochemistry was performed on liver sections in paraffin with a primary antibody (CXCL14: ab137541, Abcam, rabbit, 1/200; Cleaved Caspase 3: #9661, Cell Signaling, rabbit, 1/200). Tissue sections were dried for 1 h at 58 °C, followed by antigen retrieval, and incubated with the primary antibody on a Ventana automated staining platform (Ventana Medical Systems, USA). Revelation of the primary antibody was carried out using a HRP-conjugated secondary antibody (Dako, USA) and DAB substrate kit (Ventana, #760-124). Finally, all slides were scanned using a digital slide scanner (Hamamatsu Nanosizer 2.0-RS) and the files analyzed using NDP viewer software (Hamamatsu) (Supplementary data 2B).

CXCL14 detection in fluids

Serum samples and hepatocyte supernatants were stored at -80°C until the assay. CXCL14 chemokine concentrations were determined using a CXCL14 ELISA kit (DY866, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. The murine standard consisted of recombinant CXCL14 (NBP2-35156, Novus Biologicals). All samples were measured in triplicate and the CXCL14 concentration determined against a standard curve.

Pro-inflammatory cytokine detection

Sera of non-infected (NI) and MHV3-infected mice were used to measure pro-inflammatory cytokine levels 72 hpi. Secreted cytokines were analyzed using the LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) array (Biolegend) according to the manufacturer's protocol. The data were collected using an LSRFortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using LEGENDplex™ software version 7.0 (VigeneTech).

Liver immune-cell analysis by flow-cytometry

Mouse livers were flushed by perfusion with PBS through the inferior vena cava *in situ* to remove blood before collecting the entire liver. The livers were then crushed using a 70 µm cell strainer (Falcon #352350, Fisher Scientific). Parenchymal cells were removed by sedimentation for 1 h. Liver immune cells were isolated by density separation by centrifugation in RPMI media (RPMI 1640 Media, Gibco) with 35% Percoll (Percoll density gradient media, GE Healthcare, Life Sciences) at 2,600 rpm and RT during 25 mins without brake. Red blood cells were first lysed in ammonium chloride potassium (ACK) buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.01 mM EDTA). Cell suspensions were labeled for 30 min with LIVE/DEAD fixable green stain (#L34959, Life Technologies) to exclude dead cells. Cells were also incubated with an anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2, BD Pharmingen) to block non-specific binding before staining with fluorochrome-conjugated antibodies (Supplementary data 3A). The fluorescence of stained cells was measured using an LSRFortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and the data analyzed using Flowlogic™ software (Inivai). Dead cells and doublets were excluded on the basis of LIVE/DEAD labeling and area and height of side scatter, respectively. Immuno-phenotyping was based on the appropriate size-FSC/structure-SSC gates and was as follows: B-cells: CD19⁺/CD3⁻; T-cells: CD3⁺/TCRVβ⁺/NK1.1⁻/CD19⁻, on which CD4⁺ and CD8⁺ were distinguished; NKT cells: CD3⁺/NK1.1⁺/CD19⁻; NK cells: CD3⁻/NK1.1⁺/CD19⁻; within the myeloid CD19⁻/CD3⁻/NK1.1⁻/CD11b⁺ cell population, neutrophils were selected as GR1^{high} and macrophages as GR1^{int} (Supplementary data 3B). Cell activation was studied by analyzing the level of CD69. We calculated the percentage of each immune-cell population by considering the sum of events of all immune-cell populations analyzed (T, NK, NKT, B cells and neutrophils and macrophages) as 100% of the total immune cells.

Statistical analysis

Data are expressed as the means ± SEM for all similar conditions. The mean values for the human cohorts and experiments on mice inoculated with MHV-3 were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney U-test. All *in vitro* experiments were

analyzed using the parametric Student-t test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism5 software. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

Results

MHV-3 infection induces hepatic and serum CXCL14 overexpression in mice

We analyzed cytokine expression profiles following MHV-3 infection by performing quantitative PCR on a large series of 345 genes involved in inflammation during viral hepatitis using the previously described mouse fulminant-hepatitis by MHV-3 inoculation model (6). The mice became ill as early as two days post-inoculation, with significant weight loss, an increase in ALT and AST transaminase levels, and major hepatocyte necrosis at 72 hpi, as expected (Supplementary data 4).

Among the 345 genes studied, some cytokines and chemokines were upregulated, amongst them, CXCL14. We next assessed CXCL14 mRNA expression by quantitative PCR in the livers of mice, infected or not with MHV-3, at various times post-inoculation. CXCL14 mRNA levels were five-fold higher in the livers of mice inoculated with MHV-3 at 48 and 72 hpi than in the NI controls (Figure 1A).

Western-blot analysis also showed CXCL14 protein levels to increase in the livers of MHV-3-infected mice 48 and 72 hpi (Figure 1B). A major band was detected at 17 kDa, corresponding to the monomer of CXCL14 (29). Moreover, we were able to detect a second band at 34 kDa, which could be a dimer of CXCL14. After quantification, CXCL14 monomer production was significantly higher in the livers of MHV-3-infected mice 48 and 72 hpi than those of NI mice (Figure 1C).

Primary murine and human hepatocytes produce CXCL14

We next determined amongst hepatic cells whether hepatocytes were the source of CXCL14 production. Cultures of primary hepatocytes (PMH) issued from the liver of C57Bl/6 mice were seeded and infected with various ratios of MHV-3 (MOIs of 0.5, 1, or 2). Non-infected hepatocytes had a polygonal appearance, with one or two nuclei (Figure 2A). Infection with MHV-3 at an MOI of 1 induced marked lysis of PMH after five days and cells had lost their spatial organization.

We analyzed CXCL14 transcript levels in NI and infected primary murine hepatocytes by quantitative PCR. No induction of CXCL14 mRNA expression was observed during the infection from day 2 to day 9 relative to NI hepatocytes (data not shown). Next, we performed ELISA to quantify CXCL14 chemokine levels in conditioned media of

NI and infected PMH (Figure 2B) during the kinetics of infection (from 2 to 9 days post-infection). The level of CXCL14 was 500 pg/mL in conditioned media of NI cells and reached 2,000 pg/mL at six days after MHV-3 infection at a MOI of 1. In parallel, the level of ALT in the same conditioned media showed a profile similar to that of CXCL14, with a peak at six days post-infection, suggesting a correlation between release of CXCL14 and ALT (Figures 2C and D).

We examined the potential regulatory pathway of CXCL14 expression by incubating PMH with IL-6 or TNF- α at 5 ng/mL and measuring CXCL14 mRNA levels by quantitative PCR. IL-6 induced a significant 12-fold increase in CXCL14 expression after 12 to 72 h of incubation (Figure 2E). Furthermore, TNF α induced a significant four-fold increase of CXCL14 transcript levels, with the maximum level obtained after 12 h of incubation (Figure 2F). CXCL14 was not found in conditioned media of PMH incubating with IL-6 or TNF α (data not shown).

We further analyzed CXCL14 production by human hepatocytes by infecting primary human hepatocytes (PHH) with HSV-1, a lytic virus that can induce fulminant hepatitis in humans, at MOI 1 (Figure 3A). Non-infected PHH had a polygonal appearance, with mainly one nucleus and multiple contacts with other cells (Figure 3A, left). Seventy-two hours after HSV-1 infection, the PHH became balloon-like, and multiple areas of lysis were observed (Figure 3A, right). Infection with HSV-1 induced a significant 12-fold increase in CXCL14 mRNA levels from 12 to 48 hpi in PHH (Figure 3B). CXCL14 release was measured by ELISA of the conditioned media of NI and infected cells from 12 to 72 hpi. CXCL14 was easily detectable at 12 (300 pg/mL) and 72 hpi (100 pg/mL), whereas it was undetectable in the conditioned media of NI hepatocytes (Figure 3C). Furthermore, PHH incubated or not (NT) with a cocktail of five cytokines, including IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL1- β , Oncostatin M (OSM), all at 5 ng/mL for 12 to 72 h showed that the cocktail of pro-inflammatory cytokines significantly induce CXCL14 mRNA expression within few hours, with a maximum five-fold increase at 12 hpi (Figure 3D).

We also studied the production of CXCL14 by other hepatic cells, such as hepatic stellate cells (HSC) (30) and liver sinusoidal endothelial cells cell line (TRP3) (31) by western blotting. We were able to detect a band at 17 kDa, corresponding to CXCL14, in PHH but not HSC or TRP3 (Figure 3E).

Overall, these *in vitro* experiments show that hepatocytes are the physiological source of CXCL14 in the liver, that its expression is induced by TNF- α and IL-6, and that its release by hepatocytes

requires their lysis induced by infection with a lytic virus.

CXCL14 release is associated with hepatocyte death in MHV-3 infected mice

We inoculated MHV-3 in wild-type mice and then evaluated liver damages by HES staining and cleaved-caspase 3 (CC3) labelling of liver sections at 72 hpi (Figure 4A). The livers of NI mice showed no areas of lysis, whereas there were many areas of apoptosis in the livers of MHV-3-infected mice. We also evaluated liver damage by measuring ALT levels in the sera of NI and MHV-3-infected mice (Figure 4B). ALT levels were near 100 IU/L in NI mice, whereas they increased markedly three days after MHV-3 inoculation to near 10,000 IU/L. However, certain mice inoculated with MHV-3 had similar ALT levels as NI mice, potentially due to the use of a suboptimal pathological dose of virus (dots colored in grey). We also measured CXCL14 levels by ELISA in the sera of NI and MHV-3-infected mice, (Figure 4C). The release of CXCL14 was near 100 pg/mL in the sera of NI mice and was significantly higher, reaching 10,000 pg/mL in the sera of MHV-3-infected mice at 72 hpi. The serum levels of CXCL14 and ALT activity showed a significant exponential correlation, with $r^2 = 0.9065$, at 72 hpi with MHV-3 (Figure 4D).

We also determined the serum concentrations of 13 pro-inflammatory cytokines by multiplex immunoassay. IL-6 and TNF α levels were much higher in the sera of mice infected with MHV-3 at 72 hpi than those of NI mice, with levels near 1,000 pg/mL and 60 pg/mL, respectively (Figures 5A and 5B). We also measured serum concentrations of IFN γ and IFN β , cytokines mainly involved in the anti-viral response (Figures 5C and 5D). The levels of these cytokines were also higher in MHV-3 infected than NI mice with levels near 300 pg/mL and 400 pg/mL, respectively. There was no difference in the concentrations of IL-23, IL-1 α , IL-12, IL-1 β , IL-10, IL-27, IL-17A, or GM-CSF between NI and infected mice (data not shown). Finally, there was a significant exponential correlation between CXCL14 and IL-6 with $r^2 = 0.9537$ and $p < 0.0001$ and a linear correlation between CXCL14 and TNF α levels at 72 hpi, with $r^2 = 0.9287$ and $p < 0.0001$ (Figures 5E and 5F).

Overall, these data suggest that CXCL14 release into serum is associated with liver damage, in particular with hepatocyte lysis induced by MHV-3 inoculation, and with TNF α and IL-6 expression during the inflammatory process of hepatitis.

Association between CXCL14 level and the presence of immune-cell populations in the MHV-3 mouse model

We characterized CXCL14 in the antiviral response using the MHV-3 model. The total number of immune infiltrating cells in the liver decreased following MHV-3 inoculation (Figure 6A). There were no significant difference in the number or percentage of CD8⁺ T cells or B cells following MHV-3 inoculation relative to those of NI mice (Figure 6B). However, the proportion and number of CD4⁺ T cells and NK cells increased after MHV-3 infection (Figure 6B and C), whereas those of NKT cells, macrophages, and neutrophils strongly decreased (Figure 6B and D). There was a correlation between the CXCL14 serum concentration and the percentage of CD4⁺ T cells per gram of liver, with $r^2 = 0.7210$ (Figure 6E). Finally, we analyzed immune-cell activation using the marker CD69. CD4⁺ T, CD8⁺ T, B, NK, and NKT cells were all activated after MHV-3 inoculation relative to those from NI mice (Figure 6F). Furthermore there was a strong correlation between CXCL14 levels and the percentage of activated cells, with r^2 between 0.8761 and 0.9816 (Figure 6G).

Overall, these results show that infection with MHV-3 induced an active immune response to control viral replication associated with CXCL14 overexpression.

Characterization of fulminant hepatitis induced by MHV-3 inoculation in WT and CXCL14-deficient mice

We assessed the *in vivo* function of CXCL14 using the MHV-3 infection model in CXCL14-deficient mice (CXCL14^{-/-}) and compared it to that of CXCL14^{+/+} WT littermates. Although the mice started to lose weight at 48 hpi, there was no significant difference between the weight loss of WT and CXCL14-deficient mice (Supplementary data 5A and 5B). There was also no significant difference between the survival curves of the CXCL14-deficient and WT mice after MHV-3 inoculation (Figure 7A).

After euthanasia, the livers were weighted, again showing no difference between the CXCL14^{-/-} and WT mice following MHV-3 inoculation (Supplementary data 5C). Furthermore, we determined MHV-3 amplification in the liver by qPCR of the MHV-3 capsid gene in CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice (Figure 7B). The livers of both CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice showed approximately 10⁶ copies of the MHV-3 capsid at 72 hpi, demonstrating that all mice developed an infection. There was no significant difference in viral amplification in the liver between the two genotypes, although some mice had lower copy numbers of the MHV-3 capsid gene in their livers

(grey symbols); these mice tended to be less sick and did not lose weight.

We evaluated liver damage following MHV-3 inoculation by staining with HES. The livers of both CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice showed limited areas of hepatocyte lysis at 72 hpi, which expanded markedly by 108 hpi, showing no differences between the two genotypes (Figure 7C). Furthermore, we measured the levels of ALT and AST transaminases in the sera of mice as an indication of liver damage. Both CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice showed a significant increase in serum AST and ALT levels after infection, with no significant difference between the two genotypes at either 72 or 108 hpi (Figure 7D and E). In both genotype, some mice showed non-significant increase of AST and ALT levels (grey symbols), corresponding to less sick mice.

We also compared the inflammatory and anti-viral responses between CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice after MHV-3 inoculation by measuring IL-6 and TNF- α levels in the sera. The IL-6 concentration was higher 72 hpi in both CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice, with a mean value near 800 pg/mL, without a significant difference between the two genotypes (Supplementary data 5D and 5E). We observed the same result for TNF- α , with a mean concentration at 72 hpi near 40 pg/mL in CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice.

In conclusion, absence of CXCL14 does not alter the occurrence of murine viral hepatitis in the MHV-3 model.

CXCL14 levels are associated with the release of ALT into the sera of patients with viral hepatitis

Finally, we evaluated whether CXCL14 release could be a biomarker of acute hepatitis in humans. CXCL14 levels were measured in the sera of 61 patients with acute viral hepatitis caused by various viruses, or in the sera of 139 patients with non-viral acute hepatitis and 36 healthy donors. Characteristics such as age range, sex and transaminase activity range of the cohort members are presented in Figure 8A. There were no significant difference between the non-viral and viral groups or healthy donors, except for ALT and AST level linked to hepatitis.

Serum CXCL14 levels, measured by ELISA, were significantly higher in the sera of patients with viral hepatitis than those in the sera of healthy donors and non-viral hepatitis patients (Figure 8B). The mean CXCL14 serum concentrations were about 100 pg/mL and 200 pg/mL for healthy donors and non-viral hepatitis group, respectively, and reached 1,200 pg/mL in the sera of the viral hepatitis group. No significant difference within this group was obtained between the various etiologies, such as

infection due to HAV (n = 26), HBV (n = 9), HEV (n = 22), and HSV-1 (n = 4) (Figure 8C).

We also examined the potential correlation between CXCL14 concentrations and ALT levels in the acute viral hepatitis group of patients (Figure 8D). There was no correlation between these two parameters for patients infected with HAV, HBV, or HEV. However, there was a positive correlation between CXCL14 and ALT levels in the sera of patients with herpetic acute hepatitis, with $r^2 = 0.985$ and $p = 0.007$.

Overall, these patient data suggest that the increase in CXCL14 levels in serum is associated with severe acute hepatitis induced by viral liver infection in humans and can be considered to be a biomarker of this disease.

Discussion

The number of human hepatitis cases due to infection by hepatotropic viruses, such as HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, or HSV-1 is increasing, along with the associated mortality. Immunity plays a key role in resolving such viral infections. Among the actors of immunity, we focused on the chemokine CXCL14. Indeed, we found CXCL14 to be overexpressed in the livers of mice infected by a virus responsible for fulminant hepatitis. We aimed to understand the regulation and expression of CXCL14 during viral hepatitis and the role of CXCL14 in inflammation following viral infection.

We demonstrate that, in the liver, CXCL14 is expressed by hepatocytes but not endothelial cells or hepatic stellate cells, suggesting that hepatocytes in the livers are the major source of CXCL14, as already observed by the human atlas consortium (www.proteinatlas.org). CXCL14 is ubiquitously and abundantly expressed in various normal epithelial tissues, such as those in the digestive and urinary tract, placenta, tongue, breast, kidney, and skin (20, 26). The expression of CXCL14 is generally down-regulated in inflammatory processes, indicating that it plays an important role in the maintenance of tissue homeostasis (32). However, we found that IL-6 and TNF α are able to induce CXCL14 transcript and protein levels in PMH. In hepatitis, in which inflammation is high, IL-6 and TNF α are known to be overexpressed. Indeed, CXCL14 levels were also elevated and were closely associated with those of IL-6 and TNF α . It has been shown that CXCL14 expression can be inhibited by inflammatory stimuli, such as TNF α in epithelial tissues (20). However, the molecular mechanisms governing CXCL14 expression are still unclear.

Surprisingly, we have been unable to measure CXCL14 protein in conditioned media without cell

lysis, even when the CXCL14 transcript was upregulated. Cytokines and chemokines are released during classical degranulation from secretory granules previously packaged in the Golgi for storage. The mode of CXCL14 secretion is still unknown. Here, we hypothesise that cell lysis is responsible for the massive release of CXCL14 into the bloodstream. Thus, we demonstrate, both *in vitro* and *in vivo* in mice and humans, that CXCL14 is released after necrotic lysis. CXCL14 is released as an alarmin, as are IL-33 (6, 29), HMGB1 (34), S100 protein, and IL-1 β (35) in hepatitis. In patients, CXCL14 is overexpressed in the acute inflammatory context of hepatitis, which differs from chronic viral hepatitis, for which we have not observed overexpression (data unpublished). Moreover, the best correlation between transaminase levels, the gold standard of hepatocyte lysis, and those of serum CXCL14 was obtained in HSV-1 infected patients, probably due to the fact that HSV-1 is the most lytic virus of hepatocytes in humans.

We investigated the role of CXCL14 in viral hepatitis using CXCL14-deficient mice and their littermates infected with MHV-3. We measured a series of parameters without observing any differences between WT and CXCL14-deficient mice after infection with MHV-3. CXCL14 has been previously shown to be a chemoattractant for tissue macrophages (32) and dendritic cells (30, 31). MHV-3 has previously been shown to induce a cellular and molecular response following its binding to the TLR2 receptor present on the surface of hepatocytes, as well as that of macrophages and dendritic cells (38). In our study, flow cytometry analysis showed that MHV-3 targets hepatocytes, as well as circulating and resident macrophages of the liver. Indeed, MHV-3 infection causes the disappearance of macrophages. It is therefore difficult to observe an effect of CXCL14 on the macrophage population in this MHV3-dependent infection.

One of the few studies exploring the role of CXCL14 *in vivo* reports that CXCL14-deficient mice exhibit reduced bacterial clearance from the lungs and that CXCL14 shows direct bactericidal activity, in part through bacterial membrane depolarization (22). These activities are not effective in the context of viral infection.

Finally, we looked for an association between CXCL14 expression and immune cells present in the liver during viral hepatitis using our MHV-3 infected mouse model. Here, we found that the expression of CXCL14 is strongly associated with the number of activated T lymphocytes (CD4 and CD8), activated B lymphocytes, and activated NK and NKT cells.

In conclusion, our studies demonstrate that CXCL14 is regulated by IL-6 and TNF α , is released into the blood by hepatocyte lysis, and is associated with an increase in the number of activated T and B lymphocytes, as well as activated NK and NKT cells. Furthermore, CXCL14 could be a biomarker of acute viral hepatitis in humans.

Funding statement

This work was supported by the INSERM, the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”, the University of Rennes 1 and the “Région Bretagne” and in particular the CPER grant called “infectio”. CD was supported by a PhD fellowship from the “Région Bretagne”, INSERM and ANRS.

Acknowledgements

We would like to thank Lucie Fonteneau for her technical assistance. We acknowledge the “Laboratoire de Biochimie-Toxicologie” from the “CHU de Rennes” for transaminase measurements. For histological analysis, bead-based immunoassays, and animal house facilities, we would like to thank the dedicated platforms (i.e H2P2, flow-cytometry and cell sorting, and ARCHE) of SFR Biosit – UMS 3480, US_S 018, France.

Conflict of Interest

The authors have no financial or commercial conflict of interest to declare.

References

1. Mysore KR, Leung DH. Hepatitis B and C. *Clin Liver Dis*. 2018 Nov;22(4):703–22.
2. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1264–1273.e1.
3. Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, Kabbani M, Cobat A, Bastard P, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med*. 2019 Aug 5;216(8):1777–90.
4. Lamontagne L, Descoteaux JP, Jolicoeur P. Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J Immunol*. 1989 Jun 15;142(12):4458–65.
5. Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L. A synergistic interferon-gamma production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e551–561.
6. Carrière V, Arshad MI, Le Seyec J, Lefevre B, Farooq M, Jan A, et al. Endogenous IL-33 Deficiency Exacerbates Liver Injury and Increases Hepatic Influx of Neutrophils in Acute Murine Viral Hepatitis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1359064.

7. Arshad MI, Patrat-Delon S, Piquet-Pellorce C, L'helgoualc'h A, Rauch M, Genet V, et al. Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis. *PLoS One*. 2013;8(9):e74278.
8. Bleau C, Filliol A, Samson M, Lamontagne L. Mouse Hepatitis Virus Infection Induces a Toll-Like Receptor 2-Dependent Activation of Inflammatory Functions in Liver Sinusoidal Endothelial Cells during Acute Hepatitis. *J Virol*. 2016 15;90(20):9096–113.
9. Jacques A, Bleau C, Martin J-P, Lamontagne L. Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 2008 May;152(2):298–310.
10. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*. 2014 Sep;61(3):660–71.
11. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 2006;26(10):1175–86.
12. Mikulak J, Bruni E, Oriolo F, Di Vito C, Mavilio D. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Front Immunol*. 2019;10:946.
13. Afify M, Hamza AH, Alomari RA. Correlation Between Serum Cytokines, Interferons, and Liver Functions in Hepatitis C Virus Patients. *J Interferon Cytokine Res*. 2016 Oct 11;37(1):32–8.
14. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):778–809.
15. Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Pérez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2002 Nov;97(11):2861–70.
16. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014 Sep;147(3):577–594.e1.
17. Benarafa C, Wolf M. CXCL14: the Swiss army knife chemokine. *Oncotarget*. 2015 Oct 8;6(33):34065–6.
18. Cao X, Zhang W, Wan T, He L, Chen T, Yuan Z, et al. Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for human neutrophils and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2000 Sep 1;165(5):2588–95.
19. Huising MO, van der Meulen T, Flik G, Verburg-van Kemenade BML. Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites. *Eur J Biochem*. 2004 Oct;271(20):4094–106.
20. Meuter S, Moser B. Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues. *Cytokine*. 2008 Nov;44(2):248–55.
21. Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, et al. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol*. 2000 May;12(5):677–89.
22. Dai C, Basilio P, Cremona TP, Collins P, Moser B, Benarafa C, et al. CXCL14 Displays Antimicrobial Activity against Respiratory Tract Bacteria and Contributes to Clearance of *Streptococcus pneumoniae* Pulmonary Infection. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5980–9.
23. Hara T, Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J Biochem (Tokyo)*. 2012 May;151(5):469–76.
24. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmī Z, Dahl R, Christopherson K, et al. The chemokine CXCL14 (BRAF) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol*. 2006 Aug;34(8):1101–5.
25. Lu J, Chatterjee M, Schmid H, Beck S, Gawaz M. CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator. *J Inflamm Lond Engl [Internet]*. 2016 Jan 5 [cited 2018 Oct 16];13. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4700668/>
26. Maerki C, Meuter S, Liebi M, Mühlemann K, Frederick MJ, Yawalkar N, et al. Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of CXCL14 Suggests an Immediate Role in Skin Infections. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):507–14.
 27. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol.* 2016 May 12;5(2):85–6.
 28. Farooq M, Filliol A, Simoes Eugénio M, Piquet-Pellorce C, Dion S, Raguene-Nicol C, et al. Depletion of RIPK1 in hepatocytes exacerbates liver damage in fulminant viral hepatitis. *Cell Death Dis [Internet].* 2019 Jan 8 [cited 2020 Jul 9];10(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325114/>
 29. Waldemer-Streyer RJ, Reyes-Ordoñez A, Kim D, Zhang R, Singh N, Chen J. Cxcl14 depletion accelerates skeletal myogenesis by promoting cell cycle withdrawal. *NPJ Regen Med.* 2017 Jan 5;2:16017.
 30. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6b):1726–39.
 31. Parent R, Durantel D, Lahlali T, Sallé A, Plissonnier M-L, DaCosta D, 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 Jul 18;450(1):7–12.
 32. Kurth I, Willimann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):855–61.
 33. Rostan O, Gangneux J-P, Piquet-Pellorce C, Manuel C, McKenzie ANJ, Guiguen C, et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *mBio.* 2013 Sep 17;4(5):e00383-00313.
 34. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2012 Sep;32(8):1200–10.
 35. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017 Jan;14(1):43–64.
 36. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, et al. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8262–70.
 37. Schaerli P, Willimann K, Ebert LM, Walz A, Moser B. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity.* 2005 Sep;23(3):331–42.
 38. Bleau C, Burnette M, Filliol A, Piquet-Pellorce C, Samson M, Lamontagne L. Toll-like receptor-2 exacerbates murine acute viral hepatitis. *Immunology.* 2016;149(2):204–24.

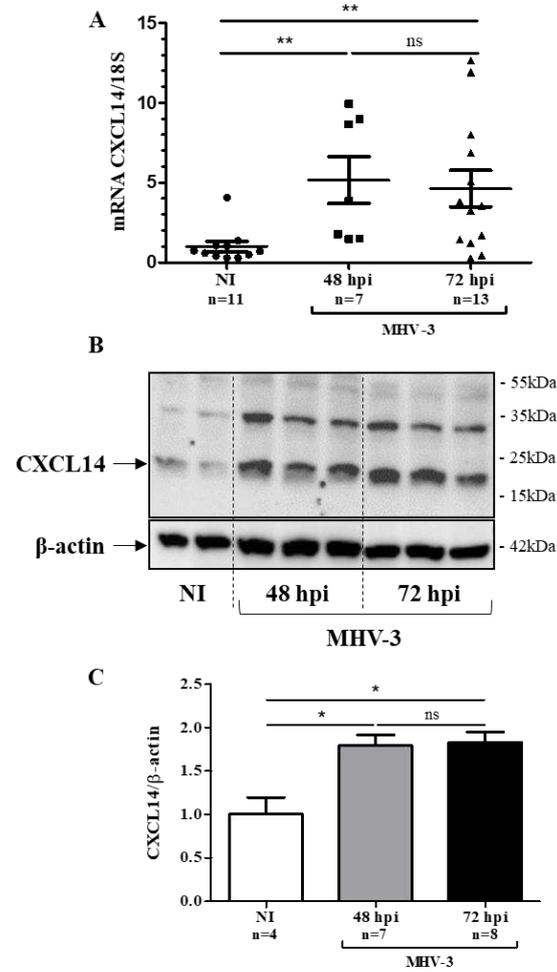


Figure 1. A non-targeted microarray approach highlights over-expression of CXCL14 in the livers of mice infected with MHV-3, confirmed both at the mRNA and protein levels. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Forty-eight hours or seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver. A) CXCL14 mRNA expression in the livers of non-infected (NI) and MHV-3-infected mice after 48 and 72 h. B) Western blot analysis of CXCL14 in the livers of control (NI, n = 4) and MHV-3 infected mice 48 (n = 7) and 72 hpi (n = 8). C) Quantification of western blot of CXCL14 in the livers of control (NI, n = 4) and MHV-3-infected mice 48 (n = 7) and 72 hpi (n = 8). A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI and MHV-3 mice).

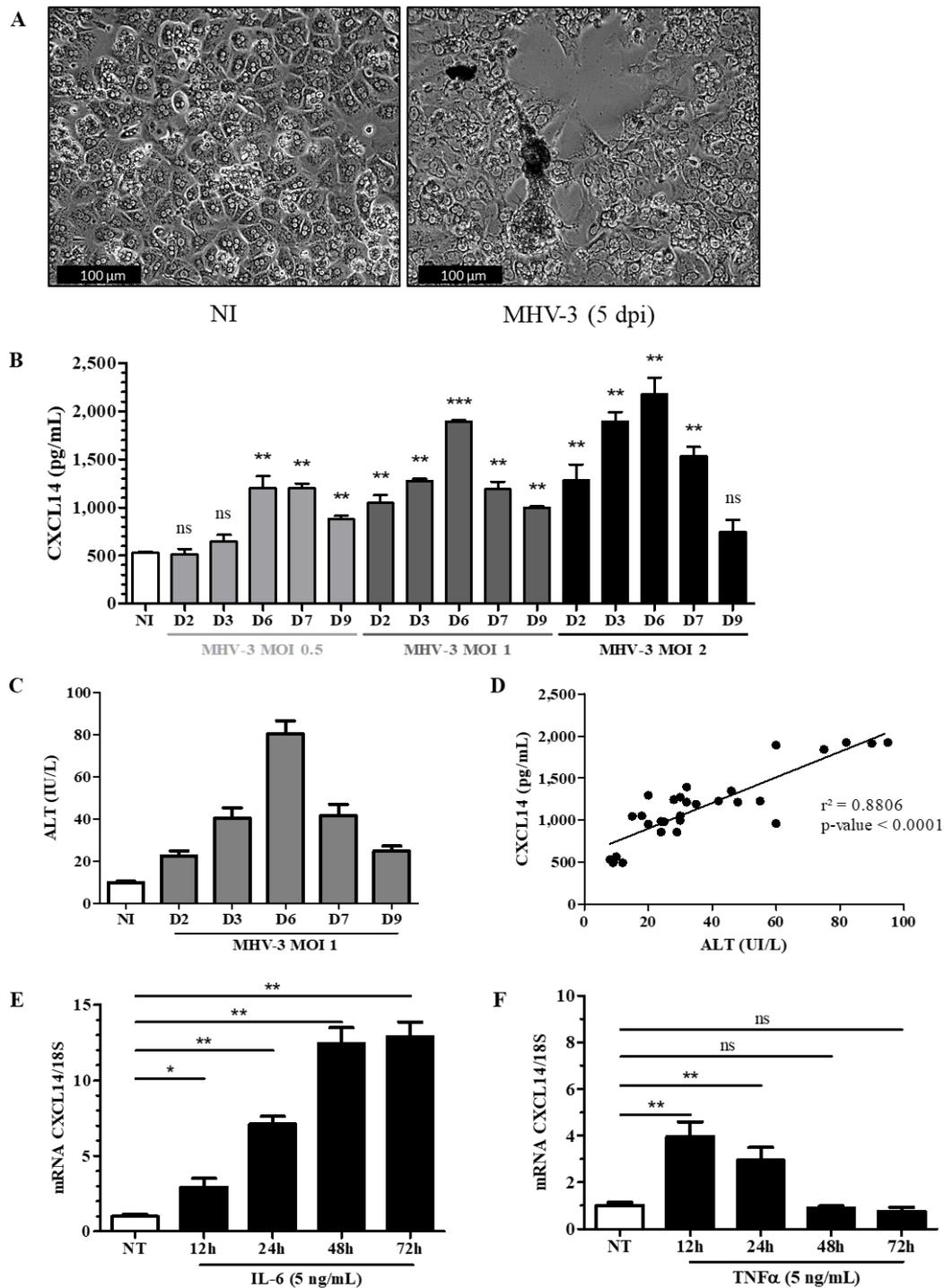


Figure 2. Murine primary cultures of hepatocytes are induced to overexpress CXCL14 when infected with MHV-3 or stimulated with IL-6 and TNF. Cells were infected with MHV-3 or not (NI). From day 2 to day 9 after, conditioned media and cell lysates were collected. A) Images of murine primary hepatocyte cultures, non-infected (NI) (left) and five days post-infection (dpi) with MHV-3 virus at a MOI of 1 (right). B) Measurement of the CXCL14 concentrations in conditioned media of primary murine hepatocytes, non-infected (NI) or infected with various concentrations of MHV-3 (MOIs of 0.5, 1, or 2), after 2, 3, 6, 7 and 9 days post-infection. C) ALT activity measured in conditioned media of non-infected (NI) or infected cells at 2, 3, 6, 7 and 9 days post-infection by MHV-3 at a MOI of 1. D) Correlation between CXCL14 and ALT levels in conditioned media of primary murine hepatocytes infected with MHV-3 at a MOI of 1. E) Relative expression of CXCL14 mRNA by murine primary hepatocytes after stimulation with IL-6 or F) TNF α at 5 ng/mL, at 12, 24, 48 or 72 h post-incubation. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between non-infected cells and MHV-3 infected cells).

