



HAL
open science

Inhibition du Virus de l'Hépatite Delta par des inducteurs de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$

Brieux Chardès

► **To cite this version:**

Brieux Chardès. Inhibition du Virus de l'Hépatite Delta par des inducteurs de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$. Virologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1141 . tel-03510163

HAL Id: tel-03510163

<https://theses.hal.science/tel-03510163v1>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340 BMIC
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Virologie & Immunologie
Discipline : Infectiologie

Soutenue publiquement/à huis clos le 20/09/2019, par :

Brieux CHARDÈS

**Inhibition du Virus de l'Hépatite Delta
par des inducteurs de la voie NFκB**

Devant le jury composé de :

Mr. Pr. **Serge LEBECQUE**, PU-PH, CRCL **Président**

Mr. Dr. **Étienne DECROLY**, DR CNRS **Rapporteur**

Mme. Dr. **Caroline GOUJON**, CR INSERM **Rapporteuse**

Mr. Dr. **François-Loïc COSSET**, DR CNRS **Examineur**

Mr. Dr. **Eloi VERRIER**, CR INSERM **Examineur**

Mme. Dr. **Julie LUCIFORA**, CR INSERM **Directrice de Thèse**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

AUTEUR : Brieux CHARDÈS

TITRE : Inhibition du Virus de l'Hépatite Delta par des inducteurs de la voie NFκB

RÉSUMÉ : La surinfection par le Virus de l'Hépatite Delta (HDV) de patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B (HBV) est la forme la plus agressive d'hépatite virale chronique avec une progression plus rapide vers la cirrhose ainsi qu'un risque accru d'insuffisance hépatique et de carcinome hépatocellulaire. Environ 15 à 20 millions de personnes sont co-infectés par ces deux virus ; il s'agit d'une des coinfections la plus répandue et difficile à combattre au monde. Les traitements disponibles pour HBV ne sont pas efficaces contre HDV. L'unique option thérapeutique pour les patients co-infectés par HBV et HDV repose sur l'utilisation d'interféron alpha pégylé avec de très nombreux effets secondaires et une efficacité très limitée. Très peu de molécules sont actuellement en R&D pour HDV et à priori aucune ne cible directement la réplication du virus. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies antivirales efficaces pour traiter les patients co-infectés.

Lors d'une infection virale classique, plusieurs cytokines sont produites. Plusieurs études ont montré une activation de la voie de signalisation de l'interféron par HDV *in vitro* et *in vivo*. Toutefois il n'y a aucune donnée sur l'activation de la voie « Nuclear factor κ B » (NFκB) par HDV, et même une absence d'activation de celui-ci a déjà été proposée par notre laboratoire. Notre objectif était de tester l'effet sur HDV d'immunomodulateurs activant cette voie.

Après criblage de différents inducteurs des voies canoniques et non-canoniques de NFκB nous avons identifié un agoniste du récepteur "toll like" 1/2 (Pam3CSK4) et un agoniste du récepteur à la lymphotoxine β (BS1) diminuant les ARN et protéines d'HDV. Des études approfondies ont montré un effet anti-HDV dose-dépendant et stable malgré une augmentation de la quantité de particules virales utilisées pour infecter les cellules. Des expériences d'arrêt de traitement ont révélé un effet antiviral persistant et altérant l'infectivité des nouvelles particules d'HDV. Ceci suggère un effet irréversible sur la matrice de transcription et réplication d'HDV.

Des analyses transcriptomiques sur des cellules infectées par HBV et HDV et traitées par Pam3CSK4, BS1 ont confirmé l'induction de cette voie NFκB et révélé l'activation de nombreux gènes impliqués dans une réponse inflammatoire. Une étude par Gene Ontology des fonctions moléculaires et processus biologiques significativement modulés lors des traitements par Pam3CSK4 et BS1 a permis d'identifier une liste de potentiels effecteurs ciblant les ARN et responsables du phénotype anti-HDV. L'identification mécanisme sous-jacent (i.e. dégradation des ARN ou régulation transcriptionnelle négative) reste toutefois à réaliser.

Ce projet a montré que l'induction de la voie NFκB est une potentielle cible thérapeutique pour inhiber l'infection à HDV. Notre recherche du ou des effecteurs de l'effet anti-HDV nous permettra d'identifier à terme un nouveau facteur de restriction. Ainsi, nos efforts de recherche devraient ouvrir des pistes pour mener au développement de nouvelles stratégies antivirales pour éliminer HDV.

MOTS CLÉS : Virus de l'Hépatite Delta ; Virus de l'Hépatite B ; Nuclear Factor κ B ; antiviraux ; immunomodulateurs

AUTHOR: Brieux CHARDÈS

TITLE: Inhibition of Hepatitis Delta Virus by inducers of the NFκB pathway

ABSTRACT: Super-infection by Hepatitis Delta Virus (HDV) of chronically Hepatitis B Virus (HBV) infected patients leads to the most aggressive forms of chronic viral hepatitis, with a faster progression towards fibrosis/cirrhosis and an increased risk of liver failure and hepatocellular carcinoma. Around 15-20 millions of people are co-infected with both viruses, which ranks this co-infection as one of the most prevalent and clinically challenging of the world. HDV infection is not susceptible to available direct anti-HBV. The only therapeutic option for HBV/HDV co-infected patients is the pegylated-interferon-α, a drug which has many side effects and suboptimal responses. Few molecules that target HDV are currently in development but none of them is affecting the replicative step of this virus. There is an urgent need to develop efficient treatment strategies for patients.

An infection produced many cytokines. Different studies showed an activation of the interferon pathway during HDV infection in vitro and in vivo. Nevertheless, there is no current data available concerning an activation of the Nuclear factor κ B » (NFκB) pathway by HDV, and more than that our laboratory has suggested a lack of activation. Our purpose was to test the effect on HDV of various immunomodulatory drugs activating this pathway.

After screening of various inducers of the canonical and non-canonical NFκB pathways we identified an agonist of the “toll like” receptor 1/2 (Pam3CSK4) and an agonist of the lymphotoxin β receptor (BS1) decreasing the HDV RNA and proteins. More extensive studies have shown a dose-dependent and stable anti-HDV effect despite an increase of the number of viral particles used to infect cells. Rebound experiments have shown a persistent antiviral effect and an alteration of the HDV particles infectivity. Its suggests an irreversible effect on HDV replication and transcription template.

Transcriptomic analysis on HBV/HDV infected and treated with Pam3CSK4 and BS1 cells has confirmed the induction of the NFκB pathway and revealed the activation of numerous genes involved in an inflammatory response. A Gene Ontology study of molecular functions and cellular processes significantly modulated by Pam3CSK4 or BS1 treatments had enable us to identify a list of potential effectors targeting the RNA and responsible of the anti-HDV phenotype. The underlying mechanism (i.e. RNA degradation or negative regulation of transcription) remains to be deciphered.

Our project has shown that the NFκB induction is a potential target to inhibit the HDV infection. Research of effector(s) will probably enable us to identify a new restriction factor. Thus, our research efforts should pave the way for the development of novel efficient antiviral strategies to eliminate HDV.

KEYWORDS : Hepatitis Delta Virus ; Hepatitis B Virus ; Nuclear Factor κ B ; antiviral drugs ; immunomodulatory drugs

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES TABLES.....	20
PARTIE I	21
1. Introduction	22
a. Découverte du Virus de l'Hépatite B	22
b. Découverte du Virus de l'Hépatite Delta	25
2. Biologie et physiopathologie virale	26
a. Virus de l'Hépatite B	26
i. Biologie d'HBV	26
1. Classification.....	26
2. Structure	29
a. Génome viral	29
b. Protéines virales	30
i. Antigène HBs	31
ii. Antigène HBc	33
iii. Antigène HBe	34
iv. Antigène Pol	34
v. Antigène HBx	35
c. Structure du virion et des particules sous-virales	35
3. Cycle viral d'HBV	37
a. Entrée	37
b. Formation du mini-chromosome	38
c. Transcription des ARN, encapsidation et rétro-transcription.....	40
d. Assemblage des particules virales et sécrétion	40
ii. Physiopathologie de HBV.....	42
1. Aspect clinique.....	42
a. Infection	42
b. Cirrhose hépatique	46
c. Hépto-carcinome	46
2. Épidémiologie	49
3. Dépistage et diagnostic d'HBV	53
4. Vaccination	55
5. Prise en charge.....	56
a. Modification du mode de vie et éducation thérapeutique.....	56

b.	Thérapies médicamenteuses.....	56
i.	Principe	56
ii.	Analogues de nucléos(t)ides	57
iii.	Interféron- α Pégylé.....	58
b.	Virus de l'Hépatite Delta	62
i.	Biologie d'HDV	62
1.	Classification.....	62
2.	Structure d'HDV.....	65
a.	Génome viral	65
b.	Protéines virales	66
c.	Ribonucléoprotéine et virion	68
3.	Cycle viral d'HDV.....	69
a.	Entrée.....	69
b.	Réplication.....	70
i.	Principe	70
ii.	Formation de multimères d'anti-génome	70
iii.	Formation des multimères de génome	71
iv.	Clivage des multimères et circularisation des monomères.....	72
v.	Transcription de l'ARNm HDAg	72
c.	Assemblage des particules virales et sécrétion	72
ii.	Physiopathologie d'HDV.....	74
1.	Immunopathogénèse	74
a.	Une réponse immunitaire soutenue mais inefficace	74
b.	Une modulation accrue de différents gènes et voies cellulaires	75
c.	Un contrôle des infections associées.....	75
2.	Aspect Clinique.....	76
a.	Infection	76
i.	Principe	76
ii.	Co-infection HBV/HDV	78
iii.	Sur-infection HDV d'un patient HBV chronique	78
b.	Hépto-carcinome	79
3.	Épidémiologie	80
4.	Dépistage et diagnostic	83
5.	Prise en charge.....	84
a.	Modification du mode de vie et éducation thérapeutique.....	84
b.	Thérapie médicamenteuse	85
iii.	Traitements en développement et / ou en clinique	85

1.	Les inhibiteurs d'entrée des virions.....	85
a.	Principe.....	85
b.	Myrcludex B.....	87
i.	Résultats pré-cliniques	87
ii.	Résultats cliniques	88
2.	Les inhibiteurs de formation et de relargage des virions.....	89
a.	Principe.....	89
b.	Nucleic Acid Polymers REP2139 et 2055.....	90
3.	Inhibiteurs de farnésylation de la L-HDAg	92
a.	Principe.....	92
b.	Lonafarnib (SCH 66336).....	92
iv.	Modèles d'étude.....	94
1.	In vitro	94
2.	In vivo	94
3.	Réponse immunitaire innée et pathogénèse	95
a.	Principe.....	95
b.	Notions de « pattern recognition receptor »	96
i.	Principe	96
ii.	Toll-like receptors.....	97
1.	Principe.....	97
2.	TLR2.....	101
a.	Biologie.....	101
b.	Rôle	101
c.	Ciblage	102
3.	TLR3.....	103
a.	Biologie.....	103
b.	Rôle	103
c.	Ciblage	103
4.	TLR4.....	104
a.	Biologie.....	104
b.	Rôle	104
c.	Ciblage	104
5.	TLR7/8.....	105
a.	Biologie.....	105
b.	Rôle	105
c.	Ciblage	105
6.	TLR9.....	106

a.	Biologie.....	106
b.	Rôle	106
c.	Ciblage	107
c.	Récepteurs de la famille du TNFR.....	107
i.	Principe	107
ii.	TNFR1.....	108
iii.	TNFR2.....	109
1.	Biologie.....	109
2.	Rôle	110
3.	Ciblage	111
iv.	LT-βR.....	111
1.	Biologie.....	111
2.	Rôle	113
3.	Ciblage	113
d.	Réponses immunitaires associées.....	114
i.	Réponse NFκB	114
1.	Principe.....	114
2.	Voies de signalisation NFκB	117
a.	Voie canonique	117
b.	Voie alternative.....	118
3.	Fonctions de la signalisation NFκB.....	121
a.	Médiateur de l'inflammation.....	121
b.	Activation et recrutement de cellules de l'immunité innée	122
c.	Activation et régulation de l'immunité adptative	122
	PARTIE II	124
	1. Projet et méthodologie de recherche	125
a.	Projet	125
b.	Méthodologie	127
	2. Article en soumission	128
	3. Résultats additionnels	155
a.	Phénotype anti-HBV de Pam3CSK4, BS1 et IL-1β.....	155
i.	Introduction	155
ii.	Matériel et méthode.....	155
iii.	Résultats	155
iv.	Discussion.....	159
b.	Séquençage ARN de cellules dHepaRG infectées HDV ou HBV+HDV et traitées par Pam3CSK4 ou BS1	160

i. Matériel et méthode.....	160
ii. Résultats	161
iii. Discussion.....	169
4. Perspectives	173
a. Application <i>in vivo</i>	173
i. Toxicité.....	173
ii. Distribution, métabolisme et élimination	174
iii. Approche expérimentale	175
b. Conséquences des traitements sur les cellules de l'immunité innée et adaptative	176
i. HDV, inducteurs de la voie NFκB et cellules présentatrices d'antigènes .	176
ii. HDV, inducteurs de la voie NFκB et réponse lymphocyte T CD4+	177
c. Optimisation de Pam3CSK4 et BS1.....	178
i. Optimisation de BS1.....	179
ii. Optimisation de Pam3CSK4.....	179
iii. Approche expérimentale	179
BIBLIOGRAPHIE	181

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa : acide aminé

AAV : Virus Adéno-Associé

ADAR : Adenosine Deaminase Acting on ARN

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNccc : ADN circulaire clôt de manière covalente

ADNrc : ADN relâché circulaire

ALT : Alanine Amino-Transférase

Anticorps : Ac

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNpg : ARN pré-génomique

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a CARD

AST : Aspartate Amino-Transférase

BCR : B-Cell Receptor

CARD : Domaine de recrutement des caspases

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CBP : CREB Binding Protein

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

C-ter : C-terminal

Cys : Cystéine

DC : Cellule Dendritique

db : double brin

DENV : Virus de la Dengue

DHBV : Virus de l'Hépatite du Canard de Pékin

EASL : European Association for Study of the Liver

EBV : Virus d'Epstein-Barr

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FADD : Fas-Associated Death Domain

FimH : Fimbriae H

FTI : Inhibiteur de farnésylation

Thèse Brieux CHARDÈS

HAV : Virus de l'Hépatite A
HBc : Protéine de capsid d'HBV
HBeAg : Protéine sécrétée d'HBV
HBsAg : Protéine d'enveloppe d'HBV
HBSP : HBV Splice-generated Protein
HBV : Virus de l'Hépatite B
HBx : Protéine X d'HBV
HDAC : Histone Déacétylase
HDAg : Antigène d'HDV
HDV : Virus de l'Hépatite D
HSPG : Héparane Sulfate Protéoglycane
HSV : Herpesvirus
IC : Concentration d'Inhibition
IFN : Interféron
IL : Interleukine
Ig : Immunoglobuline
IKK : I-KappaB Kinase
IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRF : Interferon Regulatory Factor
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
kb : kilo-base
kDa : kilodalton
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphotoxine
MAL : Myd88-Adaptor Like
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCMV : Cytomégalovirus Murin
MDSC : Myeloid-Drevid Suppressor Cells
miARN : micro ARN
MPL : Monophosphoril Lipid A
Myd88 : Myeloid factor 88
MyrB : Myrcludex B
NAP : Nucleic Acid Polymer

NFκB : Nuclear Factor κ B

NIH : National Institute of Health

NIK : NFκB-Inducing Kinase

NK : Natural Killer

NLR : Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein-like Receptor

NLS : Nuclear Localisation Signal

NOX : NADPH Oxydase

NTCP : Na⁺ Taurocholate Co-transporting Polypeptide

N-ter : N-terminal

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

PAMP : Pathogens Associated Molecular Patterns

pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde

PEG : polyoxyéthylènes-glycol

PEG-IFN : Interféron Pegylé

PHH : hépatocyte primaire humain

Pol : Polymérase d'HBV

PRR : Pattern Recognition Receptor

rcDNA : ADN circulaire partiellement double brin

RE : Réticulum Endoplasmique

RHD : Rel Homology Domain

RIP : Receptor Interacting protein

RLR : Retinoic acid-inducible gene-Like Receptor

RNAP : ARN polymérase ADN dépendante

RNP : Ribonucléoprotéine

RT : Rétro-Transcriptase

sb : simple brin

Ser : Sérine

STAT : Signal Transducer And Activator of Transcription

TAB : TGFβ-Activated kinase-Binding protein

TAK : TGFβ-Activated Kinase

TBK : TANK-Binding Kinase

TCR : T-Cell Receptor

TGF : Tumor Growth Factor

TIR : Toll Interleukine Receptor

TIRAP : TIR-Associated Protein

TLR : Toll-Like Receptor

Thr : Thréonine

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TRADD : TNF Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein (TRADD)

TRAF : Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor

TRIF : TIR-domain-containing adaptor Inducing interferon

Tyr : Tyrosine

UI : Unité Internationale

VSV : Vesicular Stomatitis Virus

WHV : Virus de l'Hépatite de la Marmotte

WNV : Virus du Nil Occidental

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Observation de l'Ag Delta.	26
Figure 2. Distribution géographique des génotypes d'HBV.	28
Figure 3. Génome d'HBV.	29
Figure 4. Les ARN d'HBV.	31
Figure 5. Structure et activité des protéines HBsAg.	32
Figure 6. Structure et activité de la protéine HBc.	33
Figure 7. Structure et activité de la protéine Pol.	35
Figure 8. Particule virale d'HBV.	36
Figure 9. Particules sous-virales d'HBV.	37
Figure 10. Cycle viral simplifié d'HBV.	39
Figure 11. Ancrages des trois formes de HBsAg dans la membrane du RE.	41
Figure 12. Historique d'une infection HBV aigüe.	43
Figure 13. Historique d'une infection HBV chronique. C	43
Figure 14. Représentation schématique des différentes phases d'une infection par le virus de l'Hépatite B.	45
Figure 15. Incidence globale des cas de carcinome hépatocellulaire en 2018. ..	48
Figure 16. Incidence Européenne d'HBsAg.	49
Figure 17. Incidence mondiale d'HBsAg.	52
Figure 18. Algorithme de diagnostic de l'infection HBV.	54
Figure 19. Arbre décisionnel d'arrêt du traitement IFN-α-PEG.	59
Figure 20. Arbre décisionnel des thérapies anti-HBV.	61
Figure 21. Distribution mondiale des génotypes d'HDV.	64
Figure 22. Structure des ARN HDV.	66
Figure 23. S-HDAg et sites catalytiques.	68
Figure 24. Mécanismes d'entrée d'HDV.	69
Figure 25. Mécanisme de réplication d'HDV.	71
Figure 26. Mécanismes d'assemblage et de sécrétion des particules d'HDV.	73
Figure 27. Evolution des marqueurs HBV et HDV lors d'une co-infection.	78
Figure 28. Évolution des marqueurs HBV et HDV lors d'une surinfection HDV d'un patient déjà infecté par HBV.	79

Figure 29. Prévalence d'HDV chez les individus HBsAg positifs en Europe en 2017.	81
Figure 30. Prévalence mondiale d'HDV et répartition des génotypes.	82
Figure 31. Arbre de diagnostic de l'infection HDV.	84
Figure 32. Oxystéroïls et dérivés.	87
Figure 33. Structure de la cyclosporine A.	86
Figure 34. Structure du REP2055 (A) et du REP2139 (B)	91
Figure 35. Structure du Lonafarnib.	93
Figure 36. Localisation des différents TLR et PAMP reconnus.	98
Figure 37. Voies des TLR.	100
Figure 38. Structure moléculaire de Pam2 et Pam3CSK4.	102
Figure 39. Voies de signalisations du TNFR1.	109
Figure 40. Voie de signalisation du TNFR2.	110
Figure 41. Voies de signalisation du LTβR.	112
Figure 42. Dimères de NFκB potentiels.	115
Figure 43. Structures des sous-unités du dimère NFκB.	117
Figure 44. Voies canoniques et alternative de NFκB.	120

LISTE DES TABLES

Tab. 1 Caractéristiques des génotypes d'HBV	27
Tab. 2. Conséquences cliniques des génotypes et sous-génotypes principaux d'HBV	51
Tab. 3. Génotypes d'HDV et impact sur la pathologie	77

PARTIE I

Bibliographie et État de l'Art

1. Introduction

a. Découverte du Virus de l'Hépatite B

Les premières descriptions de pathologies hépatiques remontent à l'antiquité avec l'observation de cas de jaunisse par les médecins babyloniens, dans l'Ancien Testament puis par le père de la médecine, Hippocrate, créant alors le terme médical d'ictère. Les observations de cas d'ictères se sont multipliées de la seconde moitié du XVIII^{ème} à la fin de la Seconde Guerre Mondiale avec le développement de la médecine moderne. L'implication d'un agent infectieux a été clairement établie dès 1885 avec l'apparition de cas de jaunisse 1 à 7 mois après deux campagnes distinctes de vaccination contre la variole¹. Le relevé de minuscules anomalies sur les foies de soldats décédés et atteints de jaunisse par des médecins de campagne de la Première Guerre Mondiale a soulevé l'hypothèse d'un lien entre ce symptôme et une atteinte. Cette théorie a été confirmée dans les années 1930 avec l'observation par Roholm et Iversen d'une inflammation diffuse dans les échantillons de biopsies hépatiques provenant de trente-huit patients¹. Le relevé par Turner *et al.* de cas d'ictères chez des soldats américains vaccinés contre la fièvre jaune lors de la Seconde Guerre Mondiale² a permis d'associer ce symptôme à un agent infectieux jusque-là inconnu que les médecins vont nommer dès 1947 « Hépatite » pour résumer l'inflammation du foie observée³. L'étude des modes de transmission lors de la guerre, a établis que cet agent infectieux était transmis par administration d'échantillons fécaux ou sanguins issus de patients présentant une jaunisse active, les symptômes apparaissant après un mois d'incubation et de nombreux patients revenant ensuite à l'état normal⁴. De plus les militaires ayant développé une jaunisse étaient alors résistants à une ré-infection⁵.

Dès la fin des années 1940, la médecine est parvenue à différencier « Hépatite A », associée aux cas de jaunisse apparaissant précocement et transmissibles par voie orale et sanguine, et « Hépatite B », associée aux cas de jaunisse apparaissant tardivement et transmissibles par voie sanguine uniquement⁶. Le développement de la médecine de guerre lors de la Seconde Guerre Mondiale a permis la mise en place des grandes études cliniques que nous connaissons aujourd'hui. Ces études associées aux tests fonctionnels du foie, que sont la quantification de l'alanine

aminotransférase (ALT), de l'aspartate aminotransférase (AST) et des γ -Glutamyl-Transpeptidases comme marqueurs de l'inflammation hépatique, ont permis l'observation dans les années 1950 de formes chroniques de ces infections hépatiques dans des cohortes de patients⁷, Stokes et ses collègues concluant à 0,2 à 0,5% de la population américaine porteuse de l'Hépatite B. La découverte de patients porteurs n'ayant jamais déclaré de jaunisse a conduit les médecins de l'époque à faire l'hypothèse d'une sous-évaluation du portage chronique de l'infection. Toutefois les ceux-ci ne faisaient alors pas la différence entre les Hépatites B et C que nous connaissons actuellement, en effet le terme « Hépatite B » établi à la fin des années 1940 englobait à la fois des cas d'infections au virus de l'Hépatite B (HBV), mais très probablement des cas d'infection à l'Hépatite C, présentant des symptômes très similaires pour un non-spécialiste de ces pathologies.

L'identification en plusieurs étapes de la protéine d'enveloppe d'HBV (HBsAg) alors nommé Antigène (Ag) Australien, et de la particule d'HBV, alors nommée particule de Dane, va révolutionner le dépistage de l'infection à HBV :

- **(i)** Les sérums de patients ayant subi de multiples perfusions ont été collectés afin d'évaluer la présence d'Ag dirigées contre des protéines humaines.
- **(ii)** Par la technique d'immunodiffusion en gel d'agarose, les chercheurs ont constaté l'apparition de complexes Ag-Anticorps (Ac) en mettant en contact des sérums tests avec le sérum d'un patient ayant subi près de 50 transfusions, suggérant que celui-ci avait développé une immunité dirigée contre une ou des protéines issues des transfusions⁸.
- **(iii)** Le screening d'une banque de sang américaine trois ans plus tard a confirmé cette étude avec l'observation de ce complexe Ag-Ac dans de nombreux échantillons⁹.
- **(iv)** En 1965, l'étude de l'interaction entre un sérum immunisé et les échantillons de 24 aborigènes Australiens montra l'apparition d'une interaction Ag-Ac différente des précédentes avec l'implication d'un contenu hautement protéique, là où les précédentes interactions impliquaient une lipoprotéine¹⁰.
- **(v)** Cet Ag a alors pu être identifié chez respectivement 10 et 8 patients du National Institute of Health (NIH), ayant subi de nombreuses transfusions dans le cadre d'hémophilies ou de leucémies, là où 700 sérums d'américains sains ne réagissaient pas¹¹.

- **(vi)** Des résultats similaires furent par la suite obtenus avec des cohortes de patients atteints de la lèpre, de leucémies ou de thalassémies. Toutefois le lien avec l'HBV aurait pu mettre plusieurs années à être établis, la probabilité d'identifier le dénominateur commun étant faible.
- **(vii)** L'établissement en 1968 d'une corrélation entre taux élevé d'ALT et positivité pour cet Ag Australien chez des patients présentant des hépatites chroniques a commencé à soulever cette hypothèse¹².
- **(viii)** L'observation en 1969 de cet Ag chez 20% de 125 patients présentant une hépatite virale aiguë de type B et chez aucun autre patient présentant des pathologies hépatiques alternatives a appuyé la possibilité d'un lien entre l'Ag Australien, plus tard nommé HBsAg, et les hépatites observées à la sortie de la Seconde Guerre Mondiale¹³.
- **(ix)** Simultanément des chercheurs japonais ont constaté le développement d'une positivité à l'HBsAg et l'apparition de défaillances hépatiques chez des patients ayant subi des transfusions de sang contaminé¹⁴.
- **(x)** L'observation par électro-microscopie en 1970 de la particule de Dane composée d'Ag australiens, que nous connaissons désormais comme HBV, et de sous particules circulaires et tubulaires, a définitivement confirmé le lien entre l'Ag Australien et un virus responsable des cas d'Hépatites B¹⁵.
- **(xi)** La localisation de ces particules dans des hépatocytes infectés en 1972 a également renforcé ce lien entre Ag Australien et hépatites¹⁶.
- **(xii)** En 1975 l'inoculation de sérums HBsAg positifs à des chimpanzés a induit une pathologie hépatique associée à la localisation de l'Ag dans les hépatocytes, la présence de l'Ag Australien dans leur sérum et le développement d'Ac anti-HBsAg¹⁷.

Au début des années 1970, l'installation en routine du dépistage de l'HBsAg chez les donneurs de sang a alors laissé espérer l'élimination du risque de transmission des Hépatites B lors des transfusions.

b. Découverte du Virus de l'Hépatite Delta

La caractérisation de l'HBV s'est accélérée au cours des années 1970. En 1977, Rizzetto M *et al.* ont identifié dans le sérum de patients HBsAg positifs un nouvel Ag spécifique des noyaux des hépatocytes infectées¹⁸ (Figure 1). La localisation nucléaire de cet Ag associée à l'absence de structures de protéines de capsid core (HBc) observables par électro-microscopie a alors soulevé l'hypothèse de l'existence d'un quatrième Ag distinct des Ag HBs et HBc et HBV sécrété (HBeAg), alors nommé Ag Delta (HDAg). De plus la concentration de ce dernier était plus élevée chez les patients présentant de fortes atteintes hépatiques¹⁸. En 1978, des études d'infection de chimpanzés avec les sérums de patients HBsAg positifs / HDAg positifs, réalisées par le NIH, ont permis d'étudier ce nouveau pathogène. Suite à l'infection, l'Ag Delta n'a pas pu être observé chez les chimpanzés déjà immunisés contre HBV. En effet ces derniers possédaient des Ac empêchant l'implantation du virus. Le virus de l'Hépatite Delta (HDV) a alors été incapable de détourner la machinerie de l'HBV et de s'implanter. De plus l'HBsAg et l'Ag Delta ne furent observables que chez les chimpanzés sains sensibles à HBV¹⁹. Des expérimentations du même groupe ont également montré une apparition plus précoce d'Ag Delta, associée à une diminution des Ag HBsAg et HBc, marqueurs d'HBV suite à l'administration de sérum HBsAg / Ag Delta positifs chez des chimpanzés déjà porteurs chroniques d'HBV. En effet, ces derniers présentant déjà un taux d'HBsAg sérique élevé, le détournement de l'enveloppe virale d'HBV par HDV n'eut pas à attendre l'implantation du virus associé. Simultanément, l'isolement d'Ag Delta des sérums de chimpanzé a permis l'observation d'une particule virale de 35 à 37 nm présentant un petit génome à ARN différent de celui d'HBV²⁰. L'hypothèse d'un Ag Delta composant d'un virus défectif très proche des viroïdes et dépendant d'HBV pour sa réplication est alors apparu dans la communauté scientifique, nommant cet agent HDV pour virus de l'Hépatite Delta. Dans la foulée, les résultats préliminaires de Rizzetto M *et al.*, associant la positivité à l'Ag Delta à de fortes atteintes hépatiques chez les patients, ont été confirmées par l'observation d'hépatites fulminantes chez des populations des forêts équatoriales d'Amérique du Sud et en Afrique Centrale, positives pour ce marqueur²¹.

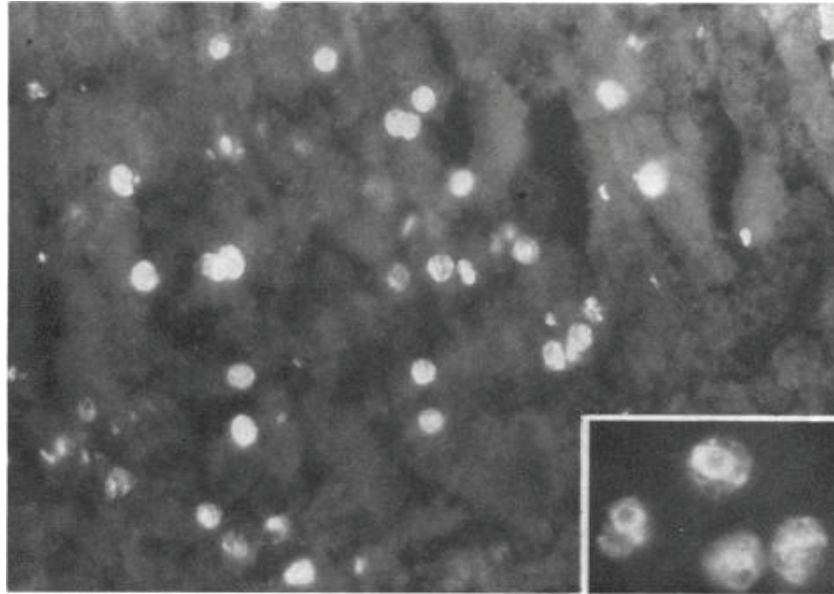


Figure 1. Observation de l'Ag Delta. Les biopsies de foies de patients HBsAg positifs ont été incubées avec un antisérum spécifique anti-Delta. Le signal obtenu par immunofluorescence semble être majoritairement nucléaire (adapté de Rizzetto M *et al.*, Gut 1977).

2. Biologie et physiopathologie virale

a. Virus de l'Hépatite B

i. Biologie d'HBV

1. Classification

HBV appartient au groupe VII de la classification de Baltimore proposée par le prix Nobel de médecine de 1975. Ce groupe réunit l'ensemble des virus à Acide désoxyribonucléique (ADN) double brin (db) répliquant via un intermédiaire à Acide Ribonucléique (ARN) et une étape de rétro-transcription. Selon la seconde classification de référence établie par le Comité de Taxonomie des Virus, HBV constitue le virus prototype de la famille des *Hepadnaviridae*, famille regroupant les virus hépatotropes à ADN db possédant une activité rétro-transcriptase (RT). Les virus de l'hépatite de la marmotte (WHV) ou du canard de Pékin (DHBV) sont également membres de cette famille et présentent de grandes similitudes avec HBV²². Les erreurs de la polymérase virale et la capacité de recombinaison du génome d'HBV sont à l'origine de dix génotypes allant d'A à J, et différenciés selon des dissimilarités des séquences nucléotidiques supérieures à 7,5% (Figure 2). Les quasi-espèces créées

présentent des variations dans leur résistance au traitement, leur susceptibilité aux vaccins, leur échappement viral et leur virulence à l'origine de la survie d'HBV (Table 1). Ces points seront traités lors de l'étude de la pathologie induite par le virus. La répartition géographique, le devenir clinique et la réponse aux traitements des patients varie selon le génotype considéré ; toutefois les vaccins anti-HBV disponibles sont pan-génotypiques²³. Les génotypes A, B, C, D, F et I sont ensuite subdivisés en sous-génotypes présentant au minimum 4% de divergence²⁴. Enfin des recombinants impliquant les génotypes B/C et C/D ont été identifiés mais ne sont pas considérés comme des génotypes en tant que tels.

Tab. 1 **Caractéristiques des génotypes d'HBV** (adapté de McNaughton AL *et al.*, 2019 Gastroenterology)

Génotype	Taille du génome (b)	Différences avec la séquence HBV consensus
A	3221	<ul style="list-style-type: none"> • Insertion de 6 bases en 3' du gène <i>PC/C</i> • Rares mutations G1896A abolissant l'expression d'HBeAg • Mutations fréquentes dans le promoteur core
B	3215	
C	3215	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations fréquentes dans le promoteur core • Rares mutations G1896A abolissant l'expression d'HBeAg
D	3182	<ul style="list-style-type: none"> • Déletion de 33 bases dans le gène <i>pré-S/S</i>
E	3212	<ul style="list-style-type: none"> • Déletion de 3 bases en 5' du gène <i>pré-S/S</i>
F	3215	<ul style="list-style-type: none"> • Rares mutations G1896A abolissant l'expression d'HBeAg
G	3248	<ul style="list-style-type: none"> • Insertion de 36 bases en 5' du gène <i>PC/C</i> entraînant une surexpression d'HBc • Déletion de 3 bases en 5' du gène <i>pré-S/S</i> • Rares mutations G1896A abolissant l'expression d'HBeAg
H	3215	<ul style="list-style-type: none"> • Rares mutations G1896A abolissant l'expression d'HBeAg
I	3215	<ul style="list-style-type: none"> • Recombinant des génotypes A, C et G
J	3182	<ul style="list-style-type: none"> • Identifié chez un patient Japonais, recombinant d'un <i>Orthohepadnavirus</i> infectant les Gibbons

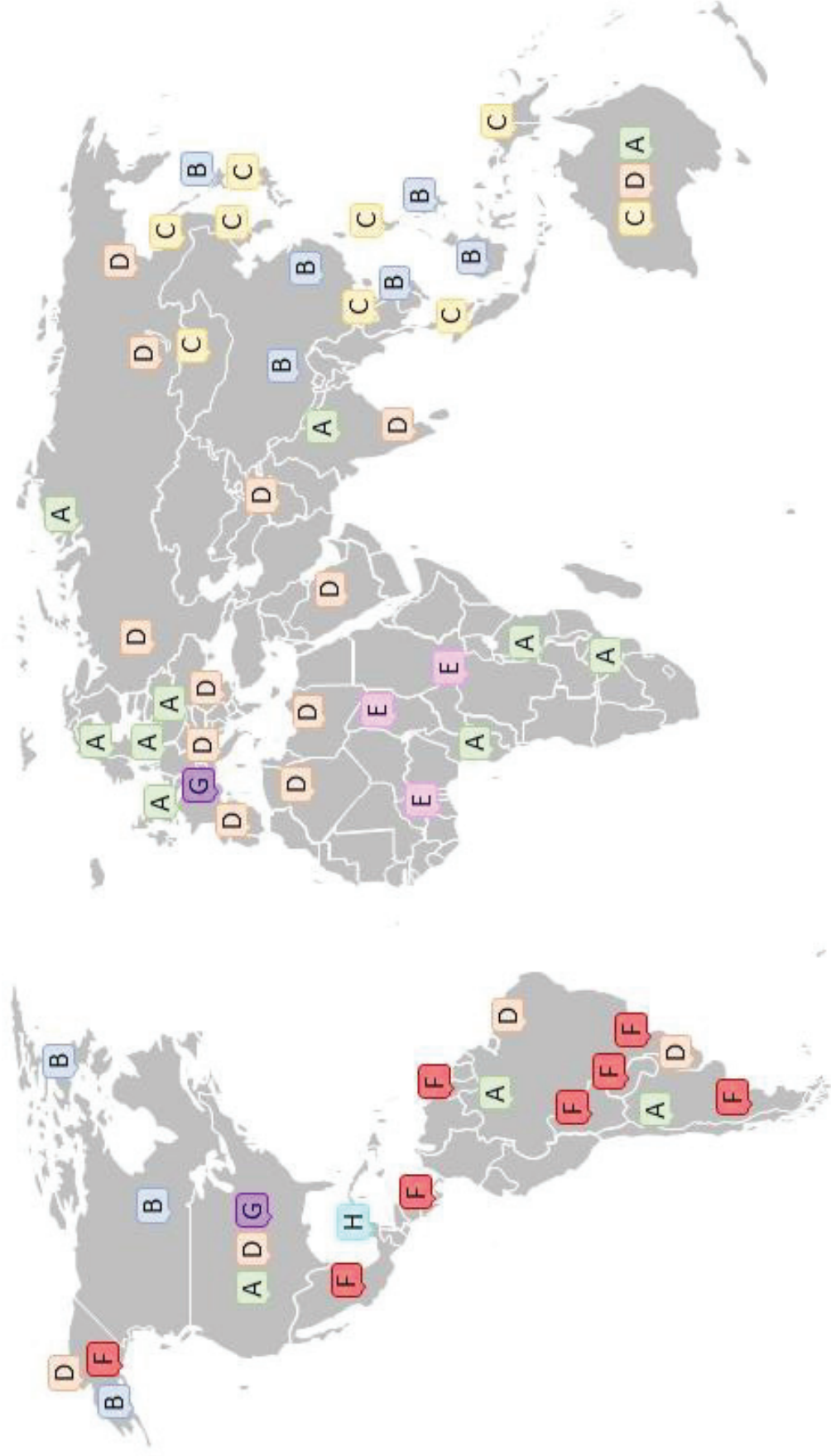


Figure 2. **Distribution géographique des génotypes d'HBV.** Le génotype A est ubiquitaire mais majoritaire dans le Sud de l'Afrique, en Inde et en Europe du Nord. Les génotypes B et C se concentrent en Asie de l'Est et en Océanie. Des foyers de génotype B sont observés en Alaska et au Canada. Le génotype D, également ubiquitaire, se concentre autour du bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et dans les Amériques. Le génotype E est uniquement constaté en Afrique de l'Ouest et Centrale. Le génotype F est spécifique à l'Amérique du Sud et Centrale et le génotype H est uniquement déposé au Mexique. Enfin le génotype G est caractéristique des populations homosexuelles des pays industrialisés d'Europe et d'Amérique du Nord (adapté de Rajoriya N *et al.*, 2017 J Hepatol).

2. Structure

a. Génome viral

Le génome d'HBV est constitué d'un ADN circulaire partiellement db (rcDNA) de 3,2k bases (kb). Le brin négatif sert de matrice pour la transcription après réparation du brin positif. Celui-ci présente un déficit d'environ 600 nucléotides (nt) à son extrémité 3' selon le génotype considéré, le génome est donc composé d'une portion ADN simple brin²⁵ (sb). La polymérase virale est associée avec un fragment d'ARN résidu de l'ARN pré-génomique (ARNpg) viral à l'extrémité 5' du brin positif. Malgré sa petite taille, environ deux nt sur trois du génome d'HBV encodent une ou plusieurs protéines²⁶. Il est intéressant de relever que ce codage multiple constitue un mécanisme supplémentaire protégeant le virus contre de potentiels traitements. Lorsqu'une mutation évolutive touche le génome, celle-ci impacte simultanément

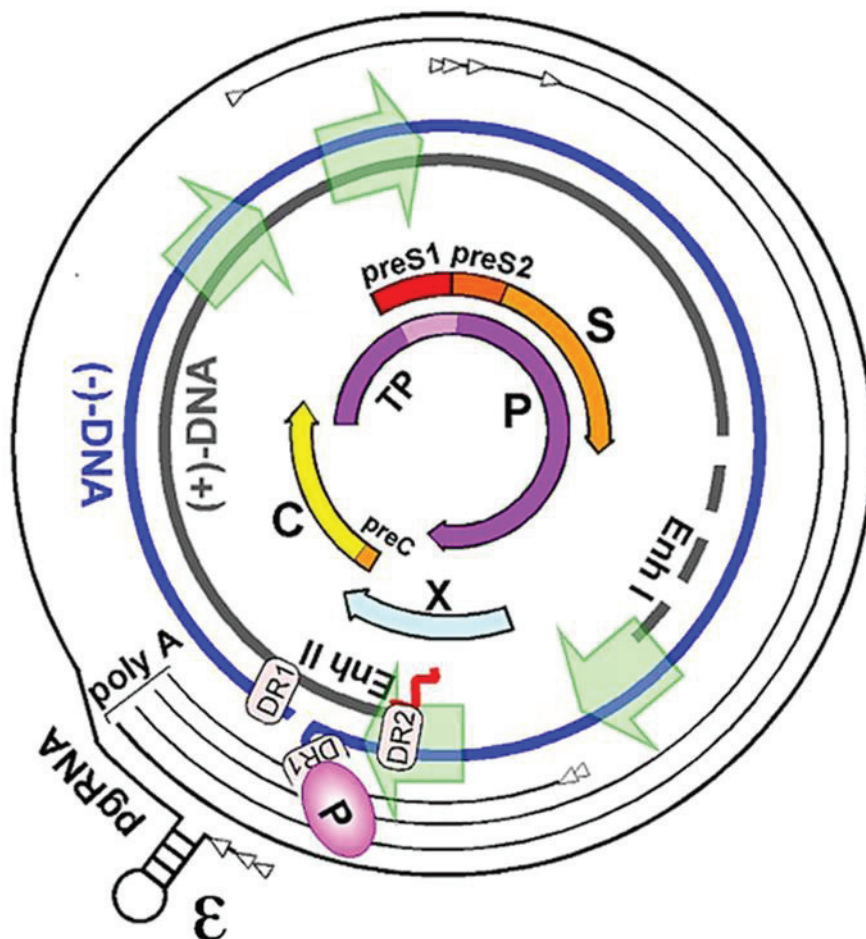


Figure 3. **Génome d'HBV.** Le génome encode quatre gènes différents nommé *préC/C*, *pré-S/S*, *Pol* et *X* traduits en quatre ARNm différents. Tous sont polyadénylés et l'un d'entre eux, nommé ARNpg, comporte une boucle ε en 5' nécessaire au recrutement de la polymérase virale responsable de la rétro-transcription.

plusieurs protéines virales, amplifiant son effet et donc le mécanisme évolutif protecteur associé.

Le génome viral comporte quatre Open Reading Frames (ORF), nommés Pol (P), Core (C), Surface (S) et X (Figure 3). Ces quatre cadres de lecture encodent quatre gènes *pré-S/S*, *PC/C*, *pol* et *S*. Quatre promoteurs nommés core, SPI, SPII et X dirigent l'initiation de la transcription en différents sites du génome afin de produire quatre ARN polyadénylés de 3,5, 2,4, 2,1 et 0,7kb. Deux enhancers et un cis-acting negative regulatory element complètent l'arsenal de régulation de la transcription du virus. Grâce au chevauchement des quatre ORF le virus encode simultanément sept protéines différentes via cinq transcrits ARN différents :

- **ORF-S** : localisé dans l'ORF-P il comporte le gène *pré-S/S* encodant les trois formes des protéines de surface d'HBV via trois codons d'initiation distincts : *i.e.* large (L-HBsAg), moyen (M-HBsAg) et petite (S-HBsAg).
- **ORF-P** : il constitue près de 80% du génome viral et comporte le gène *pol* encodant Pol. Il recouvre en partie l'extrémité 3' du gène *PC/C* et l'extrémité 5' du gène *X*.
- **ORF-C** : il comporte le gène *PC/C* encodant HBc et HBeAg via l'intermédiaire de deux codons d'initiation distincts.
- **ORF X** : il comporte le gène *X* encodant la protéine X (HBx).

b. Protéines virales

Les cinq ARN HBV (Figure 4) sont exportés au cytoplasme où le virus détourne la machinerie cellulaire afin de les traduire en protéines :

- La forme dite longue de l'ARN de 3,5kb (ARN precore) donne la protéine precore/core, modifiée post-traductionnellement par clivage de son extrémité N-terminale (N-ter) afin de donner la protéine HBeAg.
- La forme dite courte de l'ARN de 3,5kb (ARNpg), différente de la longue par quelques nt, donne les protéines HBc et Pol.
- L'ARN messager (ARNm) de 2,4kb donne la protéine L-HBsAg.
- L'ARNm de 2,1kb donne les protéines S et M-HBsAg. Celui-ci présente la même extrémité 3' que l'ARNm encodant la L-HBsAg mais une extrémité 5' différente permettant l'inclusion ou non des domaines pré-S1 et pré-S2²⁷.

- L'ARNm de 0,7kb donne la protéine HBx.

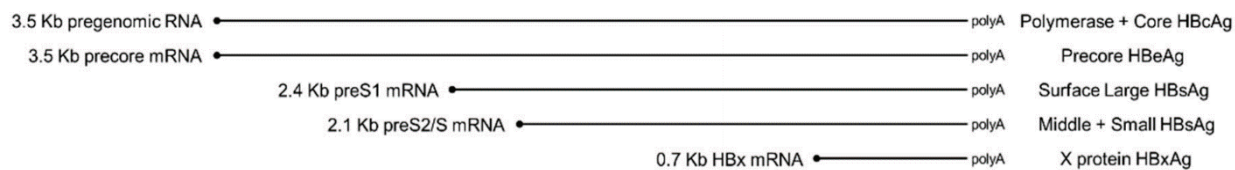


Figure 4. **Les ARN d'HBV.** Cinq ARN d'HBV majoritaires co-existent. Deux formes courtes et longues de 3,5kb l'une de l'ARNpg, un ARN de 2,4kb, un plus petit de 2,1kb et un dernier de 0,7kb (adapté de Hadziyannis E *et al.*, 2018 Genes).

Associés à ces ARN, une série d'ARN HBV épissés ont largement été décrits²⁸. Ceux-ci résultent majoritairement d'un épissage alternatif de l'ARNpg. Ils peuvent alors être encapsidés et rétrotranscrits pour former des particules virales défectives²⁹. Un de ces ARN est à l'origine d'une huitième protéine virale nommée HBV splice-generated protein (HBSP) favorisant la fibrose hépatique³⁰, la migration cellulaire³¹ et l'altération de la réponse inflammatoire³².

i. Antigène HBs

La transcription du gène *pré-S/S* génère deux transcrits ARNm de 2,1 et 2,4kb traduits dans le réticulum endoplasmique (RE) à partir de trois codons d'initiation distincts donnent respectivement les protéines S/M-HBsAg et L-HBsAg composant l'enveloppe³³ (Figure 5) :

- La protéine S-HBsAg constituée de 226 acides aminés (aa) est le constituant principal des virions et la forme majoritaire des protéines HBsAg³³. Elle comporte quatre domaines transmembranaires après synthèse dans le RE.
- La protéine M-HBsAg, produite à partir du même ARNm, comporte 55aa supplémentaires, correspondant à la région pré-S2, et présente quatre domaines transmembranaires identiques à ceux observés pour la S-HBsAg, les extrémités N- et C-terminales (N-ter & C-ter) se trouvant dans la lumière du RE³⁴.
- La protéine L-HBsAg est une extension de la protéine M-HBsAg avec 108nt supplémentaires correspondant à la région pré-S1.

Les régions pré-S1 et pré-S2 sont essentielles pour l'entrée virale et comportent plusieurs sites actifs :

- ✓ Un site de liaison aux hépatocytes³⁵ ;
- ✓ Un site CCAAT de liaison aux facteurs de transcription³⁶ ;
- ✓ Un site de liaison à la protéine Hsc70 empêchant la translocation des domaines pré-S1 et pré-S2 dans la lumière du RE³⁷ ;
- ✓ Un site de liaison à la nucléocapside nécessaire à la morphogénèse des nouvelles particules virales³⁸ ;
- ✓ Un site essentiel pour la sécrétion virale ;
- ✓ Un site de liaison à l'albumine³⁹ ;

La région pré-S1 des protéines M et L-HBsAg comporte des épitopes⁴⁰ reconnus par les lymphocytes B³⁹ et T⁴¹ et utilisables en vaccination⁴². Une fois synthétisée, chacune des protéines HBsAg s'homo ou s'hétérodimérise avec une autre protéine HBsAg présente dans la membrane du RE⁴³.

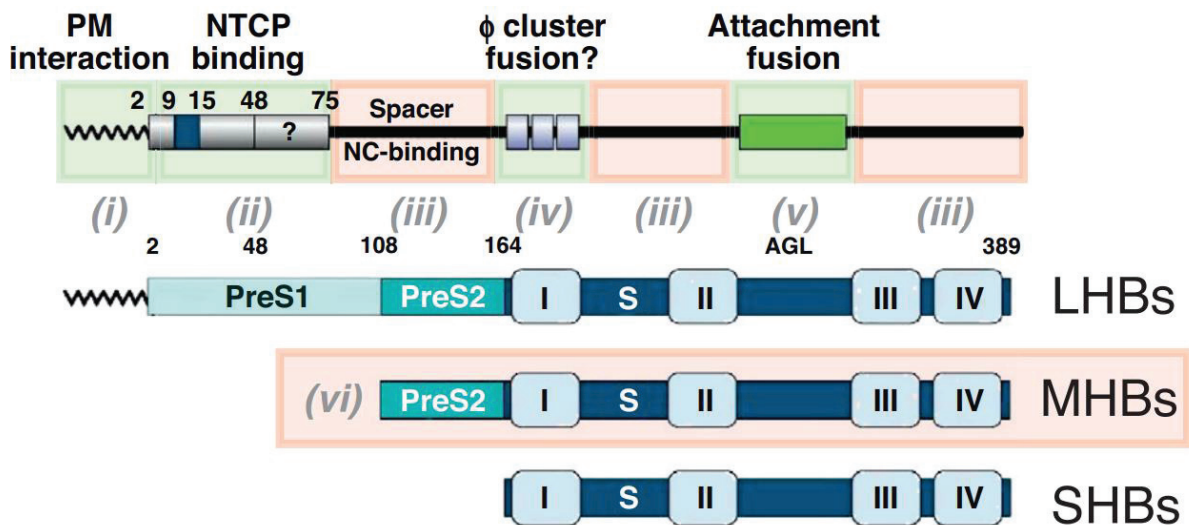


Figure 5. Structure et activité des protéines HBsAg. Trois isoformes de la protéine HBsAg existent, partageant la même extrémité C-ter. La protéine M-HBsAg présente une extrémité C-ter supplémentaire nommée pré-S2 et impliquée dans l'interaction avec la nucléocapside. La protéine L-HBsAg présente le domaine pré-S2 supplémenté en C-ter d'un domaine pré-S1 nécessaire à la reconnaissance du récepteur d'entrée d'HBV (adapté de Urban S *et al.*, Current Op in Vir 2018).

ii. Antigène HBc

La protéine HBc, composée de 183aa (21,5kiloDalton (kDa)), est encodée par le gène *PC/C* et traduite depuis l'ARNpg de 3,5kb. Elle est le constituant principal des capsides icosaédriques d'HBV⁴⁴. Sa structure fonctionnelle est divisée en deux domaines (Figure 6) :

- **Une extrémité N-ter allant des aa 1 à 149 nécessaire à la dimérisation d'HBc et la formation de la capsid** : cette séquence riche en hélices α ⁴⁵ présente une cystéine (Cys) en position 61 essentielle pour stabiliser le dimère via un pont disulfure entre les deux monomères.
- **Une extrémité C-ter allant des aa 150 à 183 nécessaire à la réplication de l'ADN viral**⁴⁶ : cette séquence riche en arginines se lie aux ADN afin de permettre à HBc d'agir comme protéine chaperone⁴⁷. Un motif d'adressage au noyau permet à HBc de se localiser au niveau de l'ADN viral⁴⁸. Cette relocalisation, associée à sa structure proche des histones cellulaires, est à l'origine d'une hypothèse suggérant qu'HBc serait capable de participer à la structuration de l'ADN circulaire clôt de manière covalente⁴⁹⁻⁵¹ (ADNccc). HBc peut également se lier à l'ARNpg couplé à la polymérase virale afin de l'encapsider. Lors de l'infection, la phosphorylation de sérines (Ser) et thréonines (Thr) à cette extrémité serait responsable du désassemblage de la capsid virale une fois le pore nucléaire franchi⁵².

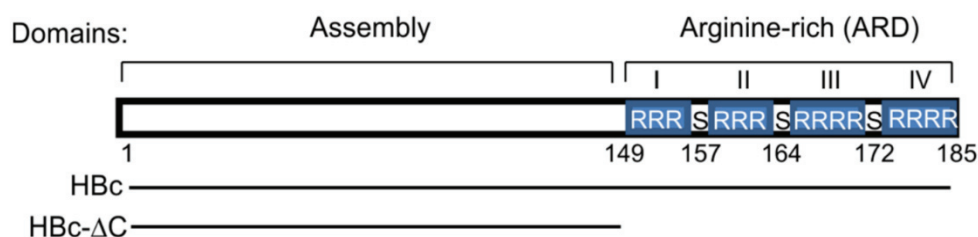


Figure 6. Structure et activité de la protéine HBc. La protéine constituant la capsid d'HBV peut être segmentée en deux parties. Une extrémité N-ter impliquée dans l'assemblage de la capsid virale, et une extrémité C-ter présentant de multiples activités dont : une régulation de la réplication via une activité proche de celle des histones ; un rôle dans le désassemblage de la capsid virale ; l'initiation de l'encapsidation par interaction avec la boucle ϵ de l'ARN-pré-génomique (adapté de Lubyova *et al.*, Plos One 2017).

iii. Antigène HBe

La transcription du gène *PC/C* génère la forme longue de l'ARNpg ensuite traduite afin de donner la protéine précore. Celle-ci fait 25kDa et comporte les séquences précédemment décrites pour HBc avec une séquence additionnelle de 29aa située en N-ter⁴⁸. Une maturation post-traductionnelle permet le clivage protéolytique de 19aa en N-ter et l'exportation au Golgi de la protéine de 22kDa maturée. Celle-ci est à nouveau clivée en C-ter par les protéases de l'appareil de Golgi afin de former la protéine soluble HBeAg de 17kDa qui sera sécrétée⁵³. La détection d'HBeAg chez les patients est utilisée comme marqueur d'une répllication virale active, toutefois son implication dans le cycle réplificatif d'HBV n'est pas clairement établie.

iv. Antigène Pol

La polymérase d'HBV (pol) est encodée par le gène *pol* et traduite depuis la forme courte de l'ARNpg afin de donner une protéine de 845aa (90kDa) segmentée en trois domaines distincts (Figure 7) :

- Un domaine terminal en C-ter servant à reconnaître la boucle ϵ de l'ARNpg et initier la rétro-transcription : absent des polymérase des autres *Hepadnaviridae*, le noyau aromatique d'un résidu tyrosine (Tyr) en position 63 sert de fixation au premier nucléotide du brin négatif de l'ADN viral afin d'initier la rétro-transcription, en remplacement de l'initiation par l'intermédiaire d'un nucléotide comme cela se fait habituellement⁵⁴. Un motif d'adressage au noyau est responsable de la localisation nucléaire de cette protéine et probablement de l'export du complexe ADNrelâché circulaire (ADNrc)/Pol au noyau lors de la primo-infection ou suite à la rétro-transcription⁵⁵. Il semble que, par la suite, ce signal puisse être bloqué afin de permettre la persistance de la Pol dans le cytoplasme et donc son action de rétro-transcription.
- Un domaine à activité RT responsable de la synthèse de l'ADNrc en position centrale, et séparé du domaine terminal C-ter par un spacer de 150nt⁵⁶.
Un domaine à activité ARNaseH N-ter responsable de la dégradation de l'ARNpg, matrice de la rétro-transcription.