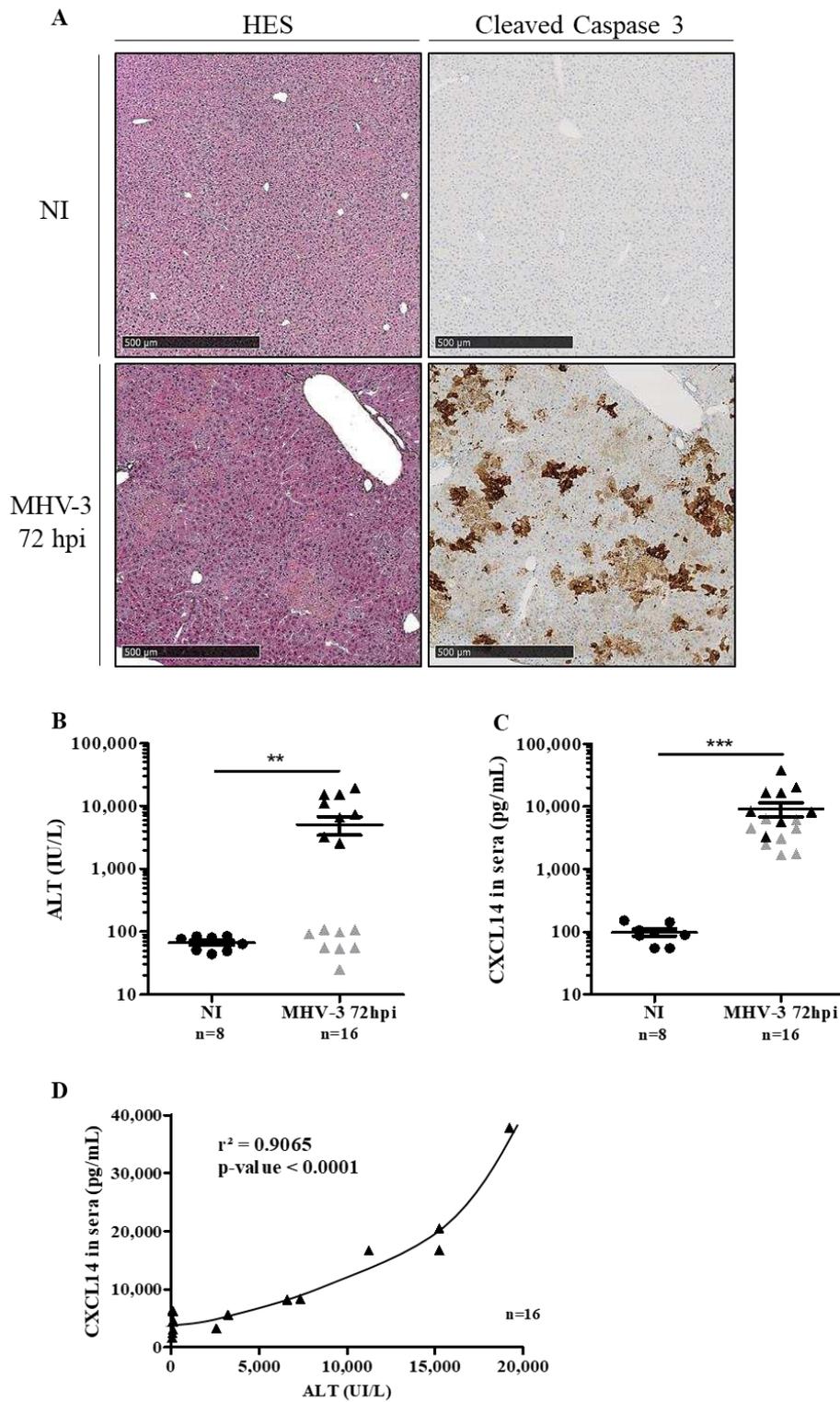


Figure 4. Increase in CXCL14 expression is associated with the intensity of hepatitis in mice with MHV-3-induced fulminant hepatitis. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver and the serum. A) HES staining (left) and cleaved-caspase 3 immunolabelling (right) in the livers of control (NI) and MHV-3-infected mice (72 hpi). B) ALT levels in the sera of control (NI) and MHV-3-infected mice (72 hpi). C) Titration of CXCL14 in the sera of control (NI) and MHV-3-infected mice by ELISA (72 hpi). D) Exponential correlation curve between ALT and CXCL14 levels in the sera of control (NI) and MHV-3-infected mice 72 hpi. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI mice and MHV-3 infected mice).

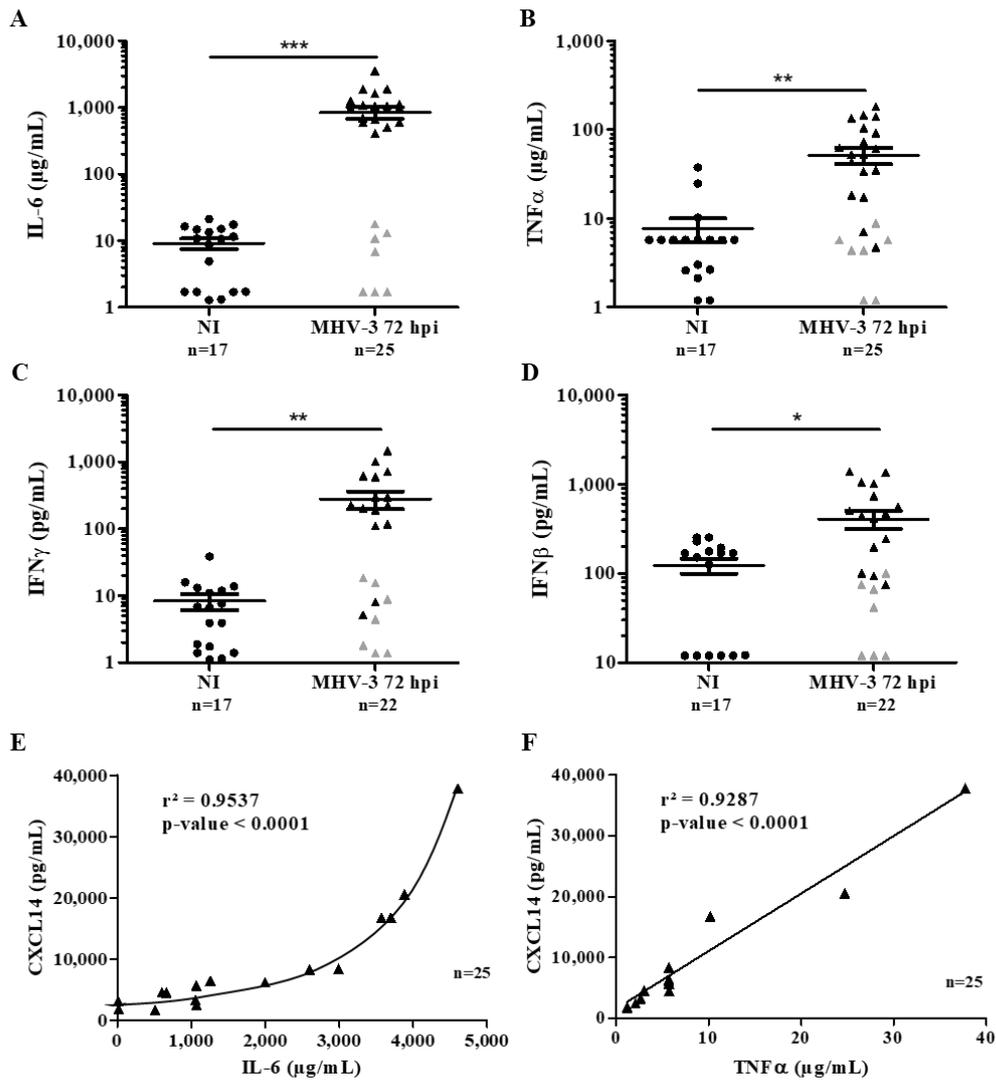


Figure 5. Fulminant hepatitis induced by MHV-3 is associated with pro-inflammatory cytokine and CXCL14 overexpression. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the serum. A-D) Measurement of IL-6, TNFα, IFNγ, and IFNβ cytokines in the sera of NI and MHV-3-infected mice 72 hpi. E) Correlation curve between CXCL14 and IL-6 concentrations following MHV-3 infection. F) Correlation curve between CXCL14 and TNFα concentrations following MHV-3 infection. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI mice and MHV-3 infected mice).

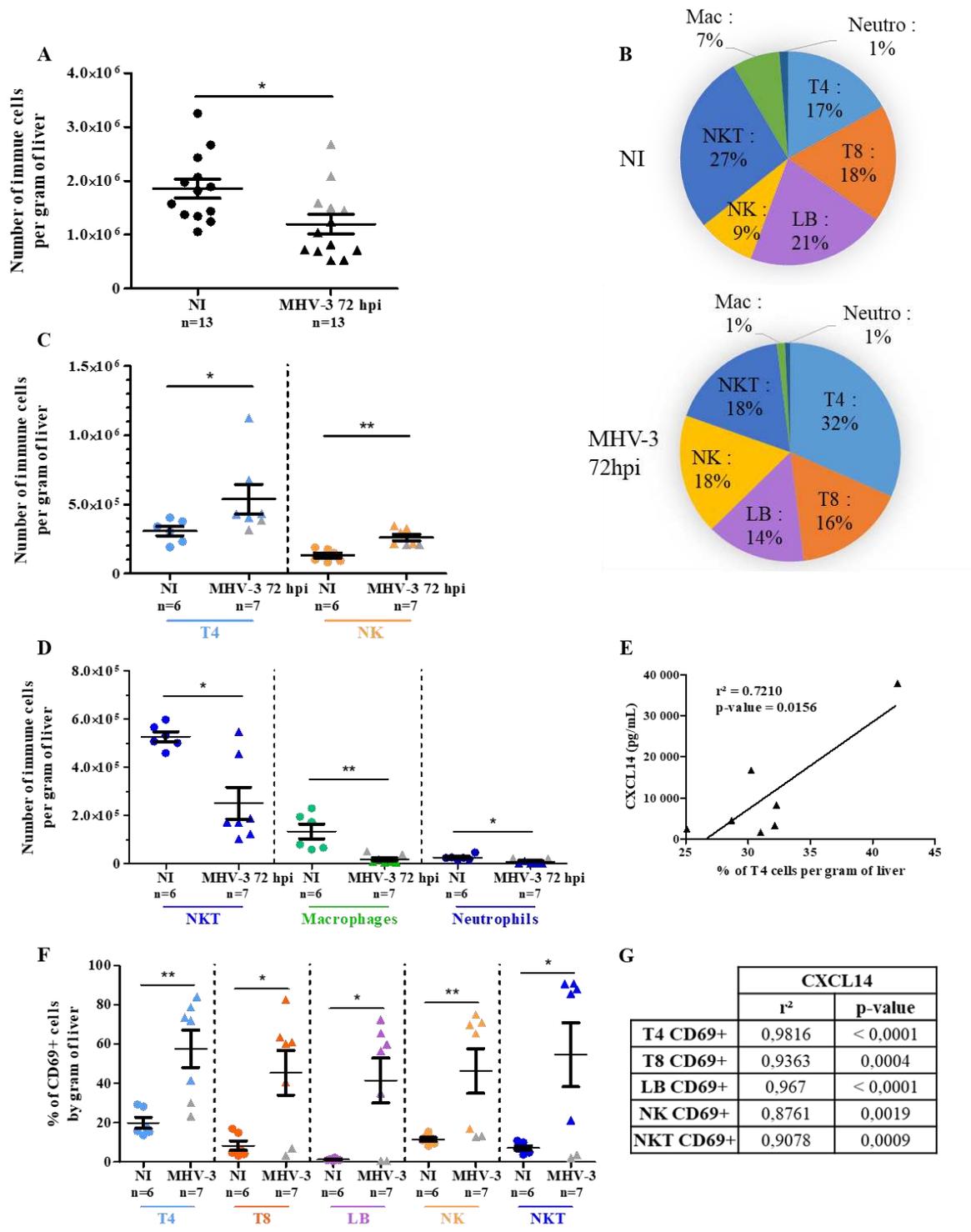


Figure 6. CXCL14 expression is associated with the activation of immune cells. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver and extract immune cells. A) Quantification of immune cells by flow-cytometry in the livers of non-infected and MHV-3-infected mice 72 hpi. B) Percentage of each cell population (CD4 T, CD8 T, B, NK, and NKT cells, macrophages, and neutrophils) in the livers of NI and MHV-3-infected mice. C) Percentage of CD4 T and NK cells in the livers of NI and MHV-3-infected mice. D) Percentage of NKT cells, macrophages, and neutrophils in the livers of NI and MHV-3-infected mice. E) Correlation between CXCL14 concentration and the proportion of CD4 T cells in mice infected with MHV-3. F) CD69 labelling of immune cells (CD4 T, CD8 T, B, NK, and NKT cells) in the livers of NI and MHV-3-infected mice. G) Correlation between CXCL14 serum concentration and percentage of activated cells (CD4 T, CD8 T, B, NK and NKT). A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI mice and MHV-3 infected mice).

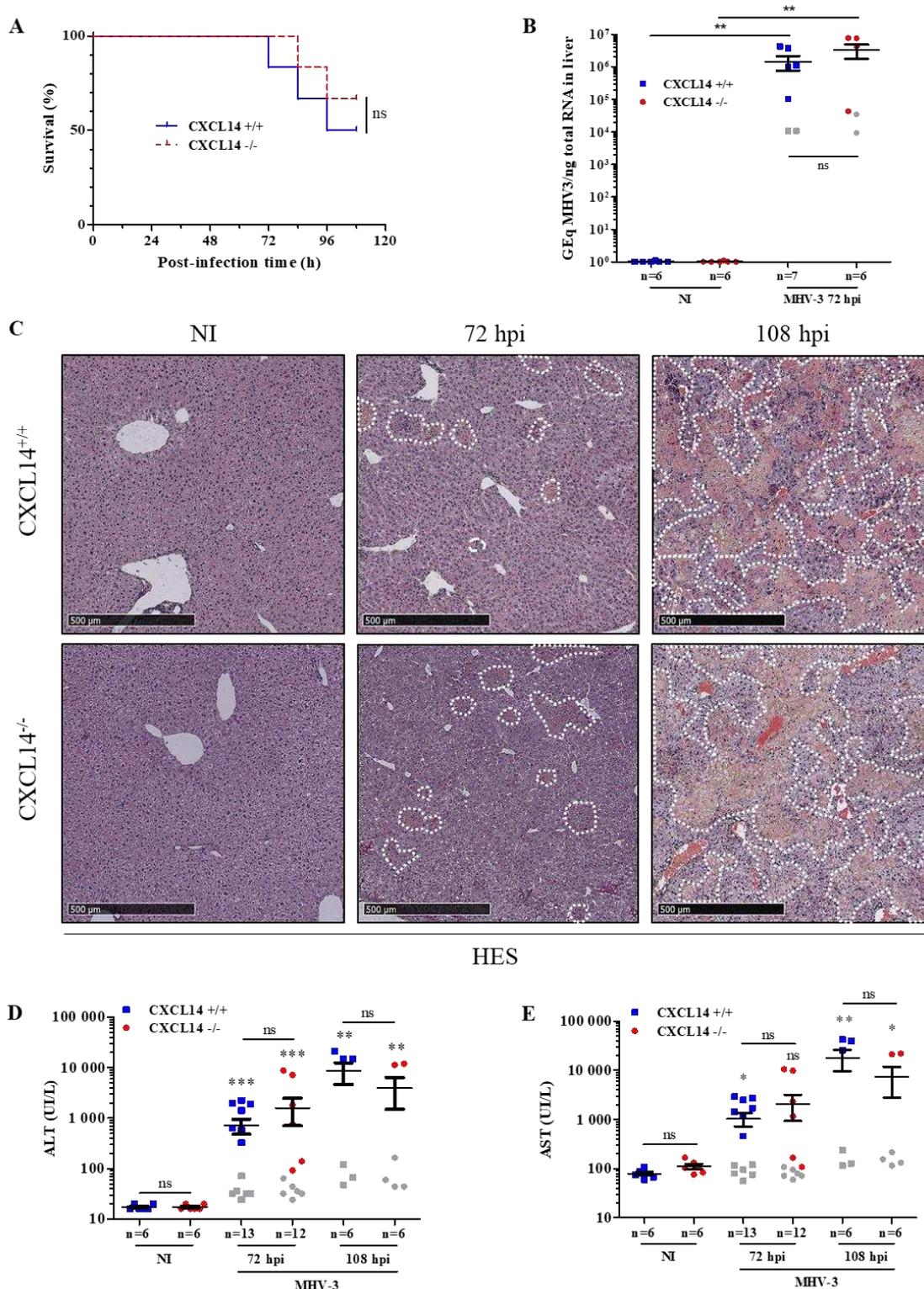


Figure 7. The absence of CXCL14 does not alter murine MHV3-induced hepatitis. Wild-type mice (CXCL14^{+/+}) and CXCL14 deficient mice (CXCL14^{-/-}) were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours or one hundred and eight hours after, mice were euthanized to recover the liver and the serum. A) Survival curve of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice inoculated with MHV-3. B) Quantification of the MHV-3 genome in the livers of NI and MHV-3-infected CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice by qPCR 72 hpi. C) HES staining of the livers of NI or MHV-3-infected CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice 72 and 108 hpi. D&E) Measurement of the transaminases ALT and AST in the sera of NI and MHV-3-infected CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice at 72 and 108 hpi. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI mice and MHV-3 infected mice).

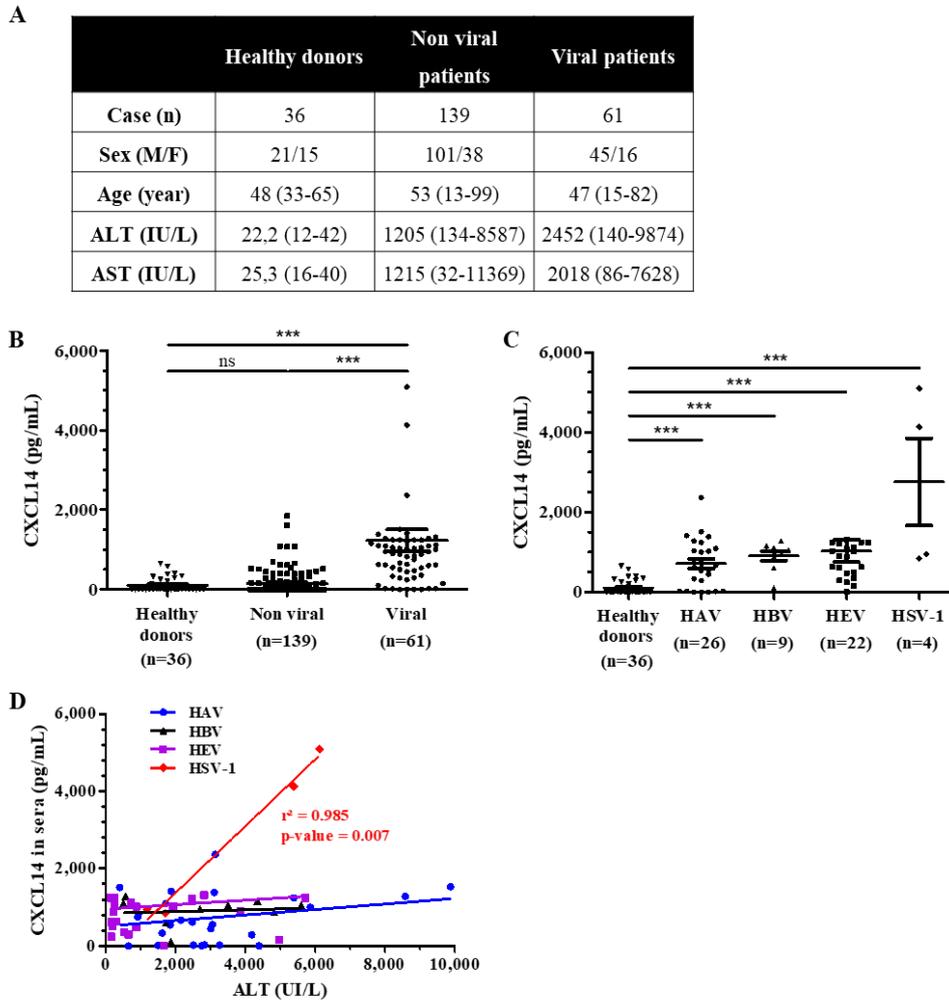
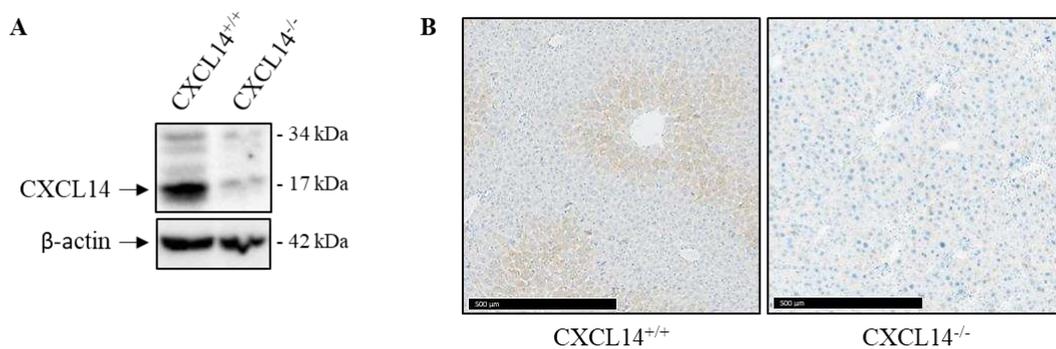


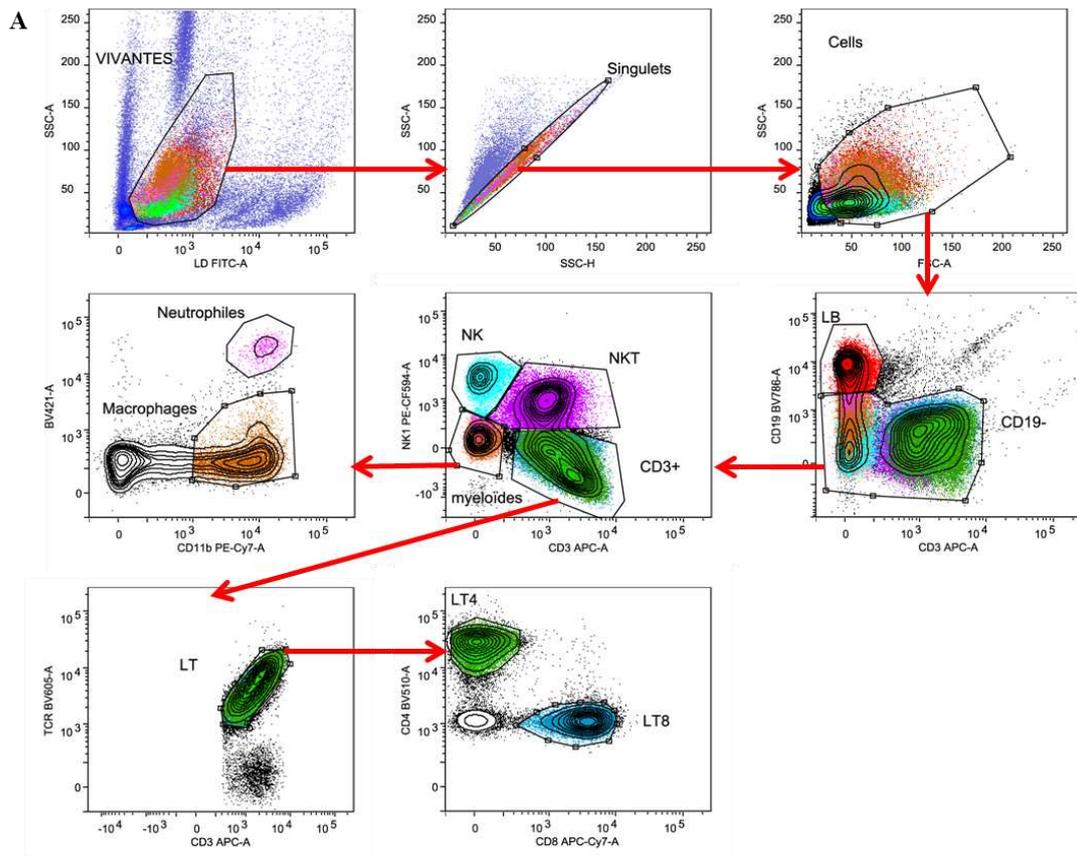
Figure 8. Elevated CXCL14 levels in the sera of patients with acute viral hepatitis. Serum of patients or healthy donors were collected and used for measurement of CXCL14 concentration and transaminase levels. A) Main characteristics of the cohort: number of cases, sex ratio, mean age, and ALT and AST levels. B) Quantification of CXCL14 in the sera of healthy donors, patients with non-viral hepatitis, and patients with viral hepatitis by ELISA. C) Measurement of CXCL14 in the sera of healthy donors and patients with viral hepatitis by ELISA, depending on the virus causing the hepatitis. D) Correlation between CXCL14 concentration and ALT activity in the sera of patients with acute viral hepatitis, according to the virus. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between healthy donors and patients).

Species	Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Human	CXCL14	5'-TCCCAACCTGAGGATTCTG-3'	5'-TTGGGAACCTCACATGCTTC-3'
	18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'
	CXCL14	5'-CTCGTTCCAGGCATTGTACC-3'	5'-GTGTAAGTGTTCCCGGAAGG-3'
	IL-6	5'-CGATGATGCACTTGCAGA-3'	5'-CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG-3'
Mouse	TNF α	5'-AGATAGCAAATCGGCTGACG-3'	5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3'
	18S	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'
	MHV-3 capsid	5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3'	5'-TTTGCCACGGGATTG-3'

Supplementary data 1: Sequence of specific primers used for qPCR.



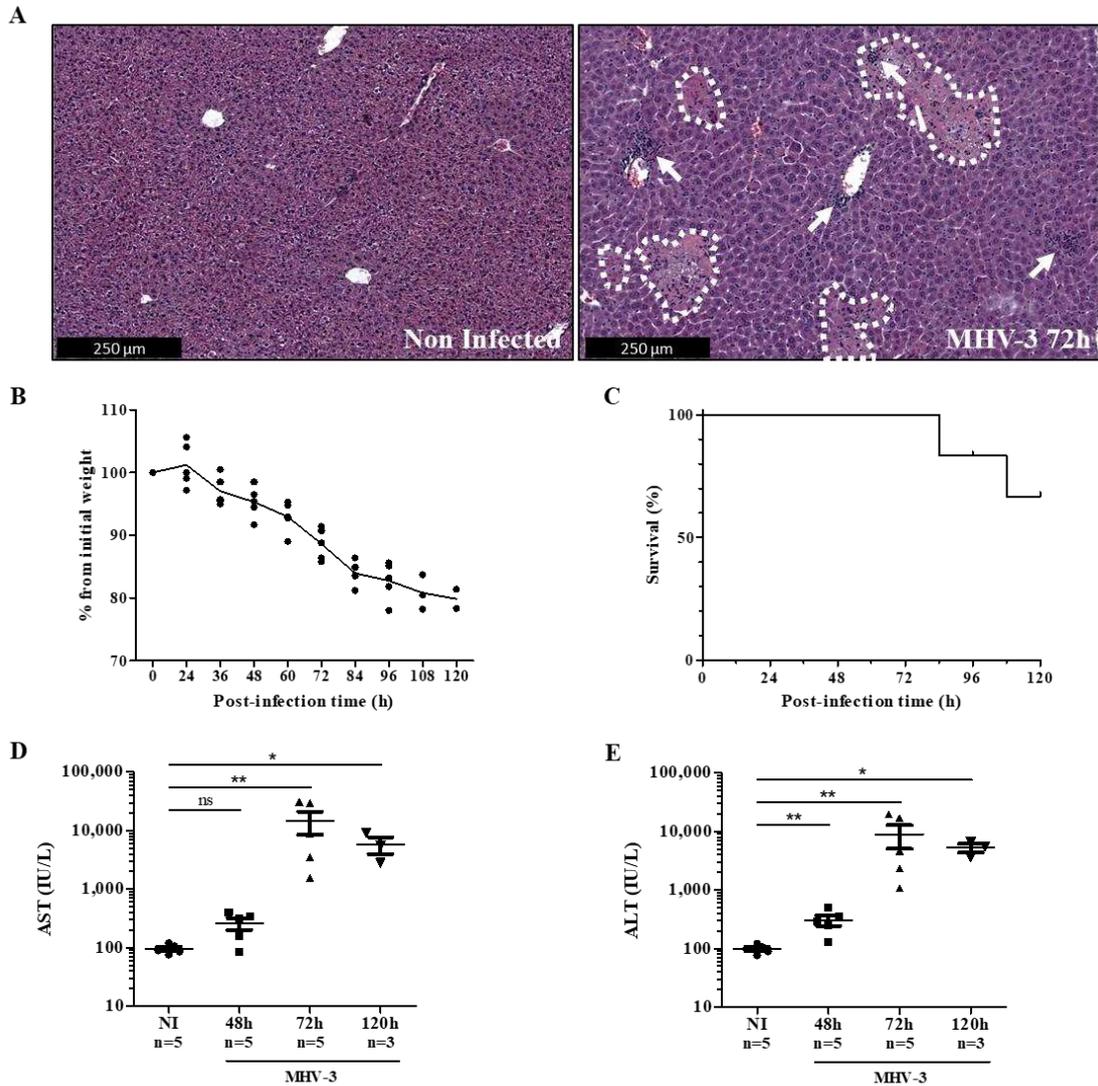
Supplementary data 2: Immunohistochemistry and western-blot of CXCL14 in liver. A) Western-blot of CXCL14 and actin in liver of CXCL14 deficient mice and wild-type littermate. B) Immunohistochemistry of CXCL14 in liver of CXCL14 deficient mice and wild-type littermate.