Figure 7. **Structure et activité de la protéine Pol.** La polymérase virale peut être divisée en trois domaines à activités distinctes. Un domaine N-ter à l'origine de l'initiation de la transcription (TP). Un domaine interne comportant l'activité RT. Un domaine C-ter à activité RNaseH.

v. **Antigène HBx**

HBx est une protéine majoritairement cytoplasmique de 154 aa (17kDa) traduite à partir d'un ARNm viral de 0,7kb. Cette protéine multifonction est impliquée dans de nombreux mécanismes allant de la carcinogénèse⁵⁷, à l'activation de gènes cellulaires par modulation de leurs marques épigénétiques⁵⁸ et production de miARN⁵⁹ et long non-codants⁶⁰, mais également modulation de l'apoptose⁶¹, de l'immunité⁶² et de la réparation de l'ADN⁶³. HBx est majoritairement impliquée dans la régulation épigénétique de l'ADNccc, entre autres en régulant des enzymes nécessaires à la formation de ce dernier, comme P300, CREB Binding Protein (CBP), Histone Déacétylase 1 (HDAC1) et les histones H3 et H3⁵⁰. HBx inhibe également la répression transcriptionnelle de l'ADNccc en inhibant la méthylation H3K9me3 par l'Histone Lysine N-méthyl Transférase SETDB1 et l'hétérochromatine protéine 1⁶⁴. Cette protéine virale dégrade également le facteur cellulaire Structural Maintenance of Chromosome protéine 5/6 supprimant la transcription d'HBV⁶⁵.

c. **Structure du virion et des particules sous-virales**

L'une des particularités d'HBV est la sécrétion de particules complètes (infectieuses) et incomplètes. Les particules infectieuses ou particules de Danes (Figure 8) sont des sphères de 42nm de diamètre observées dans le sang des patients infectés¹⁵ (10^9 à 10^{10} /ml). Elles sont constituées d'une enveloppe externe composée des formes S, M et L-HBsAg, de lipides et d'une nucléocapside contenant un génome viral. Lors de la production d'une nouvelle particule virale à la membrane du réticulum endoplasmique, l'ARNpg associé à Pol via sa boucle ϵ en 5' est encapsidé à l'intérieur d'une capsid virale icosaédrique de 30nm et constituée de 240 protéines HBc, afin de constituer la nucléocapside⁶⁶. L'ARNpg, ainsi protégé, est rétro-transcrit afin de donner l'ADNrc⁶⁷. Une fois cette étape de rétro-transcription accomplie⁶⁸, le complexe

ADNrc et capsid virale est enveloppé par les protéines S, M et L-HBsAg dans un rapport de 4:1:1⁶⁹ afin de former un nouveau virion complet.

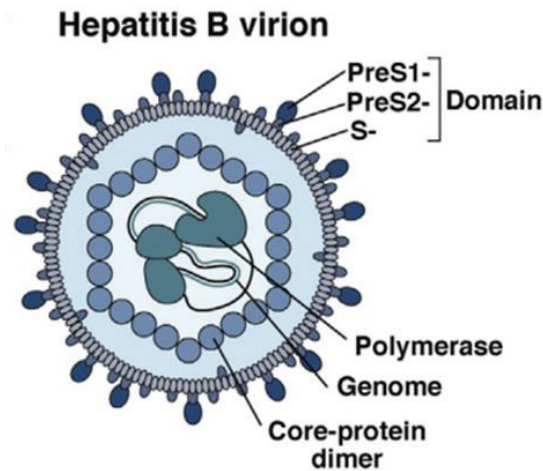


Figure 8. **Particule virale d'HBV.** Une nucléocapside contenant un ADNrc est entourée par une enveloppe composée des trois formes S, M et L-HBsAg complexées. Une polymérase est fixée à l'ADNrc et la nucléocapside est composée de 240 unités de la protéine HBc (adapté de Urban S *et al.*, Gastroenterology 2014).

En parallèle, des particules virales incomplètes déficitaires sont générées dans les compartiments tardifs du RE (Figure 9) :

- **Déficit en nucléocapside ou génome uniquement** : les sphères et filaments d'HBsAg de 20 à 25nm de diamètre constituent le premier type de ces particules sous-virales à avoir été identifié dès 1977 par Bluemberg *et al.* lors de la caractérisation de l'Ag australien. Cette forme de particules vide est retrouvée en très large excès chez les patients ($10^{14}/\text{ml}$), comparé aux particules de Dane⁷⁰. L'absence de génome viral rend ces particules non-infectieuses⁷¹. Celles-ci ont des propriétés immunogènes et sont probablement sécrétées afin de servir de leurres pour le système immunitaire par ciblage des épitopes par des Ac anti-HBsAg⁷². Ce type de particule sous-virales sont notamment utilisées en tant qu'Ag dans le développement de vaccins anti-HBV⁷³. Les sphères présentent très peu de L-HBsAg (10%) comparées aux particules de Dane tandis que cette proportion n'est pas modifiée dans les filaments.

- **Déficit en ADNrc** : cette seconde forme de particules virales incomplètes comporte une enveloppe et une capsid complète mais est vide et donc déficiente pour le génome viral⁷⁴. Elles apparaissent 100 fois plus concentrées que les particules virales complètes chez le patient ($10^{11}/\text{ml}$).
- **Déficit en ADNrc et présence d'un ARNpg** : cette troisième forme de particules virales incomplètes a été récemment identifiée et est 100 fois moins concentrée que les particules virales complètes⁷⁵ ($10^7/\text{ml}$)

De manière intéressante, bien que les trois formes de S, M et L-HBsAg soient retrouvées dans l'ensemble des particules virales complètes et incomplètes, la proportion de 4:1:1 n'est observée que pour les particules de Dane et les filaments³³.

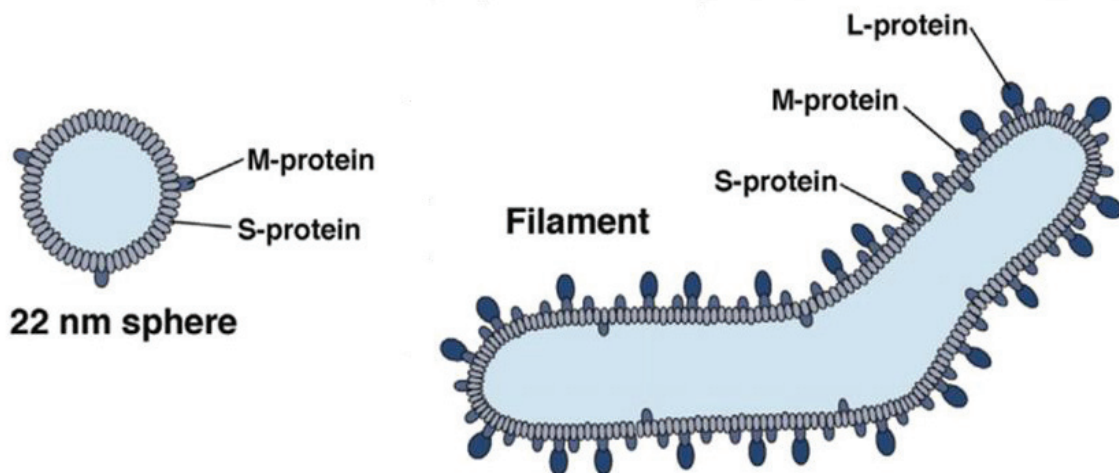


Figure 9. Particules sous-virales d'HBV. Une forme sphérique de 22nm majoritairement composées des formes S et L-HBsAg cohabite avec une forme filamenteuses composée des trois isoformes de la protéine d'enveloppe avec une proportion moindre de la L-HBsAg (adapté de Urban S *et al.*, Gastroenterology 2014).

3. Cycle viral d'HBV

a. Entrée

L'entrée d'HBV dans les hépatocytes se déroule en quatre étapes successives :

- (i) Le virus se lie tout d'abord aux hépatocytes en établissant des liaisons faibles entre les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) membranaires, la boucle antigénique et la région pré-S1 de la L-HBsAg, ce qui induit un changement

conformationnel des HBsAg composant l'enveloppe virale^{76,77,78}. Une publication récente a montré que le Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) est également un co-récepteur d'entrée d'HBV⁷⁹ et est situé à proximité du récepteur Na⁺ Taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP).

- **(ii)** Cette modification permet l'interaction entre le domaine pré-S1 myristoylé des L-HBsAg de l'enveloppe d'HBV et le récepteur NTCP⁸⁰. C'est un récepteur de transport des acides biliaires encodé par le gène *SLC10A1* et impliqué dans leur métabolisation.
- **(iii)** Une fois l'interaction faite entre ce récepteur et le virion, le complexe est endocyté.
- **(iv)** Le virion est désassemblé afin de libérer la nucléocapside. L'exposition du signal d'adressage au noyau et sa phosphorylation à l'extrémité C-ter de la protéine HBc entraîne son importation vers le noyau.

D'autres récepteurs non-spécifiques des hépatocytes, tels que les récepteurs purinergiques⁸¹, seraient également impliqués. Taylor *et al.*, ont montré qu'une inhibition de ces récepteurs empêchait l'entrée d'HBV et HDV *in vitro*⁸².

b. Formation du mini-chromosome

Après l'entrée de la nucléocapside dans le noyau, celle-ci est retenue au niveau du panier nucléaire⁸³. Les trimères d'HBc sont désassemblés afin de libérer l'ADNrc⁵². Cet ADN viral présentant une section ADNsb est alors réparé pour former l'ADNccc (Figure 10). Mais les mécanismes cellulaires impliqués dans cette réparation restent à être confirmés :

- **(i)** La polymérase virale, à l'origine de la rétro-transcription de l'ARNpg en ADNrc et fixée en 5' de manière covalente, est retirée afin de générer un ADNrc déprotéinisé⁸⁴.
- **(ii)** Le primer ARN, situé sur le brin positif et nécessaire à la rétro-transcription de l'ARNpg et des séquences terminales redondantes présentes sur le brin négatif sont retirés⁸⁵.
- **(iii)** La section ADNsb est réparée afin de former un ADNdb, probablement en détournant la polymérase cellulaire κ ⁸⁶.
- **(iv)** Suite à la réparation les deux extrémitées sont liées afin de former un ADN pleinement db.

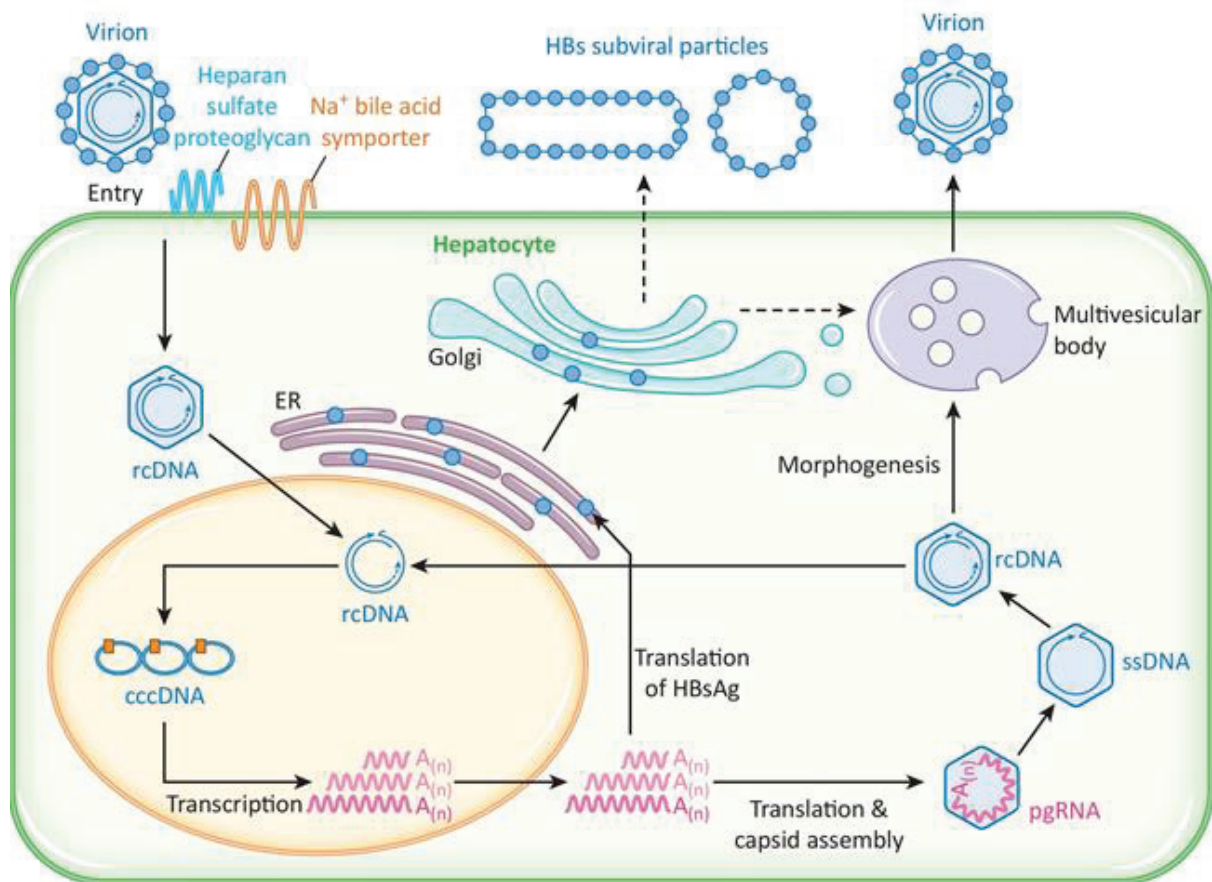


Figure 10. Cycle viral simplifié d'HBV. (adapté de Shih C *et al.*, 2018 Trends in Microbiology)

L'ADNccc formé sert ensuite de matrice pour la transcription par la polymérase cellulaire II. Toutefois cet ADN viral, replié en minichromosome persistant dans le noyau des hépatocytes⁸⁷, serait régulé comme un chromosome classique, arborerait des nucléosomes et exploiterait la machinerie cellulaire. Pollicino *et al.* ont montré que l'état transcriptionnel de l'ADNccc est impacté par les statuts d'acétylation et méthylation des histones H3 et H4 fixés à celui-ci⁴⁹. Un phénomène similaire a été observé sur l'ADNccc du DHBV avec une inhibition de sa transcription et une modulation de l'acétylation de l'histone H3 après traitement par des inhibiteurs d'histone déacétylase ou par de l'Interféron (IFN)- α ⁸⁸. La protéine HBx régule également l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc⁵⁰ en modulant la transcription de gènes impliqués dans les mécanismes de régulation épigénétique, et son absence est associée à une inhibition de la transcription virale⁸⁹. HBc en fait de même en modulant l'espacement entre les nucléosomes⁹⁰. Le génome d'HBV est également capable de

s'intégrer dans l'ADN humain, pouvant alors être à l'origine de l'initiation et de la progression du Carcinome Hépatocellulaire (CHC) en induisant une instabilité chromosomique ou en altérant la fonction du gène où le génome viral est intégré⁹¹.

c. Transcription des ARN, encapsidation et rétro-transcription

L'ADNccc sert de matrice pour la transcription par la polymérase cellulaire II des cinq ARN viraux précédemment décrits (Figure 10). Ceux-ci partagent la même extrémité polyA, portent un complexe de coiffe en 5' et sont traduits en protéines virales par les ribosomes cellulaires. L'un de ces ARN, l'ARNpg, encode les protéines HBc et Pol. Il constitue également la matrice pour l'activité de rétro-transcription de la polymérase virale en permettant sa fixation à la boucle ϵ de 137nt située en 5'. Cette interaction permet le recrutement des trimères de dimères d'HBc phosphorylés au niveau des Ser155, Ser162 et Ser170⁹² et ainsi l'initiation de l'encapsidation. Une fois encapsidé, la reconnaissance par la Tyr63 de la Pol fixée au premier nucléotide de l'ARNpg initie la rétro-transcription. Après synthèse de l'ADNrc, l'activité ARNase de la Pol dégrade la matrice d'ARNpg excepté un primer d'ARN situé à son extrémité 5'. Les nouvelles capsides virales contenant l'ADNrc sont alors enveloppées⁹³ ou recyclées vers le noyau afin de renouveler l'ADNccc⁹⁴.

d. Assemblage des particules virales et sécrétion

Le signal pour l'enveloppement de la capside virale n'a pas encore été clairement défini. L'une des hypothèses soulevées est une augmentation de la rigidité de la nucléocapside suite à la rétro-transcription de l'ARNpg en ADNrc. Cette modification des propriétés physiques entraînerait un risque de rupture contrebalancé par le recrutement des protéines HBsAg⁹⁵. La nucléocapside est exportée à la membrane cytoplasmique du RE où sont ancrées les formes S, M et L d'HBsAg assemblées sous formes d'homo et hétérodimères reliés par des ponts disulfures⁹⁶ (Figure 10). L'ancrage des protéines S et M-HBsAg ne diffère pas des domaines transmembranaires I à IV. Toutefois, l'ancrage de la protéine L-HBsAg présente deux conformations distinctes :

- Une conformation conserve le domaine I intra-membranaire, permettant l'exposition des domaines pré-S1 et pré-S2 dans le RE et leur glycosylation.

- Une seconde conformation permet d'exposer le domaine I dans le cytosol. Les domaines pré-S1 et pré-S2 précédemment dans la lumière du RE se retrouvent alors également exposés.

Lorsque ces domaines sont exposés dans le cytosol, les domaines pré-S1 et pré-S2 reconnaissent l'HbC dimérisé afin d'envelopper la capsid⁹⁷ (Figure 11). La dimérisation des protéines HBsAg permet également l'intégration à cette nouvelle enveloppe virale de formes de L-HBsAg exposant leurs domaines pré-S1 et pré-S2 à la lumière du RE et ne pouvant interagir avec la capsid virale. L'exposition des domaines pré-S1 et pré-S2 à l'extérieur du virion facilite l'entrée dans une nouvelle cellule à infecter. Le virus détourne ensuite l'Endosomal Sorting Complexes Required for Transport cellulaire afin d'être sécrété par la voie des multivesicular bodies et de se dissocier de la membrane cellulaire⁹⁸.

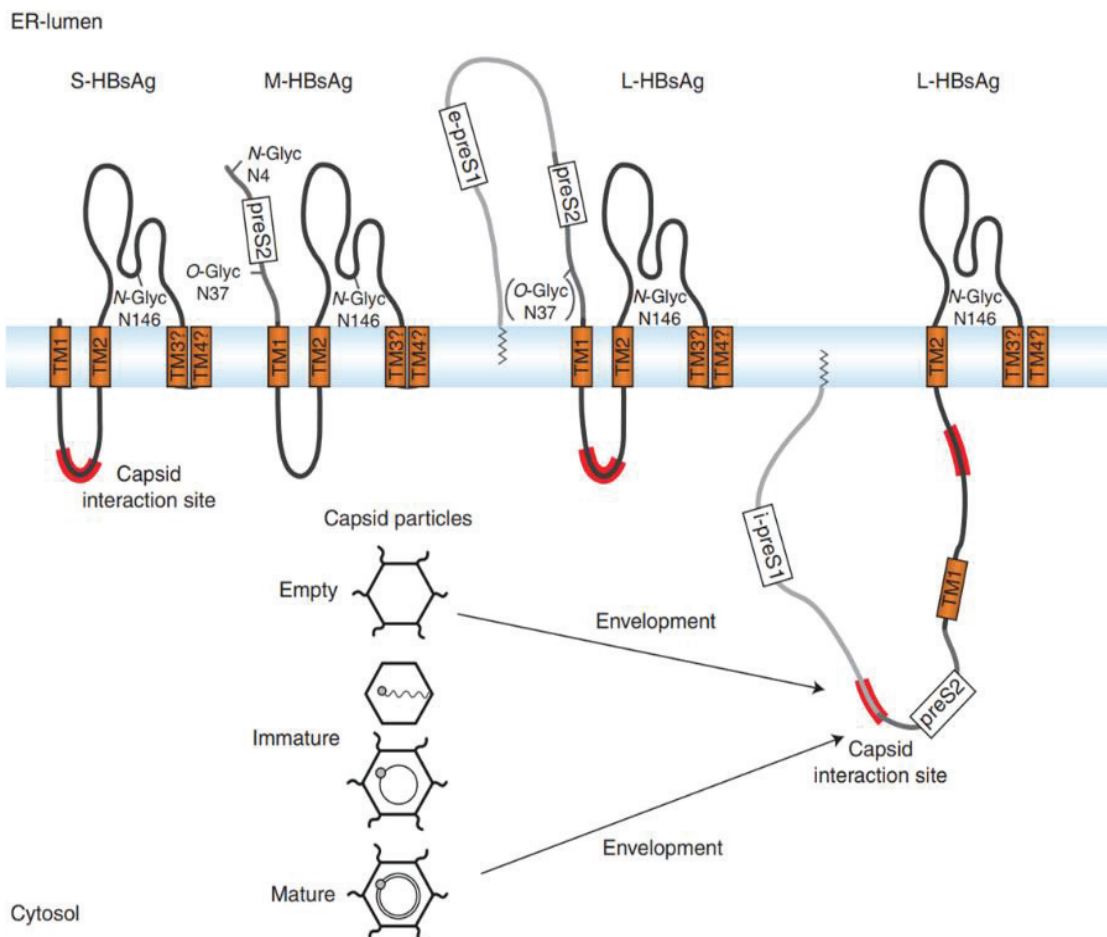


Figure 11. Ancrages des trois formes de HBsAg dans la membrane du RE. Les protéines S, M et L-HBsAg présente un ancrage similaire avec quatre domaines transmembranaires (TM) créant une première boucle cytosolique et une seconde boucle dans la lumière du RE. La protéine L-HBsAg présente également un ancrage dans la membrane n'impliquant pas le TM1. Celui-ci est alors exposé dans le cytosol avec l'extrémité N-ter de la protéine comportant les domaines pré-S1, pré-S2 et un site d'interaction avec la capsid (adapté de Selzer L *et al.*, 2015 Cold Spring Harb Perspect Biol).

ii. Physiopathologie de HBV

1. Aspect clinique

a. Infection

L'infection à HBV se transmet de deux manières :

- **Transmission verticale** : cette transmission de la mère à l'enfant a lieu lors de l'accouchement et est particulièrement observée dans les pays en voie de développement et à forte endémicité. L'enfant reste toutefois vulnérable à cette transmission pendant les six premières semaines de sa vie avant de recevoir la première injection vaccinale⁹⁹. Les bébés concernés présentent alors une très forte charge virale et un taux d'HBeAg positif. Il est intéressant de noter que l'allaitement n'augmente pas le risque de transmission d'HBV et ne doit donc pas être déconseillé.
- **Transmission horizontale** : cette transmission d'un individu infecté à un individu sain non-vacciné, majoritairement liée à une exposition à des produits sanguins contaminés, touche particulièrement les usagers de drogues, les patients recevant des transfusions sanguines ou des actes de soin dans des conditions non-contrôlées et les partenaires de relations sexuelles non-protégées¹⁰⁰. Les infections chroniques issues d'une transmission horizontale depuis les parents sont principalement observées chez les individus jeunes où le passage de l'infection à la chronicité est fréquent¹⁰¹.

Quatre types de cas sont alors observés chez le patient, chacun se traduisant par une acquisition différente ou un stade différent de l'infection. Selon les définitions du Center for Disease Control and Prevention Américain, on différenciera alors les patients à :

- **Infection aigüe** (Figure 12) (HBsAg et IgM anti-HBc positifs) qui après un temps d'incubation sera le plus souvent asymptomatique ou se traduira par une asthénie, des arthralgies et une jaunisse (OMS). Dans les semaines suivant l'exposition au virus, celui-ci sera éliminé, ce qui se traduira par une disparition

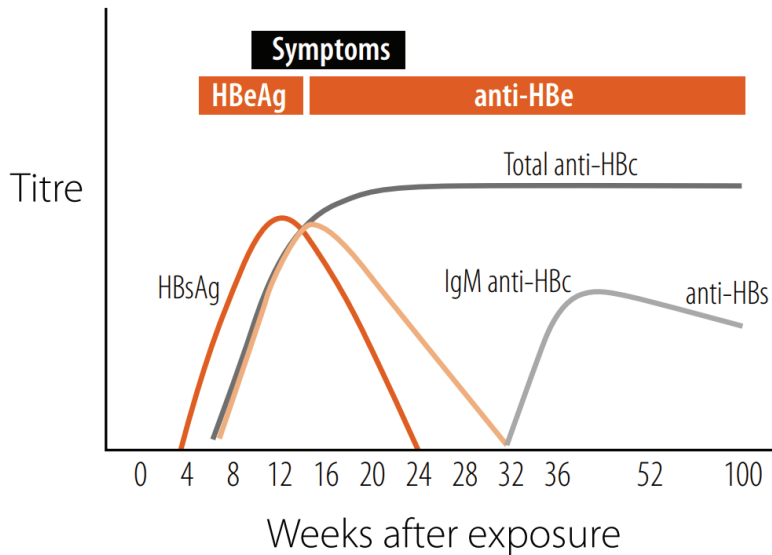


Figure 12. **Historique d'une infection HBV aiguë.** Après une courte période d'incubation, une réplication virale active transitoire est observée (HBsAg, HBeAg élevés). Une asthénie généralisée et jaunisse peuvent également être associées. A long terme les marqueurs sériques diminuent tandis que des Ac anti-HBeAg et HBsAg apparaissent (adapté de B Positive).

des HBsAg sériques et l'apparition d'Ac anti-HBsAg. Des Ac anti-HBc apparaissent plus précocement.

- **Infection chronique** (Figure 13) (Absence d'Immunoglobuline (Ig) M anti-HBc et HBsAg, HBeAg ou ADN HBV sériques positifs, ou HBeAg, HBsAg ou ADN HBV sériques positifs lors de deux dosages espacés d'au moins six mois) qui consiste en un passage à la chronicité d'une infection aiguë. C'est souvent le signe d'un échec de la réponse immunitaire anti-HBV, principalement observée chez les patients jeunes¹⁰².

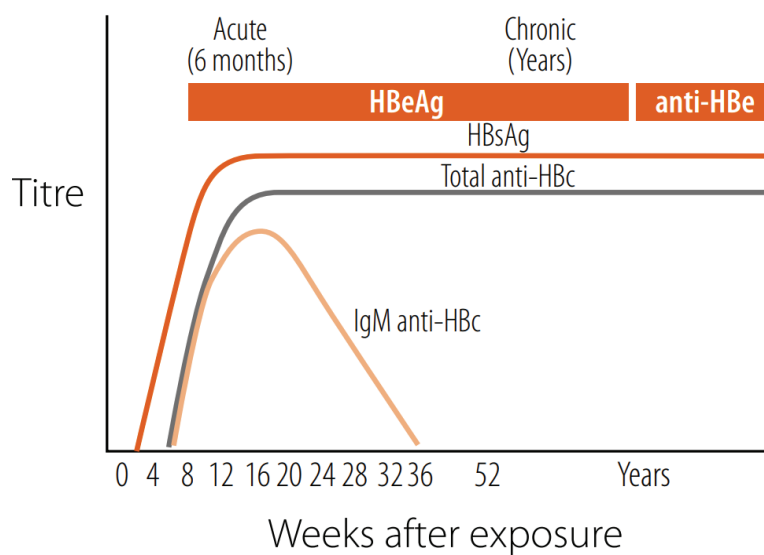


Figure 13. **Historique d'une infection HBV chronique.** Contrairement à une infection aiguë, le système immunitaire de l'hôte ne parvient pas à lutter efficacement contre HBV, ce qui se traduit par des taux élevés d'HBe, d'HBsAg et d'Ac anti-HBc à long terme (adapté de B Positive)

- **Infection périnatale** (enfant d'âge < 24 mois né d'une mère HBV positive et HBsAg, HBeAg ou ADN HBV sériques positifs).
- **Infection occulte** caractérisée par des ADN HBV sériques mesurables en l'absence d'HBsAg. Ces nouveaux cas, jusque-là ignorés, ont été identifiés grâce à l'amélioration de la sensibilité des tests de dépistage et sont probablement la conséquence de la persistance de l'ADNccc viral dans les hépatocytes des patients HBsAg négatifs¹⁰³.

Une infection chronique à HBV est segmentée en différentes phases caractérisées¹⁰⁴ (Figure 14) :

- **La phase d'immunotolérance ou phase d'infection HBeAg positive** : celle-ci se caractérise par une forte réplication virale et une faible inflammation hépatique chez le patient. Elle apparaît au tout début de l'infection par HBV et est marquée par une très forte charge virale, un foie normal à l'analyse histologique, des taux d'ALT et AST normaux et des taux sériques élevés d'ADN HBV (>20 000 Unités Internationales (UI)/ml) et HBeAg. Cette phase, majoritairement observée chez les patients infectés lors de l'enfance ou à la naissance, persiste pendant des années et est associée à un faible risque de développement de pathologies hépatiques¹⁰⁵.
- **La phase d'immunoréactivité ou phase d'hépatite chronique HBeAg positive** : elle est définie par une réponse immunitaire anti-HBV active. Le système immunitaire de l'hôte reconnaît alors l'agent exogène et induit une réponse cytotoxique contre les hépatocytes infectés. Les conséquences pour le virus sont une chute de la charge virale et l'apparition de marqueurs de lutte contre l'infection tels qu'une augmentation du taux d'ALT. A ce moment les paramètres de l'infection varient fortement avec à terme l'apparition d'Ac anti-HBeAg et la disparition des HBeAg sériques. Cette inflammation est responsable de l'apparition de fibrose et de cirrhose.
- **La phase de contrôle immunitaire** : lors de cette phase les patients développent des Ac anti-HBeAg, présentent des taux d'ALT normaux, une charge virale très faible dans le sérum (<2 000 UI/ml) et un fonctionnement

hépatique normal. Une séroconversion précoce avant l'apparition de signes d'atteinte hépatique est un bon pronostic pour le patient. 0,1 à 2% d'entre eux développent des Ac anti-HBsAg menant à l'élimination virale de la circulation sanguine et améliorant le pronostic¹⁰⁶.