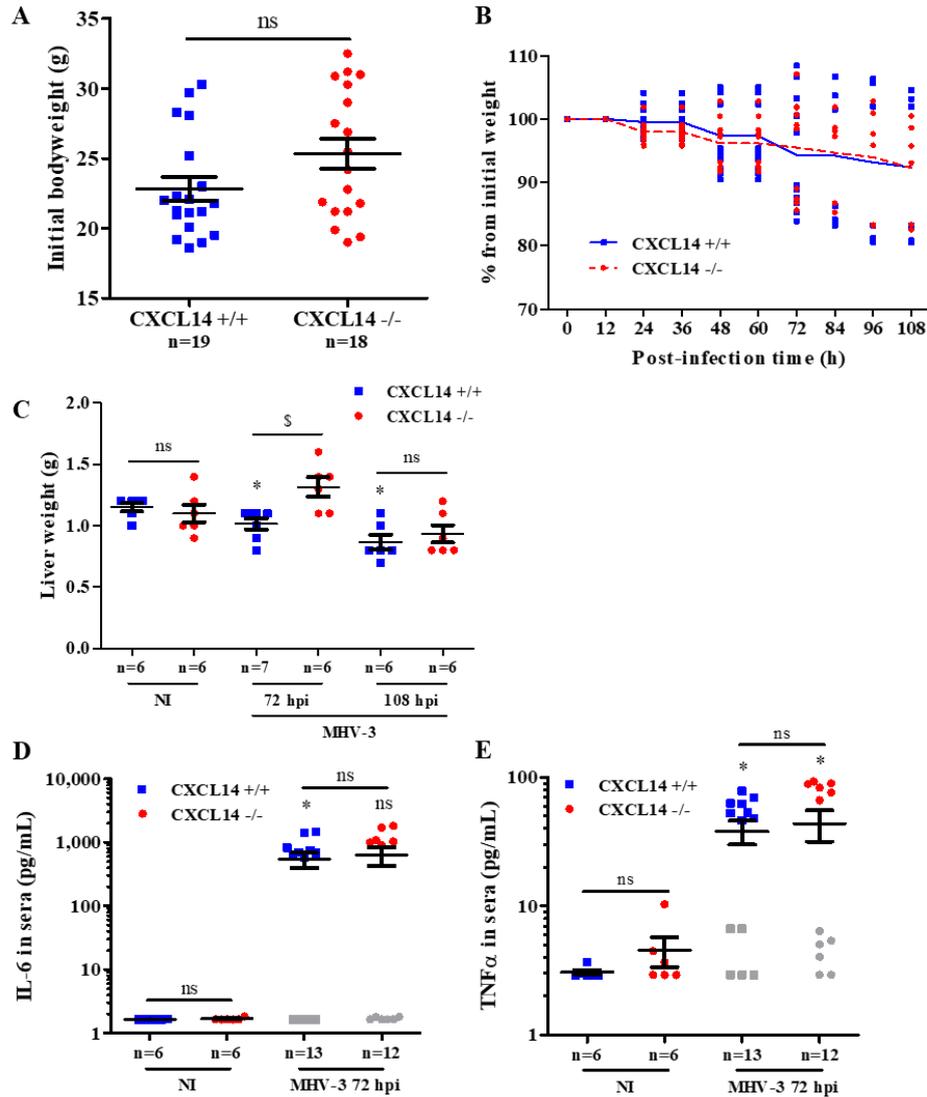
B

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (efluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PercpCy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
NK1.1 (PEefluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™

Supplementary data 3: Flow-cytometry analysis of hepatic immune cell infiltrates in non-infected and MHV-3 infected mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver and the spleen. A) Gating strategy used to identify the different populations of hepatic immune cells. B cells (CD19+/CD3-), T-CD8+ cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD8+), T-CD4+ cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD4+), NKT cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1+), NK cells (CD3-/TCRVβ+/NK1.1+), neutrophils (GR1+/CD11b+) and macrophages (GR1+/-/CD11b+) were first gated for singulets and on a viability marker. B) Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow-cytometry analysis.



Supplementary data 4: Characterisation of MHV-3 model in mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Forty-eight hours, seventy-two hours or one-hundred hours after, mice were euthanized to recover the liver and the serum. A) Hematoxylin-Eosin-Safran labelling in liver of C57BL/6J mice, non-infected (left) or 72hpi with MHV-3 (right). Necrosis area are surrounded by dotted lines, and immune cell infiltrates are indicated by white arrows. B) Weight-loss measurement in C57BL/6J mice following MHV-3 inoculation from 12 to 120 hpi. C) Survival curve of C57BL/6J mice after MHV-3 inoculation from 12 to 120hpi. D and E) Measurement of AST and ALT activity in sera of C57BL/6J non-infected (NI) mice and in infected mice 2 and 3 days after MHV-3 inoculation. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI and MHV-3 mice).



Supplementary data 5: Characterisation of MHV-3 hepatitis in CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver and the serum. A) Initial weight of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice following MHV-3 inoculation from 12 to 108 hpi. B) Weight-loss measurement in CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice following MHV-3 inoculation from 12 to 108 hpi. C) Liver weight measurement at slaughtering of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. D) Appearance of liver of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. 0 : normal liver, 1 : liver with little damages, 2 : liver with major damages. E) IL-6 concentration in sera of NI and infected (72hpi) CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. C) TNFα concentration in sera of NI and infected (72hpi) CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparison between NI and MHV-3 mice of same genotype). \$ < 0.05, \$\$ < 0.01, \$\$\$ < 0.001 (comparison between WT and CXCL14 deficient mice infected with MHV-3).

2. Article 2: Antimicrobial activity and immune surveillance function of CXCL14

Christelle Devisme, Aurélie Godel, Céline Delaloy, Mélanie Simoes-Eugénio, Céline Raguenes-Nicol, Jacques Le Seyec, Claire Piquet-Pellorce, Charaf Benarafa and Michel Samson.

Mots-clés : chimiokine CXCL14, surveillance immunitaire, activité antimicrobienne, lymphocytes B, modèle animal.

Les chimiokines jouent un rôle central dans la régulation de la migration cellulaire, ainsi elles sont indispensables dans les processus de surveillance immunitaire et d'inflammation. La chimiokine CXCL14, également appelée BRAK ou BMAC, est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus et organes sains, en particulier dans le rein, la peau, le cerveau et le foie. La peau est constamment au contact de microorganismes. Au-delà de la barrière physique, on y retrouve des peptides antimicrobiens, comme les défensines, afin de lutter contre les infections microbiennes dues aux bactéries, aux champignons mais aussi à certains virus. CXCL14 possède des structures communes aux défensines et est capable d'exercer des activités antimicrobiennes, notamment contre les bactéries. Comme toutes les chimiokines, CXCL14 est chémoattractante pour certaines cellules immunitaires dont les cellules dendritiques, les cellules NK, les neutrophiles et les monocytes. Cependant, elle ne semble pas être capable de recruter les lymphocytes T, et son capacité à attirer sur les lymphocytes B n'a été démontré qu'*in vitro*.

Des observations et des analyses ont été réalisées chez des souris déficientes pour CXCL14, en comparaison à des souris contrôles. Premièrement, des observations ont eu lieu concernant les souriceaux nés d'accouplement CXCL14^{+/+}/CXCL14^{-/-}. Par la suite, des analyses ont été réalisées chez des souris adultes des 2 génotypes afin de comprendre le rôle de CXCL14 dans une situation basale. Enfin, suite à un traitement antibiotique des couples fondateurs, les souriceaux de ces couples ont à nouveau été suivis et leur système immunitaire a été analysé.

Les observations concernant les souriceaux issus des couples CXCL14^{+/+}/CXCL14^{-/-} ont mis en évidence une mortalité accrue pour les nouveau-nés CXCL14^{-/-} mais pas pour les nouveau-nés CXCL14^{+/+}. Ces données nous ont amenés à étudier le système immunitaire des souris adultes issues des 2 génotypes. Des marquages par immunofluorescence et des analyses par

FACS ont démontré que les souris CXCL14^{-/-} présentaient une réponse immunitaire plus active que celle observée chez les souris contrôles. Nous avons notamment mis en évidence qu'elles démontraient une réponse de type B pro-active, avec la présence de centres germinatifs des lymphocytes B dans la rate et une différenciation des LB en plasmocytes, cellules effectrices. Nous avons également observé une augmentation du nombre de macrophages sous-capsulaires CD169⁺, suggérant une réponse immunitaire active.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les souris CXCL14^{-/-} ayant survécu présentent une réponse immunitaire active afin de lutter aux microbes de l'environnement. L'absence de CXCL14 chez ces souris les rendrait donc plus susceptibles aux infections nosocomiales et incapables de lutter contre.

Article en cours de préparation.

Antimicrobial activity and immune surveillance function of CXCL14

Introduction

Chemokines are chemoattractant cytokines, mainly involved in regulation of cell migration. Then, chemokines play an important role in immune surveillance and inflammation (1). They induce intracellular signaling through a G protein-coupled cell-surface receptor (2). Based on their cysteine residues, two major chemokine families have been found: the CC and the CXC family. A chemokine CXCL14, also called BRAK or BMAC, has been identified from breast and kidney cell. This chemokine is constitutively expressed in normal tissue, particularly mucosal surfaces, kidney, skin or liver (3, 4). Skin and mucosa are constantly exposed to microorganisms (5). Beside the physical barrier, antimicrobial peptides (AMP) prevent a wide spectrum of infections due to bacteria, yeast or viruses (6, 7). While some AMPs like defensins and cathelicidin LL-37 are expressed upon induction of inflammation or released by neutrophils, others, such as CXCL14, are expressed constitutively and downregulated by inflammation and infection. CXCL14 displays bactericidal activity against Gram-positive or negative bacteria, such as *S. pyogenes* or *E. coli* (8,9). Antimicrobial activities of CXCL14 could be neutralized antibody (anti-CXCL14 mAb) in mice (10). It has been proposed that CXCL14 contributes to antimicrobial immunity in absence of inflammation (9, 10). Furthermore, CXCL14 plays an antimicrobial role in respiratory tract infection, and has bactericidal actions against *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* (12). CXCL14 shares common structural characteristics of AMPs, such as anti-parallel β -strands and a C-terminal α -helix. It kills bacteria via microbial membrane depolarization and via its binding for bacterial DNA.

While the majority of chemokines are key contributors to leukocyte mobilization and recruitment to inflamed tissues, other chemokines are essential for homeostasis and development of hematopoietic and hematopoietic organs. Similarly to its sAMP activity, CXCL14 is likely to contribute to chemotaxis in steady state and was shown to have

chemoattractant for monocytes, immature dendritic cells, neutrophils and NK cells in *in vitro* and *in vivo* experiments (13–16). However, its receptor is still not identified for these functions. Some studies demonstrated that CXCL14 is able to bind CXCR4 receptor with high affinity (17). Unlike other chemokine, as CXCL12, CXCL14 is not chemotactic for naïve or activated T cells (8, 9). One study demonstrates that CXCL14 can bind to B cells with high specificity and is involved in trafficking of B cells. However this function of CXCL14 on B cells has been identified only by *in vitro* experiment (4). Here, we aim to study the potential role of CXCL14 in the host-pathogen relation by using CXCL14 deficient mice.

Materials and methods

Animal model and ethics statement

Experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the institution's guidelines for animal welfare and authors were authorized to conduct animal experimentation by "La direction des Services Vétérinaires" (license M Samson, #A3523840), the project was authorized by the "Comité Régional d'Ethique d'Expérimentation Animal" [CREAA], license given by the "Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche", #21301-2019062102252380. Animal experimentation was conducted in compliance with the Swiss Animal Welfare legislation and animal studies were reviewed and approved by the commission on animal experiments of the canton of Bern, Switzerland under licenses BE8/16 and BE35/19. CXCL14 deficient (*Cxcl14*^{-/-}) mice were described previously (20) and control littermates were produced at the SPF animal facilities of the Theodor Kocher Institute and then at Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern, Switzerland. Mice were maintained in a temperature-controlled housing with a 12h light/12h dark cycle and were provided with food and water *ad libitum*. For experiments performed at University of Rennes, mice were acclimatized for at least 1 week before the experiment. Genotyping was performed using standard PCR protocols with the following primers in a single reaction (wild-type allele: 5' TGG CCC AGG AAT CAA ACA CAG 3', 5' GGG GCC CTC CTA CTT CTA CCA TC 3', 474bp; Mutant allele (Neo): 5' CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC 3', 5' CAA GGT GAG ATG ACA GGA GAT C 3', 280bp).

Timed matings and evaluation of embryos

Cxcl14^{+/-} females were synchronized and mated individually with *Cxcl14*^{+/-} males at 2-4 hours before the start of the dark period of the 12-12h light cycle. Positive vaginal plug check the next morning was defined as embryonic age 0.5 (E0.5). At this time point, females with a vaginal plug were removed from the male's cage. Timed pregnant females were euthanized at E15.5, embryos dissected from the uteri and kept in PBS. Embryos were weighed and crown-rump lengths were measured. A tail biopsy was taken for genotyping. After fixation, gross anatomopathology evaluation of the embryos was performed.

Biochemical parameters

All animals were monitored daily and weighed before slaughtering. Blood was taken by retro-orbital route at slaughtering. Serum alanine aminotransferase (ALT) transaminase levels were measured according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine primary reference procedures using an Olympus AU2700 Autoanalyser (Olympus Optical).

Histological analysis

Mouse spleen was collected after slaughtering. Fragments of tissues were fixed in 4% paraformaldehyde before being embedded in paraffin for immunohistochemistry investigations. For histological analysis, spleen sections of 4µm were stained by Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) to investigate tissue organization.

For immunolocalization of F4/80, tissue sections were dried 1h at 58 °C, followed by antigen retrieval and incubated with the corresponding primary antibody (Table X) in a Ventana automated staining platform (Ventana Medical Systems, USA). Revelation of primary antibody was carried out using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Dako, USA) and DAB substrate kit (Ventana, #760-124). Finally, all slides were scanned using a digital slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer 2.0-RS) and files were analyzed using the NDP viewer software (Hamamatsu). Immunolabelling of immune cells was performed by using CD3, B220, IgM and CD138 antibodies. Proliferation of cells was highlighted by using Ki67 antibody. Tissues sections were dried 1h at 58°C and incubated with the corresponding primary antibody. Revelation of primary antibody was done by using fluorochrome-conjugated second antibody. Finally slides were scanned using a digital slide scanner.

Immune cell analysis by flow cytometry

In order to remove blood, mouse livers were flushed by perfusion with PBS through inferior vena cava *in situ* before collecting organs. Then, livers were crushed on a 70µm cell strainer (Falcon #352350, Fisher Scientific), and spleen on a 40µm cell strainer (Falcon #352340, Fischer Scientific). For liver, parenchymal cells were removed by sedimentation during 1h. Liver immune cells were isolated with density separation by centrifugation on RPMI media (RPMI 1640 Media, Gibco) with 35% Percoll (Percoll density gradient media, GE Healthcare, Life Sciences). For each organ, red blood cells were lysed by a treatment with the Erythrocyte-lysing reagent Easylyse (Dako) diluted in water (1/20) during 3 minutes at room temperature in the dark. Cell suspensions were labeled for 30 minutes with LIVE/DEAD fixable green or yellow stain (respectively #L34970 and #L34959, Life technologies) to exclude dead cells. Cells were also incubated with an anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2, BD Pharmingen) to block non-specific binding before staining with fluorochrome-conjugated antibodies described in Supplementary data 1. Fluorescence of stained cells was measured on LSR Fortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using Flowlogic software (MACS Miltenyi Biotec). Dead cells and doublets were excluded on the basis of LIVE/DEAD labeling and forward/side scatter, respectively. The immuno-phenotyping used was made on the appropriate size-FSC/structure-SSC gate and was as follows: B-lymphocytes: CD19⁺/CD3⁻ cells; T-lymphocytes: CD3⁺/TCR-β⁺/NK1.1⁻/CD19⁻ on which CD4⁺ and CD8⁺ were distinguished; NKT cells: CD3⁺/NK1.1⁺/CD19⁻; NK cells: NK1.1⁺/CD3⁻/CD19⁻; neutrophils: GR1^{high}/CD11b^{high} and macrophages: GR1^{low}/CD11b^{high}. Lymphoid activation was studied by analyzing the expression of CD69 marker. We calculated the percentage of each immune cell population, by considering the sum of events of all immune cell populations analyzed (T, NK, NKT, B cells and neutrophils and macrophages) as 100% of the total immune cells.

Cytokines and immunoglobulins detection

Serum samples were stored at -80°C until the assay. To determine pro-inflammatory cytokines and immunoglobulins concentrations, the LEGENDplex™ Mouse Inflammation panel (740150, Biolegend) and the LEGENDplex™ Mouse immunoglobulin isotyping panel (740492, Biolegend) were used according to the manufacturers' instructions. All samples were measured in triplicate and each concentration was determined with the standard curve after reading the plate using a LSR Fortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM for all similar conditions. Mean from humans cohorts and from experiments in mice inoculated by MHV-3 were assessed by using the non-parametric Mann-Whitney U-test. All *in vitro* experiments were analyzed with the parametric Student-t test. All statistical analysis were achieved with the GraphPad Prism5 software. A p-value less than 0.05 is considered as significant. p-value of significant results were indicated by « * » < 0.05, « ** » < 0.01 et « *** » < 0.001.

Results

Perinatal mortality is observed in CXCL14 deficient new pups

Mice deficient in CXCL14 (*Cxcl14*^{-/-}) have been generated independently by several groups. When reported, these mouse lines have shown reproducible skewed genotype ratios at weaning age compared to expected Mendelian ratios. Crossing heterozygous mice reportedly produced only 2-12% *Cxcl14*^{-/-} mice instead of the expected 25% (20–22). In a retrospective analysis of our breeding records (TBase), we observed reduced percentage (<10%) of *Cxcl14*^{-/-} pups at weaning of heterozygous mice crossed together (Figure 1A). Consistent with the other studies, crossing heterozygous females with homozygous *Cxcl14*^{-/-} male mice only yielded 36% *Cxcl14*^{-/-} mice instead of the expected 50% (Figure 1B). When we crossed homozygous *Cxcl14*^{-/-} together in three independent matings, we obtained a total of 7 litters over several months but only 1 litter of 4 pups reached weaning age.

To test whether reduced numbers of *Cxcl14*^{-/-} mice at weaning age is due to embryonic lethality, we performed timed matings and collected embryos at E15.5. The weight and length of embryos did not differ depending on genotype (Figure 1C). In addition, genotype analysis did not reveal reduced numbers of *Cxcl14*^{-/-} mice (Figure 1D). Taken together, our findings strongly suggest that *Cxcl14*^{-/-} mice develop normally in utero and that survival defects occur perinatally.

An active immune response is observed in CXCL14 deficient mice

We first analyzed the global structure of spleen by a HES staining (Figure 2A). Spleen of CXCL14^{+/+} mice presented a normal organization with follicles in white pulp and some germinal centers represented by white arrow. In spleen of CXCL14^{-/-} mice, white pulp is

most extended with a lot of germinal centers in follicles. In fact, area occupied by follicles by spleen in CXCL14^{-/-} mice is 2-fold increased (Figure 2B).

Labelling of immune cells in spleen highlighted higher number of B and T cells with proliferation centers of B cells in spleen of CXCL14^{-/-} mice in comparison with spleen of CXCL14^{+/+} mice (Figure 2C). Quantification of germinal centers show a 2-fold increase in spleen of CXCL14^{-/-} mice (Figure 2D). By flow-cytometry, B and T cells were quantified, and B cells were significantly increased in spleen of CXCL14^{-/-} mice, while percentage of T cells remains unchanged (Figure 2E).

Characterisation B cell response in CXCL14 deficient mice

To understand which type of immune response is developed in CXCL14^{-/-} mice, we analysed by flow-cytometry B cell subpopulations. In spleen of CXCL14 deficient mice, percentage of plasmablasts and plasma cells were significantly increased (Figure 3A). Analysis by immunofluorescence show that B220 labelling is increased like IgM and CD138 labelling in spleen of CXCL14^{-/-} mice in comparison with observations made in spleen of CXCL14^{+/+} mice (Figure 3B). Moreover, quantification of CD138⁺ cells was 2-fold increase in spleen of CXCL14 deficient mice, which confirms an increase of plasma cell number by spleen (Figure 3C). The production of IL-27 and IL-6, two cytokines involved in proliferation and differentiation of B cells, was measured in sera of mice. Concentrations of these two cytokines were respectively 10-fold and 3-fold increase in serum of CXCL14^{-/-} mice (Figure 3D). We further evaluated immunoglobulin production by plasma cells in sera of wild-type and CXCL14 deficient mice. IgM concentration was similar in sera of mice from both genotype at 1000 µg/mL. However, IgG1 and IgG3 were respectively 2-fold and 2.5-fold increase in sera of CXCL14^{-/-} mice in comparison with CXCL14^{+/+} mice (Figure 3E). IgA, IgG2a and IgG2b concentration were not modified between WT and CXCL14 deficient mice (Supplementary data 2).

Characterisation of macrophages in spleen of CXCL14 deficient mice

A characterisation of macrophage population was also done in spleen of wild-type and CXCL14 deficient mice (Figure 4A). A F4/80 labelling of macrophage was made, and show a significant decrease of F4/80⁺ macrophages in spleen of CXCL14^{-/-} in comparison with values from CXCL14^{+/+} mice (Figure 4B). To complete this observation, a quantification of by flow-cytometry was done in spleen of mice from both genotype, and highlighted a decrease of total macrophage population (Figure 4C). However, analysis by flow-

cytometry demonstrated a significant increase of CD169⁺ macrophage percentage in spleen of CXCL14 deficient mice (Figure 4D).

Circulating cytokines measurement

Measurement of concentrations of inflammatory cytokines was performed in sera of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} (Figure 6). We demonstrated a significant increase of TNF α , CCL5, CXCL10 and IFN α concentrations in sera of CXCL14 deficient mice, in comparison with data obtained in sera of wild-type mice. However, no modification of IFN γ , CXCL1, CCL2, IL-12, IL-1 β and GM-CSF concentrations was observed between wild-type and CXCL14 deficient mice (Supplementary data 3).

Bibliography

1. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121–7.
2. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006;7(12):243.
3. Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, et al. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol*. 2000 Jun;156(6):1937–50.
4. Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, et al. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol*. 2000 May;12(5):677–89.
5. Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *J Invest Dermatol*. 2005 Jul 1;125(1):9–13.
6. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):710–20.
7. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol*. 2003 Sep;74(3):448–55.
8. Frick I-M, Nordin SL, Baumgarten M, Mörgelin M, Sørensen OE, Olin AI, et al. Constitutive and inflammation-dependent antimicrobial peptides produced by epithelium are differentially processed and inactivated by the commensal *Fingoldia magna* and the pathogen *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Oct 15;187(8):4300–9.
9. Maerki C, Meuter S, Liebi M, Mühlemann K, Frederick MJ, Yawalkar N, et al. Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of CXCL14 Suggests an Immediate Role in Skin Infections. *J Immunol*. 2009 Jan 1;182(1):507–14.
10. Kurth I, Willimann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):855–61.
11. Dai C, Basilico P, Cremona TP, Collins P, Moser B, Benarafa C, et al. CXCL14 Displays Antimicrobial Activity against Respiratory Tract Bacteria and Contributes to Clearance of *Streptococcus pneumoniae* Pulmonary Infection. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5980–9.
12. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmi Z, Dahl R, Christopherson K, et al. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for

- the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol.* 2006 Aug;34(8):1101-5.
13. Shurin GV, Ferris R, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, et al. Loss of New Chemokine CXCL14 in Tumor Tissue Is Associated with Low Infiltration by Dendritic Cells (DC), while Restoration of Human CXCL14 Expression in Tumor Cells Causes Attraction of DC Both In Vitro and In Vivo. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5490-8.
 14. Cao Q, Chen H, Deng Z, Yue J, Chen Q, Cao Y, et al. Genetic deletion of Cxcl14 in mice alters uterine NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jun 14;435(4):664-70.
 15. Cao X, Zhang W, Wan T, He L, Chen T, Yuan Z, et al. Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for human neutrophils and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000 Sep 1;165(5):2588-95.
 16. K T, K S, Y N, K T, A S, A O, et al. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett.* 2013 May 11;587(12):1731-5.
 17. Mokhtar NM, Cheng C, Cook E, Bielby H, Smith SK, Charnock-Jones DS. Progesterone regulates chemokine (C-X-C motif) ligand 14 transcript level in human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2010 Mar;16(3):170-7.
 18. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):1101-9.

Figures

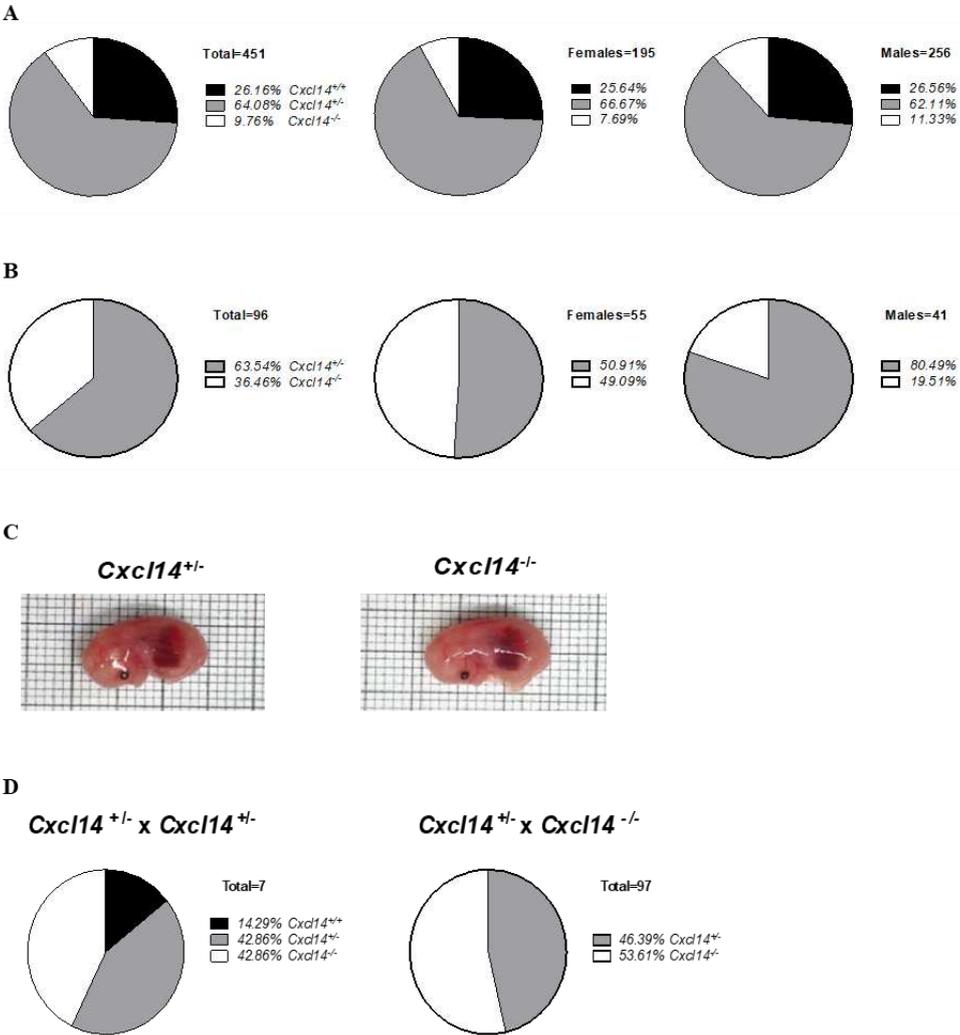


Figure 1: High mortality is observed in CXCL14 deficient new pups. A) Genotyping ratio of pups at weaning age, born from matings of heterozygous female and male mice. Genotypes are shown for all pups together as well as for each sex. B) Genotyping ratios of pups reaching weaning age born from matings of heterozygous female and homozygous knock-out male mice. C) Representative pictures of E15.5 heterozygous and homozygous knock-out embryos. D) Genotyping ratios of E15.5 embryos from indicated matings.

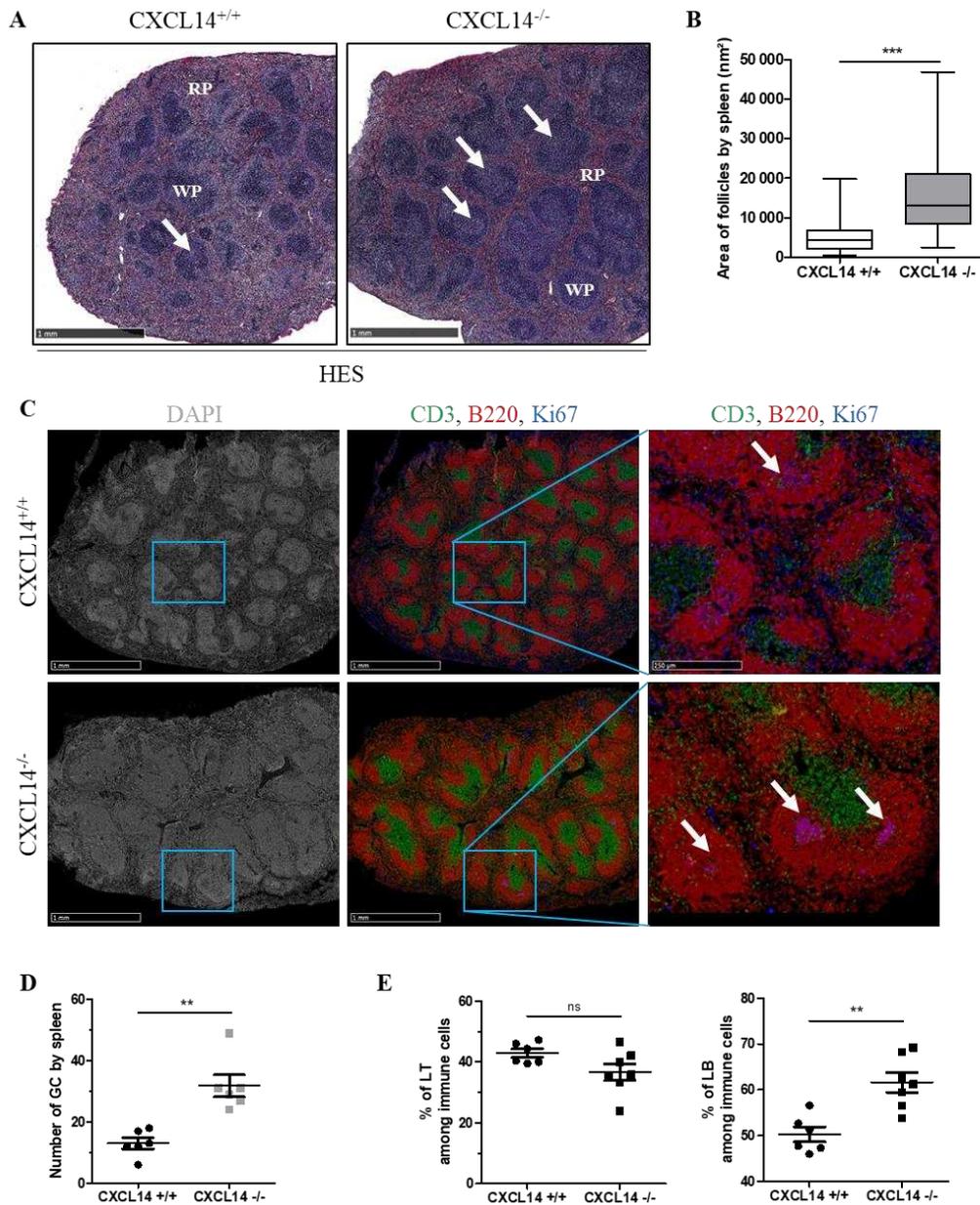


Figure 2: CXCL14 deficient mice have a pro-active immune response. Mice were euthanized to recover spleen and immune cells. A) HES staining in spleen of WT mice (CXCL14^{+/+}) or CXCL14 deficient mice (CXCL14^{-/-}). White arrows highlight germinal center (GC), RP: red pulp, WP: white pulp. B) Quantification of area occupied by follicles by spleen, in WT and CXCL14 deficient mice. C) Immunofluorescence of immune cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. CD3 in green, B220 in red, Ki67 in blue, DAPI in grey. White arrows highlight germinal center (GC). D) Quantification of germinal center by spleen in WT or CXCL14 deficient mice. E) Flow-cytometry analysis of T4, T8, and B cells in spleen of each genotype. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