- **La phase d'échappement immunitaire** : Chez environ un patient sur dix, le virus parviendra à échapper au système immunitaire après plusieurs années, ce qui se traduira par une augmentation des marqueurs de réplication et d'inflammation hépatique¹⁰⁷. Ces patients présenteront alors des taux sériques d'HBeAg faibles accompagnés d'Ac anti-HBeAg et des ADN HBV détectables (>2 000 UI/ml). Ce profil est également récurrent chez les patients en phase de contrôle immunitaire ayant suivi un traitement immunosuppresseur¹⁰⁸.

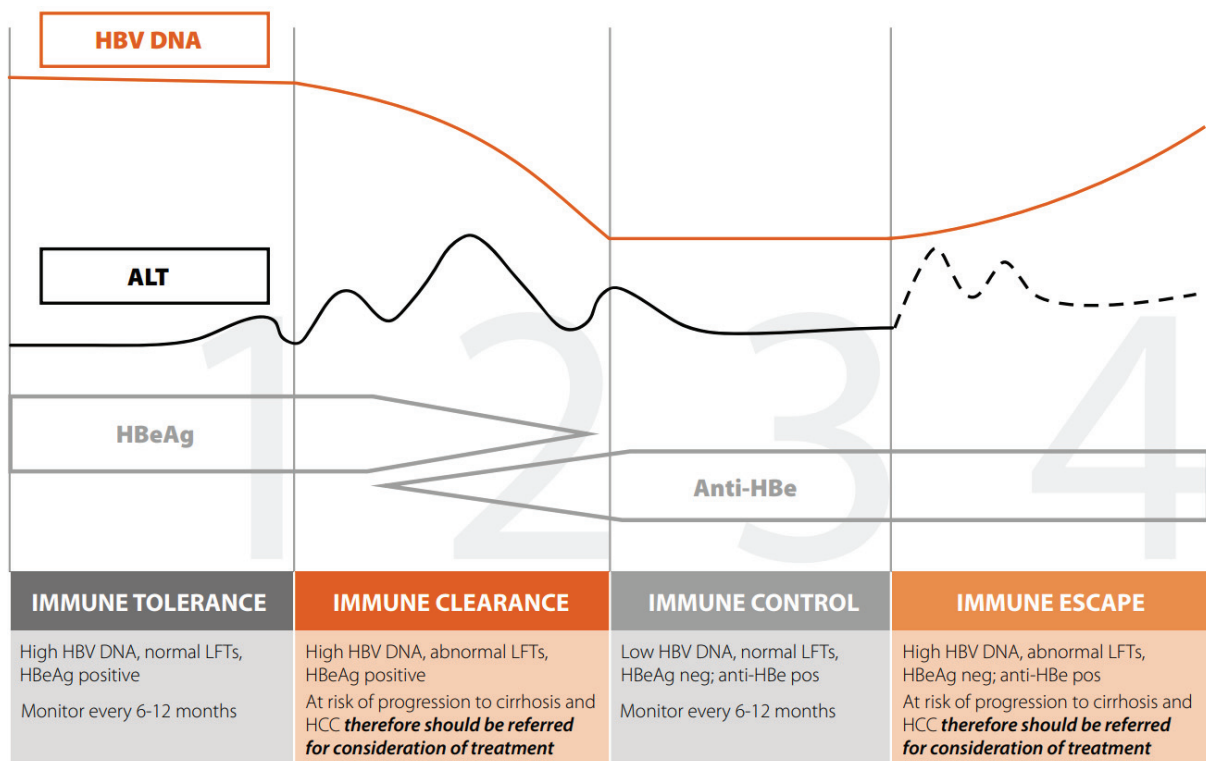


Figure 14. Représentation schématique des différentes phases d'une infection par le virus de l'Hépatite B. Lors de l'exposition au virus, une phase d'immunotolérance se traduisant par une forte activité virale (ADN HBV sériques élevés, présence d'HBeAg) et aucune conséquences cliniques (ALT normales) est observée chez le patient. Par la suite lors de la phase d'immunoréactivité, une atteinte clinique devient mesurable (ALT élevées), associée avec une diminution des marqueurs d'activité virale et l'apparition d'Ac anti-HBeAg. Pendant la troisième phase de contrôle immunitaire les HBeAg et les ADN HBV ont disparus ou sont difficilement mesurables et les taux d'ALT sont normaux (adapté de B Positive). Chez environ 10% des patients, une quatrième phase consistant en une réactivation de l'infection sera observée après de nombreuses années de contrôle du virus, se traduisant par une inflammation hépatique et une activité répliquative du virus élevée (adapté de B Positive)

b. Cirrhose hépatique

La cirrhose est définie comme le développement de nodules anormaux entourés de bandes fibreuses et représente le dernier stade la fibrose hépatique. Suite à une phase de fibrose dite « compensée » asymptomatique, une phase « décompensée » cirrhotique voit apparaître des dysfonctionnements hépatiques par alération des fonctions des hépatocytes et une hypertension¹⁰⁹. Des complications comme de l'ascite, des syndromes hépatorénaux, hépatopulmonaires ou des infections peuvent alors survenir, aggravant le pronostic¹¹⁰. 70 à 90% des patients cirrhotiques infectés par HBV développeront un CHC¹¹¹, toutefois ceci n'est pas un critère obligatoire mais montre que les patients HBV positif et cirrhotiques doivent être surveillés pour le développement d'un CHC.

c. Hépto-carcinome

Près de 600 000 cas de ce cancer touchant le foie sont observés annuellement selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), classant alors le CHC comme le 5^{ème} cancer le plus répandu et le 2^{ème} en terme de mortalité¹¹² (Figure 15). Près de 80% des cas de CHC sont imputables à HBV ou au virus de l'hépatite C (HCV), ces deux facteurs multipliant le risque de développer ce type de cancer par vingt ou cent fois selon les études^{113,114}. Près de 54% des CHC ont pu être attribués à l'infection par HBV¹¹⁵, ces cas étant principalement observés dans les pays en voie de développement. Plusieurs facteurs favorisent le développement d'un CHC tels que : des prédispositions génétiques¹¹⁶, des facteurs environnementaux comme l'alcool¹¹⁷ et l'aflatoxine¹¹⁸ et des infections¹¹⁹ (HBV, HCV & HDV).

De manière générale, HBV n'est pas un virus cytopathique, les dommages au foie observés résultant principalement d'une réponse immunitaire persistante de l'hôte. Une forte charge virale et un taux élevé d'HBsAg dans le sérum des patients constituent des facteurs de mauvais pronostic de développement d'un CHC chez les patients infectés par HBV, avec un risque multiplié par deux lorsque la charge virale mesurée est supérieure à 10^4 copies/ml¹²⁰. Comparé aux patients non-infectés, le risque de développer un CHC, lorsqu'un individu est infecté par HBV, est dix à vingt-cinq fois supérieur¹²¹. Le génotype C d'HBV est également un facteur favorisant¹²².

L'une des raisons expliquant la forte incidence des CHC chez les patients infectés par HBV est l'inflammation hépatique chronique induite par le virus¹²³. La régulation de l'immunité adaptative par le virus en activant la sénescence des lymphocytes Th1 CD4⁺ et CD8⁺¹²⁴ réduit la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses. Le virus favorise également les cancers du foie via une activité oncogénique directe :

- **Une activation de proto-oncogènes ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur**¹²⁵ : c'est la conséquence de l'insertion précoce de fragments de génome viral dans le génome du patient et constaté dans 80% des cas de CHC¹²⁶.
- **Une instabilité chromosomique** : HBV favorise les recombinaisons chromosomiques et altère les mécanismes de la mitose¹²⁶.
- **Une altération des fonctions cellulaires** : HBx module la prolifération cellulaire, le stress oxydatif, l'apoptose, les marques épigénétiques et les mécanismes de réparation de l'ADN de la cellule¹²⁷.
- **Une altération des fonctions cellulaires** : l'accumulation intra-RE de la L-HBsAg active des mécanismes pro-tumoraux tels que le stress oxydatif et des mécanismes de réponse au dommage de l'ADN¹²⁸. Cette protéine est également capable de moduler le cycle cellulaire et ainsi favoriser la prolifération cellulaire¹²⁹.

Estimated cumulative risk of incidence in 2018, liver, both sexes, ages 0-74

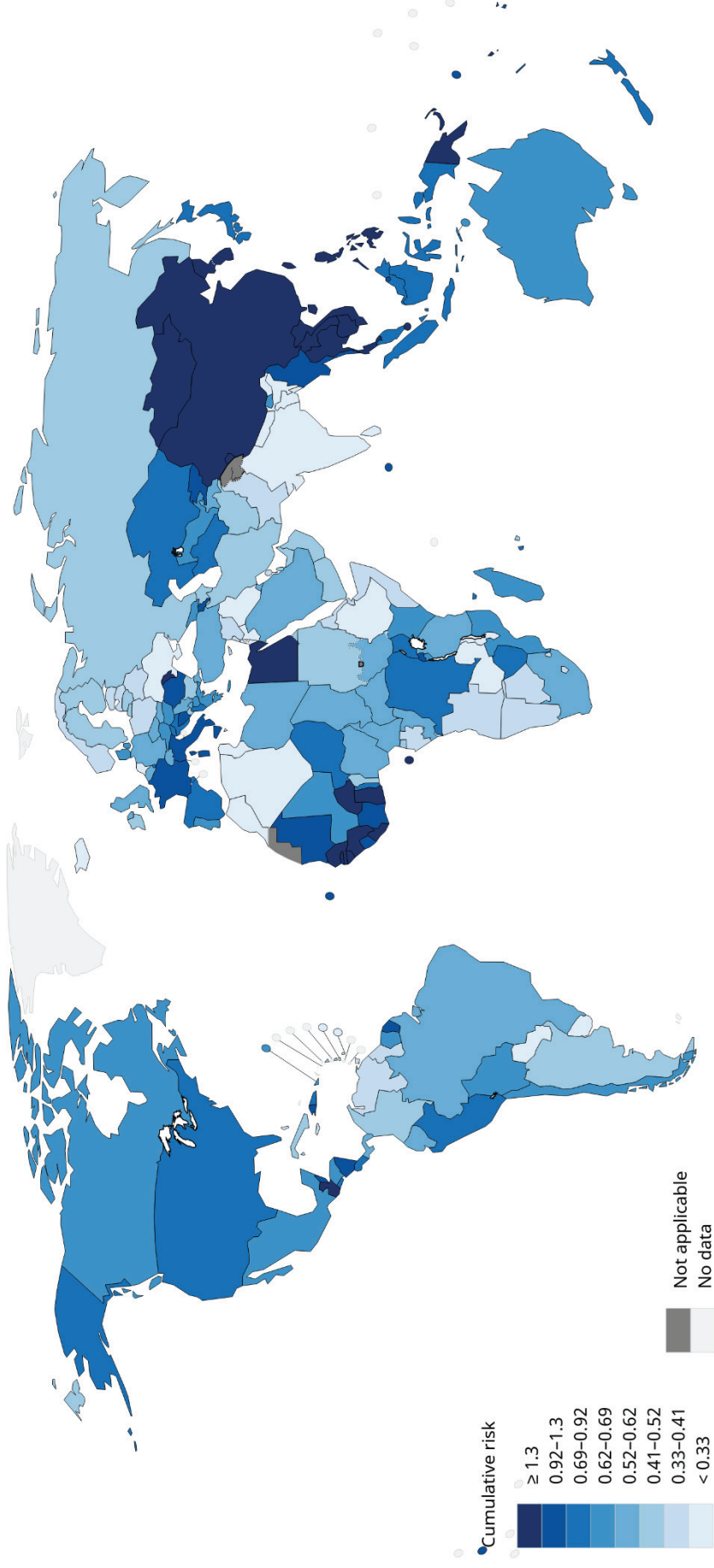


Figure 15. **Incidence globale des cas de carcinome hépatocellulaire en 2018.** Les cas de CHC sont majoritairement observés en Afrique de l'Ouest et Asie du Sud-Est, zones d'endémie du génotype A1 et en Asie de l'Est, zone d'endémie du génotype C. De plus ces deux génotypes sont considérés comme des facteurs favorisant l'apparition de CHC comparé aux autres génotypes d'HBV (généré grâce aux données de l'International Agency for Cancer Research : <https://gco.iarc.fr/today/home>).

2. Épidémiologie

La distribution des foyers d'endémie d'HBV varie de par le monde. Cette prévalence est élevée dans le Pacifique Ouest et en Afrique avec près de 6% de patients porteurs ; et plus faible au Moyen-Orient, en Asie du Sud-Est, en Europe et en Amériques avec respectivement 3,3%, 2%, 1,6% et 0,7¹³⁰. Toutefois ces statistiques ne représentent pas les subtilités locales avec des taux de prévalence variant énormément d'un état à l'autre dans une même région du monde. Lorsque l'on se penche sur le cas de l'Europe (Figure 16), on constate une prévalence plus élevée dans les pays de l'Est (<5%) et les pays du Sud (<2%) comparé au Nord (<1,5%) et à l'Ouest¹³¹ (<1%). La méta-analyse de Schweitzer *et al.*, réalisée en 2015 et synthétisant un très grand nombre d'études épidémiologiques réalisées entre 1965 et 2013 a conclu à 248 million d'individus porteurs chroniques de l'infection à HBV¹³².

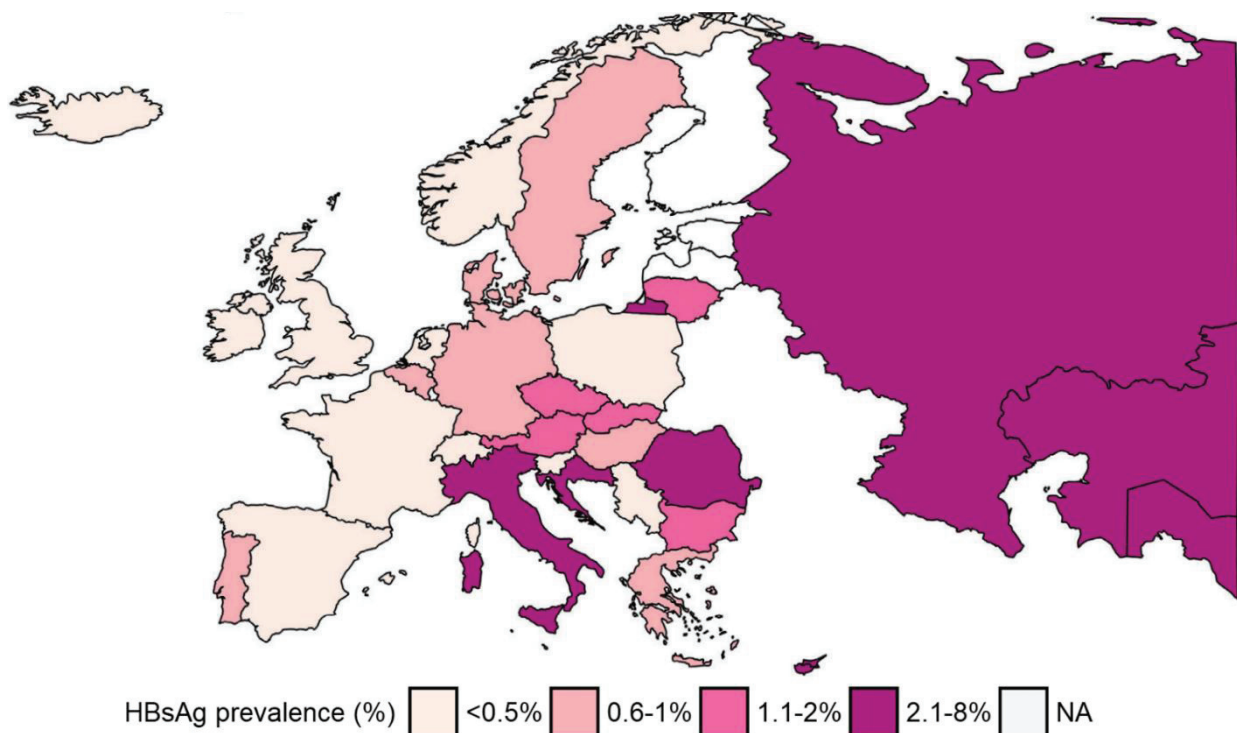


Figure 16. Incidence Européenne d'HBsAg. (Adapté de l'EASL HEAPHEALTH Project Report & généré selon les données de Schweitzer *et al.*, 2015)

Trois ans plus tard, l'OMS estime à 257 millions le nombre de patients infectés (Figure 17), avec toutefois une majorité de patients nés avant la distribution du vaccin, ce nombre ne traduit donc pas l'impact à long terme sur l'infection¹³³. Mais cette prévalence est largement influencée par l'âge de l'infection, en effet 90% des enfants infectés progresseront vers la chronicité contre uniquement 5% des adultes immunocompétents¹³⁴. La vaccination des populations jeunes est donc une étape critique pour un contrôle à long terme de l'infection à HBV. La recommandation de cette vaccination en 1992 a ainsi entraîné un recul de l'infection dans les pays développés. Désormais la majorité des pays ont implémenté la vaccination des enfants mais nous ne verrons les effets de cette procédure que d'ici quelques dizaines d'années. Toutefois cette recommandation n'a été appliquée que partiellement dans les pays en voie de développement, ce qui se traduit par une augmentation des inégalités entre pays riches et pays pauvres¹³⁵. La proportion d'enfants infectés diminue depuis 30 ans, avec seulement 1,3% des enfants de moins de 5 ans présentant une infection à HBV en 2015 selon l'OMS. Cette valeur reste à modérer avec une inégalité d'accès aux traitements générant des disparités¹³⁶. Les nouvelles migrations du XXI^{ème} siècle redistribuent également les foyers d'infections à HBV vers les pays industrialisés à faible prévalence¹³⁷. Toutefois en restant en cercles restreints pour des raisons sociaux-culturelles, ces mouvements de population n'entraînent que très peu de transmissions vers les habitants de ces pays. Une étude récente suggère que les infections virales constituent désormais la 7^{ème} cause de morbidité et mortalité mondiale avec 1,45 millions de morts par an¹³⁸. Ces disparités régionales sont également imputables aux comportements différents des virus selon le génotype considéré et résumés en table 2.

Tab. 2. Conséquences cliniques des génotypes et sous-génotypes principaux d'HBV. (adapté de Tong S *et al.*, 2016)

Génotype	Localisation	Conséquences cliniques
A	A1 : Afrique & Asie du Sud-Est A2 : Europe, Amérique du Nord	<ul style="list-style-type: none"> • Risque élevé de transmission périnatale et de CHC avec A1 • Risque élevé de transmission sexuelle et de passage à la chronicité avec A2
B	B1 : Japon B2 : Asie de l'Est B3 : Indonésie, Philippines & Chine	<ul style="list-style-type: none"> • Risque élevé de cirrhose & CHC • Bonne réponse aux thérapies IFN comparée au génotype C
C	C1-C3 : Asie du Sud-Est & de l'Est C4 : Australie C6-C16 Indonésie	<ul style="list-style-type: none"> • Séroconversion HBeAg plus tardive • Risque élevé de cirrhose & CHC comparé au génotype B
D	D1 : Moyen-Orient D2 : Europe & Afrique D3 : Ubiquitaire D5 : Inde D7 : Afrique	<ul style="list-style-type: none"> • Risque élevé de transmission horizontale • Pathologies hépatiques plus sévères que A2
E	Afrique Centrale & de l'Est	
F	Amérique Centrale & du Sud	• Risque élevé de CHC précoce
G	Populations homosexuelles	• Co-infection fréquente avec HIV & les génotypes HBV A & H
H	Mexico & Nicaragua	
I	Chine du Sud, Vietnam, Laos et Inde	<ul style="list-style-type: none"> • Prévalence plus élevée chez les hommes que chez les femmes • Risque élevé de CHC

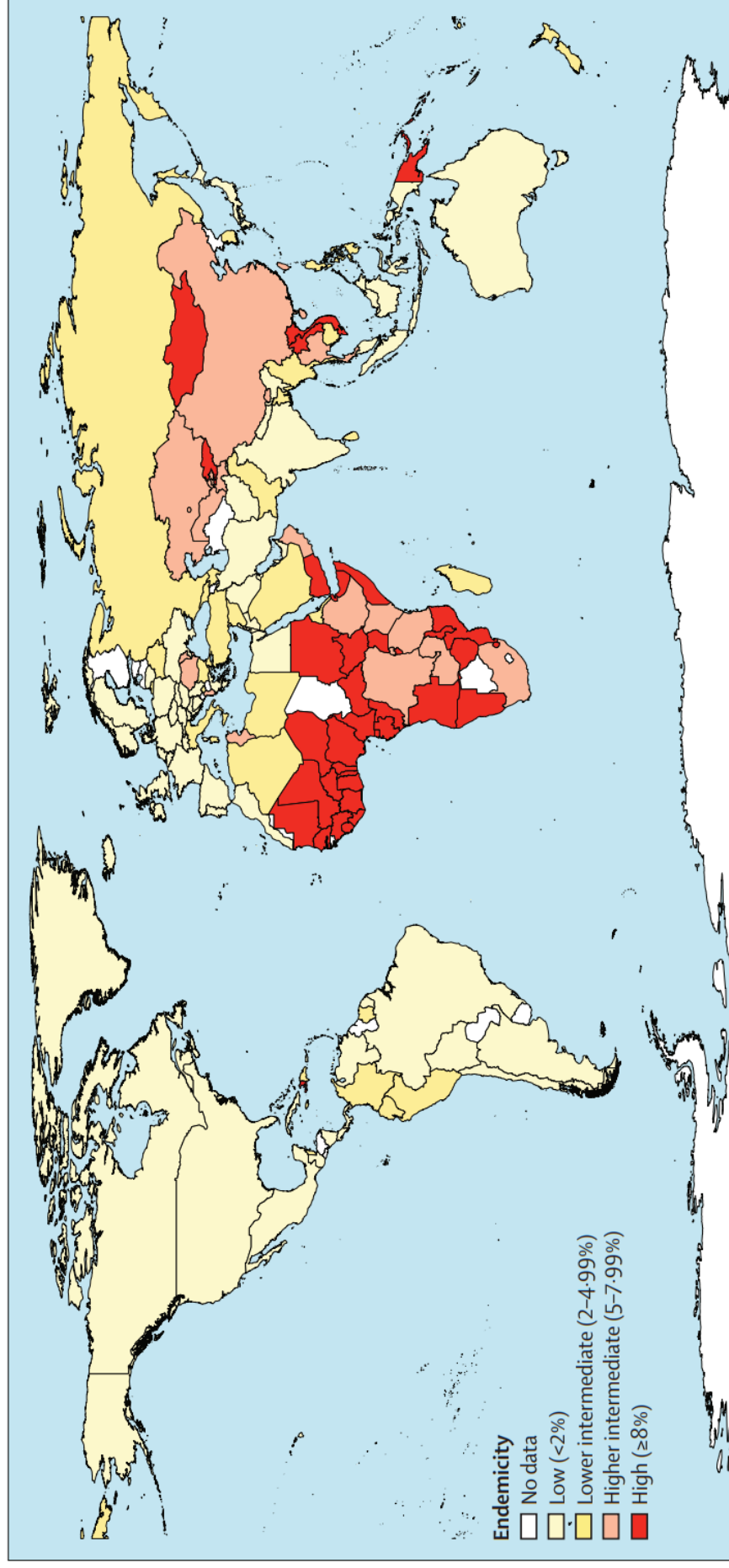


Figure 17. **Incidence mondiale d'HBsAg.** La très grande majorité des cas d'HBV sont localisés en Afrique subsaharienne et en Afrique de l'Est, zones où l'accès aux soins est limité. Des foyers endémiques sont également observés en Asie, notamment en Mongolie et en Asie du Sud-Est (adapté de Schweitzer et al., 2015)

3. Dépistage et diagnostic d'HBV

Le dépistage de l'infection par HBV passe par l'évaluation du taux d'HBsAg dans le sérum du patient. Ce test est utilisé en routine quel que soit le pays considéré afin d'évaluer si un individu est porteur, ou non, de l'infection. Une fois la possibilité d'une infection par HBV soulevée, celle-ci est confirmée ou infirmée en évaluant les taux d'HBc et d'ADN HBV dans le sérum. Si ces deux derniers paramètres apparaissent augmentés, le médecin conclue alors à une hépatite virale en phase aiguë. Le portage chronique est confirmé lorsque les HBsAg restent positifs pendant 6 mois. Le dosage des HBsAg sanguins constitue un « gold standard » permettant d'évaluer à la fois le statut de l'infection à HBV, mais également le risque de développer un CHC ou de réactivation de la réplication après traitement par des analogues de nucléosides¹³⁹.

Une fois le dépistage établi, le diagnostic d'HBV est scindé en sept étapes (Figure 18) en se fondant sur les recommandations 2017 de l'European Association for Study of the Liver (EASL) :

- **(i)** La première chose à faire est d'initier un dépistage des partenaires sexuels et une évaluation complète de l'activité de l'hépatite par dosage de différents marqueurs (AST/ALT, bilirubine, γ Glutamyl-Transférase, albumine sérique, numération de la formule sanguine, γ -globulines). Une étude directe du foie par imagerie ultrasonore est systématiquement entreprise et sera renouvelée deux fois par an afin d'estimer l'état de fibrose et diagnostiquer un potentiel CHC précoce. Selon les résultats précédents, une biopsie ou une étude de la rigidité du foie par élastographie peut avoir lieu après prescription par un spécialiste afin d'évaluer la fibrose et l'inflammation locale¹⁴⁰. Selon le stade de fibrose, un score de 1 à 4 sera délivré, 1 correspondant à une fibrose limitée et 4 à une fibrose cirrhotique. La sévérité de la maladie hépatique est également évaluée en étudiant les possibles atteintes extra hépatiques (splénomégalie, encéphalopathie, périartérite noueuse) qui peuvent survenir chez 10 à 20% des patients¹⁴¹.
- **(ii)** Les niveaux sériques d'HBeAg, HBc et d'anti-HBeAg/HBc sont mesurés afin de déterminer le stade de l'infection. La présence d'HBeAg signifie alors que le patient est en phase d'immunotolérance ou d'immunoréaction tandis que

l'absence d'HBeAg indique une transition vers la phase de contrôle immunitaire.
Un Taux d'HBc élevé indique une infection aiguë.

- **(iii)** L'activité virale est évaluée par mesure des taux d'ADN HBV sériques afin d'estimer l'évolution depuis le dépistage et affiner le stade de l'infection et la prise en charge thérapeutique.
- **(iv)** La quantification des HBsAg sérique permet d'affiner les précédents résultats dans les cas des patients HBeAg négatifs ou sous traitement par l'IFN- α .
- **(v)** Le génotype d'HBV impliqué est déterminé afin d'évaluer le risque de CHC et de permettre la prise en charge à long terme de l'infection et notamment la possibilité d'un traitement par l'IFN- α .
- **(vi)** Les co-morbidités telles que l'alcoolisme, les maladies impactant le système immunitaires ou métaboliques et les possibles co-infections (HDV, HCV et Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV)) influençant le devenir de la maladie sont alors prises en compte.
- **(vii)** La recherche d'Ac anti-virus de l'hépatite A (HAV) est réalisée.

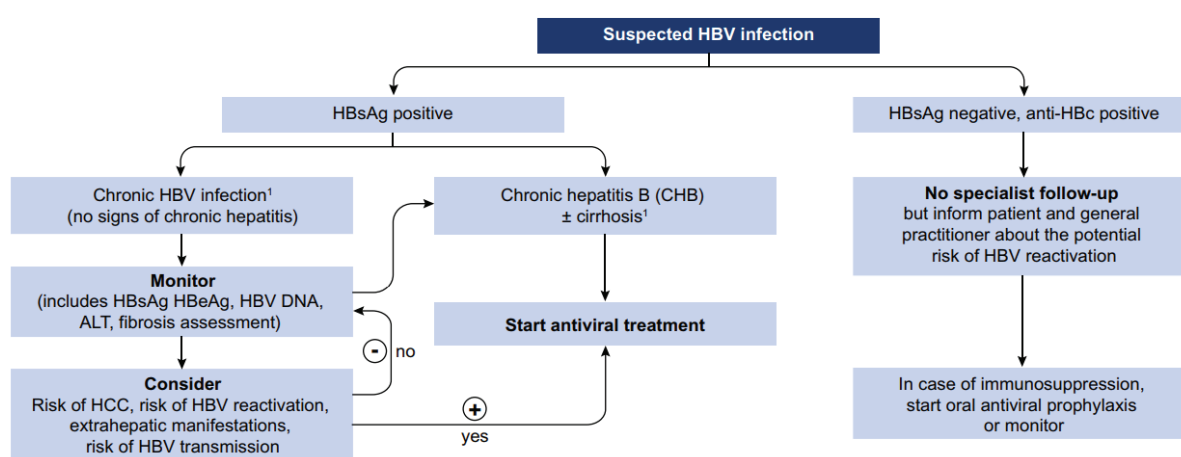


Figure 18. Algorithme de diagnostic de l'infection HBV. Lors d'une suspicion d'infection HBV, le statut HBsAg positif ou négatif du patient est déterminé en premier. Dans un second temps, des signes d'hépatite chronique sont recherchés chez le patient HBsAg positif. Si ceux-ci sont avérés alors celui-ci est placé sous traitement. Si aucun signe d'hépatite n'est visible, les autres paramètres d'infection (HBeAg, ADN HBV) et d'inflammation (ALT, fibrose) sont évalués afin de confirmer ou infirmer l'absence d'hépatite chronique. Si aucun diagnostic d'hépatite HBV n'a pu être établi, les risques annexes (CHC, atteintes extra-hépatiques) sont étudiés. S'il apparaît que l'un de ces phénomènes est présent chez le patient, celui-ci est placé sous traitement (adapté des EASL Guidelines, 2017).