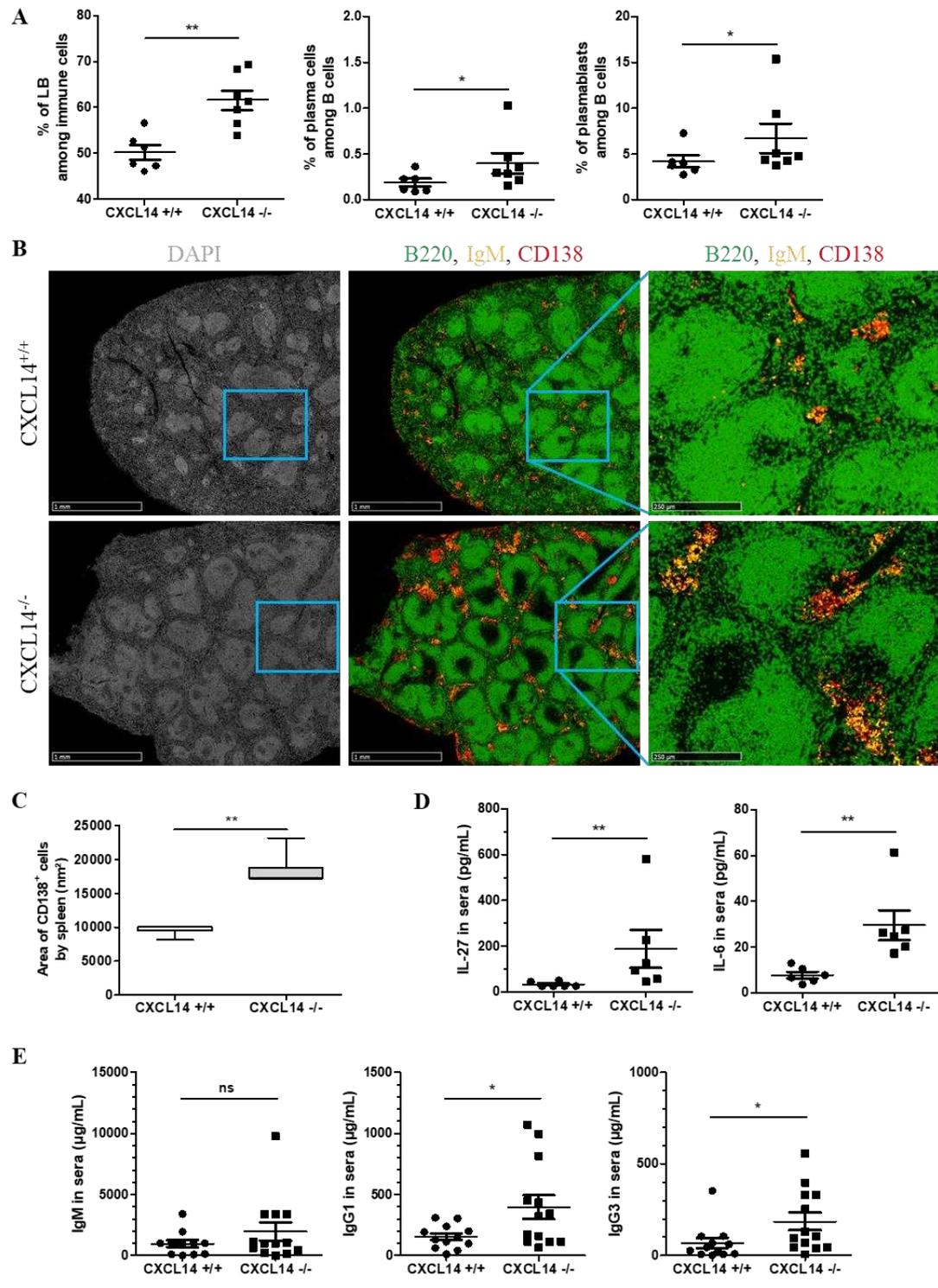


Figure 3: Characterisation of B cell response in CXCL14 deficient mice. Mice were euthanized to recover spleen, immune cells and serum. A) Flow-cytometry analysis of B cells, plasma cells and plasmablast cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. B) Immunofluorescence of immune cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. B220 in green, IgM in yellow, CD138 in red. C) Quantification of area occupied by CD138⁺ cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. D) Measurement of IL-6 and IL-27 cytokines in serum of WT and CXCL14 deficient mice. E) Quantification of circulating immunoglobulins (IgM, IgG1, IgG3) in sera of WT and CXCL14 deficient mice. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

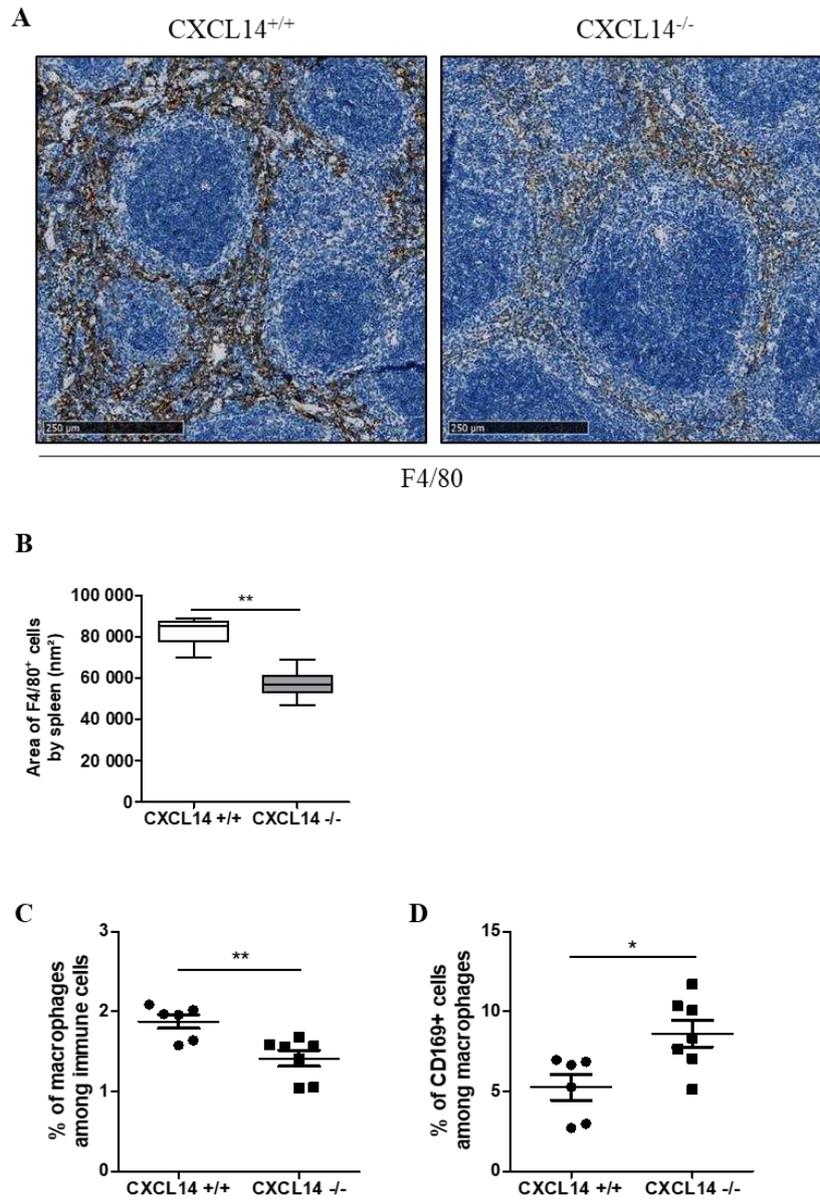


Figure 4: Characterisation of macrophages in spleen of CXCL14 deficient mice. Mice were euthanized to recover spleen and immune cells. A) Immunohistochemistry of F4/80+ cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. B) Quantification of area occupied by F4/80+ cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. C) Flow-cytometry analysis of all macrophages and F4/80+ macrophages in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. D) Flow-cytometry analysis of CD169+ macrophages in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. E) Immunohistochemistry of CD169+ cells in spleen of WT and CXCL14 deficient mice. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

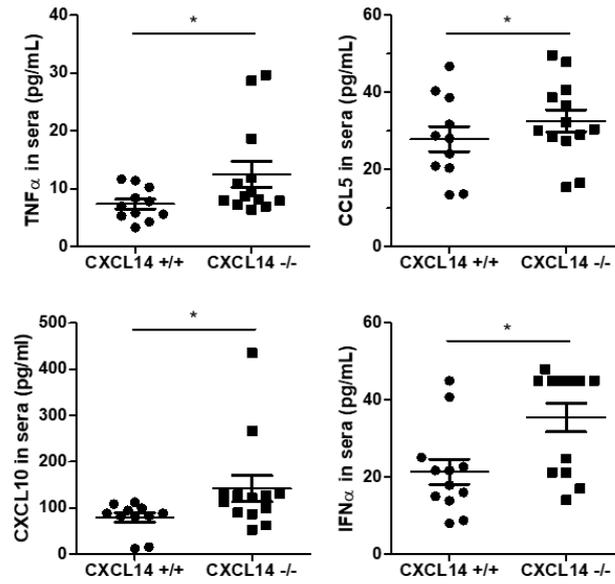
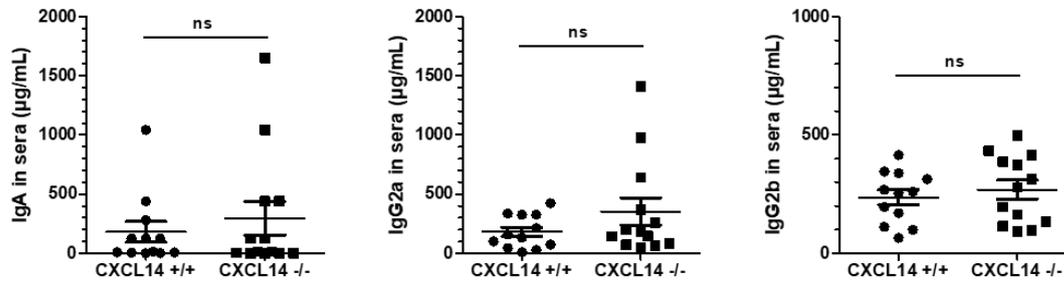


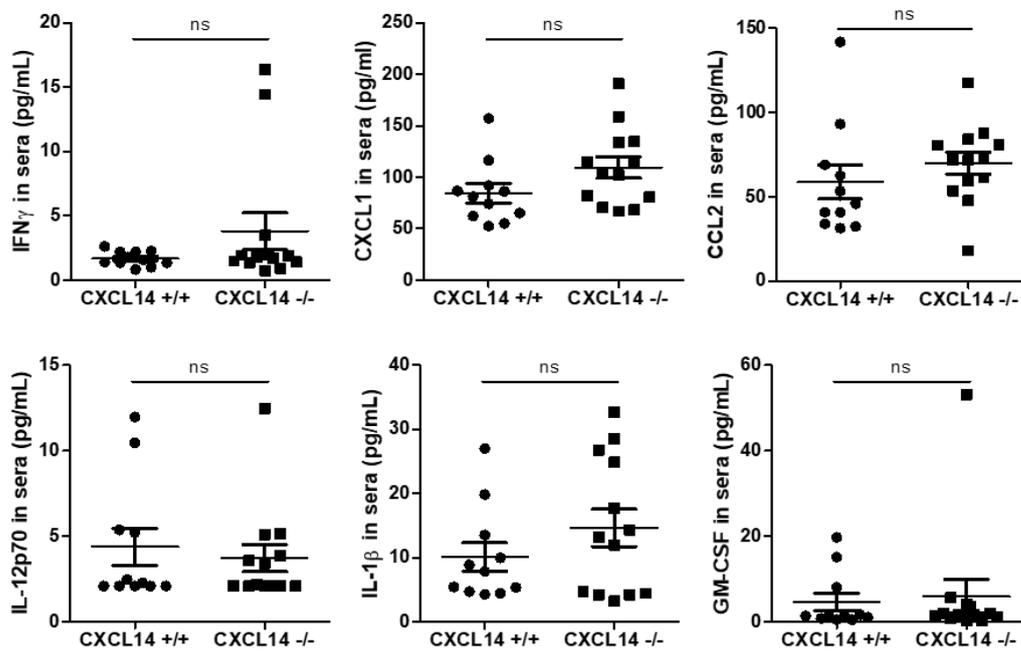
Figure 5: Circulating cytokines measurement. Mice were euthanized and serum was recovered. Quantification of TNF α , CCL5, CXCL10, and IFN α concentrations in sera of CXCL14^{+/+} and CXCL14^{-/-} mice. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (eFluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PerCPy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
FoxP3 (PE)	150D/E4	#12-4774-42, eBioscience
NK1.1 (PE-eFluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PE-Cy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD3 (BUV496)	145.2.C11	#564661, BD Pharmingen™
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™
CD5 (APCR700)	53-7.3	#565505, BD Pharmingen™
CD138 (BB515)	281-2	#566207, BD Pharmingen™
IgM (BUV395)	II/41	#743329, BD Pharmingen™
IgD (PE)	11-26.2a	#405706, Biolegend
CD169 (APC)	3D6.112	#142418, Biolegend
Ly6C (PerCPy5.5)	a121	#560525, BD Pharmingen™
Ly6G (APCH7)	1A8	#565369, BD Pharmingen™

Supplementary data 1 : Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometry.



Supplementary data 2 : measurement of immunoglobulins in sera of WT and CXCL14 deficient mice.



Supplementary data 3 : measurement of inflammatory cytokines in sera of WT and CXCL14 deficient mice.

3. Article 3: In MHV-3 induced murine fulminant hepatitis, IL-18bp is required to activate immune cells without having an effect on the development of hepatitis.

Christelle Devisme, Gaby Palmer, Céline Raguene-Nicol, Jacques Le Seyec, Claire Piquet-Pellorce, Michel Samson.

Mots clés : IL-18 binding protein, hépatite virale fulminante, modèle animal, MHV-3.

Les hépatites fulminantes sont décrites comme une atteinte hépatique sévère accompagnée d'une encéphalopathie apparaissant moins de 8 semaines après les premiers symptômes. Leur incidence et leur prévalence ne sont pas connues mais elles restent un problème majeur de santé publique. Les virus des hépatites A et E sont les causes principales de survenues des hépatites virales fulminantes. Les virus de l'hépatite A cause à lui seul 1,5 millions de cas par an dans le Monde. Lors du développement d'une hépatite virale fulminante (HVF), les chances de survie sont seulement de 25% sans transplantation hépatique. Après transplantation, le taux de survie augmente à 80%. Parmi les acteurs immunitaires impliqués dans le contrôle de l'HVF on retrouve les cytokines. Elles jouent un rôle central dans le contrôle de la propagation virale par le recrutement des cellules immunitaires. Dans le foie, les cellules de Kupffer produisent de nombreuses cytokines, comme le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6 mais également l'IL-18 dans le contexte de l'infection virale. L'IL-18 agit sur les cellules NK afin de produire de l'IFN γ pour inhiber la réplication virale. L'IL-18bp est un inhibiteur naturel de cette voie en se fixant sur le récepteur de l'IL-18. Il a été démontré qu'une mutation de l'IL-18bp pouvait entraîner une susceptibilité accrue au développement d'une HVF.

Un modèle expérimental d'hépatite virale fulminante a été développé par l'inoculation du virus de l'hépatite murine (MHV) chez des souris déficientes pour l'IL-18bp et des souris contrôles. L'hépatite induite suite à l'infection par le MHV-3 est proche du schéma clinique de l'HVF chez l'Homme. En effet, dans ce modèle, on observe une atteinte hépatique majeure due à une nécrose massive des hépatocytes et entraînant le décès des animaux 5 à 7 jours post-inoculation. Ce modèle est relevant pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires immunitaires impliqués dans l'HVF.

L'infection de souris IL-18bp^{+/+} et IL-18bp^{-/-} a été analysée par différentes techniques afin d'étudier le rôle de la protéine IL-18bp dans le contexte de l'HVF. Les principaux paramètres vitaux mesurés chez les souris suite à l'inoculation du virus, comme le poids, la survie et le comportement social, n'a pas démontré de différence entre les souris des 2 génotypes. L'analyse de l'atteinte hépatique par la mesure des transaminases hépatiques (ALT et AST) ainsi que par la coloration HES a démontré une atteinte hépatique sévère 5 jours après inoculation du MHV-3 mais sans différence significative selon le génotype. Enfin, l'analyse des acteurs cellulaires et moléculaires (cytokines et immunoglobulines) a révélé une augmentation du relargage de cytokines pro-inflammatoires et antivirales, mais aucune différence n'a été mise en évidence entre les souris IL-18bp^{+/+} et IL-18bp^{-/-}, sauf pour la cytokine IL-18 qui est sous-exprimée chez les souris déficientes pour l'IL-18bp. L'étude de la réponse immunitaire cellulaire n'a pas mis en évidence de différence sur le nombre et le pourcentage des différents types cellulaires étudié (LT, LB, NK, NKT, macrophages et neutrophiles) dans le foie et la rate. Cependant, l'ensemble des populations immunitaires étudiées sont activées dans les rates des souris IL-18bp^{+/+}, comme attendu, mais pas chez les souris IL-18bp^{-/-}.

Pour conclure, l'ensemble des résultats a démontré que l'IL-18bp est indispensable à l'activation de la réponse immunitaire mais ne permet pas de contrôler l'apparition de l'hépatite virale fulminante murine induite par le MHV-3.

Article en préparation.

In MHV-3 induced murine fulminant hepatitis, IL-18bp is required to activate splenic immune cells without having an effect on the development of hepatitis.

Christelle Devisme¹, Gaby Palmer², Céline Raguene-Nicol¹, Jacques Le Seyec¹, Claire Piquet-Pellorce¹, Michel Samson^{1,*}

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

² Université de Genève, Département de Médecine, Suisse

* corresponding author : Inserm-U.1085, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), Université de Rennes, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex, France. Tel: +33 22 323 5927; Fax: +33 22 323 4794; E-mail: michel.samson@inserm.fr

Abstract

Fulminant viral hepatitis (FVH) are defined by severe liver failure and encephalopathy. Major causes of FVH are hepatitis virus A and E. Patients with FVH have a poor prognosis, with less than 25% surviving without liver transplantation. FVH is characterized by an inflammation and an activation of molecular and cellular actors of the immune system. It has reported a homozygous mutation on *il18bp* gene in patients with fulminant viral hepatitis, which led on production of non-functional protein and a susceptibility to develop FVH. We developed an experimental model of FVH in wild-type (WT) and IL-18bp deficient mice infected by murine hepatitis virus-3 (MHV-3) to understand the role of IL-18bp in viral hepatitis and to test future therapeutic strategies. MHV-3 induced acute liver failure in mice from both genotypes, but no difference in terms of survival curves, liver transaminase levels and liver damages was observed between IL-18bp deficient mice and WT mice. However, we found that in IL-18bp deficient mice, IL-18 is highly downregulated in liver and in serum and splenic NK cells, T and B lymphocytes failed to be activated in comparison to WT mice. In this model, we demonstrate that IL-18bp is required to activate immune cells and regulates IL-18 expression without having an effect on the development of hepatitis.

Key words: IL-18 binding protein, fulminant viral hepatitis, MHV-3, animal model.

Introduction

Fulminant viral hepatitis (FVH) is defined as a severe liver destruction associated with encephalopathy within eight weeks of the onset of the first symptoms (1, 2). Actually, prevalence and incidence of FVH are not precisely known. Hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis E virus (HEV) are the most common hepatotropic viruses in humans. HAV and HEV are responsible of acute form of hepatitis, while HBV and HCV are frequently found in chronic hepatitis (3). In some cases, primary infections with these virus, particularly HAV and HEV, can lead to fulminant hepatitis (1). HAV is the main cause of FVH worldwide, with an estimated 1.5 million cases per year (4). Patients with FVH have a poor

prognosis, with less than 25% surviving without liver transplantation. Nevertheless, after liver transplantation survival rates reached 80% (4, 5). An experimental model system of fulminant viral hepatitis has been developed in mice by infection with mouse hepatitis virus (MHV) (6, 7). Thus, MHV type 3 produces a clinically relevant model of FVH in infected mice infected with acute liver failure associated of large hepatocyte necrosis and mouse death at on the 5th-7th day after infection (8). MHV infection can therefore serve as a model for deciphering the viral and immunologic events. Fulminant viral hepatitis is characterized by an inflammation and an activation of molecular and cellular actors of the immune system. Cytokines play a key role in controlling or escaping of the viral

load. In liver, resident immune macrophages, also called Kupffer cells (KC), are responsible to release cytokines such as TNF α , IL-1 β and IL-6 (8-10). In the context of viral hepatitis, KC are also able to release IL-18, a member of IL-12 cytokine family, which acts on Naturel Killer cells to produce IFN-gamma (168). This cytokine is able to inhibit the viral replication of hepatitis viruses in liver (11). IL-18 pathway is regulated by a natural inhibitor called IL-18 binding protein (IL-18bp) (12). IL-18 functions by signaling through the IL-18 receptor (IL-18R), a heterodimer comprising alpha and beta subunits (12, 13) and IL-18bp which is in molar excess compared to IL-18, binds with extremely high affinity to IL-18 and inhibits the binding of IL-18 to these receptors (14). Using IL-18bp deficient mice, Harms *et al* (15) demonstrate that IL-18bp is required for normal NK cell abundance and function, and contributes to maintaining steady-state levels of circulating IL-18.

In human, looking for genetic mutations responsible of occurrence of FVH, Belkaya *et al.* (16) found that IL-18bp is mutated in patients with FVH. This mutation lead to a production of a non-functional protein and a loss of control in IL-18 pathway. Absence of IL-18bp in patients induced fulminant forms of hepatitis, due to IL-18 mediated hepatotoxicity. In our study, we aim to study the function of IL-18 binding protein during fulminant viral hepatitis by using a murine model of MHV-3 induced fulminant viral hepatitis in wild-type and in IL-18bp deficient mice.

Materials and methods

Animal model and ethics statement

All experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the institution's guidelines for animal welfare (authors were authorized to conduct animal experimentation by "La direction des Services Vétérinaires" (license M Samson, #A3523840). The project was authorized by the "Comité Régional d'Ethique d'Expérimentation Animal" [CREAA], license given by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation", #12431-2017111701458343). IL-18bp deficient mice and control littermates in C57BL/6N background were given by Dr Cem Gabay from the "Institut National Genevois" (INGE) of Genève (Switzerland). Mice were maintained in a temperature-controlled housing with a 12h light/12h dark cycle and were provided with food and water *ad libitum*.

Amplification and titration of MHV-3

Mice were inoculated with 1000 Murine Hepatitis Virus type-3 (MHV-3) particles (provided by Prof. Lucie Lamontagne, Canada) per mice to amplify this virus *in vivo*. All mice were euthanized 72 h post-

inoculation (hpi) and the liver collected, crushed and filtered over 70 μ m nylon filters in sterile RPMI medium. The flow-through was centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 30 min. The supernatant containing the MHV-3 was collected, aliquoted and stored at -80°C. Virus was amplified *in vitro* on L2 rat pulmonary cells in RPMI medium (Gibco®, Life Technologies) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, HyClone® FetalClone® III), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Life Technologies), and 1% L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies). Cells were plated at 80 % of confluence and the virus at MOI 0.5, 1 or 2 added 24 h later. The progression of lysis was checked every 12 h and the infection stopped when 80% of the cells were lysed. Then, the cells were subjected to two freeze-thaw cycles and the supernatant collected, centrifuged at 5,000 rpm for 15 min at 4°C, aliquoted, and stored at -80°C. MHV-3 was titrated on L2 cells in 96-microwell plates by the method of TCID₅₀ (Tissue Culture Inhibit Dose 50). The viral titer was determined by the Reed and Muench method (17).

MHV-3 induced fulminant murine hepatitis

IL-18bp deficient mice and their littermate wild-type, aged between 8 and 12 weeks, were inoculated with a suboptimal dose of MHV-3. Virus was diluted in sterile Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco®, Life Technologies) and 200 μ L injected by the intraperitoneal route per 20 g of mice bodyweight. Control mice were injected with sterile DPBS only. The weight and behaviour of all mice were checked every 12 h for five days. A batch of mice was euthanized at 48 hpi, 72 hpi and 5 days post-infection (dpi), and blood samples collected by retro-orbital route. Serum was obtained following a centrifugation at 3,500 rpm at 4°C for 15 min. Serum alanine (ALT) and aspartate (AST) aminotransferase transaminase levels were measured according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine primary reference procedures using an Olympus AU2700 Autoanalyzer (Olympus Optical) at the CHU Pontchaillou (Rennes, France). The liver was collected after dissection for analysis by qPCR, flow-cytometry and immunohistochemistry.

RT-qPCR from liver tissue

Liver tissue was homogenized using an Ultra Turrax® T25 digital homogenizer in Nucleospin RNA lysis buffer (#740955, Macherey-Nagel) with 0.1% beta-mercaptoethanol. RNA extraction was performed as recommended by the manufacturer. Total RNA was loaded onto the column in 70% ethanol. DNA was eliminated by incubation with DNase for 15 min at room temperature (RT). Finally, RNA was eluted in 50 μ L ultra-pure RNase- and DNase-free water (Gibco®, Life Technologies). The total RNA concentration was determined by spectrophotometry using a NanoDrop® (ND-1000

Spectrophotometer). cDNA was synthesized from 1µg of RNA by reverse transcription using a commercial kit (Applied biosystems® High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) in the presence of dNTP (50mM), random primers, MultiScribe® reverse transcriptase. The volume was adjusted at 20µL with ultra-pure RNase- and DNase-free water (Gibco®, Life Technologies) and the reaction carried out 2 h at 37°C, followed by inactivation of the enzyme at 95°C for 5 min. To analyze target genes expression, real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using specific primers at 1µM (Supplementary data 1), Sybr Green dye (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems®) and CFX384 Touch™ Real-time PCR detection system (Bio-Rad®). Each measurement was performed in triplicate. Relative gene expression was normalized against that of the 18S gene.

Histological analysis

Fragments of murine tissues were fixed in 4% paraformaldehyde before being embedded in paraffin for immunohistochemistry. For histopathology, 4 µm liver sections were stained by Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) to investigate inflammation and MHV3-induced lysis. All slides were scanned using a digital slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer 2.0-RS) and the files were analyzed using the NDP viewer software (Hamamatsu).

Immune-cell analysis by flow-cytometry

Mouse livers were flushed by perfusion with PBS through inferior vena cava *in situ* to remove blood before collecting organ. The livers were crushed on a 70 µm cell strainer (Falcon #352350, Fisher Scientific), and the spleens on a 40 µm cell strainer (Falcon, #352340, Fisher Scientific). Hepatic parenchymal cells were removed by sedimentation for 1h. Immune cells from spleen and liver were isolated with density separation by centrifugation on RPMI media (RPMI 1640 Media, Gibco) with 35% Percoll (Percoll density gradient media, GE Healthcare, Life Sciences) at 2,600 rpm and RT during 25 min without brake. Red blood cells were lysed by an incubation with the Erythrocyte-lysing reagent Easylyse (Dako) diluted in water (1/20) during 3 min at RT in the dark. Cell suspensions were labeled for 30 min with LIVE/DEAD fixable green stain (#L34970, Life Technologies) to exclude dead cells. Cells were also incubated with an anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2, BD Pharmingen) to block non-specific binding before staining with fluorochrome-conjugated antibodies (Supplementary data 2). The fluorescence of stained cells was measured on LSR Fortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and the data were analyzed using Flowlogic™ software (Inivai). Dead cells and doublets were excluded on the basis of

LIVE/DEAD labeling and area and height of side scatter, respectively. Immuno-phenotyping was based on the appropriate size-FSC/structure-SSC gate and was as follows: B-lymphocytes: CD19⁺/CD3⁻ cells; T-lymphocytes: CD3⁺/TCR-β⁺/NK1.1⁻/CD19⁻ on which CD4⁺ and CD8⁺ were distinguished; NKT cells: CD3⁺/NK1.1⁺/CD19⁻; NK cells: NK1.1⁺/CD3⁻/CD19⁻; neutrophils: GR1^{high}/CD11b^{high} and macrophages: GR1^{low}/CD11b^{high} (Supplementary data 3). Cell activation was studied by analyzing the level of CD69. We calculated the percentage of each immune-cell population, by considering the sum of events of all immune-cell populations analyzed (T, NK, NKT, B cells and neutrophils and macrophages) as 100% of the total immune cells.

Anti-viral cytokine detection

Serum samples were stored at -80°C until the assay. To determine pro-inflammatory cytokines and immunoglobulins concentrations, the LEGENDplex™ Mouse Anti-virus Response panel (740621, Biolegend) and the LEGENDplex™ Mouse immunoglobulin isotyping panel (740492, Biolegend) were used according to the manufacturers' protocol. All samples were measured in triplicate and each concentration was determined with the standard curve after reading the plate using a LSR Fortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using LEGENDplex™ software version 7.0 (VigeneTech).

Statistical analysis

Data are expressed as the means ± SEM for all similar conditions. The mean values for the experiments on mice inoculated with MHV-3 were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney U-test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism5 software. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

Results

Characterisation of MHV-3 induced hepatitis in IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice

To assess the function of IL-18bp in the occurrence of fulminant viral hepatitis, we infected with murine hepatitis virus (MHV-3), control mice and mice deficient for IL-18bp. We evaluated the survival rate (Figure 1A) and we found that mice started to die 4 days after MHV-3 inoculation, without difference between mice from both genotypes, and with 70% and 66% of survival at day 5 post-inoculation for IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} respectively. Initial weight measured was at 22g (Supplementary data 4A) and no difference between IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice was found. Weight loss were measured following MHV-3 infection (Figure 1B) and two

genotypes started to lost weight 3 days after MHV-3 inoculation, and the weight-loss at day 5 was near 15% from initial weight. Liver weight were taken following MHV-3 inoculation and were around 1 gram and no difference was observed between two genotypes (Supplementary data 4B). We measured ALT concentration in sera of mice (Figure 1C) in wild-type and IL-18bp deficient mice, and we found that ALT level increased significantly 30-fold 3 days following MHV-3 inoculation, and continued to increase at 5 days (100-fold). However, no significant difference was found in ALT values between IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. AST level was also measured in sera (Supplementary data 4C), and same conclusions were done. An HES staining in livers from WT and IL-18bp deficient mice was performed (Figure 1D) and liver from non-infected mice show normal tissue organization. In contrast, immune cell infiltrates were found in liver of WT and IL-18bp deficient mice, and are shown by dark arrows at 72 hpi. Necrotic areas were shown in liver of WT and IL-18bp deficient mice, and occupied approximately 85% of total area of liver, at 120 hpi. All these results highlighted that IL-18bp has no function in liver damage in MHV-3 induce fulminant hepatitis in mice.

Immune cell characterisation following MHV-3 infection

Immune cell populations of liver were analysed by flow-cytometry in wild-type and IL-18bp deficient mice (Figure 2). Percentages of analysed immune cell populations, as T4 lymphocytes, T8 lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, NKT cells, macrophages and neutrophils, were not modified following MHV-3 inoculation in liver of IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice (Figure 2A-G). Moreover, percentage of activated cells was evaluated by using CD69 marker. T4 lymphocytes, T8 lymphocytes, B lymphocytes, NK cells and NKT cells were all activated 3 days after MHV-3 inoculation without any difference between WT and IL-18bp deficient mice (data not shown).

Splenic immune cells were also analysed by flow-cytometry in WT and IL-18bp deficient mice (Figure 3). After MHV-3 inoculation, number and percentage of each cell populations were not modified in comparison with values from NI mice (data not shown). Moreover, no difference was observed between WT and IL-18bp deficient mice after MHV-3 infection (Figure 3A). Splenic CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, B cells, NK cells and NKT cells were all activated in WT mice, but surprisingly no activation of these immune cells was observed in IL-18bp deficient mice (Figure 3B-F).

Cytokines and chemokines expression in IL-18bp deficient mice and WT mice after MHV-3 infection

Cytokine expression and secretion in IL-18bp deficient mice and WT mice infected by MHV-3 were evaluated (Figure 4). Pattern expression of cytokines and chemokines was measured by quantitative PCR in liver (Figure 4A-I). IL-12, CXCL10, IFN β , IFN γ , TNF α , IL-6, IL-1 β and NF- κ B were overexpressed after MHV-3 inoculation without significant difference between IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. IL-18 transcripts were overexpressed in liver of WT mice with a 5-fold increase, but surprisingly expressed at basal level in liver of IL-18bp deficient mice (Figure 4I).

We measured anti-viral cytokine concentrations in sera of mice following MHV-3 inoculation (Figure 5A-G). IFN α , IFN β and IL-12 concentrations were not induced by the treatment in both WT and IL-18bp deficient mice. Concentrations of TNF α , IFN γ and IL-1 β were significantly increased 3 days after MHV-3 inoculation, with values at 250 pg/mL, 50 pg/mL and 30 pg/mL respectively (Figure 5I, J and L). However, no significant difference was observed between IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. Concentrations of GM-CSF, CCL2 and IL-6 were significantly increased after MHV-3 inoculation, whereas IL-10, CXCL1 and CCL5 concentrations were not modified by MHV-3 treatment (Supplementary data 5). As observed for transcript, IL-18 concentration was increased in sera of WT mice after MHV-3 inoculation, and stays at basal level in sera of IL-18bp deficient mice (Figure 5G).

Concentration of immunoglobulins was also measured in sera of WT and IL-18bp deficient mice (Supplementary data 6). IgA was the only studied immunoglobulin secreted following MHV-3 infection (Supplementary data 6A), and its concentration was near 1000 μ g/mL in sera of mice from IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} genotype. IgA had an antiviral activity, particularly in mucosal immunity. Concentration of IgM, IgG1, IgG3, IgG2a and IgG2b were not modified by MHV-3 inoculation (Supplementary data 6B-F).

Excepted the fact that IL-18bp regulates the expression of IL-18 during viral infection, these results confirmed that IL-18bp had globally no function in pathophysiology of MHV-3 induced fulminant hepatitis in mice.

Discussion

The aim of this study was to investigate the function of IL-18 binding protein during fulminant viral hepatitis (FVH) and to find out a relevant model of viral hepatitis to test therapeutic strategies targeting the IL-18/IL-18bp axis. To elucidate its function, an experimental model of FVH was

developed by the inoculation of murine hepatitis virus-3 (MHV-3) on wild-type and IL-18bp deficient mice. This model induced the development of HVF with an activation of antiviral immune response in mice.