Les conséquences futures de l'infection telles que le CHC sont également dépistées. Lors des contrôles semi-annuels de l'infection, une étude du foie par

tomographie ou Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) permet de visualiser la possible apparition de tumeurs. Une fois la possibilité de cancer soulevée, une étude des nodules par IRM, échographie de contraste ou dosage de l'alpha foeto-protéine permet de confirmer le diagnostic¹⁴². Enfin l'étude histologique par biopsie n'est pas toujours nécessaire mais peut être réalisée.

4. Vaccination

Le vaccin contre HBV est efficace afin de lutter contre la transmission de la maladie. Existant depuis 1982, les campagnes de vaccinations nationales ont débuté dans les années 1990¹⁴³ avec une recommandation dans les pays présentant plus de 8% d'individus HBsAg positif dès 1995. En 2014 le vaccin contre HBV était présent dans 184 pays¹⁴⁴. A l'heure actuelle, l'OMS recommande :

- La vaccination des enfants dans les 24h après la naissance. Ce vaccin doit être associé à une détection sérique d'IgG anti-HBV dans le cas où la mère de l'enfant est HBsAg positive¹⁴⁵.
- La vaccination des populations adultes à risque (i.e. professionnels de santé, proches de patients HBsAg positifs, population homosexuelles ou consommatrices de drogues, sujets à des transfusions fréquentes). Toutefois cette tranche de population cible est compliquée à cibler¹⁴⁶.

Deux types de vaccins anti-HBV co-existent, les vaccins recombinants et ceux dérivés du plasma¹⁴⁴. Les seconds ont été développés à partir d'HBsAg de patients HBV positifs et sont désormais peu utilisés. Les vaccins recombinants au contraire sont générés à partir d'HBsAg produit par des levures, permettant d'éviter l'insertion d'ADN viraux dans le génome dans le cas où la purification serait imparfaite¹⁴⁴. En France cette vaccination est obligatoire pour le nourrisson de plus de 2 mois né après le 1^{er} Janvier 2019 et pour les professionnels de Santé et les étudiants en filières médicales et paramédicales. Chez le nourrisson elle comporte alors 3 injections à 2 mois, 4 mois et 11 mois. Chez l'enfant non-vacciné de moins de 11 ans le même schéma est appliqué. Elle est également recommandée pour les personnes ayant des comportements à risques, en contact avec un porteur de l'infection et les enfants non-vaccinés. A l'heure actuelle les vaccins disponibles sont composés d'Ag viraux et sont monovalents ou multivalents en association à un vaccin contre l'HAV ou contre la

diphthérie, le tétanos, la poliomyélite, la coqueluche et les infections à *Haemophilus influenzae* B. Bien que la sécurité de tels vaccins ait été régulièrement décrite depuis l'introduction au calendrier vaccinal, celle-ci a été régulièrement confirmée¹⁴⁷.

5. Prise en charge

a. Modification du mode de vie et éducation thérapeutique

L'absence de traitement curatif pour HBV explique que l'ensemble des moyens mis en place auront pour objectif d'améliorer la qualité de vie du patient et sa survie en limitant la progression de l'infection et des complications associées. La réussite ou l'échec de cette prise en charge sera dépendante du stade auquel la pathologie est détectée mais également de l'âge du patient. Il est important de parvenir à des dépistages de plus en plus précoces. L'une des premières recommandations sera une modification du mode de vie avec la limitation voire l'arrêt des conduites à risques que sont la consommation d'alcool, de drogues et de tabac. En cas de surpoids, une prise en charge sera mise en place, par une réduction pondérale, par une modification de l'hygiène de vie avec des séances de sport et une adaptation de l'alimentation. L'éducation thérapeutique sera également primordiale en instruisant le patient sur les différents aspects de la maladie, mais également sur les traitements mis en place et les possibles évolutions. Les motivations des examens de routines devront également être mentionnées. Des formations sur les gestes quotidiens tels que l'auto-ingestion d'IFN- α devront être dispensées. Un patient acteur de Santé et du parcours de soin est un patient impliqué dans sa maladie. Enfin en parallèle des traitements, la vaccination de l'entourage et la contraception seront recommandée afin d'éviter une possible transmission.

b. Thérapies médicamenteuses

i. Principe

Le but de la prise en charge médicamenteuse est de prévenir ou contrôler la progression de l'infection vers les atteintes hépatiques à l'origine des décès. Cela passe par un contrôle ou une élimination de la charge virale, une séroconversion de l'HBsAg et une limitation des dommages au foie. Deux classes de médicaments

disposent actuellement d'une Autorisation de Mise sur le Marché pour le traitement de l'infection à HBV et permettent le contrôle de la réplication virale :

- Les analogues de nucléos(t)ides à action directe inhibant la RT,
- L'IFN- α pegylé (PEG IFN- α) à action indirecte stimulant le système immunitaire¹⁴⁸.

ii. Analogues de nucléos(t)ides

Origine : Les analogues de nucléos(t)ides approuvés sont divisés en trois groupes :

- La Lamivudine et la telbivudine, deux analogues de la déoxycytidine en conformation L.
- L'adéfovir et le ténofovir, deux analogues de la déoxyadénosine 5'-monophosphate. Ces deux molécules existent aussi sous forme de pro-drogues nécessitant une métabolisation pour être actives.
- L'entécavir, un analogue de la déoxyguanosine.

Mécanisme d'action : Les analogues de nucléos(t)ide miment les nucléotides et nucléosides afin d'être incorporés dans les ARN ou ADN néo-synthétisés pour bloquer le mécanisme cellulaire impliqué, l'ARN est alors dégradé par la cellule. Dans le cas d'une infection HBV, le mécanisme de rétro-transcription médié par la polymérase virale visant à produire un nouvel ADN HBV est directement inhibé¹⁴⁹. Ces traitements résultent en une diminution de la quantité de virions produits, toutefois l'ADNccc n'est pas impacté empêchant l'élimination du virus. De plus l'ADN intégré n'est pas non plus touché, n'impactant donc pas son activité carcinogène. Des études ont parfois montré qu'un traitement à long terme diminue la quantité d'ADNccc mais ce phénomène est probablement imputable au renouvellement naturel des hépatocytes combinés à la diminution de l'infection de nouveaux hépatocytes¹⁵⁰.

Application : Dans le cas d'un patient présentant des taux élevés d'HBsAg, d'ADN HBV (>2000UI/ml) et d'ALT (>40UI/ml) sérique ou une fibrose avancée, le traitement de première ligne consiste en une monothérapie d'analogue de nucléos(t)ide, en 245mg par prise, une fois par jour par voie orale au cours des repas (VIDAL). La durée du traitement n'est pas définie et peut perdurer pendant plusieurs

mois, l'objectif étant de parvenir à une séroconversion HBeAg persistante pendant au minimum 12 mois de traitement par analogues de nucléos(t)ides. Ceux-ci sont utilisés afin de supprimer la réplication du virus et stabiliser la progression la pathologie et éviter les complications. Leur effet sera plus progressif que celui de l'IFN- α mais le traitement est moins invasif avec beaucoup moins d'effets indésirables. Une régression des cas de développement de cirrhose a été constatée dans 71% des cas¹⁵¹. L'usage des nouveaux analogues de nucléosides, tels que le ténofovir et l'entécavir a rendu obsolète l'utilisation de ceux de première génération (lamivudine, adéfovir et telbivudine). Les thérapies par analogues de nucléos(t)ides doivent être suivies par un contrôle régulier des taux sériques d'ALT et d'ADN HBV tous les six mois et une étude de la fibrose du foie tous les deux ans afin de prévenir une rechute potentielle. Dans le cas d'un patient HBeAg négatif, le traitement perdurera jusqu'à séroconversion HBsAg. Lors des traitements à long terme, la fonction rénale (dosage de la créatininémie) et la densité minérale osseuse devront être évaluées.

iii. Interféron- α Pégylé

Origine : Les IFN- α 2a et 2b sont des traitements majeurs de l'Hépatite B chronique. Ces protéines humaines de 19kDa sont peu adaptées à la thérapeutique car elles sont très rapidement éliminées par le rein, leur conférant une demi-vie courte (4 à 9h) et sont de plus extrêmement sensibles aux protéases humaines. Un rapprochement des prises est donc nécessaire pour maintenir une concentration sérique efficace, diminuant *de facto* la compliance au traitement et augmentant le risque d'effets indésirables. Ces IFN ont donc été optimisé par pégylation, qui consiste à fixer des chaînes de polyoxyéthylènes-glycols (PEG) afin d'augmenter la taille et le poids moléculaire du composé final. Les PEG-IFN- α 2a (40kDa) et 2b (60kDa) diffèrent par le type de PEG fixé sur la protéine. L'impact majoritaire de la transformation en PEG-IFN est une diminution de la clairance rénale comparée à la molécule initiale, améliorant donc sa stabilité et sa demi-vie. Par conséquence, les prises par les patients sont espacées, améliorant la compliance au traitement. La distribution est également diminuée même si celle-ci est peu impactée dans le cas du PEG- IFN- α 2b¹⁵².

Mécanisme d'action : Cette cytokine induit l'expression de plusieurs gènes encodant des protéines connues pour leurs larges activités antivirales et favorise le développement des cellules immunitaires. Dans le cadre de l'infection à HBV, l'IFN- α agirait via plusieurs mécanismes pas encore totalement déchiffrés :

- **Inhibition de la transcription et de la réplication virale** : en favorisant le recrutement d'histones hypoacétylés et de répresseurs de transcription sur l'ADNccc⁸⁸ ;
- **Dégradation de l'ADNccc** par l'intermédiaire de l'APOBEC3A dont le gène correspondant est induit après traitement par l'IFN- α ¹⁵³ ;
- **Inhibition de l'export des ARNm viraux** au noyau par l'Interferon induced GTP protéine MxA¹⁵⁴ ;
- **Blocage de la formation des nucléocapsides**¹⁵⁵ ;
- **Élimination des nucléocapsides complètes**¹⁵⁶ ;
- **Activation des cellules natural killer**¹⁵⁷ (NK) ;

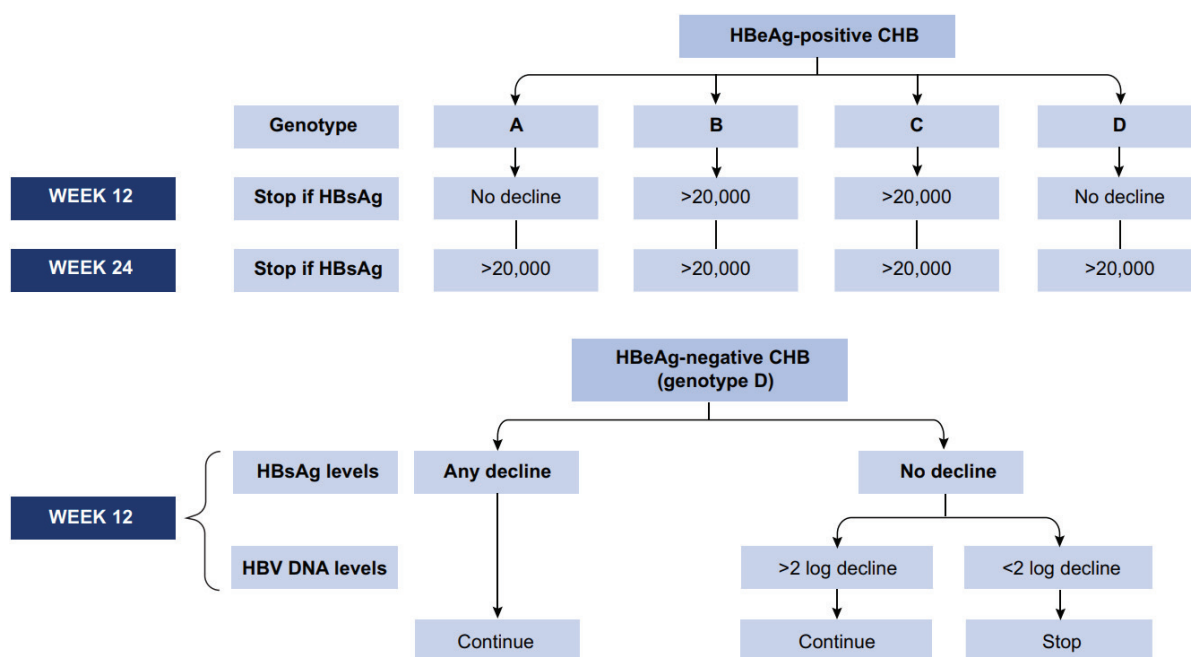


Figure 19. Arbre décisionnel d'arrêt du traitement IFN- α -PEG. Le traitement sera arrêté à 12 semaines chez les patients HBeAg positif à hépatite B chronique et infectés par les génotypes A et D si diminution des HBsAg ou infectés par les génotypes B et C si HBsAg<20 000UI/ml. Chez ces patients le traitement sera interrompu à 24 semaines si HBsAg<20 000UI/ml. Chez les patients HBeAg négatifs à hépatite B chronique le traitement sera être arrêté à 12 semaines si diminution des ADN HBV sériques de 2-log (adapté des EASL Guidelines, 2017).

Application : L'utilisation d'IFN- α -PEG en injection sous-cutanée en monothérapie pendant 48 semaines est envisageable (Figure 19). La posologie adaptée est très variable selon les régions du monde et le stade de l'hépatite, mais généralement le traitement consiste à administrer entre 2,5 et 5 millions d'UI/m² de surface corporelle en sous-cutané, 3 fois par semaine (VIDAL) (Figure 20). Toutefois, les nombreuses contre-indications (affections cardiaques, insuffisances rénales, hépatiques ou médullaires, épilepsies) (VIDAL), les effets indésirables (anorexie, nausées, troubles cardiovasculaires et pulmonaires, syndrome pseudo-grippal) (VIDAL), l'efficacité aléatoire et le faible taux de viro-suppression n'en font pas un traitement idéal. En effet, seulement 23% des patients sous traitement présenteront une diminution suffisante de l'ADN HBV sérique à long terme¹⁵⁸. Les seules situations où l'IFN- α est intéressant sont le traitement des patients infectés par le génotype A¹⁵⁹, avec 58% de séroconversion observée contre 11% contre les autres génotypes, ou le traitement des patients co-infectés par HDV¹⁶⁰. Le traitement d'IFN- α -PEG sera arrêté après 12 ou 24 semaines (Figure 18). Il est important de préciser que cette thérapie sera contre-indiquée en cas de cirrhose décompensée. L'association de l'IFN- α -PEG en bi-thérapie avec un analogue de nucléos(t)ide ne semble pas apporter de bénéfice clair au patient¹⁶¹.

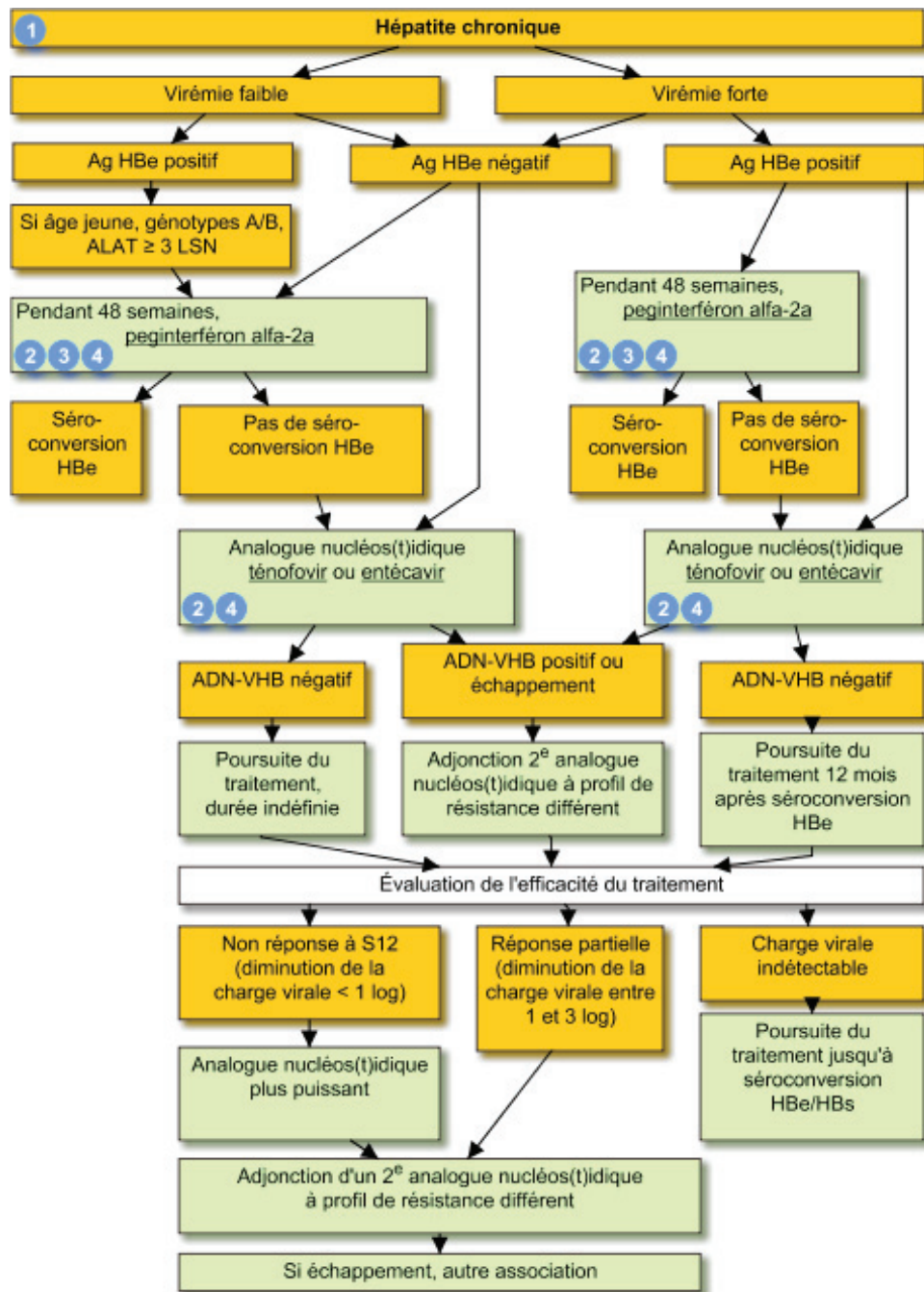


Figure 20. Arbre décisionnel des thérapies anti-HBV.

(1) Établissement du diagnostic d'hépatite B chronique.

(2) Choix du traitement : le PEG-IFN- α pendant 48 semaines sera privilégié chez les patients jeunes à faible charge virale, HBeAg positif, ALT>3, un score d'inflammation hépatique>2 et une infection par les génotypes A ou B ou les patients à virémie forte et HBeAg positif. Chez les autres patients à virémie faible et HBeAg négatif les traitements par analogues de nucléos(t) seront conseillés en première intention.

(3) Révision du traitement : Si lors de la période de traitement par IFN il y a séroconversion le traitement évoluera vers les analogues de nucléos(t)ides.

(4) Suivi du traitement : la réponse thérapeutique sera validée après négativation des ADN HBV et de l'HBeAg et la diminution des HBsAg sériques, normalisation des ALT et diminution du score inflammatoire hépatique. Les risques liés au PEG-IFN- α seront évalués par la numération de la formule sanguine, la créatininémie, la glycémie et les taux d'ALT, TSH, AFP et β -hCG.

Remarque : ces recommandations sont celles du Vidal Recos et peuvent être modulées selon les comités de médecins tels que l'EASL ou ASLD et adaptées au cas par cas selon les praticiens.

(Adapté de Vidal Recos, 2016)

b. Virus de l'Hépatite Delta

i. Biologie d'HDV

1. Classification

L'HDV est le plus petit virus de mammifère connu. Il ne se propage pas seul et dépend donc du virus d'HBV afin de détourner son enveloppe pour produire des particules virales complètes, ce qui fait de lui un virus dit défectif. C'est également le plus virulent de tous les virus à hépatites connus, aggravant les pathologies telles que les hépatites fulminantes, les décompensations hépatiques et la cirrhose, accélérant la progression vers le CHC et diminuant la réponse aux traitements.

L'origine et la filiation de l'HDV restent encore incertaines. Comme nous l'avons vu dans l'histoire de la découverte d'HBV et HDV, ce dernier dépend du premier. Mais malgré cela il en est très éloigné phylogénétiquement. Trois théories prédominent alors sans pour autant être confirmées :

- **Un viroïde ou virusoïde issu de plante ayant intégré un ARNm cellulaire :** ce type de virus comporte un petit génome à ARN circulaire (250 à 400nt), à activité ribozyme et exerçant son activité infectieuse par ARN interférence¹⁶². De plus les virusoïdes, tout comme HDV, dépendent d'un virus auxiliaire et encodent fréquemment pour une protéine virale. De par la structure et la taille de son génome, son activité ribozyme, son mécanisme de réplication et la protéine qu'il encode très similaires, HDV dériverait de ces virus pourtant très éloignés des virus de mammifères. La seule différence d'HDV par rapport aux virusoïdes et que ceux-ci utilisent souvent l'activité polymérase de leur virus auxiliaire là où HDV ne détourne que l'enveloppe d'HBV. La découverte en 1996 par Brazas et Ganem¹⁶³ d'un gène cellulaire nommé *Delta interacting protein A* possédant près de 60% de similarité en aa avec les deux isoformes de la protéine d'HDV a permis d'émettre alors l'hypothèse de l'intégration d'un ARNm cellulaire dans le génome d'un viroïde ou virusoïde initial afin de générer le virus que l'on connaît.
- **Un virus dérivé du transcriptome humain :** cette hypothèse se fonde sur la forte similarité de structure et de propriété biochimique entre le ribozyme d'HDV

et le ribozyme d'ARN cellulaires¹⁶⁴. Ainsi un ribozyme humain encodé dans un intron du gène *Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3* présente une structure tertiaire très proche de celui d'HDV. Toutefois ces deux séquences ne présentent pas de similarité. Par la suite cette structure a été observée chez de nombreux autres ribozymes de mammifères¹⁶⁵.

- **Un virus résultant d'un épissage aberrant d'HBV** : cette théorie est appuyée de par le fait que HDV est dépendant d'HBV pour sa propagation ; la prévalence d'HBV est importante et l'infection est chronique, ce qui augmente la probabilité d'apparition d'une forme dérivée du virus ; l'activité d'épissage des ARNm d'HBV rend ceux-ci susceptible aux phénomènes d'épissage aberrant. Toutefois l'absence d'homologie de séquence entre HBV et HDV et d'activité ribozyme dans le génome d'HBV s'opposent à cette théorie.

HDV est classé par le Comité International de la Taxonomie des Virus comme étant un *Deltaviridae*, une nouvelle famille dont il est le seul membre, de genre *Deltavirus*¹⁶⁶. De manière similaire à HBV, de nombreux génotypes à HDV ont été identifiés de par le monde et huit d'entre eux ont déjà été caractérisés¹⁶⁷ (Figure 21). Toutefois ces génotypes présentent une très grande variation de séquence (jusqu'à 35% de dissimilarité) ce qui laisse supposer la possibilité d'une origine différente selon les génotypes¹⁶⁸. Le génotype 1 est ubiquitaire¹⁶⁷. Le génotype 2 est retrouvé en Asie de l'Est¹⁶⁹ (i.e. Japon, Taiwan et Russie) et le génotype 4 est restreint au Japon et à Taiwan¹⁷⁰. Le génotype 3 observé en Amérique du Sud est considéré comme le génotype le plus agressif et induit chez les patients de sévères hépatites fulminantes¹⁷¹. Enfin les génotypes 5 à 8 ont été isolés en Afrique¹⁶⁷. De manière intéressante il a été montré que certains génotypes d'HDV étaient plus facilement associés à un génotype d'HBV particulier.

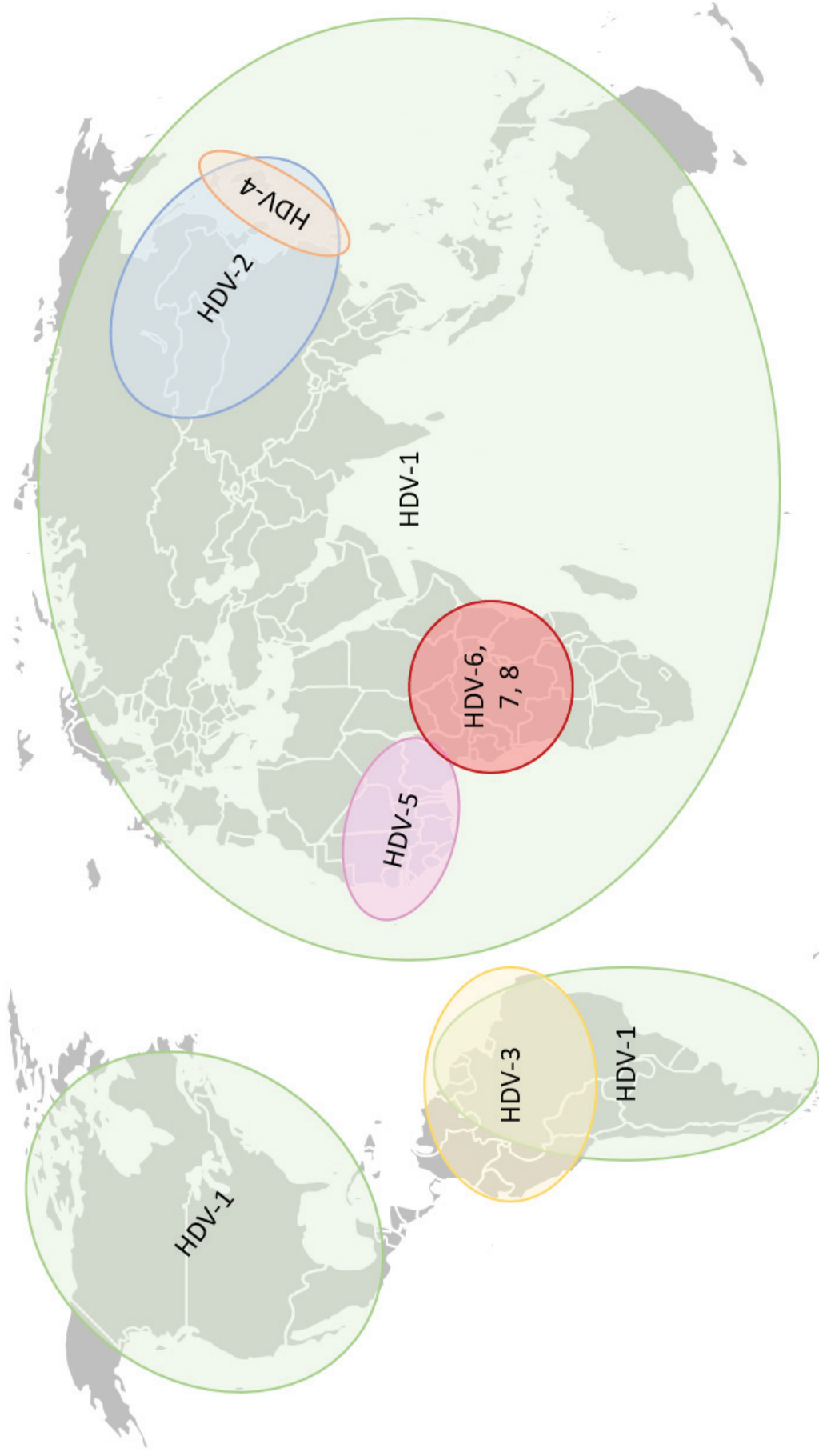


Figure 21. **Distribution mondiale des génotypes d'HDV.** Le génotype 1 semble être ubiquitaire et retrouvé sur l'ensemble du globe. Le génotype 2 est restreint à l'Asie de l'Est et partage une partie de son territoire comprenant le Japon et l'île de Taiwan avec le génotype 4. Le génotype 3 est observé dans le Nord de l'Amérique du Sud. Quatre génotypes sont présents en Afrique, le génotype 5 en Afrique de l'Ouest et les génotypes 6 à 8 en Afrique Centrale (adapté d'Alfaiate D *et al.*, 2015).