Our results demonstrate that inoculation of MHV-3 lead to the development of viral hepatitis in mice between 3 and 5 days post-inoculation and to death of mice from day 5. In fact, mice became sick and started to lose weight from day 3, as previously reported (18). Moreover, ALT level, a gold standard of liver failure, was increased in sera of mice at day 3 and day 5 post-inoculation, as expected (19). However, no difference was observed in data obtained from wild-type and IL-18bp deficient mice.

A characterisation of molecular and cellular response after MHV-3 inoculation was performed in both WT and IL-18bp deficient mice. Flow-cytometry analysis shows no difference in percentage and number of immune cell populations in liver and spleen of wild-type and IL-18bp deficient mice. It has been described that IL-18 induces NK cell activation which play a central role in control of infection by releasing IFN, particularly IFN γ (15). Our results highlight a down-regulation in IL-18 expression in IL-18bp deficient mice without modification on NK cell number and IFN γ production, suggesting another cytokine which control this pathway as TNF α or IL-1 β , suggesting an active immune response to viral infection. In contrast, Harms *et al* (15) demonstrate a decrease of NK cell number in spleen of IL-18bp deficient mice, however, gating strategies of NK cells are different between both studies. Surprisingly, in spleen of IL-18bp deficient mice, immune cells were not activated following MHV-3 infection, as normally observed in WT mice. Absence of IL-18 induces no activation of NK cells which act with NKT cells as innate defense in viral infection and led to recruitment and activation of other immune cells as T and B lymphocytes (20). These results suggest that in IL-18bp deficient mice, immune response is not activated in response to MHV-3 infection by the absence of IL-18.

As previously reported, IL-18 expression was increased in WT mice, while it remained at basal level in IL-18bp deficient mice, which is correlated with serum concentration of IL-18. These results suggest that in absence of IL-18bp, stability of IL-18 and its serum concentration are decreasing during viral infection. IL-18bp could be a chaperone protein for IL-18. Absence of IL-18 during viral infection is not observed in human viral hepatitis (16), in contrast an overexpression of IL-18 in liver of patients with mutation on *il18bp* gene is observed. This could be explained a major difference observed between human and mice.

In humans, it exists another actor on IL-18 pathway called IL-37 (IL-1F7) (21, 22) and this cytokine is absent in mice (23). IL-37 is able to interact with IL-18bp and the chain α of IL-18 receptor and then exerts a feedback on IL-18 pro-inflammatory signal. The administration of recombinant IL-37 at the time of reperfusion during by hepatic ischemia/reperfusion (I/R) shows that IL-37 reduces liver inflammatory injury in decreasing pro-inflammatory cytokine and chemokine production by hepatocytes and Kupffer cells as well as having a direct protective effect on hepatocytes (24). IL-37 is considered an anti-inflammatory cytokine because it performs functions that inhibit responses from a wide range of inflammatory aggressions, including pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF α and TLR (22, 25, 26).

In mice that do not express IL-37, we observe that IL-18bp had no effect during viral hepatitis in opposite to human. Thus, IL-18bp deficient mice appear to be a very complex model for studying human pathology since, in addition to not expressing IL-37, IL-18bp mice exhibit an absence of induction of IL-18 production, making it almost an IL-18 and IL-18bp double deficiency model.

In conclusion many differences are observed between pathology of viral hepatitis in humans and in mice, then it will be difficult to test some therapeutic strategies with this model.

Funding statement

This work was supported by INSERM, The “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”, the University of Rennes 1 and the “Région Bretagne” and in particular the CPER grant called “infectio”. CD was supported by a PhD fellowship from the “Région Bretagne”, INSERM and ANRS.

Acknowledgments

We would like to thank Alanah Brown and Avril McHugh for their technical assistance. We acknowledge the “Laboratoire de Biochimie-Toxicologie” from the “CHU de Rennes” for transaminase measurements. For histological analysis, bead-based immunoassays, and animal house facilities, we would like to thank the dedicated platforms (i.e H2P2, flow-cytometry and cell sorting, and ARCHE) of SFR Biosit – UMS 3480, US_S 018, France.

Conflict of Interest

The authors have no financial or commercial conflict of interest to declare.

References

1. Liu M, Chan CWY, McGilvray I, Ning Q, Levy GA. Fulminant viral hepatitis: molecular and cellular basis, and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2001 Mar;3(10):1–19.
2. Jayakumar S, Chowdhury R, Ye C, Karvellas CJ. Fulminant Viral Hepatitis. *Crit Care Clin*. 2013 Jul 1;29(3):677–97.
3. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23–61.
4. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol*. 2017 Sep 5;
5. Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, Encke J, Schemmer P, Schmidt J, et al. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii5–8.
6. Lamontagne L, Descoteaux JP, Jolicoeur P. Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J Immunol*. 1989 Jun 15;142(12):4458–65.
7. Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L. A synergistic interferon-gamma production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e551–561.
8. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 2006;26(10):1175–86.
9. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*. 2014 Sep;61(3):660–71.
10. Jacques A, Bleau C, Martin J-P, Lamontagne L. Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 2008 May;152(2):298–310.
11. Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:192–209.
12. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol [Internet]*. 2013 Oct 8;4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792554/>
13. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Mar;12(1):53–72.
14. Dinarello C. Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis*. 2000 Nov;59(Suppl 1):i17–20.
15. Harms RZ, Creer AJ, Lorenzo-Arteaga KM, Ostlund KR, Sarvetnick NE. Interleukin (IL)-18 Binding Protein Deficiency Disrupts Natural Killer Cell Maturation and Diminishes Circulating IL-18. *Front Immunol*. 2017;8:1020.
16. Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, Kabbani M, Cobat A, Bastard P, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med*. 2019 Aug 5;216(8):1777–90.
17. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016 May 12;5(2):85–6.
18. Carrière V, Arshad MI, Le Seyec J, Lefevre B, Farooq M, Jan A, et al. Endogenous IL-33 Deficiency Exacerbates Liver Injury and Increases Hepatic Influx of Neutrophils in Acute Murine Viral Hepatitis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1359064.
19. Leray D, Dupuy C, Dupuy JM. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV3-induced immunodepression. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982 May;23(2):539–47.
20. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*. 2001 Aug 1;13(4):458–64.
21. Ellisdon AM, Nold-Petry CA, D'Andrea L, Cho SX, Lao JC, Rudloff I, et al. Homodimerization attenuates the anti-inflammatory activity of interleukin-37. *Sci Immunol*. 2017 Feb 10;2(8):eaaj1548.
22. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1014–22.
23. Wang L, Quan Y, Yue Y, Heng X, Che F. Interleukin-37: A crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4711–9.
24. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, et al. IL-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;27(10):1609–16.
25. Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, et al. Suppression of Innate Inflammation and Immunity by Interleukin Family Member Interleukin-37. *Eur J Immunol*. 2016 May;46(5):1067–81.
26. Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, et al. IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol*. 2015 Apr;16(4):354–65.

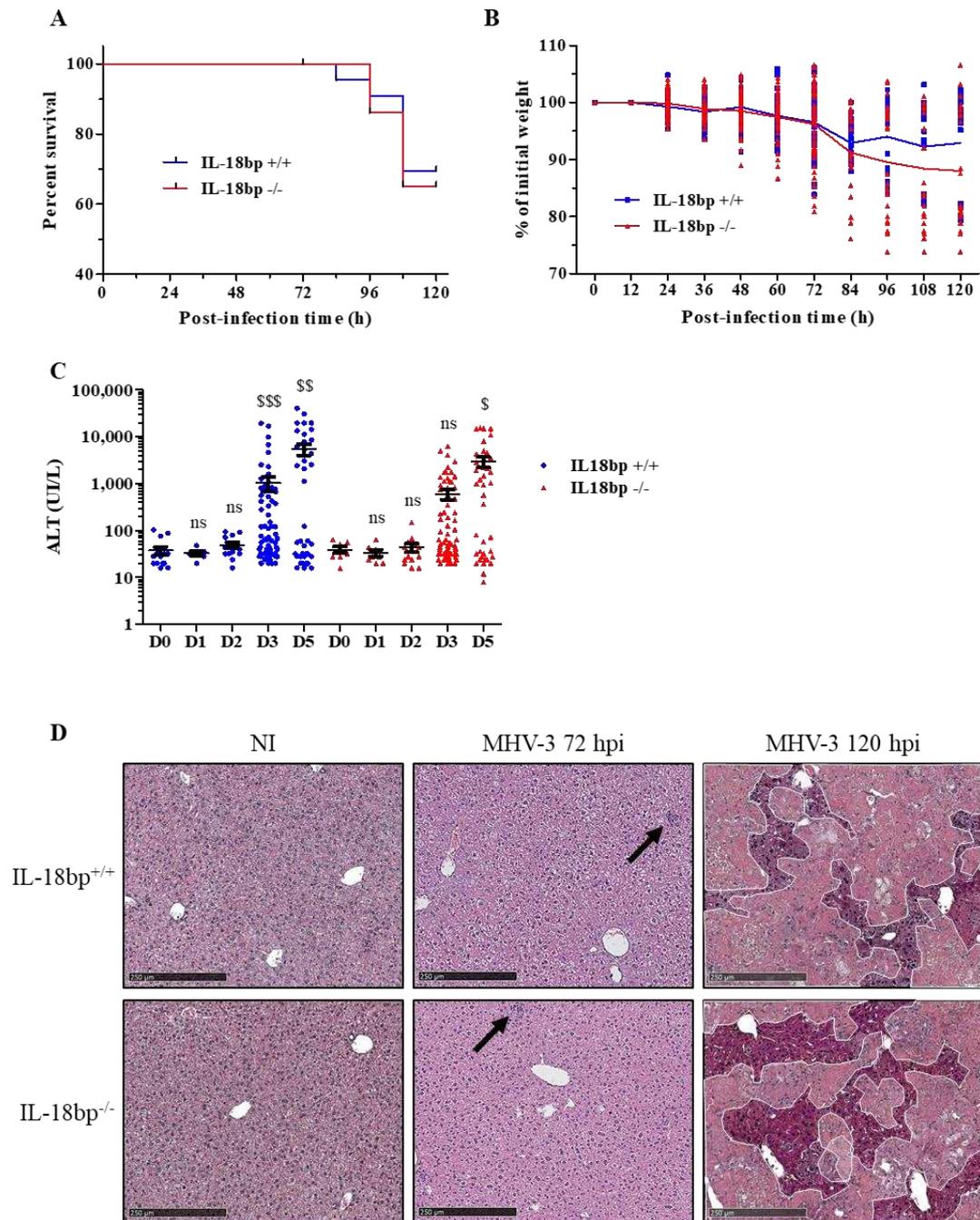


Figure 1: Characterization of MHV-3 induced acute hepatitis in IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Mice were euthanized to recover the liver and the serum at 72 and 120 hpi. A) Survival curve of IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. B) Percentage of weight loss from D0 to D5 post-infection with MHV-3 of IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. C) ALT measurement in sera of IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice from D0 to D5 post-inoculation of MHV-3. D) HES staining in liver of IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice 3 days and 5 days post-inoculation of MHV-3. A p-value < 0.05 was considered significant: \$ < 0.05, \$\$ < 0.01, \$\$\$ < 0.001 (comparison between NI and MHV-3 mice of same genotype).

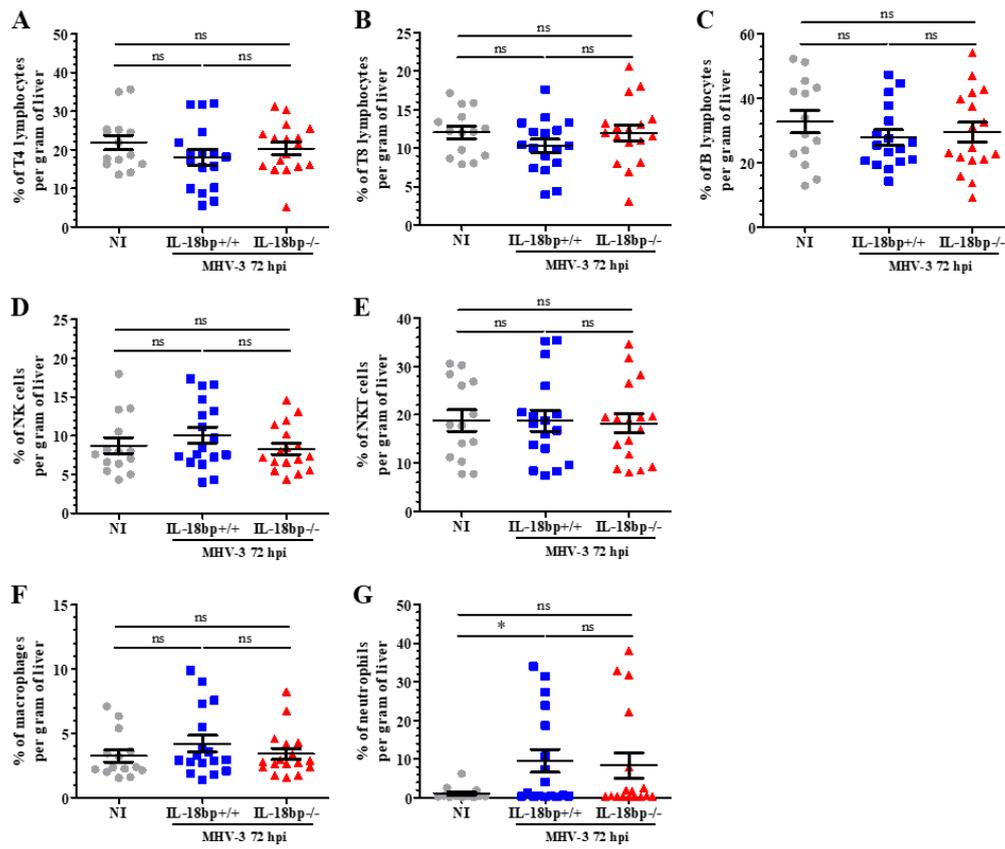


Figure 2: Characterisation of hepatic immune response to MHV-3 infection. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Mice were euthanized to recover the liver and immune-cells at 72 hpi. A-G) Percentage of intrahepatic immune-cell populations per gram of liver, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, B cells, NK cells, NKT cells, macrophages and neutrophils, respectively. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).

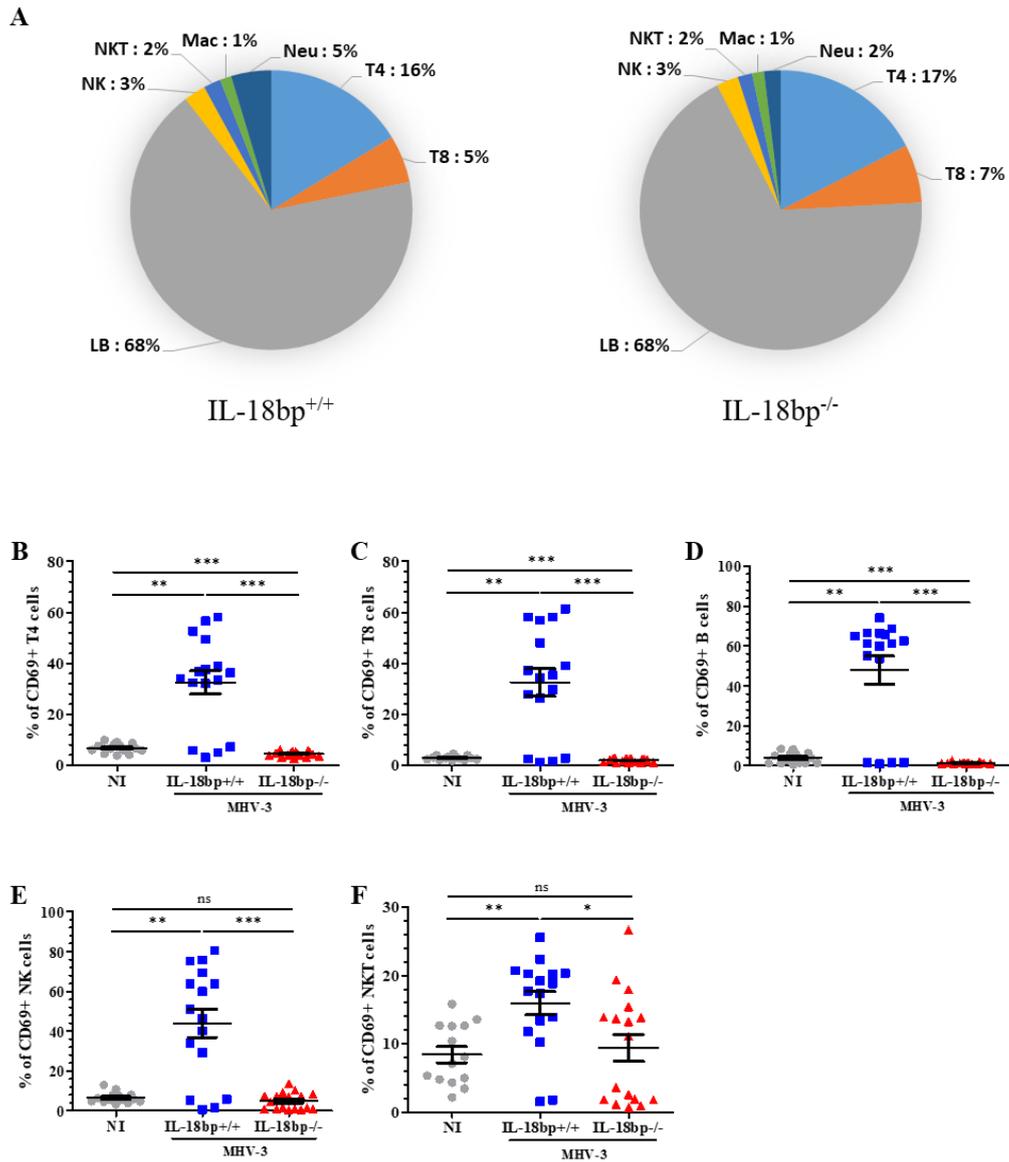


Figure 3: Splenic immune cell characterisation after MHV-3 infection. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Mice were euthanized to recover the spleen and immune-cells at 72 hpi. A) Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, NKT cells, neutrophils and macrophages by spleen at 72 hpi. B- F) Percentage of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, B cells, NK cells and NKT cells by spleen. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).

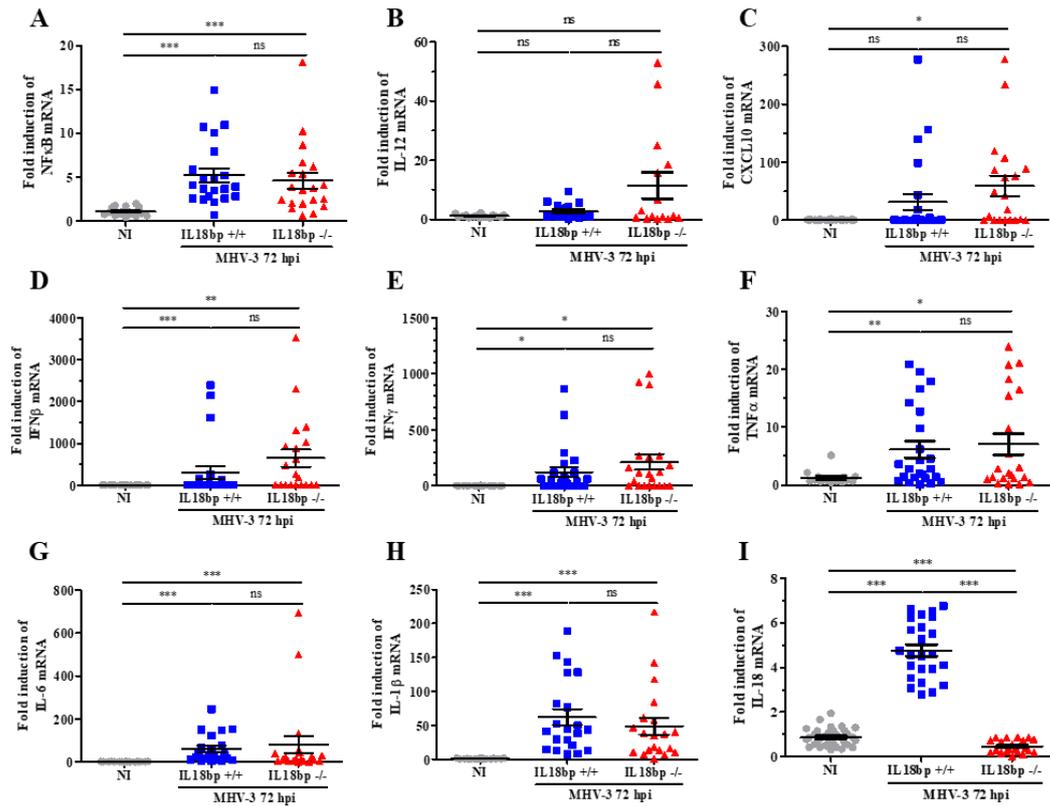


Figure 4: Cytokine expression pattern in response to MHV-3 infection in IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-}. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Mice were euthanized to recover the liver at 72 hpi. A-I) Cytokine expression in liver of IL-18bp^{+/+} or IL-18bp^{-/-} mice 3 days after MHV-3 inoculation. NF-κB, IL-12, CXCL10, IFNβ, IFNγ, TNFα, IL-6, IL-1β, IL-18, respectively. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).

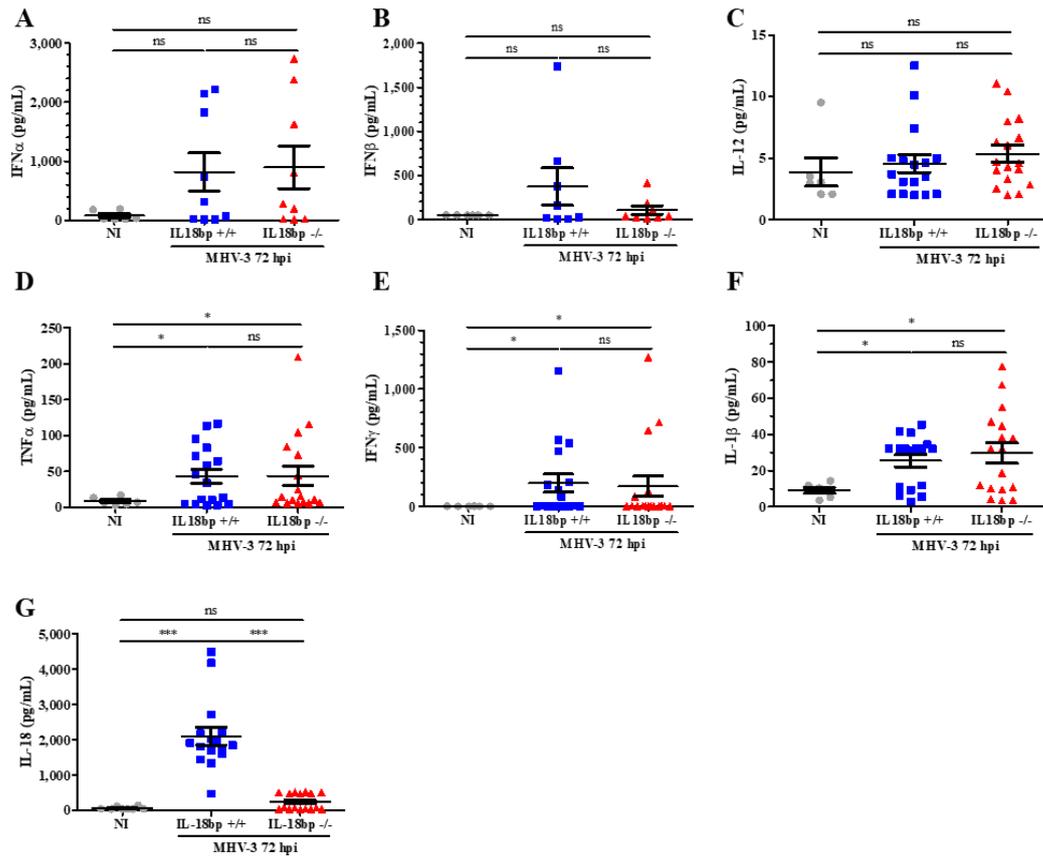


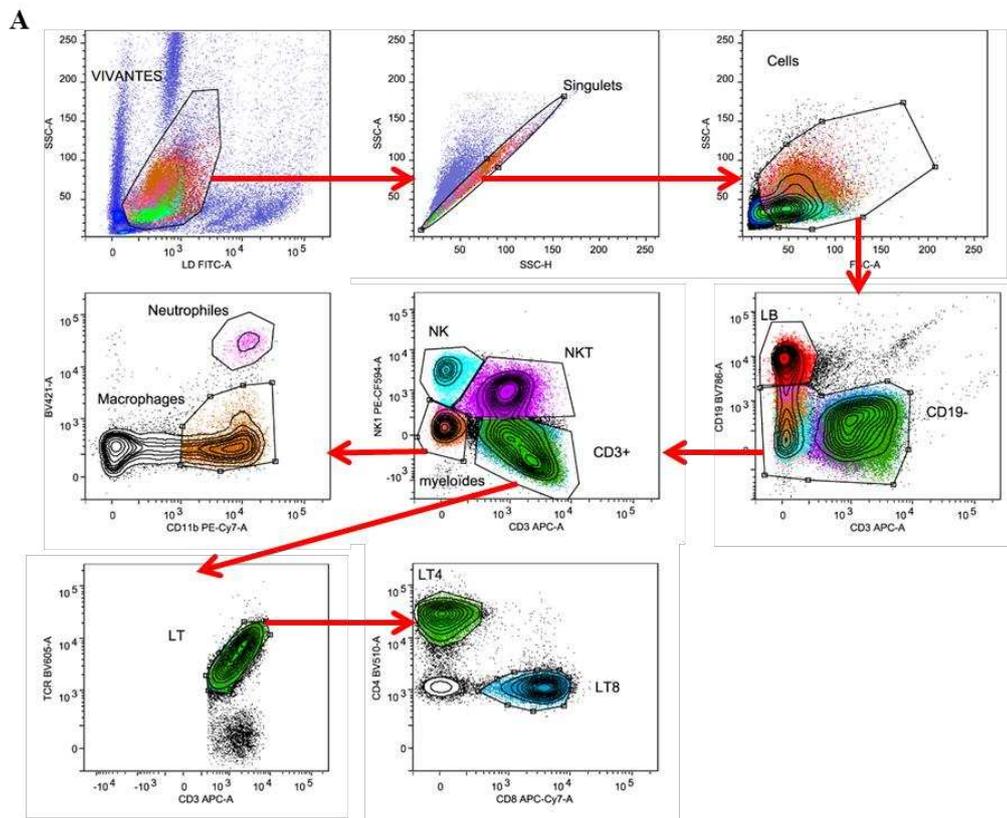
Figure 5: Cytokine immune response to MHV-3 infection in IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-} mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the serum. A-G) Cytokine concentrations in sera of IL-18bp^{+/+} or IL-18bp^{-/-} mice 3 days after MHV-3 inoculation. IFN α , IFN β , IL-12, TNF α , IFN γ , IL-1 β and IL-18, respectively. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).

TARGET	REVERSE	FORWARD
IL-18	5'-GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG-3'	5'-CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA-3'
IL-12	5'-TCAGTTTGGCCAGAAACCTC-3'	5'-GTTTGTCTGGCCTTCTGGAG-3'
IFN- β	5'-CTTGATTCTACAAAGAAGCAGC-3'	5'-TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA-3'
IFN- γ	5'-TCCAAGTGATGGCTGAACTG-3'	5'-CTCTTCGACCTCGAAACAGC-3'
TNF- α	5'-AACCTCCTCTCTGCCATCAA-3'	5'-ATGTTTCGTCTCCTCACAGG-3'
CXCL10	5'-GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC-3'	5'-GTCCATCCTTGGAAAGCACTGCA-3'
18S	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

Supplementary data 1: Sequence of specific primers used for qPCR.

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (efluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PercpCy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
FoxP3 (PE)	150D/E4	#12-4774-42, eBioscience
NK1.1 (PEefluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD3 (BUV496)	145.2.C11	#564661, BD Pharmingen™
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™
CD5 (APCR700)	53-7.3	#565505, BD Pharmingen™
CD138 (BB515)	281-2	#566207, BD Pharmingen™
IgM (BUV395)	II/41	#743329, BD Pharmingen™
IgD (PE)	11-26.2a	#405706, Biolegend
CD169 (APC)	3D6.112	#142418, Biolegend
Ly6C (PercpCy5.5)	a121	#560525, BD Pharmingen™
Ly6G (APCH7)	1A8	#565369, BD Pharmingen™

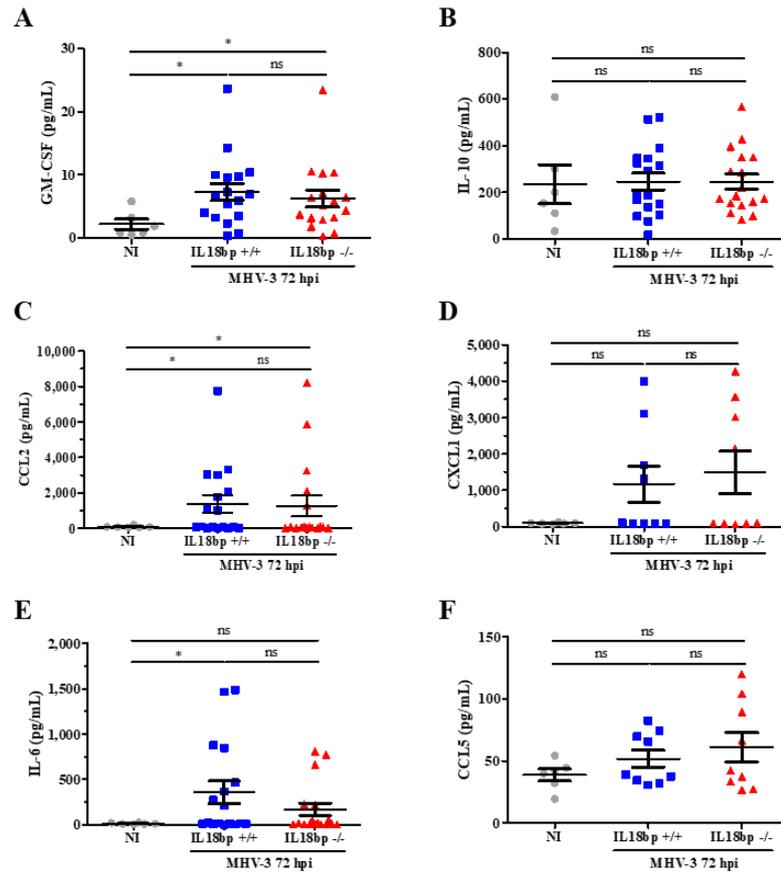
Supplementary data 2: Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometry.



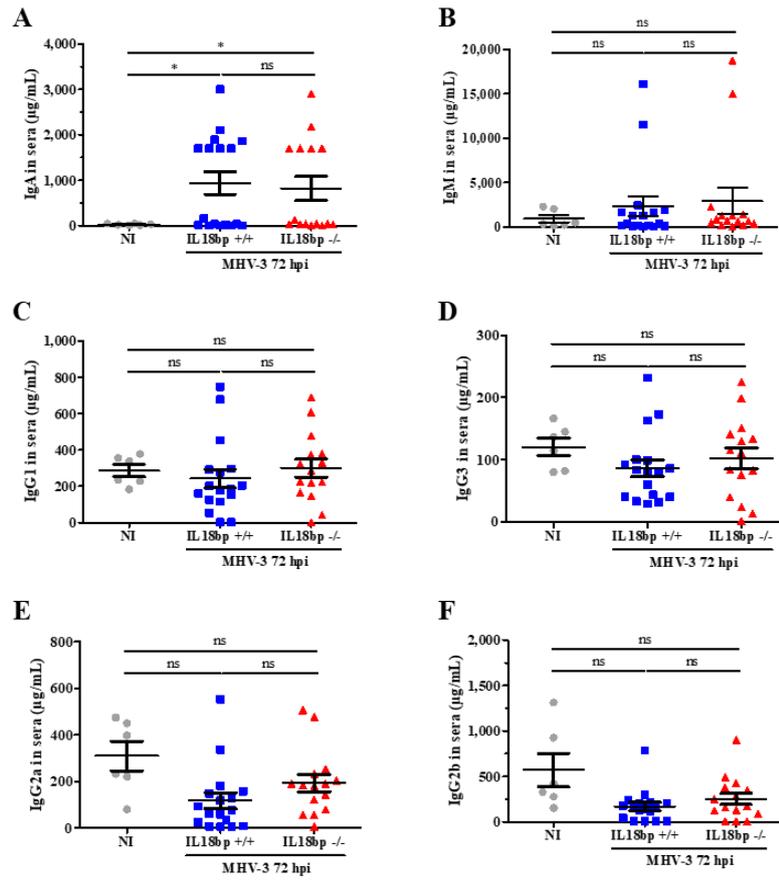
B

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (eFluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PerCPy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
NK1.1 (PEeFluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™

Supplementary data 3: Flow-cytometry analysis of hepatic immune cell infiltrates in non-infected and MHV-3 infected mice. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the liver and the spleen. A) Gating strategy used to identify the different populations of hepatic immune cells. B cells (CD19+/CD3-), T-CD8+ cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD8+), T-CD4+ cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD4+), NKT cells (CD3+/TCRVβ+/NK1.1+), NK cells (CD3-/TCRVβ+/NK1.1+), neutrophils (GR1+/CD11b+) and macrophages (GR1+/-/CD11b+) were first gated for singulets and on a viability marker. B) Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow-cytometry analysis.



Supplementary data 5: Cytokines production during MHV-3 model. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the serum. A-F) Cytokine concentrations in sera of IL-18bp^{+/+} or IL-18bp^{-/-} mice 3 days after MHV-3 inoculation. GM-CSF, IL-10, CCL2, CXCL1, IL-6 and CCL5, respectively. A p-value < 0.05 was considered significant: * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).



Supplementary data 6: Humoral immune response to MHV-3 infection in IL-18bp^{+/+} and IL-18bp^{-/-}. Mice were injected intraperitoneally either with PBS (NI) or with MHV-3. Seventy-two hours after, mice were euthanized to recover the serum. A-E) Measurement of immunoglobulins in sera of both wild-type and IL-18bp deficient mice, IgA, IgM, IgG1, IgG3, IgG2a and IgG2b respectively. A p-value < 0.05 was considered significant. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (comparisons are shown on graph).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V. Discussion générale et perspectives

1. Le rôle de la protéine IL-18bp au cours des hépatites virales fulminantes

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du développement d'une hépatite virale est un enjeu scientifique majeur. En effet, les hépatites virales fulminantes (HVF), définies par une atteinte hépatique sévère et une encéphalopathie, représentent un problème majeur de santé publique. La plupart des cas surviennent suite à une infection virale, principalement suite à une infection par les virus des hépatites A et E (VHA et VHE), les chances de survie des patients sans transplantation ne sont que de 15% contre 80% après avoir reçu une greffe hépatique. La majeure partie des cas d'hépatites virales fulminantes se répartit de façon sporadique, sans l'apparition de foyer de contamination. Il est également important de noter qu'il existe au sein d'une même famille plusieurs cas d'HVF. Ces données suggèrent ainsi qu'il pourrait exister des prédispositions génétiques déclenchant une susceptibilité accrue de développer une hépatite fulminante d'origine virale.

Dans ce contexte, l'équipe du Pr. Casanova (Institut Imagine, Paris) a étudié le génome de patients ayant développé une HVF, ainsi que les membres de leur famille (104). Cette étude avait pour objectif de déterminer s'il pouvait exister des mutations génomiques à l'origine de l'apparition d'une forme fulminante d'hépatite virale. L'exploration des génomes a démontré une mutation homozygote sur le gène *il18bp* chez les patients ayant développé une HVF. Il a également été mis en évidence que cette mutation est présente à l'état hétérozygote chez les membres des familles des patients HVF. La présence de cette mutation homozygote chez les patients entraîne la production d'une protéine IL-18bp tronquée et non fonctionnelle, incapable de contrôler la voie de l'IL-18. En effet, la protéine IL-18bp est un inhibiteur naturel de l'IL-18 chez l'Homme et la souris. Grâce à ses homologies de séquence avec le récepteur à l'IL-18, elle se fixe à la cytokine afin de réguler sa voie de signalisation. Les auteurs ont ainsi conclu que l'absence d'une IL-18bp fonctionnelle augmentait le risque de développer une hépatite virale fulminante suite à une dérégulation de la voie de l'IL-18, devenant hépatotoxique (104).

Pour étudier le rôle de la protéine IL-18bp dans le contexte de l'hépatite virale fulminante, notre équipe a développé un modèle d'HVF chez la souris par l'inoculation du virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV-3), en utilisant des souris sauvages (IL-18bp^{+/+}) ainsi que des souris homozygotes déficientes pour la protéine IL-18bp (IL-18bp^{-/-}). Des souris IL18bp^{+/+} et IL-18bp^{-/-}

^{-/-} ont été infectées par le MHV-3, modèle précédemment décrit (82, 145, 146). Les souris ont été sacrifiées selon une cinétique de 3 ou 5 jours post-inoculation pour observer les dommages hépatiques ainsi que la réponse immunitaire mise en place. Comme attendu, chez les souris sauvages, le MHV-3 induit le développement d'une hépatite virale fulminante, comme l'indique les valeurs élevées des transaminases hépatiques, mais aussi par les coupes histologiques qui montrent des dommages hépatiques importants. De plus, la mesure des concentrations sériques de cytokines pro-inflammatoires et antivirales confirme le développement d'une HVF. Chez les souris déficientes pour l'IL-18bp, les mêmes paramètres ont été étudiés, et nous observons des résultats similaires à ceux obtenus chez les souris sauvages. En conclusion, aucune différence n'est observable entre les souris des 2 génotypes sur l'ensemble des paramètres observés et mesurés.

L'étude de la réponse immunitaire dans le foie et la rate n'a pas démontré de différences au niveau du nombre et du pourcentage des cellules étudiées (LT CD4⁺ et CD8⁺, LB, NK, NKT macrophages et neutrophiles) entre les souris WT et les souris IL-18bp déficientes après inoculation du MHV-3. Cependant, au niveau splénique, nos données ont mis en évidence une différence entre les souris des 2 génotypes sur l'état d'activation par le marqueur CD69 des populations immunitaires étudiées, LT CD4⁺ et CD8⁺, LB, NK et NKT. A savoir que, comme attendu, l'ensemble des cellules immunes est activé chez les souris WT alors qu'un défaut d'activation de ces cellules est observé chez les souris IL-18bp^{-/-}. Ce résultat est à relier avec la sous-expression et le manque de production de la cytokine IL-18 chez ces mêmes souris suite à l'infection par le MHV-3. En effet, il a été démontré que l'IL-18, comme l'IL-12, avait pour fonction d'activer les cellules NK afin d'induire la production d'IFN γ par ces dernières (172). Chez les souris IL18bp^{+/+}, en présence d'IL-18, l'activation des cellules NK ainsi que la production d'IFN γ se font en réponse à l'infection dans le but d'activer les autres cellules de la réponse immunitaires, notamment les lymphocytes T. Alors que chez les souris IL-18bp^{-/-}, en l'absence d'IL-18, l'activation des NK n'a pas lieu et n'entraîne donc pas l'activation des autres cellules immunitaires. Ces résultats suggèrent donc que l'IL-18bp, au-delà de sa fonction d'inhibiteur naturel de l'IL-18, pourrait jouer un rôle de protéine chaperonne à l'IL-18 afin de la stabiliser et d'induire sa voie de signalisation par l'activation de la réponse innée à l'infection virale.

L'ensemble de nos résultats n'a pas permis de mettre en évidence de rôle spécifique de la protéine IL-18bp dans l'hépatite virale fulminante murine induite par l'inoculation du MHV-3.

L'absence de phénotype issu des expériences d'inoculation du MHV-3 peut également s'expliquer par la cinétique d'infectiosité du virus. En effet, seulement 3 jours post-inoculation, une atteinte hépatique sévère est observable, et le décès des animaux peut survenir dès 5 jours post-inoculation. Ce rapide processus de développement de l'hépatite rend difficile l'étude de phénotype sur des souris génétiquement modifiées.

Enfin, il existe chez l'Homme, une cytokine, l'IL-37, qui intervient dans la boucle de régulation de la voie de l'IL-18, et qui est absente chez la souris. Comme décrit dans la figure 15 de mon manuscrit, l'IL-37 possède des sites de reconnaissance à l'IL-18bp et agit donc comme un inhibiteur de cette protéine. Mais l'IL-37 est également capable de se fixer au récepteur de l'IL-18 et joue alors un rôle d'inhibiteur compétitif de l'IL-18 sur son récepteur IL-18R α en induisant un signal anti-inflammatoire. Chez les patients présentant une mutation sur le gène *il18bp* et suite à une infection par l'un des virus des hépatites, l'IL-18 et l'IL-37 se fixent de façon compétitive sur le récepteur IL-18R α . Cet équilibre est retrouvé entre les signaux pro- et anti-inflammatoires (**Figure 29**). Chez la souris, l'IL-37 étant absente, en réponse à l'infection virale, seule l'IL-18 se fixe sur son récepteur en induisant une réponse pro-inflammatoire. L'absence d'inhibiteur naturel, comme l'IL-18bp, ne permet pas de contrôler la voie de l'IL-18 qui peut alors devenir hépatotoxique par son action sur la réponse immunitaire médiée par les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques (178).

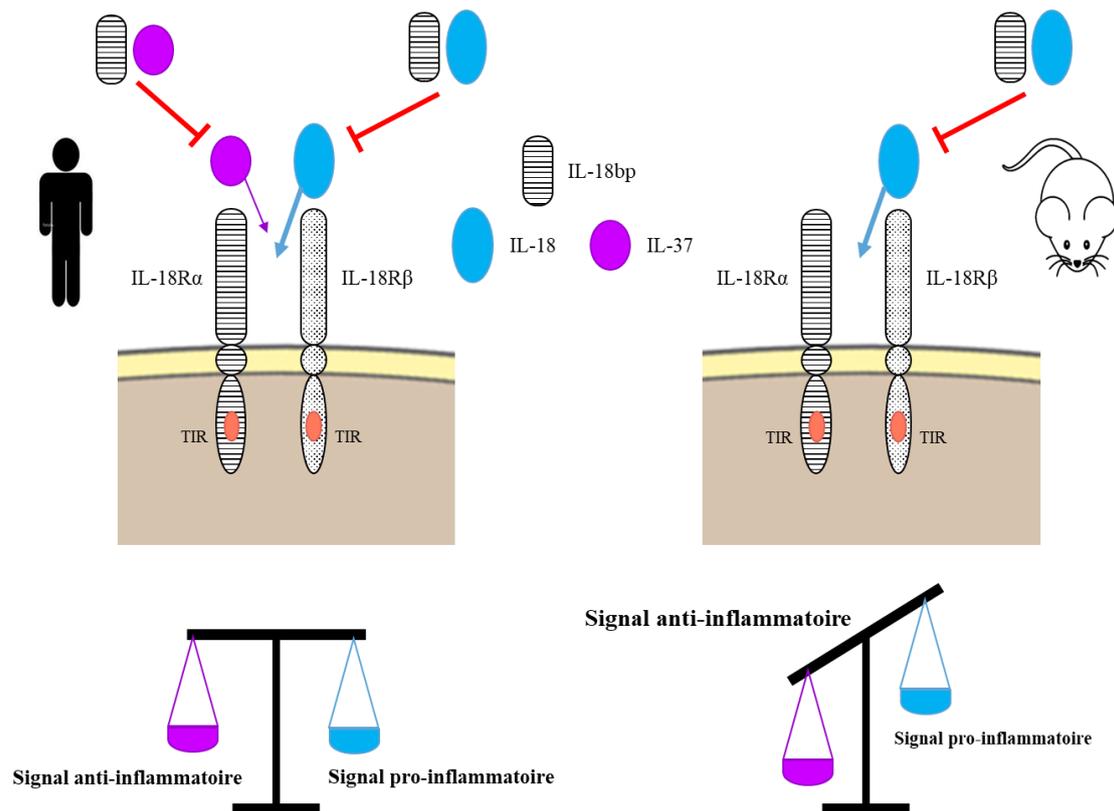


Figure 29 : voie de signalisation de l'IL-18 chez l'Homme et la souris en réponse à une infection virale.

L'ensemble de nos propres données et celles de la littérature nous conduit à formuler quelques hypothèses de travail. Notre première hypothèse porte sur la lyse des macrophages entraînant une absence de production de la cytokine IL-18 expliquant le manque de différences observées entre les souris sauvages et les souris déficientes pour l'IL-18bp. Nous supposons donc que d'autres voies de signalisation, comme la voie du $TNF\alpha$, compensent l'absence de l'IL-18 pour médier la réponse immunitaire antivirale. Il serait intéressant de produire de nouvelles expériences *in vivo* chez les souris IL-18^{+/+} et IL-18bp^{-/-} avec d'autres souches de MHV. En effet, il existe des souches uniquement hépatotropes et moins virulentes que le MHV-3. On peut par exemple citer la souche MHV-A59 (179) capable d'induire une hépatite chez la souris avec une mobilisation du système immunitaire notamment les macrophages et les lymphocytes B. Ce virus est également capable de traverser la barrière hémato-encéphalique afin d'induire une méningoencéphalite (180). Il reproduit donc le tableau clinique d'une hépatite virale fulminante, avec une cinétique plus longue et le développement d'une HVF en 10 à 15 jours. Cependant, il n'est pas décrit dans la littérature les voies de signalisation induite par

l'inoculation du MHV-A59. Il serait donc judicieux de vérifier que la voie IL-18/IL-18bp est activée et donc nécessaire dans la réponse antivirale au MHV-A59.

Notre seconde hypothèse est d'évaluer l'impact de la cytokine IL-37 dans l'hépatite virale fulminante. Pour cela, et si notre première hypothèse est vérifiée, nous pourrions infecter avec le virus MHV-A59 des souris transgéniques exprimant l'IL-37 en comparaison à des souris sauvages n'exprimant pas cette cytokine (86, 152) afin de mieux comprendre les mécanismes immunitaires mis en place dans l'HVF en se rapprochant des conditions physiopathologiques chez l'Homme.

2. Rôle de la chimiokine CXCL14 dans la réponse antimicrobienne

Les cytokines, et en particulier les chimiokines, ont une place centrale dans la réponse immunitaire suite à une infection microbienne en exerçant leur rôle de chimiotactisme et d'activation sur les cellules immunitaires. CXCL14, aussi appelée BRAK, fait partie des chimiokines étudiée dans la réponse antimicrobienne. A ce jour, plusieurs études ont démontré le rôle de CXCL14 dans la lutte antibactérienne et antifongique, en mettant en évidence sa fonction de défensine (46, 52). Dans ce contexte, CXCL14 a été décrite comme étant chimioattractante pour les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques immatures mais aussi les cellules NK (52). Aucune étude n'a démontré d'effet chimioattractant de CXCL14 sur les lymphocytes T et B. Concernant les infections virales, peu d'études existent concernant le rôle de CXCL14. Dans notre équipe, une première étude portant sur les hépatites aiguës de diverses étiologies a démontré une surproduction de la chimiokine CXCL14 chez les patients présentant une hépatite d'origine virale (44). De plus, une étude a mis en évidence une surexpression du gène *cxcl14* chez des patients présentant un carcinome hépatocellulaire d'origine virale du au VHB ou au VHC (70). L'ensemble de ces données de littérature nous ont menés à étudier l'expression et le rôle de la chimiokine CXCL14 dans le contexte des hépatites virales aiguës.

Pour répondre à notre problématique concernant l'étude de l'expression et du rôle de la chimiokine CXCL14 dans le contexte des hépatites virales aiguës, des souris ont été infectées par le virus MHV-3. Dans ce contexte nous avons observé une atteinte hépatique sévère révélée par des valeurs de transaminases élevées et une nécrose hépatocytaire, associée à un relargage massif de la chimiokine CXCL14 dans les sérums des souris infectées. Des souris déficientes pour CXCL14 ont également été infectées par ce virus afin d'étudier le rôle de CXCL14. Des résultats similaires à ceux observés chez les souris sauvages ont été obtenus chez les souris CXCL14^{-/-}. Par l'utilisation de ce modèle d'infection par le MHV-3, nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence de rôle spécifique de CXCL14 dans le contexte des hépatites virales.

Afin d'étudier la régulation d'expression de la chimiokine CXCL14, nous avons infectés des hépatocytes primaires humains et murins par des virus lytiques, respectivement le HSV-1 (virus de l'herpès simplex de type 1) et le MHV-3. Ces infections sur cultures primaires ont démontré que le relargage de CXCL14 était passif et relié à la lyse hépatocytaire. Nous avons également

mis en présence les hépatocytes primaires avec des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α . Ces expériences ont mis en évidence que l'expression de CXCL14 était positivement régulée en présence de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, le relargage de la chimiokine CXCL14 a été évalué dans le sérum de patients présentant une hépatite aiguë d'origine virale ou non. Les résultats de cette expérience ont démontré que CXCL14 était présente en grande quantité dans les sérums des patients avec une hépatite virale, contrairement aux patients avec une hépatite aiguë non virale qui présentent de faible taux de CXCL14. La concentration sérique de CXCL14 est corrélée aux dommages hépatiques pour les patients présentant une hépatite virale aiguë due à l'infection par le HSV-1.

L'ensemble des résultats démontre que CXCL14 est produit par les hépatocytes dans le foie, et n'est pas produit par les autres types cellulaires du foie comme les cellules étoilées et les cellules endothéliales. Cependant, nous n'avons pas évalué la production de CXCL14 par les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie jouant un rôle primordial dans la réponse immunitaire hépatique aux infections (28, 111, 153). L'étude de l'expression de CXCL14 a également révélée que sur les western-blot 2 bandes étaient détectées dans les hépatocytes murins contre 1 seule bande pour les hépatocytes humains. Dans les 2 cas, nous retrouvons une bande à 17 kDa comme décrit dans la littérature (157). Concernant les hépatocytes murins, nous détectons une seconde bande à 34 kDa jamais décrite dans la littérature. Cette seconde bande pourrait correspondre à un dimère de CXCL14. Cette forme de dimère pourrait permettre d'accroître la stabilité de la chimiokine dans le sérum. Enfin, notre étude a démontré que le relargage de CXCL14 dans le sérum était corrélé à l'atteinte hépatique suite à l'infection par le MHV-3 chez la souris et le HSV-1 chez l'Homme. Ces 2 virus lytiques possèdent des homologies dans leur processus pathologique d'infection. En effet, après fixation sur leur récepteur, majoritairement le TLR2, les 2 virus sont endocytés, se répliquent dans le cytoplasme de leur cellule hôte, principalement l'hépatocyte, puis lysent la membrane plasmique de la cellule pour être « exocyté » et infecter de nouvelles cellules cibles (155, 156). De plus, le MHV-3, comme l'HSV-1, induit le développement de formes fulminantes d'hépatites.

Ce modèle MHV-3 n'est pas relevant, comme explicité précédemment, car il possède des inconvénients ne permettant pas d'étudier le rôle de CXCL14. En particulier, le MHV-3 induit une hépatite fulminante par un processus très rapide en 5 jours. Comme pour l'étude réalisée sur la protéine IL-18bp, l'utilisation d'un autre virus hépatotrope murin, le MHV-A59, permettrait d'étudier de façon plus précise le rôle de CXCL14. En effet, CXCL14 a déjà été

démontrée comme ayant un rôle de protection du développement de l'hépatite toxique induite par l'injection de tétrachlorométhane (CCl₄) (72). L'utilisation d'un modèle d'hépatite virale plus adapté permettrait donc d'évaluer le rôle de CXCL14 dans cette pathologie.

Au cours de nos expériences, nous nous sommes rendu compte que les souris WT congénères et CXCL14 déficientes non infectées, c'est-à-dire à l'état basal, présentaient une immunité différente. Ceci nous a intrigués et nous avons entrepris des expériences complémentaires pour détailler et comprendre si CXCL14 pouvait avoir des fonctions chez les souris sans induire une infection, ce qui n'avait encore jamais été publié. Ainsi, nous avons étudié les populations immunitaires spléniques de souris sauvages et de souris déficientes pour CXCL14. Chez les souris CXCL14^{-/-}, nous avons démontré que ces souris présentaient une réponse immunitaire plus active que chez les souris sauvages, avec un nombre important de centres germinatifs. De plus, nous avons mis en évidence que cette réponse immunitaire active reposait essentiellement sur une réponse médiée par les lymphocytes B. En effet, nous avons montré que ces lymphocytes B proliféraient, étaient activés et se différenciaient en plasmocytes. La différenciation en plasmocytes conduit à une surproduction d'immunoglobulines, les IgG1 et IgG3, chez les souris déficientes pour CXCL14, en comparaison aux données obtenues chez les souris sauvages.

En conclusion de cette partie, nous avons mis en évidence que CXCL14 avait un rôle dans la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B. En effet, en l'absence de CXCL14, les souris présentent une réponse immunitaire exacerbée au niveau de la rate pour lutter contre les pathogènes ambiants. Cette réponse passe par la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgG1 et IgG3. Cependant, à ce jour, nous ne savons pas pour quel pathogène une réponse immunitaire de ce type est mise en place. Nous supposons qu'il s'agit d'un agent bactérien puisque sensible à un traitement antibiotique. Des expériences réalisées *in vitro* permettraient de tester un potentiel rôle chimiotactique de CXCL14 sur les lymphocytes B afin de mieux comprendre les observations réalisées dans les rates des souris sauvages et des souris déficientes pour CXCL14.

Enfin, afin d'évaluer le rôle de CXCL14 sur la réponse immunitaire systémique, nous avons réalisé des marquages HES sur des coupes d'intestin afin d'y observer les plaques de Peyer (**Figure 30**). Chez l'ensemble des souris CXCL14^{+/+}, de petites zones de follicules B sont

visibles, alors que chez les souris CXCL14^{-/-} ces follicules sont beaucoup plus étendus et forment de réels foyer de prolifération et différenciation des LB. Ces résultats suggèrent donc une réponse immunitaire fortement activée chez les souris déficientes pour CXCL14.

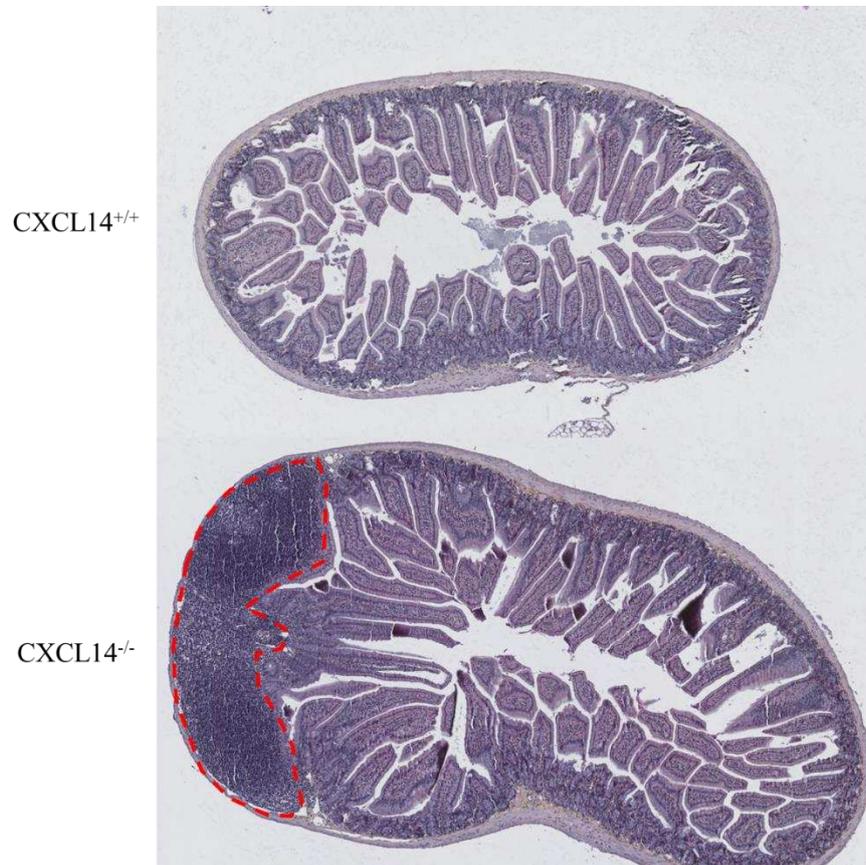


Figure 30 : Coloration HES d'intestin de souris sauvages et des souris déficientes pour CXCL14. Les pointillés rouges mettent en évidence les plaques de Peyer.

RESUMES

Résumé

Les hépatites d'origine virale constituent la forme la plus fréquente d'hépatite, devant les hépatites d'origine toxique médicamenteuse et alcoolique. On dénombre plus de 360 millions de cas d'hépatites virales dans le Monde, dus aux infections par les virus des hépatites A à E (VHA à VHE), mais également suite à une primo-infection par le virus de l'herpès (HSV). L'infection par l'un de ces virus entraîne la mobilisation de la réponse immunitaire *via* la production de cytokines, et en particulier de chimiokines et d'interleukines.

Une première partie de nos travaux a porté sur l'étude du rôle de la protéine IL-18bp au cours des hépatites virales fulminantes. Pour cela, un modèle d'hépatite murine virale fulminante, induite par l'inoculation du virus de l'hépatite murine (MHV-3), a été mis en place chez des souris sauvages et des souris déficientes pour la protéine IL-18bp. Suite à l'infection de ces souris par le MHV-3, nous avons mis en évidence que la protéine IL-18bp n'impactait pas le développement de l'hépatite fulminante chez la souris.

La seconde partie de nos travaux a porté sur l'étude de l'expression et du rôle de la chimiokine CXCL14 au cours des hépatites virales. Nous avons mis en évidence que cette chimiokine était exprimée puis relarguée par les hépatocytes lors de leur lyse induite par l'infection virale. De plus, nous avons démontré que la chimiokine était présente à de fortes concentrations dans le sérum de patients présentant une hépatite aiguë d'origine virale, suite à l'infection par le VHA, le VHB, le VHE ou le HSV. Afin d'étudier le rôle de la chimiokine CXCL14, le modèle d'hépatite virale induite par le MHV-3 a été développé chez des souris sauvages et des souris déficientes pour CXCL14. L'infection de ces souris par le MHV-3 n'a pas démontré de rôle spécifique de la chimiokine CXCL14. Cependant, des différences de réponse immunitaire chez les souris contrôles non infectées ont mis en évidence un rôle de CXCL14 dans la surveillance immunitaire. En effet, les souris déficientes pour CXCL14 démontrent une activité immunitaire médiée par les lymphocytes B plus active que celle observée chez les souris sauvages.

La chimiokine CXCL14 serait donc un acteur central de la réponse immunitaire et son rôle dans l'hépatite virale reste à déterminer. Le modèle d'hépatite induite par l'inoculation du MHV-3 ne reflétant pas la pathologie humaine, les résultats obtenus concernant le rôle de CXCL14 et de l'IL-18bp sont difficilement comparables à ceux chez l'Homme. Cependant CXCL14 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans les pathologies où la réponse immunitaire n'est plus contrôlée correctement, comme les maladies auto-immunes.

Abstract

Viral hepatitis is the most common form of hepatitis, ahead of toxic drug and alcoholic hepatitis. There are more than 360 million cases of viral hepatitis worldwide, due to infections with the hepatitis A to E viruses (HAV to HEV), but also following a primary infection with the herpes virus (HSV). Infection with one of these viruses leads to the mobilization of the immune response *via* the release of cytokines, and particularly of chemokines and interleukins.

The first part of our work focused on the study of the role of the IL-18 binding protein (IL-18bp) during fulminant viral hepatitis. For this, a model of fulminant viral murine hepatitis, induced by inoculation of the murine hepatitis virus (MHV-3), was established in wild-type mice and in mice deficient for the IL-18bp. Following infection of these mice with MHV-3, we have demonstrated that the IL-18bp protein does not affect the development of fulminant hepatitis in mice.

The second part of our work focused on studying the expression and role of the chemokine CXCL14 in viral hepatitis. We have demonstrated that this chemokine is expressed and then released by hepatocytes during their lysis induced by viral infection. In addition, we have demonstrated that chemokine is present in high concentrations in the serum of patients with acute viral hepatitis, following infection with HAV, HBV, HEV or HSV. In order to study the role of the chemokine CXCL14, the model of viral hepatitis induced by MHV-3 was developed in wild-type mice and in mice deficient for CXCL14. Infection of these mice with MHV-3 did not demonstrate a specific role for the chemokine CXCL14. However, differences in immune response in uninfected control mice demonstrated a role for CXCL14 in immune surveillance. In fact, mice deficient for CXCL14 demonstrate a more active immune response mediated by B lymphocytes than that observed in wild-type mice.

The chemokine CXCL14 is therefore a central actor in the immune response and its role in viral hepatitis remains to be determined. Since the model of hepatitis induced by inoculation of MHV-3 does not reflect human pathology, the results obtained concerning the role of CXCL14 and IL-18bp are difficult to compare with those in humans. However, CXCL14 could be an interesting therapeutic target in pathologies where the immune response is no longer properly controlled, such as autoimmune diseases.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Kassissia I, Brault A, Huet PM. Hepatic artery and portal vein vascularization of normal and cirrhotic rat liver. *Hepatology* Baltim Md. 1994 May;19(5):1189–97.
2. Liver Lobule - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2020 Apr 3]. Available from: <https://www.sciencedirect.com.proxy.insermbiblio.inist.fr/topics/immunology-and-microbiology/liver-lobule>
3. Prandi D, Erlinger S, Glasinović J-C, Dumont M. Canalicular Bile Production in Man*. *Eur J Clin Invest*. 1975;5(1):1–6.
4. Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol*. 2002 Dec 1;13(6):425–31.
5. Duncan AW, Hanlon Newell AE, Smith L, Wilson EM, Olson SB, Thayer MJ, et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):25–8.
6. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008 Jan;88(1):125–72.
7. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol*. 2017 Jan 1;66(1):212–27.
8. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):785–97.
9. Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut*. 2003 Feb;52(2):307–14.
10. Klugewitz K, Adams DH, Emoto M, Eulenburg K, Hamann A. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol*. 2004 Nov;25(11):590–4.
11. Bartneck M, Wang J. Therapeutic Targeting of Neutrophil Granulocytes in Inflammatory Liver Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Sep 20 [cited 2020 Apr 3];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6764082/>
12. Lee HJ, Kim DJ, Heo JH, Kim KA, Yoon SW, Lee JT. Eosinophilic Infiltration in the Liver: Unusual Manifestation of Hepatic Segmental Involvement. *J Korean Soc Magn Reson Med*. 2012;16(1):76.
13. Gatselis NK, Zachou K, Papamichalis P, Koukoulis GK, Gabeta S, Dalekos GN, et al. Comparison of simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis: A new or a complementary diagnostic score? *Dig Liver Dis*. 2010 Nov;42(11):807–12.

14. Hépatite A [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>
15. Mysore KR, Leung DH. Hepatitis B and C. *Clin Liver Dis*. 2018 Nov;22(4):703–22.
16. Di Bisceglie AM. Hepatitis B And Hepatocellular Carcinoma. *HepatoI Baltim Md*. 2009 May;49(5 Suppl):S56–60.
17. Hépatite B [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://vaccination-info-service.fr/Les-maladies-et-leurs-vaccins/Hepatite-B>
18. Principaux repères sur l'hépatite C [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
19. Hépatite D [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>
20. Principaux repères sur l'hépatite E [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
21. Martinez V, Bricaire F, Caumes E. Hépatites à Herpes simplex virus chez l'adulte. *Virologie*. 2004 Nov 1;8(6):445–9.
22. Schaefer TJ, John S. Acute Hepatitis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Mar 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551570/>
23. Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, Encke J, Schemmer P, Schmidt J, et al. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii5–8.
24. Gow PJ, Mutimer D. Treatment of chronic hepatitis. *BMJ*. 2001 Nov 17;323(7322):1164–7.
25. Bedossa P. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. 1996;24(2):5.
26. Li L, Duan M, Chen W, Jiang A, Li X, Yang J, et al. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J Transl Med [Internet]*. 2017 May 23 [cited 2020 Mar 29];15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442653/>
27. Sitia G, Iannaccone M, Aiolfi R, Isogawa M, van Rooijen N, Scozzesi C, et al. Kupffer Cells Hasten Resolution of Liver Immunopathology in Mouse Models of Viral Hepatitis. *PLoS Pathog [Internet]*. 2011 Jun 2 [cited 2020 Mar 29];7(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107209/>
28. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 2006;26(10):1175–86.