2. Structure d'HDV

a. Génome viral

Long de 1,68kb et localisé dans le noyau des hépatocytes, le génome ARN d'HDV est le plus petit de l'ensemble des virus infectant les mammifères¹⁷². Il réplique via un intermédiaire à ARN complémentaire nommé anti-génome (Figure 22). Ces deux formes d'ARN HDV circulaires, sb, riches en G/C (60%) avec une structure quasi-db (*i.e.* pseudo-apparié sur 74% de ses nucléotides¹⁷²) sont alors retrouvées en proportion de 5 pour 1 dans les cellules infectées¹⁷³. Ceux-ci sont partagés entre une région codante pour l'unique protéine virale et une région « viroid-like »¹⁷⁴ :

- **La région codante** possède un premier ORF située dans l'anti-génome encodant le petit isoforme S-HDAg de l'Ag d'HDV¹⁷⁵ (S-HDAg) et un second dont la fonction est inconnue¹⁷⁶. L'édition du codon stop par l'enzyme Adenosine Deaminase Acting on ARN (ADAR) 1 cellulaire dans la séquence encodant la S-HDAg permet au génome d'encoder une forme plus longue de l'Ag d'HDV nommée L-HDAg. Les ARNm HDV sont présents en quantité 500 fois plus faibles que le génome.
- **La région « viroid-like »** comporte une séquence de 85nt observée dans le génome et l'anti-génome d'HDV et se replie selon une conformation particulière afin d'exercer une activité ribozyme auto-lytique¹⁷⁷. Cette activité enzymatique virale, la seule d'HDV, est nécessaire pour sectionner les intermédiaires multimères de génome et anti-génome HDV en monomères. Cette activité a été longtemps considérée comme unique bien que d'autres ribozymes aient déjà été identifiés chez les viroïdes et virusoïdes dont il est potentiellement issu¹⁷⁸. La caractérisation de la structure du ribozyme d'HDV en 1998¹⁷⁹ a permis d'identifier des structures similaires dans des pré-ARNm humains dont certains fonctionnels permettant probablement de faciliter la traduction de l'ARNm associé¹⁶⁵. Toutefois contrairement aux ribozymes cellulaires, le ribozyme d'HDV est situé en 3' et est impliqué dans la réplication virale et non pas la traduction.

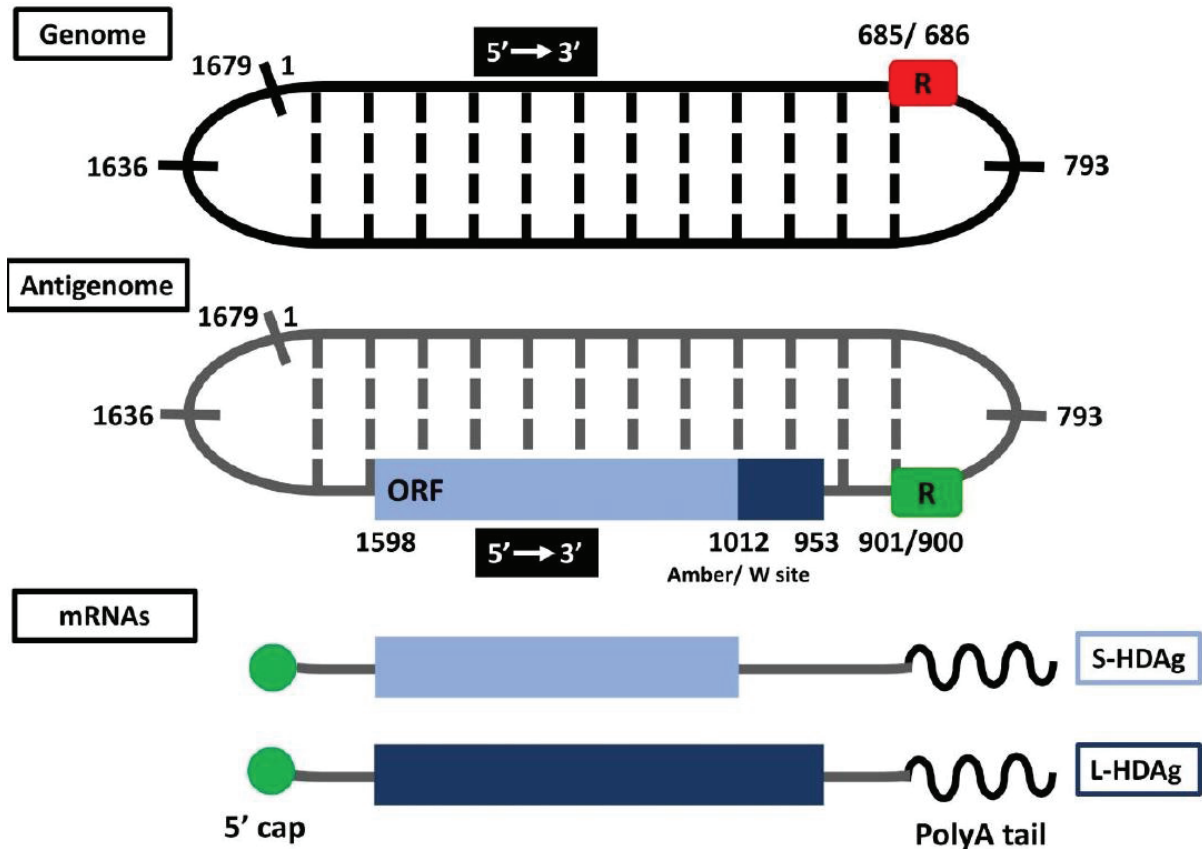


Figure 22. **Structure des ARN HDV.** Les deux génomes et anti-génomes complémentaires de 1679 nucléotides sont pseudo-appariés sur 70% de leur longueur et comportent une structure ribozyme essentielle à leur réplication. La séquence codante de l'anti-génome présente des nucléotides 1012-1598 (3'-5') est traduite pour donner l'ARNm encodant la S-HDAg. Une édition du codon stop permet une élévation de la séquence codante jusqu'au nucléotide 953 encodant alors l'ARNm correspondant à la L-HDAg. Les deux ARNm maturés présentent un complexe de coiffe et une queue polyA (adapté de Alfaiate D Thesis, 2015).

b. Protéines virales

L'anti-génome d'HDV encode initialement un seul ARNm de 0,8kb¹⁸⁰ possédant un complexe de coiffe et une queue de polyadénylation¹⁸¹, traduit ensuite pour donner une protéine de 195aa (24kDa) nommée S-HDAg. Ce premier isoforme est essentiel pour la réplication virale et le détournement de l'ARN polymérase ADN dépendante (RNAP) de type II¹⁸². Plus tardivement dans le cycle viral, l'édition A>G du codon stop en position 1012 par l'ADAR1 remplace ce dernier par un codon tryptophane¹⁸³ générant un ARNm allongé de 60 à 63nt encodant la L-HDAg¹⁸⁴. La traduction de cet ARNm produit une protéine S-HDAg allongée de 20 à 21aa en C-ter (27kDa) et

nommée L-HDAg (214aa ; 27kDa). Ce second isoforme réprime la réplication virale en inhibant la synthèse du génome¹⁸⁵ et participe à l'assemblage de la particule d'HDV¹⁸⁶. Les deux isoformes de HDAg partagent plusieurs domaines et sites (Figure 23) :

- Un domaine de liaison à l'ARN riche en arginines (97-146aa) afin de structurer la ribonucléoprotéine (RNP) virale¹⁸⁷. Le rôle de ce domaine est remis en question depuis qu'une étude a montré qu'il ne semble pas interagir avec l'ARN¹⁸⁸ ;
- Un domaine d'exportation au noyau¹⁸⁹ (66-75aa) ;
- Un domaine en super hélice α (12-60aa) impliqué dans la dimérisation de l'HDAg¹⁹⁰. Il serait également capable de générer des octamères¹⁹¹ ;
- Une séquence C-ter riche en prolines et glycines ;
- Deux sites de phosphorylation Ser77¹⁹² et Ser123¹⁹³ nécessaires pour l'adressage de l'HDAg au noyau ;
- Plusieurs sites de sumoylation ;
- Un site de méthylation Arg13 ;
- Un site d'acétylation Lys72 ;

La séquence en aa supplémentaire en C-ter de la L-HDAg comporte :

- Un signal d'assemblage de la particule virale susceptible d'être farnésylé en Cys211. Cette modification permet l'interaction avec une séquence riche en tryptophane dans la boucle cytosolique de l'HBsAg¹⁹⁴ ;
- Un domaine d'exportation au cytoplasme¹⁹⁵ (198-210aa) ;

Plusieurs équipes ont tenté d'obtenir la structure tridimensionnelle de la S- et de la L-HDAg sans succès, une étude explique cet échec par une structure extrêmement désordonnée¹⁹⁶ également responsable de la capacité des HDAg à se multimériser et à interagir avec de très nombreuses protéines cellulaires.

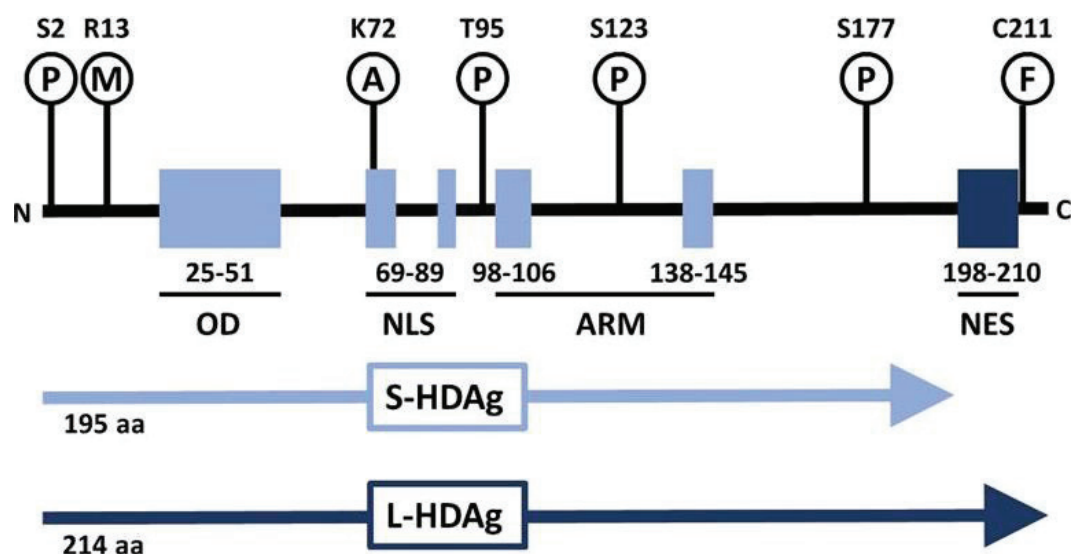


Figure 23. S-HDAg et sites catalytiques. Les deux protéines encodées par l'anti-génome d'HDV présentent une structure commune N-ter allant des aa 1 à 197 et comportant plusieurs sites catalytiques. Un premier domaine d'oligomérisation permettant la création de multimères d'HDAg fixés à la RNP virale. Un signal d'export au noyau (NLS) et un domaine riche en arginines sont également communs à la S et L-HDAg. Cette dernière forme de HDAg présente en C-ter une séquence complémentaire de 12 aa résultante de l'édition du codon stop dans la séquence codante de l'anti-génome. La nouvelle protéine produite comporte un signal d'exportation vers le cytoplasme, ayant comme conséquence le transport des nouvelles RNP vers ce compartiment (adapté de Alfaïate D Thesis, 2015).

c. Ribonucléoprotéine et virion

Lors du cycle viral, le génome s'associe aux isoformes de HDAg par l'intermédiaire de leur site de liaison à l'ARN afin de former une RNP virale et stabiliser le génome. La structure de cette RNP et la quantité de protéines HDAg présentes sur la molécule d'ARN continuent à faire débat : des études font état de 200 molécules d'HDAg fixées sur chaque molécule de génome¹⁹⁷ et d'une RNP symétrique de 19nm de diamètre¹⁹⁸. Ces HDAg agiraient comme des histones cellulaires afin de moduler la compaction de l'ARN d'HDV et donc sa réplication¹⁹⁹ mais également sa localisation dans la cellule²⁰⁰. La L-HDAg, présente sur la RNP, interagit avec l'HBsAg pour former de nouveaux virions¹⁸⁶. Cette enveloppe de protéines HBsAg comporte 95% de S-HBsAg, 5% de M-HBsAg et 1% de L-HBsAg dans un rapport différent de l'enveloppe composant les virions d'HBV²⁰¹. Une fois la RNP enveloppée, le virion d'HDV mesure 30 à 36nm soit un peu moins que les particules d'HBV²⁰².

3. Cycle viral d'HDV

a. Entrée

HDV emprunte l'enveloppe d'HBV, il partage donc les mêmes facteurs d'attachement à l'hépatocyte que sont le récepteur NTCP²⁰³ et les HSPG^{78,204} (Figure 24). Ce mécanisme ne sera donc pas détaillé à nouveau ici. Une fois entrée, la particule d'HDV libère la RNP dans le cytoplasme. Bien que le mécanisme de transport de la capsid d'HBV au noyau soit bien connu, celui de la RNP d'HDV reste à déterminer. Une des hypothèses soulevées est que la HDAg exporterait la RNP à l'aide du signal d'adressage au noyau localisé dans la séquence consensus des S et L-HDAg²⁰⁵.

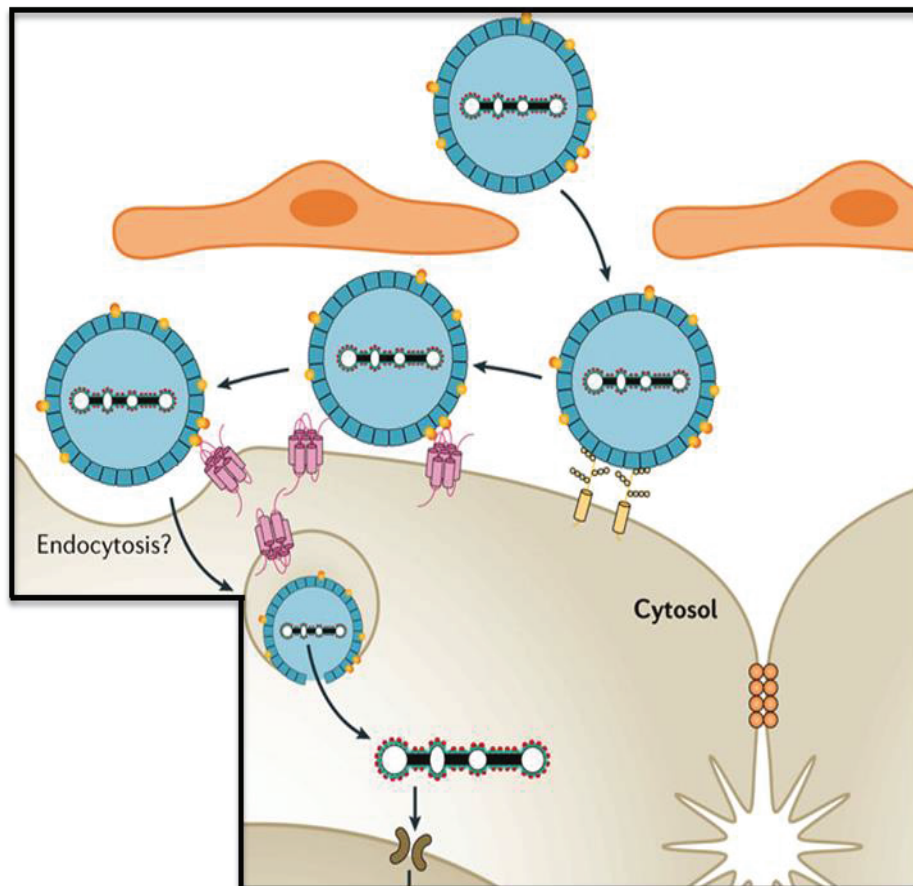


Figure 24. **Mécanismes d'entrée d'HDV.** Tout comme HBV, HDV interagit et établit un premier contact avec l'hépatocyte via les HSPG membranaires. Dans un second temps les protéines HBsAg composant son enveloppe interagissent avec le récepteur NTCP, le complexe généré est alors endocyté. La particule virale est désassemblée et la RNP anciennement protégée par l'enveloppe est exportée au noyau (adapté de Urban S *et al.*, 2016).

b. Réplication

i. Principe

La réplication d'HDV se déroule exclusivement dans le noyau et est totalement indépendante d'HBV¹⁷³. Mis à part la restriction d'entrée aux cellules présentant un récepteur NTCP, HDV peut répliquer dans de nombreux modèles cellulaires si son entrée est forcée²⁰⁶. De manière similaire aux viroïdes et virusoïdes dont il est éventuellement issu, HDV réplique via un mécanisme dit de « rolling circle » ou « boucle fermée » en plusieurs étapes. Le génome viral n'encode que deux protéines pouvant se fixer à l'ARN HDV mais sans activité polymérase : il détourne donc la machinerie cellulaire pour sa réplication et la transcription des ARN. Il a été bien établi au cours des vingt dernières années que la RNAP II est responsable de la synthèse des nouveaux génomes d'HDV et des ARNm encodant les HDAG²⁰⁷. Mais la nature de la RNAP impliquée dans la synthèse de l'anti-génome HDV depuis la matrice de génome est toujours en débat. Les trois RNAP I, II et III ont déjà été montrées comme interagissant avec le génome d'HDV^{208,209}. En effet une étude menée par Lai *et al.* a montré que l'inhibition de la RNAP II par l' α -amanitine n'empêchait pas la synthèse d'anti-génome HDV et ne bloquait que la synthèse de génome. Et inversement, l'inhibition de la RNAP I par l'actinomycine D empêchait la synthèse d'anti-génome HDV²¹⁰. Toutefois les rôles précis de chaque polymérase cellulaire dans la réplication d'HDV n'ont toujours pas été établis. De plus, le selectivity factor 1, un composant du complexe de pré-initiation de la RNAP I, interagit avec la S-HDAG²¹⁰. Une étude de protéomique a montré en 2009 une interaction entre l'HDAG et de nombreuses sous-unités et facteurs associés à la RNAP I²¹¹. Des études indiquent au contraire que la RNAP II est la seule impliquée dans la réplication du génome et de l'anti-génome d'HDV²¹².

ii. Formation de multimères d'anti-génome

Le génome sert de matrice afin de produire dans le nucléole²¹⁰ l'anti-génome complémentaire²¹² (Figure 25). La protéine S-HDAG recrute pour cela la RNAP II et différents facteurs d'initiation de la transcription²¹³. L'acétylation Lys72 par l'histone/acétyltransférase p300/CBP semble être une modification post-traductionnelle essentielle¹⁹⁹ pour l'établissement d'un complexe de pré-initiation²¹¹. Il

est probable que cette transcription débute entre les nucléotides 1541 et 1630 où des expériences de mutagenèse ont montré une perte de la capacité de réplication d'HDV²¹⁴. Ces molécules de génomes sont alors produites en multimères liés de manière covalente²¹⁵.

iii. Formation des multimères de génome

Tout comme le génome sert de matrice à la synthèse de l'anti-génome, et étant donné que HDV réplique selon un mécanisme de « rolling circle », l'anti-génome sert de matrice à la synthèse du génome (Figure 25). La S-HDAg est essentielle à la synthèse du génome d'HDV et non pas à l'anti-génome. En effet, lorsque *in vitro* la S-HDAg est fusionnée à un signal d'adressage au nucléole afin de la restreindre à ce sous-compartiment nucléaire, la synthèse de génome d'HDV est très limitée tandis que celle d'anti-génome n'est pas affectée²¹⁶. Ceci illustre un probable mécanisme de réplication différent selon l'ARN d'HDV concerné. De plus, la phosphorylation de la Ser177 de la S-HDAg par la voie ERK1/2²¹⁷ est essentielle au recrutement de la RNAP II¹⁹² et à la synthèse du génome d'HDV. De même, l'absence d'acétylation de la Lys72 par la p300/CBP ralentit cette étape de la réplication d'HDV¹⁹⁹, ceci suggérant un rôle semblable aux histones de la S-HDAg régulant l'ouverture de l'ARN d'HDV²¹⁸. Cette théorie est appuyée par le rôle important de la méthylation de l'arg13 de la S-HDAg.

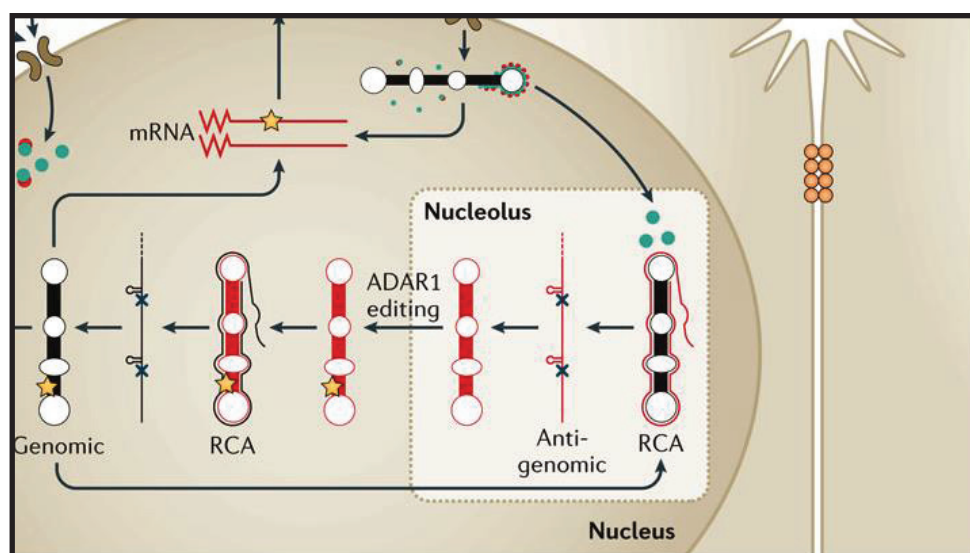


Figure 25. Mécanisme de réplication d'HDV. Une fois dans le noyau, la RNP virale est désassemblée et le génome (noir) exporté au nucléole. Dans ce compartiment, celui-ci va répliquer via un intermédiaire anti-génome complémentaire (rouge) dans un mécanisme en boucle fermée. L'anti-génome généré sert de matrice pour la synthèse *de novo* du génome, mais également d'ARNm traduits en protéines virales (adapté de Urban S *et al.*, 2016).

La synthèse du génome d'HDV est ralentie en absence de cette modification post-traductionnelle induite par la Protéine Arginine N-Méthyl Transférase ¹²¹⁹.

iv. Clivage des multimères et circularisation des monomères

L'activité ribozyme de 85nt présent dans l'ARN HDV clive les multimères en monomères²²⁰ (Figure 25). Une activité ligase cellulaire est impliquée dans la circularisation des monomères d'HDV mais la protéine responsable n'est pour l'instant pas identifiée²²¹. Les nouvelles particules de génome et d'anti-génome générées sont réinjectées dans le cycle réplcatif.

v. Transcription de l'ARNm HDAg

Le génome sert de matrice pour la production par la RNAP II d'un ARNm de 800nt mûré, encodant la S-HDAg¹⁸¹. En effet, malgré sa nature d'ARN, l'anti-génome ne possède pas de séquence de recrutement d'un ribosome et ne sert donc pas de matrice de traduction²²². L'ARNm est exporté au cytoplasme et traduit pour donner la S-HDAg. Celle-ci est ré-exporté au noyau et s'associe au génome et à l'anti-génome afin de former des RNP et de les séquestrer dans ce compartiment. La S-HDAg favorise alors la réplcation de l'ARN viral et la transcription de l'ARNm²²³ en recrutant la RNAP II. Dans des phases plus tardives le codon stop de la séquence codant l'ARNm de la S-HDAg est édité par l'enzyme cellulaire ADAR1²²⁴. L'ARNm généré possède alors une séquence encodant 19aa supplémentaires et sera traduit afin de donner la L-HDAg¹⁸⁴.

c. Assemblage des particules virales et sécrétion

La réplcation et la formation de nouvelles particules virales sont intrinsèquement liés au statut de l'ARNm d'HDV et à la présence ou absence de L-HDAg (Figure 26) :

- (i) La L-HDAg est farnésylée en Cys211 et s'associe à la RNP d'HDV afin de réprimer sa transcription et l'exporter au cytoplasme²²⁵. Le ratio S/L-HDAg des RNP est alors modifié. Pour des raisons encore inconnues les RNP composées d'anti-génome sont séquestrées dans le noyau²²⁶.

- (ii) Une fois dans le cytoplasme, la L-HDAg s'ancre dans le RE via l'ancre farnésyl ajoutée²²⁷. Elle interagit alors avec les boucles cytosoliques des HBsAg pour envelopper la RNP et former une nouvelle particule virale de 30 à 36nm de diamètre²²⁸. Il a notamment été montré que l'inhibition de la farnésylation par le lonafarnib empêchait l'interaction avec HBsAg et *de facto* l'enveloppement de la RNP¹⁹⁴.

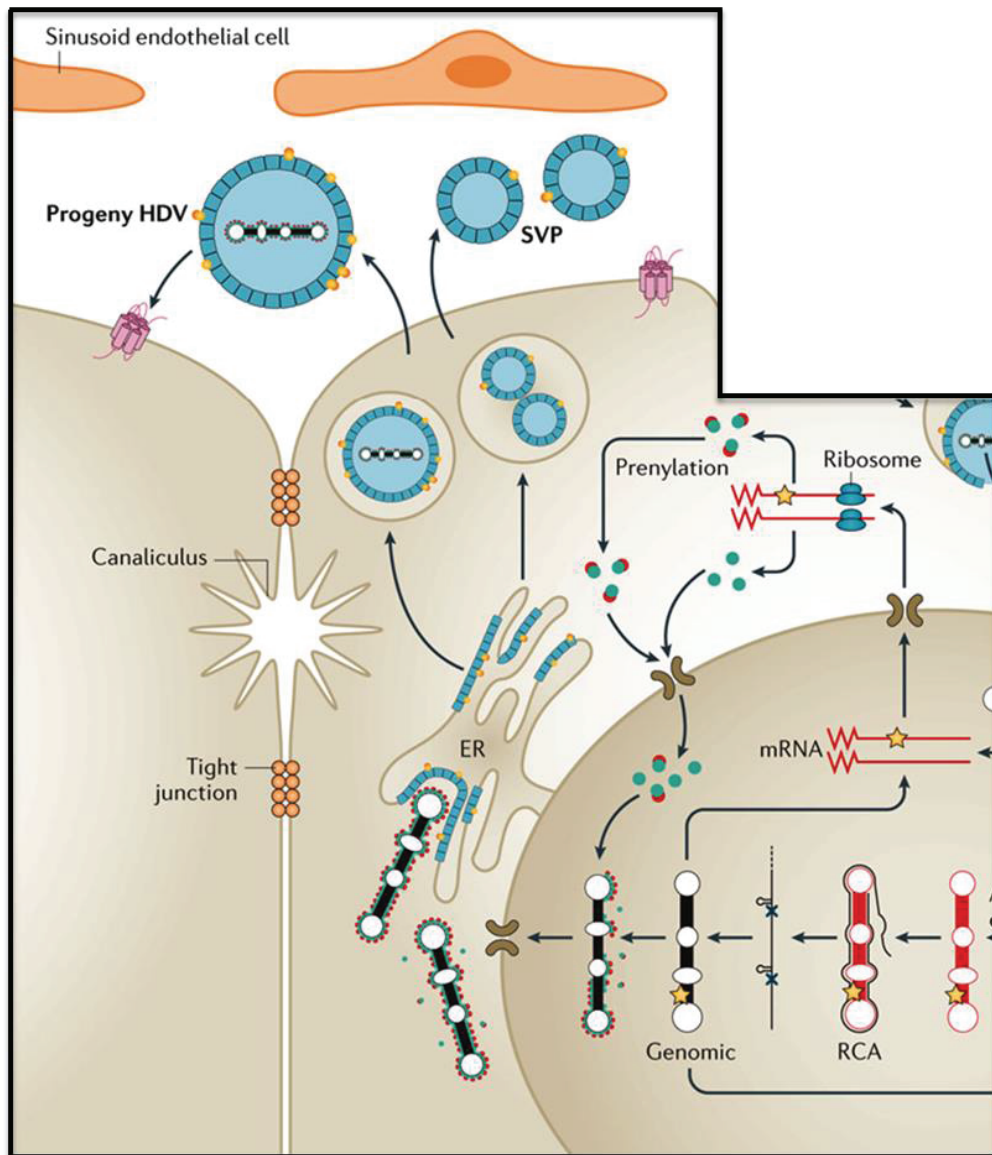


Figure 26. Mécanismes d'assemblage et de sécrétion des particules d'HDV. La L-HDAg s'associe au génome d'HDV afin d'exporter la RNP au cytoplasme. HDAg interagit alors avec les protéines HBsAg afin d'envelopper la RNP et former une nouvelle particule virale (adapté de Urban S *et al.*, 2016).

Sureau *et al.* ont déchiffré le rôle de chaque forme de HBsAg dans l'enveloppe d'HDV. Ils ont montré que la L-HBsAg est essentielle pour l'infectivité des nouvelles particules d'HDV. Mais si seule cette protéine est exprimée, la RNP d'HDV ne s'enveloppe pas. De même, lorsque seule la S-HBsAg est exprimée, la RNP s'enveloppe mais ne présente pas de capacité infectieuse. L'absence de la M-HBsAg n'altère en rien la formation des virions d'HDV et leur infectivité²²⁹. De manière intéressante, Cosset FL *et al.*, ont montré très récemment que la RNP d'HDV pouvait être enveloppé par d'autres virus que HBV²³⁰. Lors de leur étude les glycoprotéines d'enveloppes d'HCV et du Vesicular Stomatitis Virus (VSV) étaient capables d'envelopper la RNP d'HDV et de produire des particules virales infectieuses, exploitant alors le mécanisme d'entrée caractérisé pour chacun de ses virus. Ce concept a été étendu au Cytomégalo virus (CMV), Lymphocytic Choriomeningitis (LCMV) et virus du Nil Occidental (WNV) sans pour autant contrôler le mécanisme d'entrée. Enfin ils ont confirmé la formation de particules HCV enveloppant la RNP d'HDV *in vivo* en modèle de souris à foie humanisé.

ii. Physiopathologie d'HDV

1. Immunopathogénèse

a. Une réponse immunitaire soutenue mais inefficace

HDAg n'est pas directement cytotoxique chez le patient²³¹ et la charge virale n'a pas été associée à des atteintes plus sévères du foie²³². Les atteintes hépatiques semblent donc être imputables à une stimulation trop prolongée de l'immunité de l'hôte. Au niveau cellulaire, il a été observé une dédifférenciation des hépatocytes expliquant la fibrose observée dans les cas d'hépatites B et D chroniques lors d'une infection aiguë par HDV²³³. Par la suite, il a été montré qu'HDV induit une réponse IFN- γ et Interleukine (IL)-2 via la reconnaissance d'un Ag par les lymphocytes T²³⁴. Ces observations ont été appuyées dix ans plus tard par l'identification de molécules Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)-II spécifiques d'épitopes de l'HDAg et d'une réponse lymphocytes T CD4+ spécifique d'HDV^{235,236}.

Toutefois cette étude n'a jamais été répétée par la suite et il a été montré que la quantité de lymphocytes T NK continue à augmenter au cours du temps mais que

leur activation et leur activité cytolytique diminue²³⁷, suggérant un épuisement de la réponse immunitaire. Cette théorie est appuyée par plusieurs études montrant que l'infection HDV induit une réponse dominée par les lymphocytes T-helper sécrétant de l'IL-10, ce qui permet d'envisager une situation où une réponse Lymphocytes T Th1 CD4+ et CD8+ spécifique d'HDV soit à terme supprimée²³⁸.

b. Une modulation accrue de différents gènes et voies cellulaires

Contrairement à HBV, HDV ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte et n'altère donc pas la stabilité des chromosomes et la fonction de gènes suppresseurs/activateurs de tumeur. L'impact direct d'HDV sur la pathogénèse semble agir majoritairement via la faculté des composants du virus à moduler des fonctions cellulaires en interagissant avec des protéines et des voies de signalisation.

HDV induit en modèles cellulaires et en souris une très forte réponse IFN de type I, se traduisant par l'expression de plusieurs gènes²³⁹. Cette modulation des voies immunitaires a également été observée par Williams *et al.* avec une activation des facteurs de transcription Signal Transducer And Activator of Transcription (STAT) 3 et NFκB après induction par HDV de production d'espèces réactives de l'oxygène par l'enzyme NADPH Oxydase 4²⁴⁰ (NOX4). Cette même enzyme NOX4 est activée par le Tumor Growth Factor (TGF)-β qui a été montré comme induit par la L-HDAg²⁴¹. Une première preuve de modulation épigénétique par HDAg montre que celle-ci induit la transcription de la clustérine, gène pro-métastatique, par acétylation de l'histone H3²⁴². HDAg régule aussi directement la transcription de plusieurs gènes en interagissant avec le facteur de transcription YY1 et les coactivateurs CBP et p300²⁴³. Elle potentialise également l'activation de la voie MEK Elk1, déjà induite par la protéine HBx connue pour être pro-carcinogène, ce qui expliquera la progression plus rapide vers le cancer des patients HBV/HDV, sans aucun mécanisme directement carcinogène observé²⁴⁴.

c. Un contrôle des infections associées

Il est probable qu'HDV prenne le pas sur HBV en inhibant l'activation des régions amplificatrices de la transcription dans le génome d'HBV, par fixation des S et

L-HDAg et par activation du gène cellulaire MxA qui inhibe l'exportation des ARNm d'HBV depuis le noyau²⁴⁵. Ce phénomène de prédominance d'HDV sur les autres virus a également été montré avec une inhibition d'HCV dans des cas de multi-infections HBV, HCV et HDV²⁴⁶.

2. Aspect Clinique

a. Infection

i. Principe

La co-infection par HBV et HDV est considéré comme étant la plus sévère forme d'hépatite virale connue²⁴⁷. Les patients infectés par HBV et HDV présentent un risque multiplié par deux de développer une cirrhose et multiplié par trois de développer un CHC comparé aux individus mono-infectés par HBV²⁴⁸. A long terme, une cirrhose se déclarera dans 70% des cas 5 à 10 ans après l'infection et dans 15% des cas dans les 2 ans suivant l'infection²⁴⁸. Une étude plus récente a conclu qu'une réplication active d'HDV mène à un taux annuel de 4% de cas de cirrhoses et 2,8% de CHC chez les patients positifs à HDV²⁴⁹. Enfin les patients infectés par HDV et cirrhotiques présentent un taux de survie de 49% à 5 ans et de 40% à 10 ans respectivement²⁵⁰. Toutefois la gravité d'une hépatite D sera influencée par plusieurs facteurs. Tout d'abord la virulence du génotype : le génotype 1 ubiquitaire présente un faible taux de rémission²⁵¹ ; le génotype 2 présent en Asie de l'Est est peu virulent²⁵² ; tandis que le génotype 3 d'Amérique du Sud induit des formes extrêmement sévères d'hépatites D²⁵³. L'impact des génotypes 5 à 8 sur la pathologie reste à élucider.

Tab. 3. Génotypes d'HDV et impact sur la pathologie

Génotype	Localisation	Traitement	Maladie	
1	Ubiquitaire		<ul style="list-style-type: none"> • Défaillances hépatiques élevées • Moins de rémission • Mauvais pronostic 	<ul style="list-style-type: none"> • Assemblage plus efficace des particules virales
2	Asie de l'Est		<ul style="list-style-type: none"> • Peu de défaillances hépatiques • Progression plus lente 	<ul style="list-style-type: none"> • Réplication du génome plus lente
3	Nord de l'Amérique du Sud	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne réponse à l'IFN-α 	<ul style="list-style-type: none"> • Défaillances hépatiques élevées • Hépatites fulminantes sévères 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations fréquentes dans le promoteur core
4	Asie de l'Est		<ul style="list-style-type: none"> • Moins de défaillances hépatiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Déletion de 33 bases dans le gène <i>pré-S/S</i>
5	Afrique Centrale et de l'Est	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne réponse à l'IFN-α 	<ul style="list-style-type: none"> • Peu de défaillances hépatiques • Progression plus lente 	<ul style="list-style-type: none"> • Déletion de 3 bases en 5' du gène <i>pré-S/S</i>
6	Afrique Centrale et de l'Est			
7	Afrique Centrale et de l'Est			
8	Afrique Centrale et de l'Est			

ii. Co-infection HBV/HDV

La mono-infection HDV n'existant pas dans la nature, deux schémas d'acquisition co-existent. Le premier consiste en une co-infection simultanée par HBV et HDV provenant d'un individu déjà porteur des deux virus (Figure 27) : ce type d'exposition ne conduit à des hépatites chroniques que dans 2 à 5% des cas²⁵⁴ et majoritairement à des hépatites aiguës²⁴⁹ suivies d'une élimination des deux virus. Une phase pré-ictérique caractérisée par un syndrome pseudo-grippal et des taux sériques élevés d'ALT/AST sera suivi par une phase ictérique présentant les précédents symptômes et un taux élevé de bilirubine.

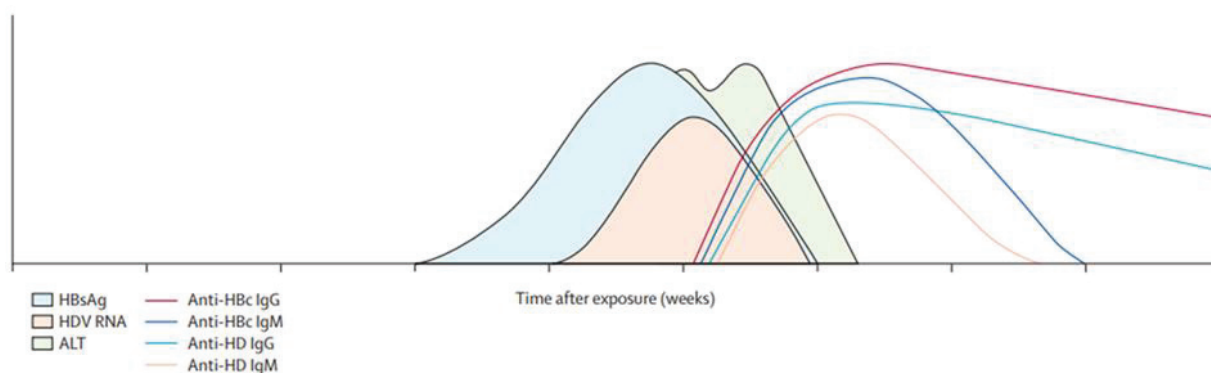


Figure 27. **Evolution des marqueurs HBV et HDV lors d'une co-infection.** Ce modèle d'infection résulte dans la majorité des cas en une élimination des deux virus chez les patients. HDV = hepatitis delta virus ; ALT = alanine aminotransférase ; HBV = hepatitis B virus ; HBsAg = hepatitis B surface antigen (adapté de Hughes SA *et al.*, 2011 Lancet).

iii. Sur-infection HDV d'un patient HBV chronique

Le second schéma d'acquisition survient lors d'une surinfection HDV d'un patient HBV chronique (Figure 28). Ce type d'exposition induit des hépatites sévères et mènera à la chronicité dans 80% des cas²⁵⁵, exacerbant alors le phénotype d'hépatite B déjà présent. A long terme, la réplication d'HBV sera fortement inhibée par HDV²⁵⁶, la majorité des patients seront HBeAg négatifs et présenteront un taux sérique d'ADN HBV faible²³². Dans le cas où l'infection HDV est éliminée spontanément ou après traitement, la réplication d'HBV se réactive²⁵⁷.

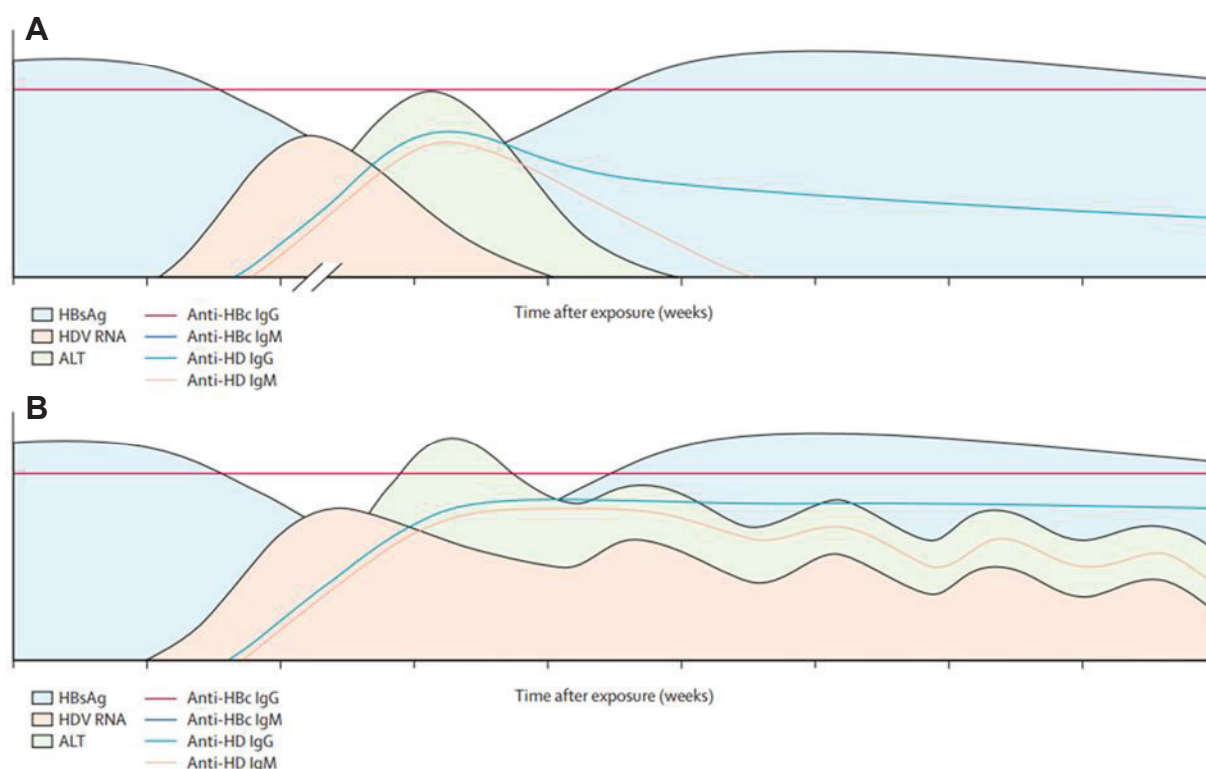


Figure 28. Évolution des marqueurs HBV et HDV lors d'une surinfection HDV d'un patient déjà infecté par HBV. (A) Ce modèle d'infection résulte majoritairement en une élimination des deux virus lorsque HDV infecte un individu récemment infecté par HBV (phase aigüe). **(B)** Au contraire, lorsque HDV infecte un patient déjà chroniquement infecté par HBV, un passage à la chronicité de l'infection HDV après un léger recul transitoire de l'infection HBV sera le plus souvent observé. HDV = hepatitis delta virus ; ALT = alanine aminotransférase ; HBV = hepatitis B virus ; HBsAg = hepatitis B surface antigen (adapté de Hughes SA *et al.*, 2011 Lancet).

b. Hépto-carcinome

L'inflammation constante induite par HDV constitue un facteur de risque majeur pour le développement d'un CHC. Des études montrent un risque 3,2 à 6 fois plus élevés de développement de CHC chez les patients chroniquement coïnfectés HBV/HDV comparés aux patients mono-infectés HBV dans les pays industrialisés^{248,258}. De nombreuses autres ayant associé une répllication d'HDV active marquée par des taux d'ARN HDV sanguins élevés au développement de CHC suggèrent qu'il s'agira d'un facteur prédisposant²⁵⁹. HDV régule les marques épigénétiques du génome d'HBV²⁶⁰ et sur-activerait des mécanismes d'oncogénèse cellulaires²⁴² et/ou sous-activer des gènes suppresseurs de tumeurs²⁶¹. Toutefois ces corrélations font encore débat.

3. Épidémiologie

Un patient est considéré comme porteur d'HDV lorsque des Ac anti-HDAg sont retrouvés dans son sérum. A la fin de la décennie 1980 ayant vu la découverte de ce virus, près de 5% des porteurs d'HBV étaient considérés comme co-infectés par HDV, soit près de 15 millions d'individus. Mais cette prévalence était alors très variable selon les pays et ne semblait pas corrélée avec la prévalence d'HBV²⁶⁰. Suite à la mise en place de la vaccination anti-HBV au début des années 1990, ce profil épidémiologique a fortement évolué dans les populations des pays industrialisés. Privé d'HBsAg, la transmission d'HDV a rapidement chuté dans ces régions comme en Italie et à Taiwan, avec un passage de la prévalence d'HDV de 24,6 à 8,1%²⁶² et de 23,7% à 4,2%²⁶³ respectivement. Mais cette diminution est également imputable à la prise de conscience générale sur les autres infections à transmission sexuelles et sanguines telles que HBV et HIV.

Ce semblant d'inversion a alors laissé penser que l'infection HDV ne constituait plus un souci prioritaire de santé publique, et son dépistage est devenu facultatif et *in extenso*, négligé. Tout d'abord, le délaissement du dépistage couplé aux nouveaux flux migratoires des vingt dernières années a vu la prévalence inchangée en Europe¹⁶⁷ (Figure 29). A Londres la prévalence d'HDV est passée chez les patients HBsAg positifs de 2,6% dans les années 1980 à 8,5% dans les années 2000²⁶⁴. De même en Allemagne avec 18,6% en 1992, 6,8% en 1997 puis une hausse jusqu'à 8-14%¹⁶⁷. L'impact de la vaccination anti-HBV sur la prévalence d'HDV reste à modérer selon les régions du monde considérées. Les pays en développement restent fortement endémiques avec près de 10 à 70% de prévalence chez les patients HBsAg positifs en Afrique Centrale, Mongolie, Pakistan, Iran et dans le bassin de l'Amazone²⁶².

Il est donc probable qu'en l'absence de dépistage systématique, la valeur de 15 millions d'individus infectés par HDV de par le monde soit largement sous-estimée. Ainsi une étude de 2019 sur la prévalence d'HDV aux Etats-Unis montre que près de 42% des patients HBsAg positifs sont également porteur d'Ac anti-HDV²⁶⁵, ce qui constitue une prévalence bien supérieure à celles précédemment établies²⁶⁶. Une seconde étude visant à évaluer la prévalence mondiale d'HDV a conclu à une

infection par HDV de 10,58% des patients HBsAg positifs²⁶⁷, ce qui est deux fois plus élevé que les précédentes estimations²⁶⁸. De plus, la prévalence d'HDV chez les patients HBV positifs variera très fortement selon la région du monde considérée (Figure 30).

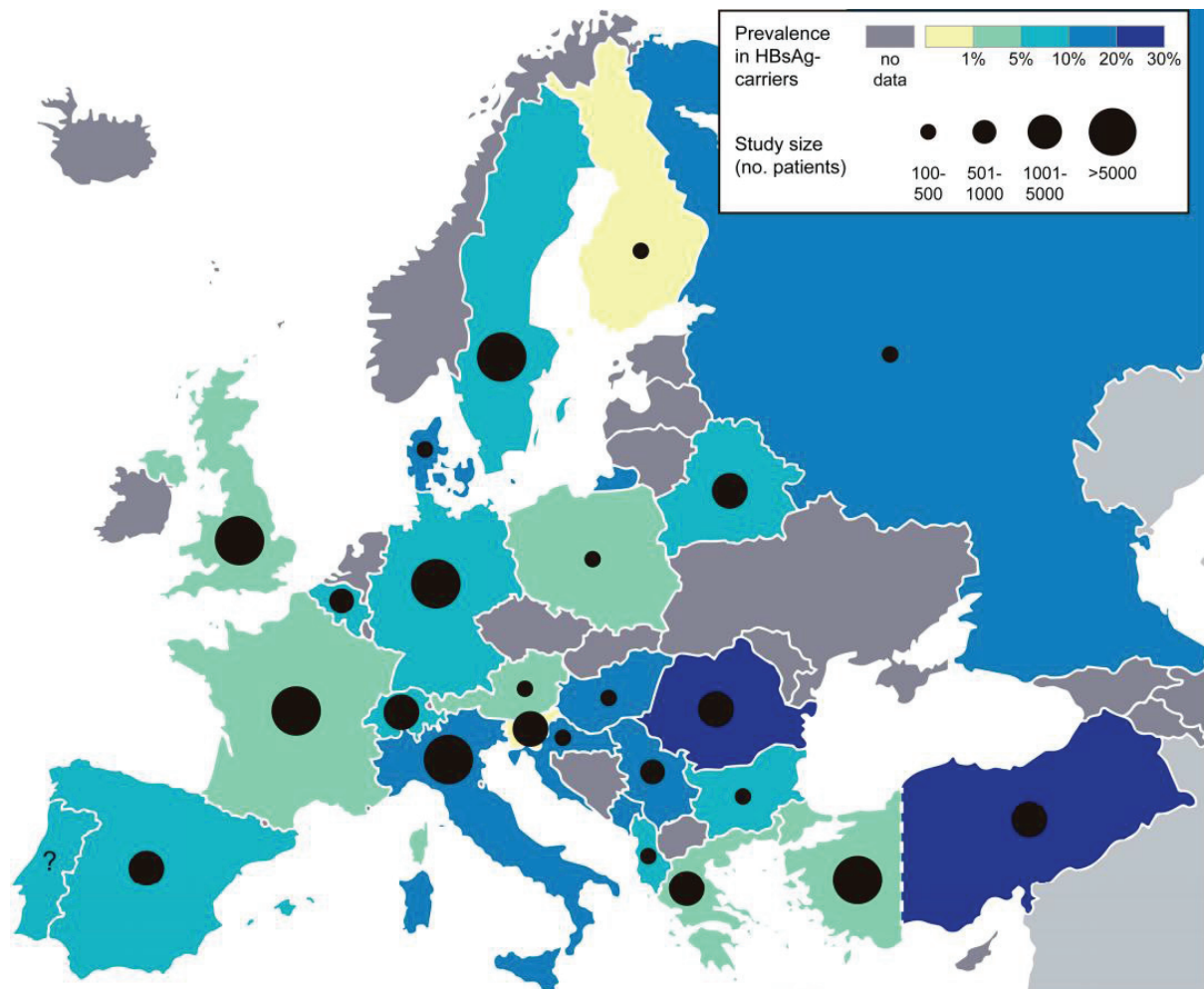


Figure 29. Prévalence d'HDV chez les individus HBsAg positifs en Europe en 2017. La prévalence a été établie sur la positivité à des Ac anti-HDV. Les cercles noirs représentent la taille des cohortes de patients HBsAg positifs utilisées pour réaliser les études (adapté de Urban S *et al.*, 2017).

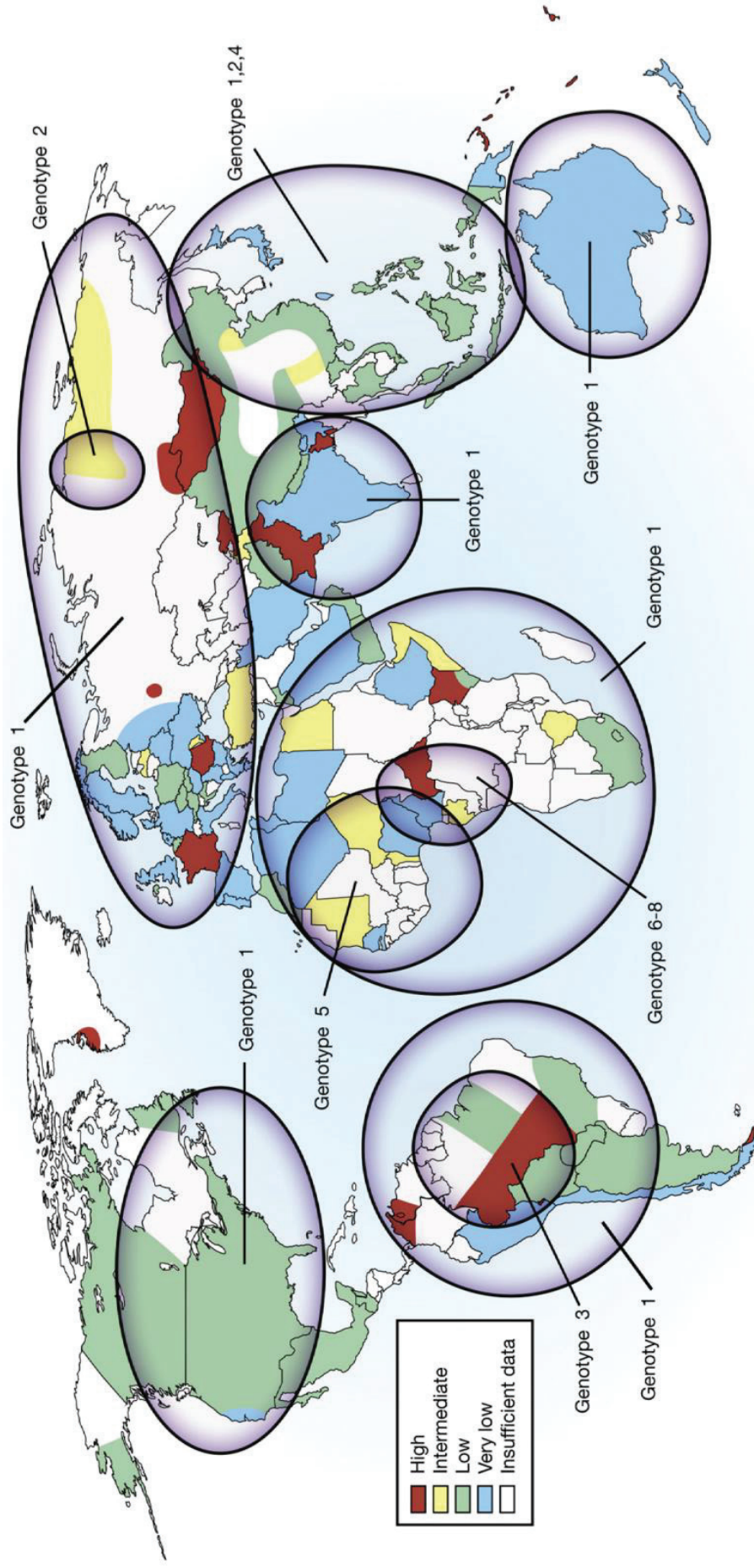


Figure 30. Prévalence mondiale d'HDV et répartition des génotypes. (adapté de Koh C et al., 2019 Gastroenterology)

4. Dépistage et diagnostic

Une détection précoce signifie une meilleure évaluation des risques et un meilleur pronostic à long terme pour le patient. La première recherche lors du dépistage doit être la présence d'Ac dirigés contre HDAg chez les individus relevés comme HBsAg positif²⁶⁹ (Figure 31). Une fois l'infection par HDV détectée, son activité et le génotype impliqué doivent être évalués en quantifiant et séquençant l'ARN HDV présent dans le sérum. Pour cela, un ARN HDV contrôle est mis à disposition par l'OMS et des tests pan-génotypiques sont disponibles²⁷⁰. Le premier objectif est de différencier la co-infection HBV/HDV de la sur-infection HDV afin d'orienter la prise en charge par évaluation des Ac anti-HBc. Ainsi un patient présentant des IgM anti-HBc sera considéré comme développant une hépatite B aigüe. Dans le cas où ce paramètre est associé à des Ac anti-HDAg, le praticien conclue alors que l'infection HDV résulte d'une co-infection HBV/HDV. Au contraire, la présence d'IgG anti-HBc associée à des Ac dirigés contre HDAg signent une hépatite D résultant d'une sur-infection²⁷¹. Tout comme pour HBV, l'évaluation de l'état du foie par échographie ou biopsie est également nécessaire afin d'affiner le diagnostic. L'hépatite aigüe se traduit par une forte infiltration de cellules immunitaires dans le foie associé à une inflammation hépatique. Un phénomène intense sera alors souvent associé à une infection HDV aigüe²⁷².