29. Noack M, Kolopp-Sarda M-N. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Francoph Lab*. 2018 Feb 1;2018(499):28–37.
30. Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37(Suppl 1):S34–45.
31. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):778–809.
32. Paun A, Pitha PM. The Innate Antiviral Response: New Insights Into A Continuing Story. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2006 [cited 2020 Apr 2]. p. 1–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706690015>
33. Boulestin A. La nouvelle classe d'interféron, les interférons lambda, inhiberait la réplication du VHB et du VHC. *Virologie*. 2005 Jul 31;9(4):329–329.
34. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2014 Nov 1;1843(11):2563–82.
35. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [cited 2020 Apr 2];2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4325469/>
36. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jul 1;36(7):1161–5.
37. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *WIREs Dev Biol*. 2013;2(1):47–63.
38. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*. 2011 Mar;317(5):575–89.
39. Melchjorsen J, Sørensen LN, Paludan SR. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J Leukoc Biol*. 2003;74(3):331–43.
40. Neptune ER, Bourne HR. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14489–94.
41. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010 Oct 15;330(6002):362–6.
42. Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;303:29–46.

43. Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Pérez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2002 Nov;97(11):2861–70.
44. Chalin A, Lefevre B, Devisme C, Pronier C, Carrière V, Thibault V, et al. Serum CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 chemokine patterns in patients with acute liver injury. *Cytokine*. 2018 Nov 1;111:500–4.
45. Liepelt A, Tacke F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Jun 16;311(2):G203–9.
46. Benarafa C, Wolf M. CXCL14: the Swiss army knife chemokine. *Oncotarget*. 2015 Oct 8;6(33):34065–6.
47. Lu J, Chatterjee M, Schmid H, Beck S, Gawaz M. CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator. *J Inflamm Lond Engl [Internet]*. 2016 Jan 5 [cited 2018 Oct 16];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4700668/>
48. Kurth I, Willimann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):855–61.
49. Schaerli P, Willimann K, Ebert LM, Walz A, Moser B. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):331–42.
50. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, et al. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res*. 2004 Nov 15;64(22):8262–70.
51. Shurin GV, Ferris R, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, et al. Loss of New Chemokine CXCL14 in Tumor Tissue Is Associated with Low Infiltration by Dendritic Cells (DC), while Restoration of Human CXCL14 Expression in Tumor Cells Causes Attraction of DC Both In Vitro and In Vivo. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5490–8.
52. Dai C, Basilico P, Cremona TP, Collins P, Moser B, Benarafa C, et al. CXCL14 Displays Antimicrobial Activity against Respiratory Tract Bacteria and Contributes to Clearance of *Streptococcus pneumoniae* Pulmonary Infection. *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):5980–9.
53. Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, et al. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol*. 2000 Jun;156(6):1937–50.
54. Salogni L, Musso T, Bosisio D, Mirolo M, Jala VR, Haribabu B, et al. Activin A induces dendritic cell migration through the polarized release of CXC chemokine ligands 12 and 14. *Blood*. 2009 Jun 4;113(23):5848–56.

55. Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, et al. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol*. 2000 May;12(5):677–89.
56. Cao X, Zhang W, Wan T, He L, Chen T, Yuan Z, et al. Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for human neutrophils and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Sep 1;165(5):2588–95.
57. Lindberg J, af Klint E, Catrina AI, Nilsson P, Klareskog L, Ulfgren A-K, et al. Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R179.
58. Chen L, Guo L, Tian J, He H, Marinova E, Zhang P, et al. Overexpression of CXC chemokine ligand 14 exacerbates collagen-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Apr 15;184(8):4455–9.
59. Padilla J, Jenkins NT, Lee S, Zhang H, Cui J, Zuidema MY, et al. Vascular transcriptional alterations produced by juvenile obesity in Ossabaw swine. *Physiol Genomics*. 2013 Apr 16;45(11):434–46.
60. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahma Z, Dahl R, Christopherson K, et al. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol*. 2006 Aug;34(8):1101–5.
61. Wang W, Huang P, Zhang L, Wei J, Xie Q, Sun Q, et al. Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2013;104(11):1523–31.
62. Lin Y, Chen B-M, Yu X-L, Yi H-C, Niu J-J, Li S-L. Suppressed Expression of CXCL14 in Hepatocellular Carcinoma Tissues and Its Reduction in the Advanced Stage of Chronic HBV Infection. *Cancer Manag Res*. 2019;11:10435–43.
63. Maerki C, Meuter S, Liebi M, Mühlemann K, Frederick MJ, Yawalkar N, et al. Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of CXCL14 Suggests an Immediate Role in Skin Infections. *J Immunol*. 2009 Jan 1;182(1):507–14.
64. K T, K S, Y N, K T, A S, A O, et al. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett*. 2013 May 11;587(12):1731–5.
65. Tanegashima K, Tsuji K, Suzuki K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T. Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors. *FEBS Lett*. 2013 Nov 29;587(23):3770–5.
66. Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther*. 2015 May 29;6:111.

67. Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K, Wald H, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur J Immunol*. 2004 Apr;34(4):1164–74.
68. Chalin A, Lefevre B, Devisme C, Barget N, Amiot L, Samson M. Circulating levels of CXCL11 and CXCL12 are biomarkers of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine*. 2019;117:72–8.
69. Collins PJ, McCully ML, Martínez-Muñoz L, Santiago C, Wheeldon J, Caucheteux S, et al. Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2017;31(7):3084–97.
70. Gu X, Wang H, Wang A, Dou T, Qi P, Ji Q, et al. An intronic polymorphism rs2237062 in the CXCL14 gene influences HBV-related HCC progression in Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012 Feb 1;39(2):797–803.
71. Zhou X, Zhu H-Q, Lu J. Regulation of gene expression in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma: integrated GWRS and GWGS analyses. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Nov 15;7(11):4038–50.
72. Li J, Gao J, Yan D, Yuan Y, Sah S, Satyal U, et al. Neutralization of chemokine CXCL14 (BRAK) expression reduces CCl4 induced liver injury and steatosis in mice. *Eur J Pharmacol*. 2011 Dec 5;671(1–3):120–7.
73. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar 1;127(3):701-721.e70.
74. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771–7.
75. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Apr 1;123(4):735–46.
76. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209–20.
77. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989 Sep 1;170(3):827–45.
78. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, et al. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1994 Jul 1;153(1):128–36.
79. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547–9.

80. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 2010 Jan 19;3(105):cm1.
81. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50.
82. Carrière V, Arshad MI, Le Seyec J, Lefevre B, Farooq M, Jan A, et al. Endogenous IL-33 Deficiency Exacerbates Liver Injury and Increases Hepatic Influx of Neutrophils in Acute Murine Viral Hepatitis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1359064.
83. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Aug 15;179(4):2551–5.
84. Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*. 2000 Apr 7;275(14):10308–14.
85. Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, et al. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine*. 2002 Apr 21;18(2):61–71.
86. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1014–22.
87. Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, et al. Suppression of Innate Inflammation and Immunity by Interleukin Family Member Interleukin-37. *Eur J Immunol*. 2016 May;46(5):1067–81.
88. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2256–61.
89. Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Dec;17(4):224–52.
90. Nakahira M, Ahn H-J, Park W-R, Gao P, Tomura M, Park C-S, et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Feb 1;168(3):1146–53.
91. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol [Internet]*. 2013 Oct 8;4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792554/>
92. Wei XQ, Leung BP, Niedbala W, Piedrafita D, Feng GJ, Sweet M, et al. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus*

- infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Sep 1;163(5):2821–8.
93. Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MCI. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2013 Dec;70(24):4795–808.
 94. Pirhonen J. Regulation of IL-18 expression in virus infection. *Scand J Immunol*. 2001 Jun;53(6):533–9.
 95. Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin-18 Protects Mice against Acute Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 1999 Mar;73(3):2401–9.
 96. Pien GC, Satoskar AR, Takeda K, Akira S, Biron CA. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Nov 1;165(9):4787–91.
 97. Xing Z, Zganiacz A, Wang J, Divangahi M, Nawaz F. IL-12-independent Th1-type immune responses to respiratory viral infection: requirement of IL-18 for IFN-gamma release in the lung but not for the differentiation of viral-reactive Th1-type lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Mar 1;164(5):2575–84.
 98. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):1190–5.
 99. Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine*. 2001 Jun 21;14(6):334–42.
 100. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Mar;12(1):53–72.
 101. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13723–8.
 102. McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16711–6.
 103. Mühl H, Kämpfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 27;267(3):960–3.
 104. Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, Kabbani M, Cobat A, Bastard P, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med*. 2019 Aug 5;216(8):1777–90.

105. Animaux utilisés à des fins scientifiques [Internet]. La Fondation Droit Animal, Ethique et Sciences. [cited 2020 Apr 3]. Available from: <http://www.fondation-droit-animal.org/informations-juridiques/animaux-utilises-a-des-fins-scientifiques/>
106. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*. 2009 Jun 9;58(12):845.
107. Simon MM, Greenaway S, White JK, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wells S, et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol*. 2013 Jul 31;14(7):R82.
108. Arshad MI, Rauch M, L'helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol*. 2011 Aug;41(8):2341–8.
109. Zhu C-L, Yan W-M, Zhu F, Zhu Y-F, Xi D, Tian D-Y, et al. Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2005 Nov 28;11(44):6936–40.
110. Lehoux M, Jacques A, Lusignan S, Lamontagne L. Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jul;137(1):41–51.
111. Jacques A, Bleau C, Martin J-P, Lamontagne L. Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 2008 May;152(2):298–310.
112. Jolicoeur P, Lamontagne L. Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+ mu+ B lymphocyte subpopulations. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1989 Dec 1;143(11):3722–30.
113. Lamontagne L, Descoteaux JP, Jolicoeur P. Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J Immunol*. 1989 Jun 15;142(12):4458–65.
114. Choi S, Jr BS, Corcoran P, Uprichard S, Jeong H. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*. 2009 Mar 1;39(3):205–17.
115. Moscato S, Ronca F, Campani D, Danti S. Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study. *J Funct Biomater*. 2015 Jan 13;6(1):16–32.
116. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2006 Jan;34(1):75–83.

117. Skardal A, Smith L, Bharadwaj S, Atala A, Soker S, Zhang Y. Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. *Biomaterials*. 2012 Jun 1;33(18):4565–75.
118. Ranucci CS, Kumar A, Batra SP, Moghe PV. Control of hepatocyte function on collagen foams: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis. *Biomaterials*. 2000 Apr 1;21(8):783–93.
119. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DVR, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Sep 2 [cited 2020 Apr 4];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759294/>
120. Rosales C, Lowell CA, Schnoor M, Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017. *J Immunol Res* [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 4];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5697120/>
121. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Dec 29 [cited 2020 Apr 4];19(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796042/>
122. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016 Jun;21(3):239–45.
123. Mikulak J, Bruni E, Oriolo F, Di Vito C, Mavilio D. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Front Immunol*. 2019;10:946.
124. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity | *The Journal of Immunology* [Internet]. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://www.jimmunol-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/175/3/1373.short>
125. Grabowska J, Lopez-Venegas MA, Affandi AJ, den Haan JMM. CD169+ Macrophages Capture and Dendritic Cells Instruct: The Interplay of the Gatekeeper and the General of the Immune System. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Oct 26 [cited 2020 Apr 4];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6212557/>
126. Weigle WO, Goodman MG, Morgan EL, Hugli TE. Regulation of immune response by components of the complement cascade and their activated fragments. *Springer Semin Immunopathol*. 1983 Sep 1;6(2):173–94.
127. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007 May 1;117(5):1175–83.
128. Afify M, Hamza AH, Alomari RA. Correlation Between Serum Cytokines, Interferons, and Liver Functions in Hepatitis C Virus Patients. *J Interferon Cytokine Res*. 2016 Oct 11;37(1):32–8.

129. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb 1;125(2, Supplement 2):S33–40.
130. Carroll MC. Complement and humoral immunity. *Vaccine*. 2008 Dec 30;26:I28–33.
131. Coutinho A, Möller G. Immune Activation of B Cells: Evidence for ‘One Nonspecific Triggering Signal’ Not Delivered by the Ig Receptors. *Scand J Immunol*. 1974;3(2):133–46.
132. Cyster JG. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science*. 1999 Dec 10;286(5447):2098–102.
133. Curtis JL. Cell-mediated Adaptive Immune Defense of the Lungs. *Proc Am Thorac Soc*. 2005 Dec 1;2(5):412–6.
134. Surh CD, Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin Immunol*. 2005 Jun 1;17(3):183–91.
135. Welsh RM, Selin LK, Szomolanyi-Tsuda E. Immunological Memory to Viral Infections. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):711–43.
136. Blais M-È, Louis I, Corneau S, Gérard G, Terra R, Perreault C. Extrathymic T-lymphocyte development. *Exp Hematol*. 2003 May 1;31(5):349–54.
137. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol*. 2006 May 1;27(5):235–43.
138. Mazzarella G, Bianco A, Catena E, Palma RD, Abbate GF. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy*. 2000;55(s61):6–9.
139. Maenaka K, Jones EY. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr Opin Struct Biol*. 1999 Dec 1;9(6):745–53.
140. Pabst R. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs: What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett*. 2007 Sep 15;112(1):1–8.
141. WHO-HIV-2016.06-fre.pdf [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250577/WHO-HIV-2016.06-fre.pdf;jsessionid=6EA106C8781AFBFCFA3B72B3308D112F?sequence=1>
142. Parker DC. T Cell-Dependent B Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 1993;11(1):331–60.
143. Cabral F, Miller CM, Kudrna KM, Hass BE, Daubendiek JG, Kellar BM, et al. Purification of Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells from Mouse Liver Perfusion. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 2018 Feb 12 [cited 2020 Apr 16];(132). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5894826/>
144. Baer A, Kehn-Hall K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 2014 Nov 4

[cited 2020 Apr 16];(93). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255882/>

145. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1264-1273.e1.
146. Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, Kabbani M, Cobat A, Bastard P, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med*. 2019 Aug 5;216(8):1777–90.
147. Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L. A synergistic interferon-gamma production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e551-561.
148. Arshad MI, Patrat-Delon S, Piquet-Pellorce C, L'helgoualc'h A, Rauch M, Genet V, et al. Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis. *PloS One*. 2013;8(9):e74278.
149. Bleau C, Filliol A, Samson M, Lamontagne L. Mouse Hepatitis Virus Infection Induces a Toll-Like Receptor 2-Dependent Activation of Inflammatory Functions in Liver Sinusoidal Endothelial Cells during Acute Hepatitis. *J Virol*. 2016 15;90(20):9096–113.
150. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*. 2014 Sep;61(3):660–71.
151. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014 Sep;147(3):577-594.e1.
152. Huising MO, van der Meulen T, Flik G, Verburg-van Kemenade BML. Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites. *Eur J Biochem*. 2004 Oct;271(20):4094–106.
153. Meuter S, Moser B. Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues. *Cytokine*. 2008 Nov;44(2):248–55.
154. Hara T, Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J Biochem (Tokyo)*. 2012 May;151(5):469–76.
155. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016 May 12;5(2):85–6.
156. Farooq M, Filliol A, Simoes Eugénio M, Piquet-Pellorce C, Dion S, Raguènes-Nicol C, et al. Depletion of RIPK1 in hepatocytes exacerbates liver damage in fulminant viral hepatitis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2020 Jul 9];10(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325114/>

157. Waldemer-Streyer RJ, Reyes-Ordoñez A, Kim D, Zhang R, Singh N, Chen J. Cxcl14 depletion accelerates skeletal myogenesis by promoting cell cycle withdrawal. *NPJ Regen Med.* 2017 Jan 5;2:16017.
158. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6b):1726–39.
159. Parent R, Durantel D, Lahlali T, Sallé A, Plissonnier M-L, DaCosta D, 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 Jul 18;450(1):7–12.
160. Rostan O, Gangneux J-P, Piquet-Pellorce C, Manuel C, McKenzie ANJ, Guiguen C, et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *mBio.* 2013 Sep 17;4(5):e00383-00313.
161. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2012 Sep;32(8):1200–10.
162. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017 Jan;14(1):43–64.
163. Bleau C, Burnette M, Filliol A, Piquet-Pellorce C, Samson M, Lamontagne L. Toll-like receptor-2 exacerbates murine acute viral hepatitis. *Immunology.* 2016;149(2):204–24.
164. Liu M, Chan CWY, McGilvray I, Ning Q, Levy GA. Fulminant viral hepatitis: molecular and cellular basis, and clinical implications. *Expert Rev Mol Med.* 2001 Mar;3(10):1–19.
165. Jayakumar S, Chowdhury R, Ye C, Karvellas CJ. Fulminant Viral Hepatitis. *Crit Care Clin.* 2013 Jul 1;29(3):677–97.
166. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:23–61.
167. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol.* 2017 Sep 5;
168. Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol Rev.* 2000 Apr;174:192–209.
169. Dinarello C. Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis.* 2000 Nov;59(Suppl 1):i17–20.

170. Harms RZ, Creer AJ, Lorenzo-Arteaga KM, Ostlund KR, Sarvetnick NE. Interleukin (IL)-18 Binding Protein Deficiency Disrupts Natural Killer Cell Maturation and Diminishes Circulating IL-18. *Front Immunol.* 2017;8:1020.
171. Leray D, Dupuy C, Dupuy JM. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV3-induced immunodepression. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982 May;23(2):539–47.
172. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug 1;13(4):458–64.
173. Ellisdon AM, Nold-Petry CA, D’Andrea L, Cho SX, Lao JC, Rudloff I, et al. Homodimerization attenuates the anti-inflammatory activity of interleukin-37. *Sci Immunol.* 2017 Feb 10;2(8):eaaj1548.
174. Wang L, Quan Y, Yue Y, Heng X, Che F. Interleukin-37: A crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):4711–9.
175. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, et al. IL-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct;27(10):1609–16.
176. Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, et al. IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol.* 2015 Apr;16(4):354–65.
177. Heydtmann M. Macrophages in Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections. *J Virol.* 2009 Apr;83(7):2796–802.
178. Born TL, Morrison LA, Esteban DJ, VandenBos T, Thebeau LG, Chen N, et al. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000 Mar 15;164(6):3246–54.
179. Godfraind C, Coutelier JP. Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression. *Histol Histopathol.* 1998;13(1):181–99.
180. Hingley ST, Leparc-Goffart I, Weiss SR. The Spike Protein of Murine Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Is Not Cleaved in Primary Glial Cells and Primary Hepatocytes. *J Virol.* 1998 Feb 1;72(2):1606–9.
181. Kuipers EN, van Dam AD, Ballak DB, de Wit EA, Dinarello CA, Stienstra R, et al. IL-37 Expression Reduces Lean Body Mass in Mice by Reducing Food Intake. *Int J Mol Sci [Internet].* 2018 Aug 2 [cited 2020 Jun 30];19(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121375/>
182. Khan HA, Ahmad MZ, Khan JA, Arshad MI. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2017 Jun 15;16(3):245–56.

183. Tognarelli EI, Palomino TF, Corrales N, Bueno SM, Kalergis AM, González PA. Herpes Simplex Virus Evasion of Early Host Antiviral Responses. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2020 Jun 30];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503643/>

ANNEXES

Annexes

1. Article n°1

Serum CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 chemokine patterns in patients with acute liver injury.

Arnaud Chalin^{a,1}, Benjamin Lefevre^{a,b,1}, Christelle Devisme^a, Charlotte Pronier^{a,b}, Virginie Carrière^a, Vincent Thibault^{a,b}, Laurence Amiot^{a,b}, Michel Samson^a

^a *Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes F-35000, France*

^b *Univ Rennes, CHU Rennes, Rennes F-35000, France*

Article publié dans *Cytokine* (May 2018, 500-504)

Les chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL12 et CXCL14 sont impliqués dans le recrutement, la migration et l'activation des cellules immunitaires dans les pathologies hépatiques. De plus, dans des modèles animaux d'hépatite aiguë, il a été démontré que ces chimiokines étaient surexprimées. Cependant, leur expression chez les patients présentant une hépatite aiguë n'est pas connue. Dans cette étude, nous avons pour objectif d'évaluer la concentration sérique de ces 4 chimiokines au cours des hépatites aiguës humaines afin de proposer de nouveaux biomarqueurs. Pour cela, la concentration sérique de chaque chimiokine a été mesurée dans les sérums de donneurs sains (n=36) et de patients (n=163) ayant une hépatite aiguë d'étiologies diverses. Les niveaux sériques de CXCL10, CXCL11 et CXCL12 sont augmentés dans tous les groupes de patients, sauf pour les patients présentant une hépatite d'origine biliaire pour CXCL11. Concernant CXCL14, celle-ci est associée uniquement aux patients présentant une hépatite d'origine virale ou de cause vasculaire. L'ensemble des données mettent en évidence que les chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL12 et CXCL14 sont relarguées au niveau sérique au cours des hépatites virales aiguës, comme démontré dans les modèles animaux. Différents profils d'expression ont été révélés selon l'étiologie de l'hépatite, suggérant ainsi une potentielle utilisation de ces chimiokines en tant que biomarqueurs.

Principaux résultats :

- Les concentrations sériques de CXCL10, CXCL11 et CXCL12 sont augmentées chez tous les patients présentant une hépatite aiguë, quel que soit l'étiologie de l'hépatite.
- L'expression de CXCL14 est associée aux hépatites aiguës d'origine virales ou vasculaires.
- L'expression des chimiokines CXCL10 et CXCL11, deux chimiokines induites par l'IFN γ , est fortement corrélée chez les patients, en particulier lors d'hépatites virales.



Serum CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 chemokine patterns in patients with acute liver injury

Arnaud Chalin^{a,1}, Benjamin Lefevre^{a,b,1}, Christelle Devisme^a, Charlotte Pronier^{a,b},
Virginie Carrière^a, Vincent Thibault^{a,b}, Laurence Amiot^{a,b}, Michel Samson^{a,*}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, Rennes F-35000, France

^b Univ Rennes, CHU Rennes, Rennes F-35000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute liver injury
CXCL10
CXCL11
CXCL12
CXCL14

ABSTRACT

Background & aims: The chemokines CXCL10 (interferon γ -inducible protein 10 [IP-10]), CXCL11 (Human interferon inducible T cell alpha chemokine [I-TAC]), CXCL12 (stromal cell derived factor 1 [SDF-1]), and CXCL14 (breast and kidney-expressed chemokine [BRAK]) are involved in cell recruitment, migration, activation, and homing in liver diseases and have been shown to be upregulated during acute liver injury in animal models. However, their expression in patients with acute liver injury is unknown. Here, we aimed to provide evidence of the presence of circulating CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 during human acute liver injury to propose new inflammation biomarkers for acute liver injury.

Methods: We analyzed the serum concentration of the studied chemokines in healthy donors (n = 36) and patients (n = 163) with acute liver injuries of various etiologies.

Results: Serum CXCL10, CXCL11 and CXCL12 levels were elevated in all the studied groups except biliary diseases for CXCL11. CXCL14 was associated with only acute viral infection and vascular etiologies. The strongest correlation was found between the IFN-inducible studied chemokines (CXCL10 and CXCL11) in all patients and more specifically in the acute viral infection group.

Conclusion: These data provide evidence for the presence of circulating CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 during acute liver injury and are consistent with data obtained in animal models. CXCL10, CXCL11 and CXCL12 were the most highly represented and CXCL14 the least represented chemokines. Differential expression patterns were obtained depending on acute liver injury etiology, suggesting the potential use of these chemokines as acute liver injury biomarkers.

1. Introduction

Acute liver injury (ALI) may have different origins, including viral infection, alcohol consumption, and drug intake. Patients may spontaneously recover, depending on the severity of the insult and the etiology. However, in some cases, the injury can lead to acute liver failure (ALF). ALF leads to multiorgan system failure and the loss of hepatic function. The incidence of ALF is fewer than 10 cases per million people per year in the developed world, but in the absence of liver transplantation, mortality is up to 50% [1], making ALF a significant public health problem.

Inflammation that results from tissue injury contributes to the pathogenesis of most acute liver diseases and is triggered by host-derived microbial and danger signals [2]. Inflammation is characterized by increased blood flow and vascular permeability, with the accumulation of fluid and leukocytes in the injured tissue, and may be detrimental for patients if not managed. Cytokines and chemokines mediate inflammation by attracting and activating immune cells and orchestrating their interaction [3]. Chemokines play an important role in inflammation. Numbering more than 50, they are categorized into four families: CC, CXC, CX3C, and C [3]. Among them, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), and CXCL12 (SDF-1) are well described in the field of liver

Abbreviations: ALF, acute liver failure; ALI, acute liver injury; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BRAK (CXCL14), breast and kidney cancer; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; IP-10 (CXCL10), interferon γ -inducible protein 10; I-TAC (CXCL11), human interferon inducible T cell alpha chemokine; SDF-1 (CXCL12), stromal cell derived factor 1

* Corresponding author at: Inserm-U.1085, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), Université de Rennes, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, RENNES Cedex 35000, France.

E-mail address: michel.samson@inserm.fr (M. Samson).

¹ Co-first author.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.029>

Received 2 February 2018; Received in revised form 21 May 2018; Accepted 29 May 2018

Available online 04 June 2018

1043-4666/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

pathogenesis. Indeed, CXCL10 and CXCL11 are both interferon- γ inducible chemokines involved in chronic liver injury and are linked to liver fibrosis and inflammation through their common receptor, CXCR3, suggesting a strong role during evolution of the disease [4–12]. CXCL12 is a strong lymphocyte chemoattractant that interacts with CXCR4, a pathway involved in many chronic liver diseases [13]. Apart from its chemotactic effect, activation through the CXCL12/CXCR4 axis leads to fibrogenesis through the activation and proliferation of hepatic stellate cells, as well as regeneration by recruiting mesenchymal stem cells from bone marrow to the injured liver [14–20]. Furthermore, both CXCL12 and CXCR4 are upregulated in cirrhotic patients infected with hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B virus (HBV), demonstrating the fundamental role of this axis in chronic injury [20]. CXCL11 and CXCL12 share a more recently discovered common receptor, CXCR7, which is involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development [21]. CXCL14 (BRAK) was initially identified from breast and kidney and is constitutively expressed in normal tissue [22]. No direct receptor has been identified for CXCL14 and it has been reported to interact with CXCR4, but with no modulatory effect [23], without interfering with the CXCL12-CXCR4 signaling axis [24]. Conversely, a recent study showed that the high-affinity interaction of CXCL14 with CXCR4 acts synergistically with CXCL12 in chemotaxis [25]. Very little concerning CXCL14 in liver pathogenesis has been reported, although it has been shown to have antitumor activity in hepatocellular carcinoma (HCC) [26].

Little is known concerning the role of CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 in human ALI, although their expression has been reported in many *in vivo* animal models of ALI and they have been shown to play important roles in human chronic liver diseases [27–33]. Here we aimed to provide evidence for the presence of these circulating chemokines during human ALI and to identify distinct chemokine expression patterns in ALI patients with various etiologies to propose new biomarkers.

2. Materials and methods

2.1. ALI patients and healthy donors

The study protocol was approved by the ethics committee of the Pontchaillou University Hospital and written informed consent was obtained from participants. Inclusion criteria were any ALI with ALT activity > 129 UI/L (equivalent to three times the upper normal limit, considered in this study to be 43 UI/L). Patients with acute-on-chronic liver injury were excluded or if another source of ALT activity was suspected (rhabdomyolysis, myocardial infarction, etc.). None of the patients had HCC. A control group consisting of 36 healthy volunteers from the French Blood Institute, who were negative for HBV, HCV, and Immunodeficiency Virus (HIV), and had normal ALT activity (< 43 UI/L), were also studied. The principal patient characteristics and those of the healthy controls (age, sex, and transaminase activity) are given in Table 1. ALI patients were divided into eight groups, depending on the cause of ALI (Table 2). In this cohort, ALI was caused by direct [acute viral infection, autoimmune disease, toxic injury (including drugs, mushrooms, or alcohol intoxication), and ischemia-reperfusion injury groups] or indirect mechanisms. Indirect injuries are collateral effects caused by vascular problems leading to blood stasis and/or liver

Table 1
ALI patients/healthy donors main characteristics and ALT/AST activity.

	Healthy donors	ALI patients
Case (n)	36	163
Sex (male/female) (n)	21/15	113/50
Age (year)	48 (33–65)	53 (13–99)
ALT (IU/L)	22.2 (12–42)	1205.2 (134.0–8587.0)
AST (IU/L)	25.3 (16.0–40.0)	1215.4 (32.0–11369.0)

Table 2

Description of the etiologies. ALI patients were divided into 8 groups of different injuries: auto-immune (n = 6), vascular (n = 7), obstetrical (n = 7), Biliary (n = 19), acute viral infection (n = 22), Congestive hepatopathy (n = 23), Toxic (n = 27) and ischemia reperfusion post liver graft (n = 52).

<i>Auto-immune (n = 6)</i>
Auto-immune hepatitis (n = 5)
Auto-immune cholangitis (n = 1)
<i>Vascular (n = 7)</i>
Liver ischemia (n = 4)
Portal veins thrombosis (n = 2)
Liver veno-occlusive disease (n = 1)
<i>Obstetrical (n = 7)</i>
Preeclampsia (n = 6)
Cholestasis of pregnancy (n = 1)
<i>Biliary (n = 19)</i>
Malignant biliary obstruction (n = 6)
Angiocholitis (n = 4)
Acute biliary pancreatitis (n = 4)
Biliary lithiasis migration (n = 3)
Cholecystitis (n = 2)
<i>Acute viral infection (n = 22)</i>
Hepatitis A (n = 8)
Hepatitis E (n = 7)
Hepatitis B (n = 5)
Herpes simplex virus 2 (n = 2)
<i>Congestive hepatopathy (n = 23)</i>
Heart failure (n = 11)
Cardiogenic shock (n = 4)
Pericardial tamponade (n = 4)
Dilated cardiomyopathy (n = 3)
Valvular cardiomyopathy (n = 1)
<i>Toxic (n = 27)</i>
Drug intoxication (other than acetaminophen) (n = 9)
AAH (Acute Alcoholic Hepatitis) (n = 7)
Acetaminophen intoxication (n = 5)
Mushrooms intoxication (n = 3)
AAH + acetaminophen intoxication (n = 2)
Drugs intoxication + AAH (n = 1)
Ischemia reperfusion post liver graft (n = 52)

ischemia (congestive hepatopathy and vascular and obstetrical groups), as well as bile fluid accumulation, due to obstruction of the bile duct (biliary group). Blood stasis, liver ischemia, and bile fluid accumulation generate tissue damage leading to ALI.

2.2. Chemokine detection

Serum was obtained at the time of entry into the study in separator tubes, centrifuged at 2000g at 4 °C for 10 min, aliquoted, and stored at –80 °C until further analysis. Serum concentrations of chemokines were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Wiesbaden, Germany for CXCL10 and CXCL14 and Peprotech, Rocky Hill, USA for CXCL11 and CXCL12), according to the manufacturers' instructions. The lower detection limits were 31.2 pg/ml for CXCL10, 32 pg/ml for CXCL11, 63 pg/ml for CXCL12 and 62.5 for CXCL14.

3. Statistical analysis

Data are shown graphically as box-and-whisker plots. The box-and-whisker plots display a statistical summary of the median, quartiles, inter-quartile range and extreme values. The degree of association between two variables was assessed by Spearman's parametric test rank correlation. Comparisons of parameters between two groups were analyzed by the Mann-Whitney u-test with $\alpha = 0.05$. All statistical analyses were performed using GRAPHPAD PRISM (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA).

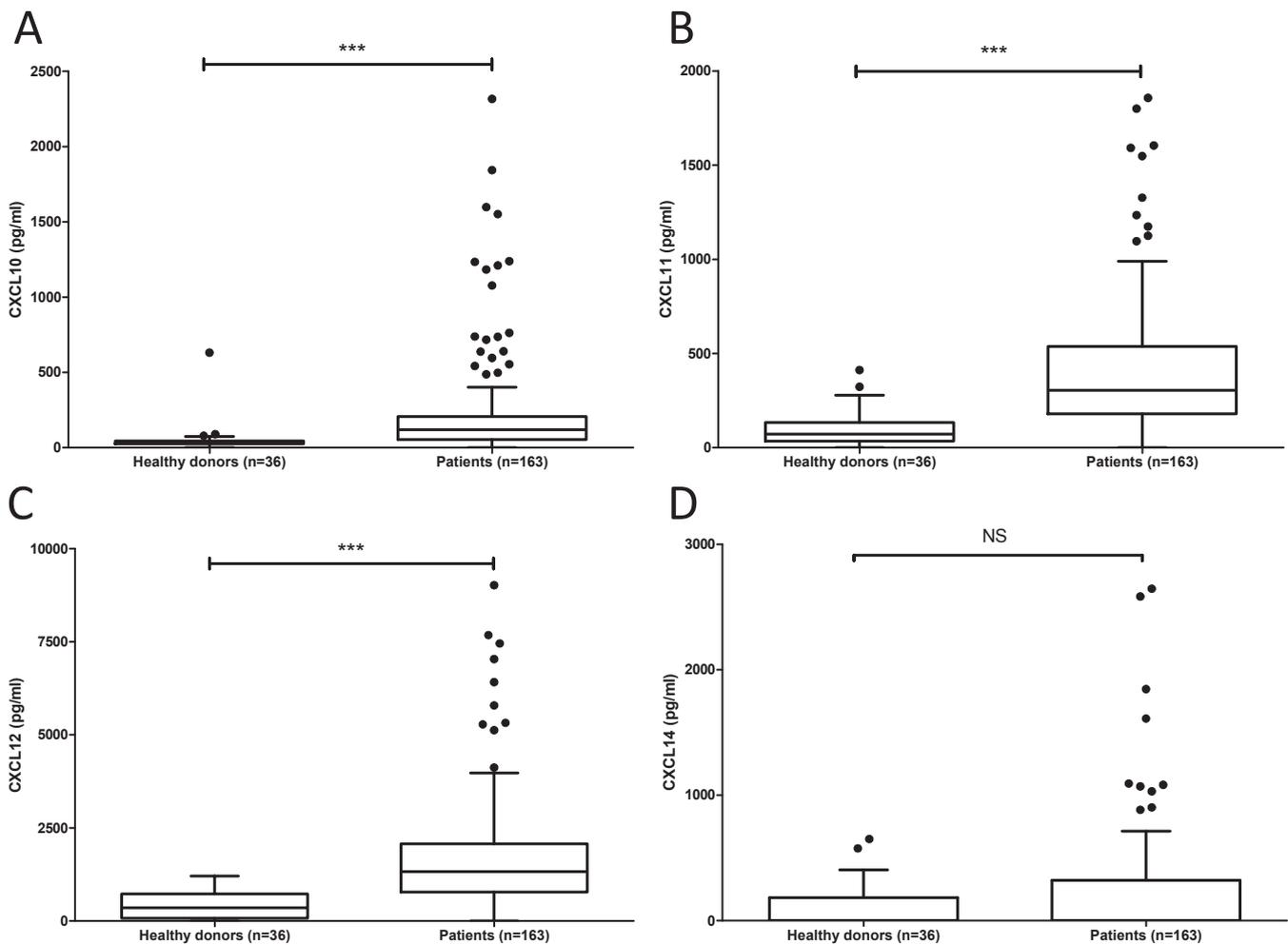


Fig. 1. Box-and-whisker plots illustrating serum chemokine levels in patients (n = 163) and healthy donors (n = 36). The box extends from the 25th to 75th percentile. The line in the middle denote the median value, and the lines extending from either end of each box denote the extent of the data beyond the 25th and 75th percentiles and outliers, if any. (A–C) ELISA for CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL14 respectively. Concentrations are given in pg/ml. (***) $p < 0.001$; statistical significance was determined by Mann-Whitney u-test).

4. Results

4.1. Serum concentrations of CXCL10, CXCL11, and CXCL12, but not CXCL14, are higher in ALI patients than healthy donors.

We first compared the serum concentrations of the four chemokines in ALI patients to those of the healthy donors. The mean age and gender ratio between healthy donors and ALI patients were not statistically different (Table 1). Serum CXCL14 level was not significantly higher in ALI patients than healthy controls (Fig. 1). On the contrary, the serum concentrations of CXCL10, CXCL11, and CXCL12 were significantly higher in the ALI cohort than healthy donors ($p < 0.0001$ for CXCL10, CXCL11 and CXCL12) (Fig. 1).

4.2. CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 serum concentrations show distinct profiles among the various groups of ALI patients

We next compared the serum concentration of the four chemokines of the various ALI patient groups with those of the healthy donor subjects (Table 3). The level of CXCL10 was highly significantly elevated ($p < 0.001$) in all groups of ALI patients compared to healthy donors except for auto-immune group which showed lower significance ($p = 0.0168$). The level of CXCL11 was highly significantly elevated for ischemia-reperfusion post liver graft, toxic, congestive hepatopathy, acute viral infection and obstetrical groups. Other etiologies showed

either moderate ($p = 0.0013$ for the auto-immune group), slight ($p = 0.0101$ for the vascular group), or non-significant (biliary group) elevation of CXCL11 levels. Regarding CXCL12, the level was highly significantly elevated for all groups except for auto-immune, obstetrical and biliary groups which showed a moderate significance ($p = 0.0018$, $p = 0.0018$ and $p = 0.0060$ respectively). The level of CXCL14 was highly significantly elevated for the acute viral infection and vascular groups only. Other groups didn't show any significantly levels compared to healthy donors. Data from auto-immune, vascular and obstetrical groups should be taken cautiously due to the low number of patients in each group. Furthermore, we found no correlation between the extent of necrosis (measured by ALT and AST activity) and circulating chemokine levels.

4.3. CXCL10, CXCL11 and CXCL12 chemokines correlate each other's in the different groups of patients

We first evaluated all correlations among the upregulated chemokines in all patients (Table 4). The best correlation was found for CXCL10 and CXCL11, which was moderate ($r = 0.4852$), but highly significant ($p < 0.0001$). However, CXCL10 and CXCL12 ($r = 0.2213$; $p = 0.0045$), but also CXCL11 and CXCL12 ($r = 0.3369$; $p < 0.0001$) were also correlated. Then we looked for any correlation of these 3 chemokines among each group of ALI patients (Table 4). The results showed that the highest and most significant correlation was found for

Table 3

Serum chemokine levels among the different groups of patients and healthy donors. Median and range (in parenthesis) for CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL14 are given. Statistical analysis of each group and for each chemokine compared to healthy donors (p-value of u-test are given).

	n	Concentrations (pg/ml)							
		CXCL10	P-value	CXCL11	P-value	CXCL12	P-value	CXCL14	P-value
Healthy donors	36	32.6 (0.0–630.9)	–	71.6 (0.0–411.6)	–	351.5 (0.0–1207.0)	–	0.0 (0.0–651.0)	–
Auto-immune	6	200.0 (20.9–1598.0)	0.0168	559.3 (75.2–1327.0)	0.0013	1523.0 (550.6–3426.0)	0.0018	0.0 (0.0–186.3)	NS
Vascular	7	220.2 (50.8–2316)	0.0006	403.1 (0.0–627.3)	0.0101	1352.0 (606.2–6416.0)	< 0.0001	650.5 (0.0–902.5)	0.0009
Obstetrical	7	194.4 (98.8–297.6)	< 0.0001	617.9 (365.0–1096.0)	< 0.0001	1000.0 (603.8–4122.0)	0.0018	0.0 (0.0–259.9)	NS
Biliary	19	76.5 (21.7–342.1)	0.0002	147.5 (0.0–696.5)	NS	760.4 (0.0–2022.0)	0.0060	0.0 (0.0–460.3)	NS
Acute viral infection	22	162.9 (42.0–1211.0)	< 0.0001	675.4 (0.0–1856.0)	< 0.0001	1257.0 (164.0–3234.0)	< 0.0001	386.8 (0.0–1030.0)	0.0005
Congestive hepatopathy	23	66.1 (35.5–638.1)	< 0.0001	210.8 (32.5–829.4)	0.0001	1524.0 (463.9–7034.0)	< 0.0001	0.0 (0.0–2584.0)	NS
Toxic	27	103.6 (0.0–1552.0)	0.0002	226.9 (0.0–1549.0)	0.0004	1832.0 (384.0–7679.0)	< 0.0001	0.0 (0.0–2647.0)	NS
Ischemia reperfusion post liver graft	52	121.3 (0.0–1844.0)	< 0.0001	324.3 (0.0–1604.0)	< 0.0001	1260.0 (0.0–9018.0)	< 0.0001	0.0 (0.0–183.2)	NS

Table 4

Correlation of CXCL10, CXCL11 and CXCL12 chemokines among the different groups of patients. Spearman’s rank correlation test. Only significant results are shown. (r, correlation coefficient, p, p-value).

Etiology	CXCL10 vs CXCL11		CXCL10 vs CXCL12		CXCL11 vs CXCL12	
	r	p	r	p	r	p
Ischemia reperfusion post liver graft	0.4223	**		NS	0.4424	**
Toxic		NS		NS		NS
Congestive hepatopathy		NS	0.2144	*		NS
Acute viral infection	0.6905	***			0.5991	**
Biliary		NS		NS	0.5542	*
All patients	0.4852	***	0.2213	**	0.3369	***

CXCL10 and CXCL11 in acute viral infection group (r = 0.6905; p < 0.0006). Other groups showed lower degree of correlation or even no significant correlation (Table 4).

5. Discussion

Our results show that CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 levels are elevated in the blood of ALI patients, consistent with results obtained in animal models.

Indeed, *in vivo* studies have shown that CXCR3 ligands are upregulated in mouse models of ALI using Concanavalin A [27,28]. Furthermore, the serum CXCL10 concentration rises after a single administration of CCl4, reaching a peak at day 1, and neutralization of CXCL10 using a monoclonal anti-CXCL10 antibody promotes hepatocyte proliferation from an early phase [29]. In our cohort, circulating CXCL11 was elevated for all etiologies except for biliary group. CXCL10 was highly or moderately elevated in all groups, and to a less extent in the auto-immune group. The serum levels of CXCL10 and CXCL11, which are interferon-γ inducible chemokines correlated with each other in the ALI cohort and with the highest degree in the acute viral infection group compared to the other upregulated chemokines. The level of CXCL10 was recently shown to be elevated in the blood of ALI patients infected by hepatitis A virus, consistent with our results [34].

The CXCL12/CXCR4 axis was shown to be indispensable for liver regeneration in a partial hepatectomy mouse model [30]. Injection of

AMD3100, a specific inhibitor of CXCR4, worsened ALI after CCl4 injection, providing additional clues to the hepatoprotective role of this axis through the recruitment of MSC from bone marrow to the injured liver [31]. In contrast, injection of AMD3100 resulted in increased hepatocyte proliferation and reduced necrosis after reperfusion in an ischemia-reperfusion injury mouse model, suggesting a specific mechanism following oxygen deprivation [32]. Serum CXCL12 levels were higher for every etiology in our cohort, consolidating the idea that CXCL12 is a major liver homeostatic chemokine. In addition, ALI patients of the obstetrical group, of whom six of seven suffered from preeclampsia, had elevated levels of circulating CXCL12, consistent with recent findings [35].

Circulating CXCL14 levels have been shown to be higher in a CCl4 ALI mouse model. Neutralization of CXCL14 using monoclonal antibodies reduced the severity of liver injury and steatosis with reduced mouse mortality [33]. Surprisingly, CXCL14 was the least represented chemokine in our ALI cohort. However, we detected elevated levels in the acute viral infection and vascular groups, suggesting a specific mechanism for its release following these injuries.

ALI patients belonging to the congestive hepatopathy and obstetrical groups suffer from indirect ALI, caused by heart failure in one and thrombosis in the other. Other organs may also be affected, and we cannot exclude that this may have been a source of the studied chemokines. Patients of the ischemia-reperfusion injury group were taking anti-rejection medication when samples were collected. It is likely that these drugs reduced the concentration of these circulating chemokines, as they are used to reduce the immune response and inflammation to avoid graft rejection. Besides, results obtained from obstetrical, vascular and auto-immune groups should be interpreted cautiously due to the low number of patients in each group.

In addition, blood was collected at different moments of the ALI for each patient. Indeed, some samples may have been collected at the most acute stage of the liver injury, whereas others may have been collected at a more distant time. This element must be considered in the interpretation of the results, because the release dynamics of these chemokines is unknown for the various etiologies studied, and the levels of the studied chemokines did not correlate with transaminase activity.

This study provides new data on circulating inflammation mediators during ALI, given the important roles of CXCL10, CXCL11, and CXCL12 mediated by their receptors (CXCR3 for CXCL10 and CXCL11, CXCR4 for CXCL12, and CXCR7 for CXCL12) in chronic liver injury shown by *in vitro* and animal model studies. It also adds new knowledge on CXCL14, as its role following interaction with CXCR4 is not yet well established. Additional data on lymphocyte or monocyte phenotypes during ALI

could provide new complementary evidence concerning the inflammation processes that occur during these disorders.

In conclusion, these results provide the first evidence that circulating CXCL10, CXCL11, CXCL12, and CXCL14 are found in ALI patients in a large cohort of patients reflecting many types of disorders. We observed distinct expression patterns depending on the etiologies, suggesting the potential use of these chemokines as ALI biomarkers.

6. Statement of financial support

This work was supported by INSERM, The “Ministère de l’Education Nationale de la Recherche et de la Technologie”, the University of Rennes 1 and the “Région Bretagne”. AC was supported by a PhD fellowship from ANRT- CIFRE fellowship with NG Biotech. CD was supported by a PhD fellowship from the “Région Bretagne” and Inserm.

Conflict of interest

The authors have no financial or commercial conflict of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Inserm, The “Ministère de l’Education Nationale de la Recherche et de la Technologie”, the University of Rennes 1, the “Région Bretagne” and ANRT for their financial support.

References

- [1] W. Bernal, J. Wendon, Acute liver failure, *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 13 (2) (2000) 113–118.
- [2] G. Szabo, J. Petrasek, Inflammasome activation and function in liver disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (7) (2015) 387–400.
- [3] I.F. Charo, R.M. Ransohoff, The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation, *N. Engl. J. Med.* 354 (6) (2006) 610–621.
- [4] F. Marra, F. Tacke, Roles for chemokines in liver disease, *Gastroenterology* 47 (3) (2011) 577–594 e1.
- [5] Y. Itoh, et al., Clinical significance of elevated serum interferon- inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels, *J. Viral. Hepat.* 8 (5) (2001) 341–348.
- [6] K. Patel, et al., Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (12) (2014) 2113–20 e1-3.
- [7] K.J. Helbig, et al., Differential expression of the CXCR3 ligands in chronic hepatitis C virus (HCV) infection and their modulation by HCV in vitro, *J. Virol.* 83 (2) (2009) 836–846.
- [8] M. El Raziky, et al., IP-10 serum level in chronic hepatitis C virus patients: relation to fibrosis and response to combined interferon/ribavirin therapy, *J. Interferon Cytokine Res.* 35 (8) (2015) 649–653.
- [9] K.J. Helbig, et al., Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation, *Hepatology* 39 (5) (2004) 1220–1229.
- [10] J.R. Larrubia, et al., Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection, *World J. Gastroenterol.* 14 (47) (2008) 7149–7159.
- [11] A.V. Semenov, et al., The role of cytokines and chemokines in laboratory diagnostic of chronic viral hepatitis C, *Klin. Lab. Diagn.* 60 (8) (2015) 45–51.
- [12] Y.Q. Deng, et al., Selected cytokines serve as potential biomarkers for predicting liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B patients with normal to mildly elevated aminotransferases, *Medicine (Baltimore)* 94 (45) (2015) e2003.
- [13] A. Liepelt, F. Tacke, Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 311 (2) (2016) G203–G209.
- [14] F. Hong, et al., Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation, *Hepatology* 49 (6) (2009) 2055–2067.
- [15] Y. Saiman, et al., CXCL12 induces hepatic stellate cell contraction through a calcium-independent pathway, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305 (5) (2013) G375–G382.
- [16] Y. Liu, et al., Contribution and Mobilization of Mesenchymal Stem Cells in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17762.
- [17] K. Xiao Ling, et al., Stromal derived factor-1/CXCR4 axis involved in bone marrow mesenchymal stem cells recruitment to injured liver, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 8906945.
- [18] U.M. Gehling, et al., Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis, *World J. Gastroenterol.* 16 (2) (2010) 217–224.
- [19] B.S. Ding, et al., Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis, *Nature* 505 (7481) (2014) 97–102.
- [20] O. Wald, et al., Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus, *Eur. J. Immunol.* 34 (4) (2004) 1164–1174.
- [21] J.M. Burns, et al., A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development, *J. Exp. Med.* 203 (9) (2006) 2201–2213.
- [22] R. Hromas, et al., Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (3) (1999) 703–706.
- [23] M. Otte, et al., CXCL14 is no direct modulator of CXCR4, *FEBS Lett.* 588 (24) (2014) 4769–4775.
- [24] T. Hara, K. Tanegashima, CXCL14 antagonizes the CXCL12-CXCR4 signaling axis, *Biomol. Concepts* 5 (2) (2014) 167–173.
- [25] P.J. Collins, et al., Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4, *FASEB J.* (2017).
- [26] W. Wang, et al., Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo, *Cancer Sci.* 104 (11) (2013) 1523–1531.
- [27] L. Basset, et al., Interleukin-27 and IFN γ regulate the expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in hepatitis, *J. Mol. Med. (Berl)* 93 (12) (2015) 1355–1367.
- [28] A. Erhardt, et al., CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis, *J. Immunol.* 186 (9) (2011) 5284–5293.
- [29] H. Yoneyama, et al., Neutralization of CXCL10 accelerates liver regeneration in carbon tetrachloride-induced acute liver injury, *Med. Mol. Morphol.* 40 (4) (2007) 191–197.
- [30] L.D. DeLeve, X. Wang, L. Wang, VEGF-sdf1 recruitment of CXCR7+ bone marrow progenitors of liver sinusoidal endothelial cells promotes rat liver regeneration, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310 (9) (2016) G739–G746.
- [31] Y. Saiman, et al., Inhibition of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis with AMD3100, a CXCR4 small molecule inhibitor, worsens murine hepatic injury, *Hepatology Res.* 45 (7) (2015) 794–803.
- [32] G.C. Wilson, et al., CXC chemokine receptor-4 signaling limits hepatocyte proliferation after hepatic ischemia-reperfusion in mice, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308 (8) (2015) G702–G709.
- [33] J. Li, et al., Neutralization of chemokine CXCL14 (BRAK) expression reduces CCl4 induced liver injury and steatosis in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 671 (1–3) (2011) 120–127.
- [34] P.S. Sung, et al., CXCL10 is produced in hepatitis A virus-infected cells in an IRF3-dependent but IFN-independent manner, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 6387.
- [35] S. Karakus, et al., SDF-1/CXCL12 and CXCR4 gene variants, and elevated serum SDF-1 levels are associated with preeclampsia, *Hypertens Pregnancy* 36 (2) (2017) 124–130.

2. Articles supplémentaires

- 1) Circulating levels of CXCL11 and CXCL12 are biomarkers of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine 117 (2019) 72–78*
- 2) The anti-fibrotic role of mast cells in the liver is mediated by HLA-G and interaction with hepatic stellate cells. *Cytokine 117 (2019) 50–58*
- 3) Hepatocellular carcinoma emergence in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis depends on High-fat diet composition and is delayed in liver exhibiting an active immune response. *Cancers 2020, 12, 1491*



Circulating levels of CXCL11 and CXCL12 are biomarkers of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection

Arnaud Chalin^{a,d}, Benjamin Lefevre^{a,b}, Christelle Devisme^a, Nathalie Barget^c, Laurence Amiot^{a,b}, Michel Samson^{a,*}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

^b Univ Rennes, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France

^c Centre de Ressources Biologiques, Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis, APHP, Bondy, France

^d NG Biotech, 35480 Guipry-Messac, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chronic HCV infection
CXCL10
CXCL11
CXCL12
Fibrosis

ABSTRACT

Background & aims: The chemokines CXCL10 (interferon γ -inducible protein 10 [IP-10]), CXCL11 (Human interferon inducible T cell alpha chemokine [I-TAC]), and CXCL12 (stromal cell derived factor 1 [SDF-1]) contribute to cell recruitment, migration, activation, and homing in liver diseases and their serum levels have been shown to be associated with the degree of liver inflammation or fibrosis in various etiologies. However, the data may be contradictory or insufficient, particularly for CXCL12, in the field of chronic HCV infection. Here, we aimed to provide evidence for these chemokines as biomarkers for chronic HCV infection.

Methods: We analyzed the serum concentration of the three chemokines in healthy donors ($n = 39$) and patients ($n = 87$) with chronic HCV infection. Chemokine serum levels were compared to the stage of liver inflammation and fibrosis obtained from liver biopsies.

Results: Serum CXCL10 and CXCL11 levels were higher at advanced stages of liver inflammation than at earlier stages, but the results were only of medium significance. Both serum CXCL11 and CXCL12 levels were significantly higher in cirrhotic patients than those with low or medium stages of fibrosis. The AUROCs were 0.8167 and 0.8574, respectively, for the diagnosis of cirrhotic patients.

Conclusion: These data provide evidence for the value of CXCL10, CXCL11, and CXCL12 as biomarkers of liver inflammation and fibrosis during chronic HCV infection. Serum CXCL10 and CXCL11 levels were associated with liver inflammation, but the level of significance was insufficient. However, serum CXCL11 and CXCL12 levels were elevated in cirrhotic patients, showing equivalent diagnostic accuracy as the existing established single serum fibrosis markers or algorithms.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is one of the major cause of chronic hepatitis and is responsible for up to 500,000 deaths each year with more than 185 million estimated cases worldwide [1,2]. Chronic hepatitis C infection is a leading cause of cirrhosis, hepatic failure, and/or hepatocellular carcinoma [3]. Although liver fibrosis is a key factor in disease progression, the exact mechanisms leading to liver parenchymal injury and fibrosis deposit in chronic HCV infection are not completely

described [4,5]. Nevertheless, the immune response to is known to be an important contributor of hepatic fibrogenesis progression [6].

Cytokines and chemokines orchestrate inflammation in chronic HCV infection [7]. Among them, CXCL10 (IP-10) and CXCL11 (I-TAC) have been shown to be involved in chemotactic events through their common receptor CXCR3, leading to T-lymphocyte trafficking into the liver [8]. CXCL12 (SDF-1) is a major liver homeostatic chemokine and highly potent lymphocyte chemoattractant [9,10]. Apart from its chemotactic effects, CXCL12 is also involved in liver regeneration by

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; APRI, AST to Platelet Ratio Index; AST, aspartate aminotransferase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; IP-10 (CXCL10), interferon γ -inducible protein 10; I-TAC (CXCL11), human interferon inducible T cell alpha chemokine; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell; SDF-1 (CXCL12), stromal cell derived factor 1; ROC, receiver-operating characteristic

* Corresponding author at: Inserm-U.1085, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), Université de Rennes, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex, France.

E-mail address: michel.samson@inserm.fr (M. Samson).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.006>

Received 6 November 2018; Received in revised form 21 January 2019; Accepted 1 February 2019

Available online 28 February 2019

1043-4666/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.



The anti-fibrotic role of mast cells in the liver is mediated by HLA-G and interaction with hepatic stellate cells

Laurence Amiot^{a,b,*}, Nicolas Vu^a, Bernard Drenou^{c,d}, Maurice Scrofani^d, Arnaud Chalin^a, Christelle Devisme^a, Michel Samson^a

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

^b Univ Rennes, CHU Rennes, F-35000 Rennes, France

^c CH Emile Muller, F-68100 Mulhouse, France

^d Institut de Recherche en Hématologie et Transplantation (IRHT), F-68100 Mulhouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibrosis
Mast cells
Hepatic stellate cells
HLA-G

ABSTRACT

Background & aims: We have reported a significant association between HLA-G expression or the number of hepatic mast cells and liver fibrosis. Here, we investigated the role of HLA-G and mast cells in liver fibrosis, focusing, in particular, on interactions between human mast and stellate cells.

Methods: Human mast cells (HMC cell line, CD34-derived mast cells, or tissue-derived mast cells) were co-cultured with purified human hepatic stellate cells (HSCs), and collagen I production by HSCs was evaluated. Mast cells and HSCs were characterized by immunocytochemistry. Various conditions were tested: different times in direct or indirect contact, presence or absence of cytokines, addition or not of HLA-G, and presence or absence of specific protease inhibitors.

Results: The reciprocal interaction between HSCs and mast cells led to the attraction of mast cells to HSCs *in vivo* and *in vitro*, and to a significant decrease in collagen production, at all times of co-culture, following the direct or indirect contact of mast cells with HSCs alone or in the presence of TGF- β , IFN- α or IL-10. We identified the diffusible factors involved in collagen I degradation as mast cell proteases. Moreover, HLA-G expression increased during the co-culture of HSCs and mast cells, with HLA-G acting on both mast cells and HSCs, to enhance collagen I degradation.

Conclusions: Mast cells play a beneficial, anti-fibrotic role in liver fibrosis, via the HLA-G-mediated decrease of collagen I. These findings are consistent with high levels of cross-communication between mast cells and hepatic stellate cells and the role of HLA-G.

1. Introduction

Mast cells were initially identified as effectors of allergy, but they are also innate immune cells involved in acute and chronic inflammation, and in immune processes, in which they act as antigen-presenting cells and anti-infectious agents [1]. Mast cells, a separate group of cells from basophils, are long-lived and characterized by their large, membrane-bound intracellular granules containing an acidic proteoglycan matrix consisting mostly of heparan sulfate [2]. Like dendritic cells, mast cells are among the first cells of the immune system to interact with antigens, toxins, and pathogens, because they are abundant at the interface between the external and internal environments. The capacity of mast cells to interact promptly with the microenvironment and

respond by releasing numerous biologically active mediators requires a delicate balance, and the inadequate regulation of mast-cell functions can have deleterious effects [1].

A role for mast cells in liver diseases is emerging [3]. The liver mast cells are mostly associated with the connective tissue, which is located close to the hepatic arteries, veins and bile ducts of the portal tracts in the human liver. In the normal liver, mast cells accumulate in small numbers along the portal tract, becoming more abundant in cases of hepatic injury. Indeed, mast cell numbers increase in patients with cholangiopathies, alcoholic liver injury, fatty liver disease, allograft rejection or liver cancer [3].

Over the last five years, we have investigated the role of HLA-G in liver diseases [4]. HLA-G is a member of the HLA class Ib family

Abbreviations: HSC, hepatic stellate cells; HMC, human mast cells; coll, collagen; α -sma, alpha-smooth muscle actin; SCF, stem cell factor

* Corresponding author at: Inserm-U.1085, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), Université de Rennes, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France.

E-mail address: laurence.amiot@univ-rennes1.fr (L. Amiot).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.02.002>

Received 19 June 2018; Received in revised form 15 December 2018; Accepted 2 February 2019

Available online 28 February 2019

1043-4666/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Article

Hepatocellular Carcinoma Emergence in Diabetic Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis Depends on Diet and Is Delayed in Liver Exhibiting an Active Immune Response

Mélanie Simoes Eugénio ¹, Muhammad Farooq ^{1,2}, Sarah Dion ¹, Christelle Devisme ¹, Céline Raguènes-Nicol ¹ , Claire Piquet-Pellorce ¹, Michel Samson ¹, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel ^{1,*},[†] and Jacques Le Seyec ^{1,*},[†] 

¹ University Rennes 1, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail)-UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France; se_melanie@outlook.fr (M.S.E.); muhammad.farooq@uvas.edu.pk (M.F.); sarah.dion@univ-rennes1.fr (S.D.); christelle.devisme@univ-rennes1.fr (C.D.); celine.raguènes-nicol@univ-rennes1.fr (C.R.-N.); claire.piquet-pellorce@univ-rennes1.fr (C.P.-P.); michel.samson@univ-rennes1.fr (M.S.)

² Department of Clinical Sciences, College of Veterinary and Animal Sciences, Jhang 35200, Pakistan

* Correspondence: marie-therese.boitrel@univ-rennes1.fr (M.-T.D.-B.); jacques.leseyec@univ-rennes1.fr (J.L.S.); Tel.: +33-(0)2-23-23-48-99 (M.-T.D.-B.); +33-(0)2-23-23-48-62 (J.L.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 14 April 2020; Accepted: 3 June 2020; Published: 8 June 2020



Abstract: The increase of the sedentary lifestyle and high-calorie diet have modified the etiological landscape of hepatocellular carcinoma (HCC), with a recrudescence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), especially in Western countries. The purpose of our study was to evaluate the impact of high-fat diet feeding on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) establishment and HCC development. Streptozotocin-induced diabetic male mice were fed with high-fat-high-cholesterol diet (HFHCD) or high-fat-high-sugar diet (HFHSD) from 1 to 16 weeks. Even if liver tumors appear regardless of the high-fat diet, two distinct physiopathological patterns were evidenced, with much more severe NASH hallmarks (liver injury, inflammation and fibrosis) in diabetic mice fed with HFHCD. The mild hepatic injury, weak inflammation and fibrosis observed in HFHSD were interestingly associated with earlier emergence of more numerous liver tumors. When activated helper and cytotoxic T cells, detected by flow cytometry, infiltrated the liver of HFHCD-fed diabetic mice, a delay in the appearance of tumor nodules and a limitation of their numbers were observed, suggesting that the immune activities partly controlled tumor emergence. These data highlighted two different mouse models of HCC progression in diabetic mice depending on diet, which could be useful to evaluate new therapeutic approaches for HCC by targeting the immune response.

Keywords: nutrition; NASH; HCC; animal study

1. Introduction

According to the World Health Organization, the liver is the seventh organ most affected by cancer in the world, but is the fourth leading cause of cancer-related deaths (Globocan2018). Between 85% and 90% of primary liver cancers derived from hepatocytes [1]. Many risk factors for the development of this hepatocellular carcinoma (HCC) are relatively well known. The most important ones include chronic viral hepatitis, linked to Hepatitis B or C virus (HBV or HCV) infections, environmental toxins as aflatoxins, abuse of alcohol consumption, metabolic diseases such as obesity or diabetes mellitus,

Titre : Etude de l'expression et du rôle de molécules solubles de l'inflammation, la chimiokine CXCL14 et la protéine IL-18bp, dans le contexte des hépatites virales : nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques.

Mots clés : chimiokine CXCL14, protéine IL-18bp, réponse immunitaire, hépatite virale, modèle animal, cohorte humaine

Résumé : Les hépatites virales constituent la forme la plus fréquente d'hépatite, avec plus de 360 millions de cas dans le Monde. L'infection virale entraîne la mobilisation de la réponse immunitaire *via* la production de cytokines, en particulier de chimiokines et d'interleukines.

Une première partie de nos travaux a porté sur l'étude du rôle de la protéine IL-18bp. Pour cela, un modèle d'hépatite murine virale fulminante par l'inoculation du virus de l'hépatite murine (MHV-3) a été développé chez des souris sauvages et des souris déficientes pour la protéine IL-18bp. Suite à l'infection, nous avons mis en évidence que la protéine IL-18bp n'impactait pas le développement de l'hépatite fulminante chez la souris.

La seconde partie de nos travaux a porté sur l'étude de la chimiokine CXCL14. Nous avons mis en évidence que cette chimiokine était exprimée puis relarguée par les hépatocytes lors de leur lyse induite par l'infection virale.

Notre étude a également démontré que la chimiokine était présente à de fortes concentrations dans le sérum de patients présentant une hépatite aiguë d'origine virale. Le modèle d'hépatite virale induite par le MHV-3 a été développé chez des souris sauvages et des souris déficientes pour CXCL14. L'infection de ces souris par le MHV-3 n'a pas démontré de rôle spécifique de la chimiokine CXCL14. Cependant, des différences de réponse immunitaire chez les souris non infectées ont mis en évidence un rôle de CXCL14 dans la surveillance immunitaire. En effet, les souris déficientes pour CXCL14 démontrent une activité immunitaire médiée par les lymphocytes B plus active que celle observée chez les souris sauvages. La chimiokine CXCL14 serait donc un acteur central de la réponse immunitaire.

Title : Study of expression and function of soluble molecules of inflammation, the CXCL14 chemokine and the IL-18bp protein, during viral hepatitis : new biomarkers and therapeutic targets.

Keywords : CXCL14 chemokine, IL-18bp protein, immune response, viral hepatitis, animal model, human cohort

Abstract : Viral hepatitis is the most common form of hepatitis, with more than 360 million cases worldwide. Viral infection leads to the mobilization of the immune response *via* cytokines production, in particular chemokines and interleukins.

The first part of our work focused on studying the role of the IL-18bp protein. For this, a model of murine hepatitis fulminant by inoculation of the murine hepatitis virus (MHV-3) was developed in wild-type mice and mice deficient in the protein IL-18bp. Following infection, we demonstrated that IL-18bp protein did not affect the development of fulminant hepatitis in mice.

The second part of our work focused on the study of the chemokine CXCL14. We have demonstrated that this chemokine is expressed and then released by the hepatocytes during their lysis induced by viral infection.

Our study also demonstrated that chemokine is present in high concentrations in the serum of patients with acute viral hepatitis. The MHV-3-induced viral hepatitis model was developed in wild-type mice and mice deficient in CXCL14. Infection of these mice with MHV-3 did not demonstrate a specific role for the chemokine CXCL14. However, differences in the immune response in uninfected mice have demonstrated a role for CXCL14 in immune surveillance. In fact, mice deficient in CXCL14 demonstrate a more active immune activity mediated by B lymphocytes than that observed in wild-type mice. The chemokine CXCL14 would therefore be a central actor in the immune response.