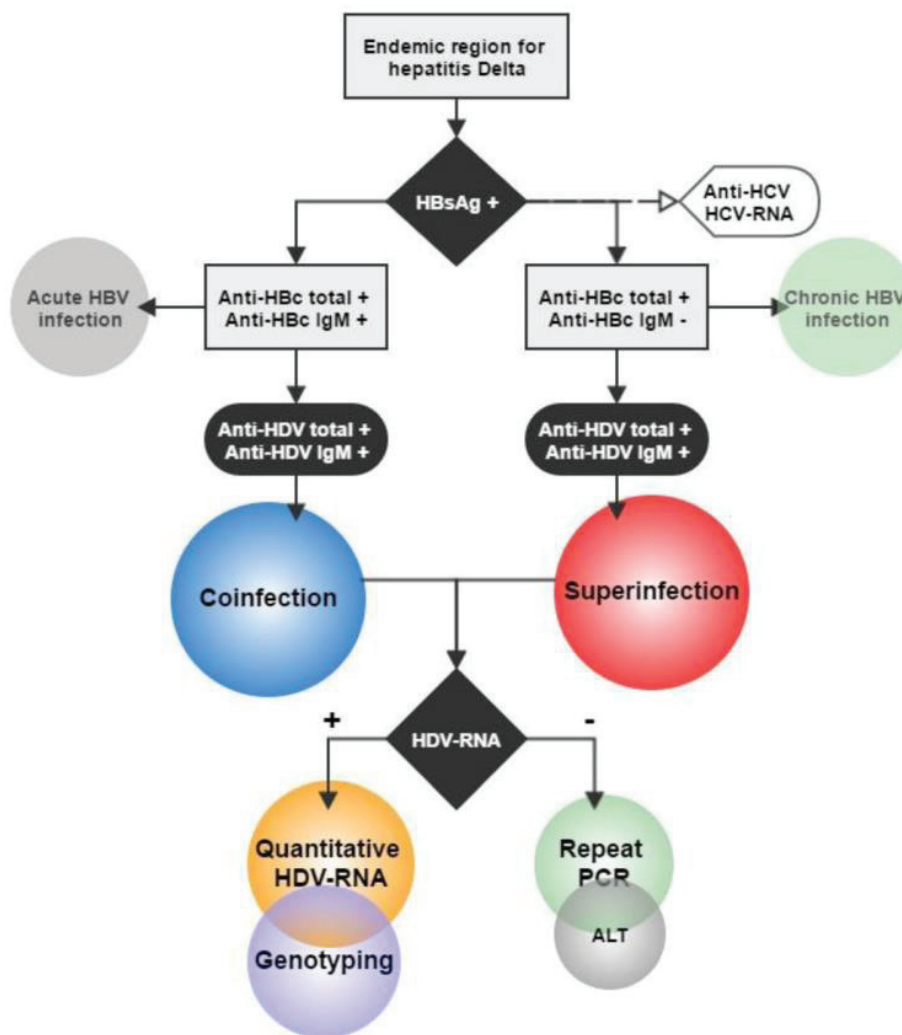


Figure 31. **Arbre de diagnostic de l'infection HDV.** Lorsqu'une infection HBV est identifié, le dépistage d'HDV associé doit être systématique. Le premier marqueur recherché est la présence d'Ac anti-HDAg dans le sérum du patient. Une fois ceux-ci identifiés, l'infection HDV est confirmé ou infirmé par la recherche d'ARN HDV sériques (adapté de *Botelho-Souza et al.*, 2017 *Virology Journal*).

5. Prise en charge

a. Modification du mode de vie et éducation thérapeutique

Les recommandations afin d'améliorer la prise en charge de la pathologie du patient restent identiques pour HBV et HDV et ne seront donc pas à nouveau discutées ici.

b. Thérapie médicamenteuse

Jusqu'à présent, l'administration de PEG-IFN- α en sous-cutané une fois par semaine pendant 48 semaines est le seul traitement qui a montré une certaine efficacité dans le traitement de l'infection par HDV¹⁶⁰. Toutefois l'efficacité reste faible avec 25% de patients répondeurs²⁷³. Malgré ce taux de patients répondeurs, l'efficacité n'est pas systématiquement persistante avec plus de 50% de rechutes après l'arrêt du traitement²⁷⁴ et l'allongement de la durée de traitement n'améliore pas l'efficacité²⁷⁵. Ces résultats hasardeux, associés aux nombreux effets indésirables et contre-indications des traitements à base d'IFN- α énoncés précédemment dans la prise en charge d'HBV, mettent en avant la nécessité de nouveaux traitements. Des thérapies alternatives sont actuellement étudiées en essais cliniques ou précliniques.

iii. Traitements en développement et / ou en clinique

1. Les inhibiteurs d'entrée des virions

a. Principe

L'identification et la caractérisation du récepteur NTCP d'entrée d'HBV et d'HDV au cours de la dernière décennie ont permis un bond en avant dans le développement des inhibiteurs d'entrée de ces deux virus partageant la même enveloppe. Spécifique des hépatocytes, sa fonction initiale est le transport des acides biliaires de la circulation sanguine vers ces mêmes cellules²⁷⁶. Bien qu'il ne s'agisse pas de traitements curatifs en tant que tels, la théorie veut que le renouvellement permanent des hépatocytes couplé à l'inhibition de la ré-infection par les pathogènes permettrait à terme l'élimination des deux virus. De plus, l'expression spécifique du NTCP à la surface des hépatocytes permet de développer des traitements dirigés spécifiquement contre le type cellulaire infecté sans risque majeur de réponse systémique. Peu après l'identification du récepteur d'entrée NTCP, plusieurs études publiées au cours des cinq dernières années ont montré en modèle cellulaire et *in vivo* une inhibition de l'entrée virale, notamment après traitement par des oxystérols²⁷⁷ (Figure 32), un analogue synthétique de l'extrémité N-ter de la L-HBsAg nommé MyrcludexB⁸⁰ (MyrB), la ciclosporine A²⁷⁸ (Figure 33) et un ARN interférent anti-NTCP²⁷⁹.

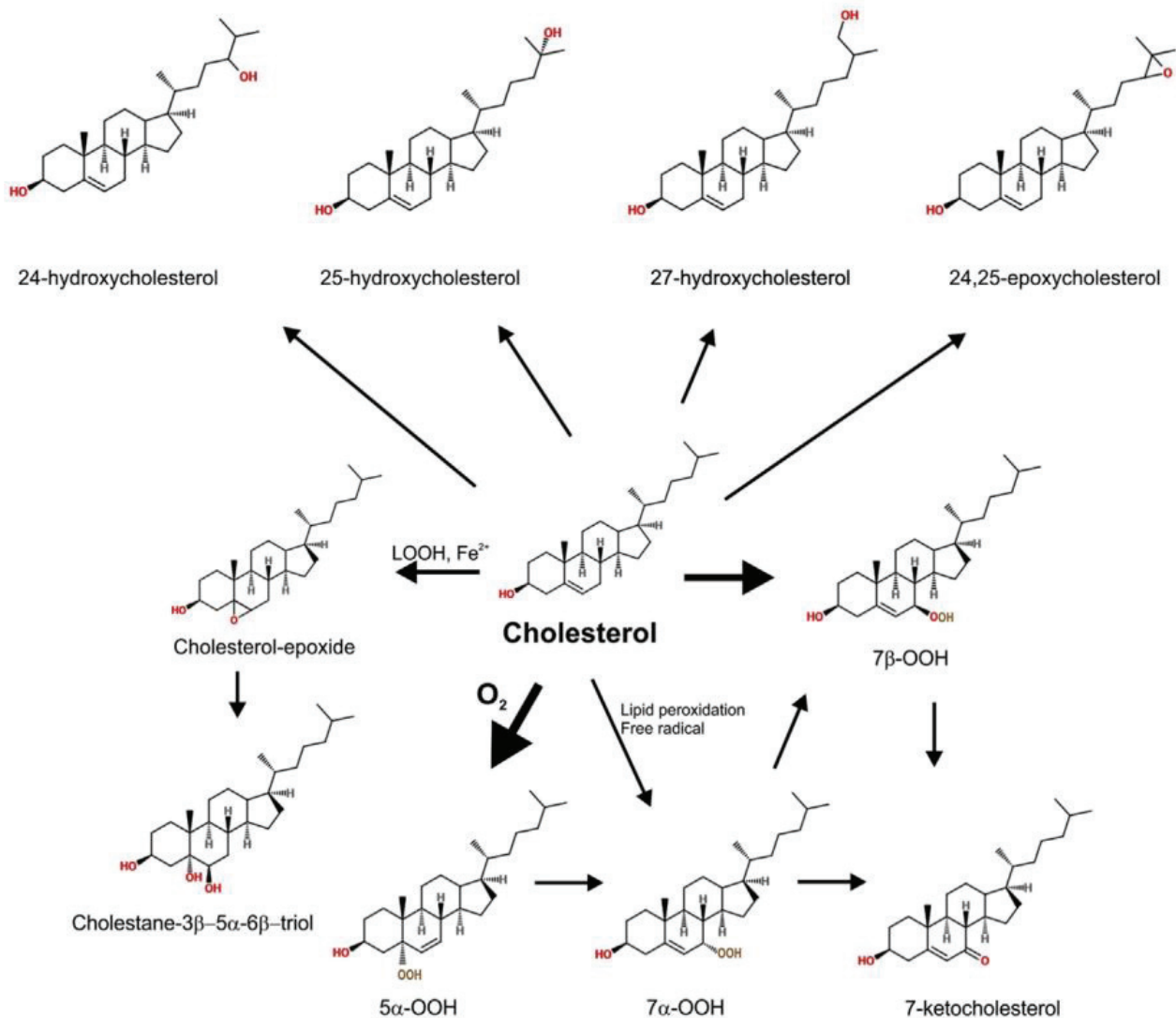


Figure 32. **Oxystérols et dérivés.** Un oxystérol possède un noyau similaire au cholestérol adjoint d'un groupement hydroxyde fixé sur un carbone de sa chaîne carboné débutant en C17 ou d'un de ses cycles (adapté de D'avenzo N 2016 Current Topics in Membrane)

De manière intuitive, l'une des premières stratégies visant à inhiber l'entrée consiste à rechercher chez le ligand naturel du récepteur et ses dérivés (i.e. le taurocholate) des inhibiteurs compétitifs de l'entrée virale. En générant une concentration sanguine de ce ligand supérieure à celle atteignable par une alimentation normale, une étude a conclu à une inhibition de l'entrée d'HBV avec une concentration minimale de 500µM de taurocholate⁸⁰. Toutefois comme mentionné

précédemment, cette concentration inhibitrice n'est pas naturelle et induirait à terme des effets indésirables conséquents sur les fonctions hépatiques. Plusieurs groupes se sont donc tournés vers des analogues synthétiques de fragments de la protéine d'enveloppe d'HBV afin de générer une compétition allostérique au niveau du site de fixation avec le NTCP.

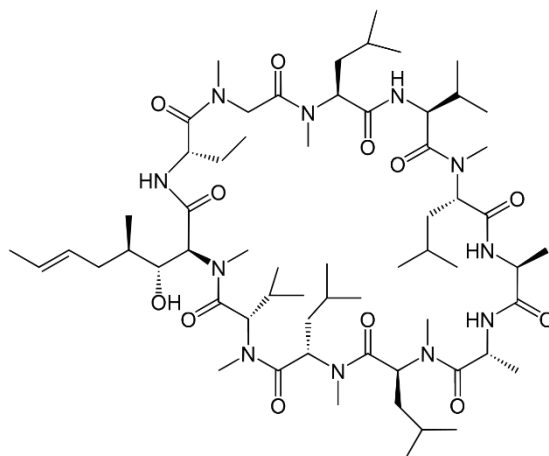


Figure 33. **Structure de la cyclosporine A.** Initialement utilisée comme traitement immunosuppresseur, la cyclosporine est un peptide cyclique de onze aa synthétisé par un fungi, ce qui lui confère des caractéristiques particulières comme la présence aa dextrogyres absent chez l'être humain.

b. Myrcludex B

i. Résultats pré-cliniques

Parmis les inhibiteurs d'entrée d'HBV et HDV, l'un d'entre eux semble très prometteur pour accéder au statut de thérapie administrable chez le patient. Le MyrB est un peptide synthétique myristoylé correspondant aux 47aa en N-ter de la L-HBsAg. De manière intéressante, bien que le récepteur d'entrée NTCP ai été récemment identifié, les dérivés de l'enveloppe d'HBV sont connus depuis longtemps pour leur activité inhibitrice de l'entrée d'HBV et HDV. Dès 2005, Gripon P *et al.*, ont identifié un composé, dénommé MyrB, avec une concentration d'inhibition (IC) 50 de 8nM pour l'entrée d'HBV dans un modèle hépatocyttaire²⁸⁰. L'année suivante, Engelke M *et al.*, ont étendu cette capacité d'inhibition à l'entrée par HDV²⁸¹. Au début de la dernière décennie, un nouveau pas en avant a été fait en montrant la capacité de ce composant à inhiber l'entrée d'HBV dans des modèles de souris et de chimpanzé. Une première étude est parvenue à montrer que le MyrB empêche la propagation d'HBV chez les

souris déjà infectées, montrant l'applicabilité *in vivo* d'un tel traitement pour contrôler l'infection de ce virus²⁸². D'autres travaux réalisés au même moment ont mis en évidence un tropisme hépatique rapide (<24h) du composé sans effets indésirables notables chez des souris, des rats, des chiens et des chimpanzés infectés par HBV²⁸³. Enfin, Lutgehetmann M *et al.*, ont montré en modèle de souris, à fois humanisé et infecté par HBV/HDV, une capacité du MyrB à inhiber la réinfection par HDV²⁸⁴.

ii. Résultats cliniques

Au vu de ces résultats prometteurs, une phase clinique I a été initiée, permettant de confirmer les résultats obtenus par Schieck A *et al.*. Une bonne tolérance et une absence d'effets indésirables couplés à une excellente biodisponibilité par administration sous-cutané (85% de composé actif) et aucune réponse immunogène au traitement ont été établies²⁸⁵. Une seconde étude a montré que, bien que le MyrB interfère avec la fonction initiale du récepteur NTCP en augmentant les acides biliaires sanguins chez l'être humain lorsqu'administré à une dose supérieure à 3-4mg²⁸⁶, l'IC50 nécessaire pour l'inhibition de HBV et HDV en hépatocyte primaire humain²⁸⁷ (PHH) (IC50 = 80pm) est 500 fois inférieure à l'IC50 nécessaire pour l'inhibition de la fonction physiologique du transporteur (IC50 = 47nm). Il y a donc aucun risque d'inhiber la fonction métabolique du NTCP lorsque l'on inhibe l'entrée d'HBV et HDV.

Des résultats préliminaires sur une étude clinique de phase 2a/2b menée chez 24 patients chroniquement infectés HBV/HDV et séparés en trois cohortes traitées MyrB, PEG-IFN- α ou MyrB + PEG-IFN- α ont été publiés la même année²⁸⁵. Les auteurs ont conclu à une capacité élevée du MyrB à diminuer chez les patients les ARN HDV et ADN HBV sanguins et à normaliser les valeurs d'ALT après 24 semaines de traitement. Les taux d'ARN HDV ont diminué de 1log₁₀ chez les patients traités par le MyrB quelle que soit la cohorte considérée avec une disparition de ce paramètre chez deux des patients de la cohorte mono-traitée. Cet effet antiviral était plus prononcé chez les patients en bi-thérapie MyrB + PEG-IFN- α avec une absence de détection des ARN HDV résiduels chez cinq patients, suggérant un effet bénéfique de la combinaison des deux traitements. Enfin seule une faible augmentation des acides biliaires sanguins a été observée à la dose quotidienne employée de 2mg.

Une seconde étude de phase 2b menée par Wedemeyer H *et al.* a visé à estimer l'intérêt de l'utilisation du MyrB en bi-thérapie avec le ténofovir²⁸⁸. Bien que ces données ne soient pas encore publiées, des premières communications en 2017 et 2018 nous permettent d'avoir un retour quant à la pertinence de cette approche thérapeutique. Lors de cette étude, 120 patients chroniquement infectés par HBV et HDV ont été subdivisés en quatre cohortes et traitées avec du ténofovir pendant douze semaines puis en bi-thérapie avec du MyrB à 2 (A), 5 (B) et 10 (C) mg de manière quotidienne pendant vingt quatre semaines. Le quatrième groupe (D) a quant à lui reçu le ténofovir en monothérapie. A l'arrêt du traitement de MyrB, le traitement de ténofovir a persisté pendant vingt quatre semaines. Lors de la communication en 2018, les résultats virologiques n'étaient disponibles que pour 41 patients et les taux d'ALT n'étaient disponibles que pour 94 patients. Un résultat similaire à l'étude Bogomolov P *et al.* a été obtenu avec une légère augmentation de la concentration d'acides biliaires dans le sang. A la fin du traitement, les taux sanguins d'ARN HDV étaient diminués de $2\log_{10}$ ou négativés chez 50% des patients des groupes (A) et (B) et 75% des patients du groupe (C) contre uniquement 3% du groupe (D). La chute de ce paramètre a pu être corrélée à une diminution de l'activité répliquative d'HDV dans les hépatocytes. De plus, comme Bogomolov P *et al.*, cette étude a montré une capacité certaine du traitement à normaliser les taux d'ALT chez les patients avec 43%, 50%, 40% et 6% de normalisation par groupe respectivement. Ces premiers résultats montrent un effet dose-dépendant du MyrB. Toutefois, 12 semaines après l'arrêt du traitement, une rechute avec augmentation des ARN HDV sérique a été observée chez 60%, 80% et 83% des patients précédemment répondeur dans les groupes (A), (B) et (C). Au vu de l'ensemble de ces résultats prometteurs, une autorisation temporaire d'utilisation sur demande nominative a été octroyée au MyrB en France en 2019 (Bulveritride commercialisé par Myr Pharmaceuticals). Toutefois les critères d'octroi ne sont pas encore précisés par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et son attribution se fait donc au cas par cas.

2. Les inhibiteurs de formation et de relargage des virions

a. Principe

Une seconde approche étudiée pour lutter à la fois contre les infections à HBV et HDV est fondée sur l'utilisation de composés nommés Nucleic Acid Polymers (NAP)

initialement supposés interagir avec les HSPG co-récepteurs d'entrée d'HBV et HDV via le NTCP. Ces NAP sont des oligonucléotides phosphorothioatés interagissant avec les hélices alpha amphipathiques de plusieurs agents infectieux tels que les protéines prions²⁸⁹, les glycoprotéines du HIV-1²⁹⁰, de l'Herpesvirus²⁹¹ (HSV), du HCV et du LCMV²⁹². En 2013, une étude du groupe de Noordeen F *et al.* publiée dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* a montré une capacité de ces NAP (REP2055) à inhiber l'entrée et la sécrétion du DHBV dans des hépatocytes de canard *in vivo*²⁹³, probablement en empêchant la sécrétion de l'HBsAg du virus. De manière intrigante toutefois, il est compliqué d'observer un effet anti-HBV *in vitro*.

b. Nucleic Acid Polymers REP2139 et 2055

Le REP2139 (Figure 34) a été développé pour assurer une meilleure tolérance que le NAP initial REP2055 (Figure 34) chez les patients HBV chroniques. Une première étude avec administration du REP2139 versus REP2055 en monothérapie chez douze patients a été réalisée. Lors de cet essai, ces deux NAP sont parvenus à diminuer respectivement de 2-7log₁₀ et 3-9log₁₀ les taux sériques d'HBsAg et d'ADN HBV tout en induisant l'apparition d'Ac anti-HBsAg²⁹⁴. La transition de neuf des patients traités par le REP2139 vers une bi-thérapie avec le PEG-IFN-α a permis une négation du paramètre HBsAg chez huit d'entre eux et une augmentation des Ac anti-HBsAg chez les neuf patients. De plus les effets indésirables observés avec le REP2055 n'ont pas été constatés avec le REP2139.

Suite à ces résultats prometteurs, une étude de phase clinique 2 a visé à évaluer l'effet anti-HDV du REP2139²⁹⁵. Douze patients chroniquement infectés par HBV et HDV ont été traités par voie intravéneuse une fois par semaine pendant quinze semaines avec 500mg de REP2139 puis en bi-thérapie avec 180μg de PEG-IFN-α une fois par semaine à nouveau pendant quinze semaines. Le PEG-IFN-α a par la suite été poursuivi en monothérapie pendant trente trois semaines. Six des douze patients ont alors montré une diminution supérieure à 5log₁₀ du taux sérique d'HBsAg à la fin de la monothérapie REP2139 et cinq d'entre eux ont conservé ce statut un an plus tard après l'arrêt de la monothérapie PEG-IFN-α. Neuf patients ne présentaient plus d'ADN HBV détectables suite à la monothérapie avec le NAP, phénotype qui persistait toujours chez sept d'entre eux un an plus tard. De plus sur les douze patients

initiaux, onze ont vu leurs taux d'ADN HDV sériques se négativer lors du traitement par le REP2139 et sept ont conservé ce profil après l'arrêt du protocole thérapeutique, suggérant que cette bi-thérapie constitue une alternative intéressante pour le contrôle de la coinfection HBV/HDV. Un troisième essai clinique est actuellement en cours afin d'évaluer le devenir à long terme de ces patients.

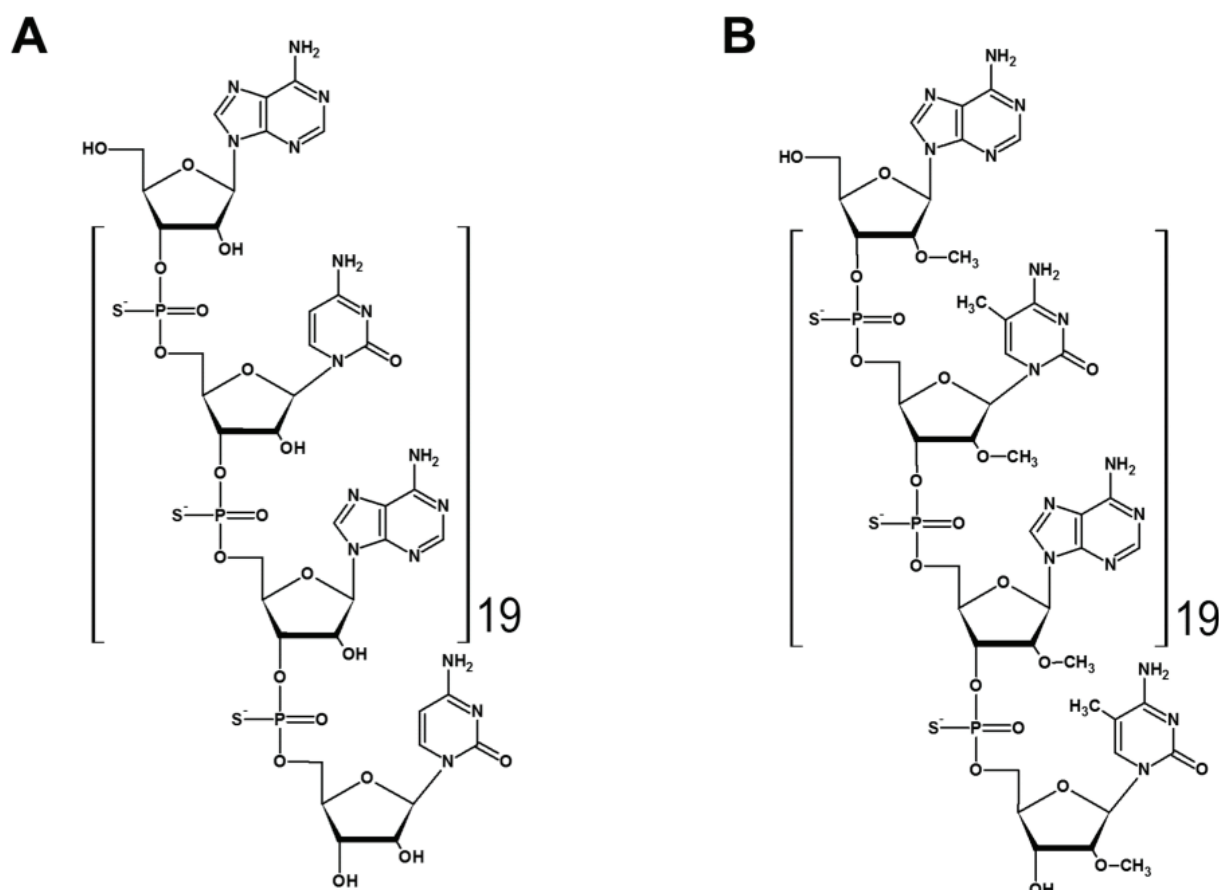


Figure 34. Structure du REP2055 (A) et du REP2139 (B) (adapté de Al-Mahtab M et al., Plos One 2016)

Au-delà du probable intérêt de la bi-thérapie REP2139/PEG-IFN- α , il semble que le REP2139 agisse également en synergie avec le ténofovir et l'entécavir *in vivo* en traitement contre le DHBV²⁹⁶. Après quatre semaines de traitement et huit semaines de suivi des paramètres viraux, Quinet J *et al.* ont constaté une diminution des HBsAg sériques plus rapide lorsque le NAP était associé en bi-thérapie comparé aux analogues de nucléosides seuls. De plus le REP2139 est parvenu à empêcher le phénomène de rebond couramment associé au ténofovir et à l'entécavir. Enfin une

étude mécanistique en 2019 a montré que l'administration du REP2139 *in vitro* en modèle hépatocytaire empêche la sécrétion d'HBsAg, comme identifié initialement pour le REP2055²⁹⁷. Cette étude confirme également que le mécanisme lié à une fixation à une protéine amphipathique précédemment observé dans le cadre d'autres infections est similaire dans le cas de l'infection à HBV.

3. Inhibiteurs de farnésylation de la L-HDAg

a. Principe

Comme décrit précédemment, l'assemblage des particules d'HDV nécessite la farnésylation de la L-HDAg sur la Cys211 afin de recruter la L-HBsAg. En l'absence de cette étape critique, aucune nouvelle particule virale n'est sécrétée. Originellement testés comme traitements antitumoraux inhibant la farnésylation à la fin du XX^{ème} siècle²⁹⁸, les inhibiteurs de farnésylation (FTI) comme le tipifarnib et le lonafarnib ont par la suite été abandonnés pour cette application²⁹⁹. Dès 2002, Bordier BB *et al.*, ont montré la faisabilité d'un traitement anti-HDV fondé sur le FTI-277³⁰⁰. Ils sont parvenus à inhiber la production de particules d'HDV des génotypes 1 et 3 en modèles *in vitro* par traitement avec cet inhibiteur. Leur seconde étude publiée en 2003 a transposé ce potentiel anti-HDV des FTI-277 et FTI-2153 à l'*in vivo* chez des souris transfectées avec les génomes d'HBV et HDV produisant des particules virales³⁰¹. Contrairement au MyrB et au REP2139, il est intéressant de noter que ce traitement impacte uniquement HDV et ne touche en rien HBV.

b. Lonafarnib (SCH 66336)

Initialement testé en phases cliniques comme traitement anti-tumoral, le lonafarnib a été écarté suite à sa faible efficacité²⁹⁹. Toutefois ces études de phases cliniques ont apporté aux études cliniques anti-HDV suivantes de solides données pharmacocinétiques et pharmacologiques sur cette molécule chez les patients. Le repositionnement de ce FTI a alors eu lieu au début des années 2010 à travers un essai clinique de phase 2A réalisé chez des patients chroniquement infectés par HDV³⁰². Vingt huit jours après le début du traitement bi-quotidien de 100 ou 200mg selon le groupe considéré, une diminution moyenne de 0,73log₁₀ à 1,53log₁₀ des taux

d'ARN HDV sérique a été observée chez les membres de l'étude. De plus cet effet antiviral a été constaté sans altération du taux d'HBsAg.

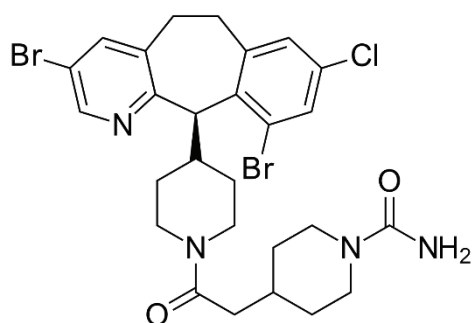


Figure 35. Structure du Lonafarnib

Suite à la preuve d'utilité potentielle du lonafarnib comme traitement anti-HDV, l'étude LOWR HDV-1 visant à améliorer la dose et la durée du traitement en association ou non à un analogue de nucléoside (ritonavir) a été initiée. Lors de cet essai clinique, quinze patients divisés en cinq groupes ont été respectivement traités avec du lonafarnib 200mg ou 300mg deux fois par jour pendant 12 semaines, 100mg trois fois par jour pendant 5 semaines, 100mg additionnés de 180µg de PEG-IFN-α ou 100mg de ritonavir pendant 8 semaines. Comme précédemment, un effet dose réponse du lonafarnib a été constaté avec une meilleure diminution de la charge virale d'HDV chez les patients traités avec les doses les plus élevées. Toutefois cette amélioration de l'effet a également été associée à une fréquence plus élevée d'effets indésirables gastrointestinaux et l'addition d'un traitement en bi-thérapie a montré un effet meilleur que le lonafarnib seul à 300mg.

Une étude simultanée a visé à caractériser précisément la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du lonafarnib en traitement anti-HDV³⁰³. Douze patients divisés en deux groupes ont été traités deux fois par jour avec du lonafarnib à 100 ou 200mg pendant 28 jours. Canini L *et al.*, ont identifié une IC₅₀=227ng/ml et une demi-vie de 1,87 jours. Le modèle (Figure 35) informatique produit à partir de ces données a conclu qu'une dose de 620mg deux fois par jours permettrait théoriquement une efficacité de 99% chez les patients, soit une dose bien supérieure à celles précédemment testés présentant déjà des effets indésirables. Au vu des études

terminées ces quatre dernières années, les essais lancés par la suite étudient l'apport de la bi-thérapie dans le traitement de l'infection HDV afin de parvenir à une meilleure efficacité sans apparition d'effets indésirables. L'analyse des conséquences de l'inhibition d'HDV sur l'infection HBV associée est également prévue.

iv. Modèles d'étude

1. *In vitro*

Jusqu'à l'identification du récepteur d'entrée d'HDV, les modèles d'études étaient restreints à deux modèles cellulaires. Le premier consiste à la mise en culture de PHH de foies de patients. Dans ce cas, plusieurs contraintes persistent, comme le fait que ces cellules primaires ne prolifèrent pas, ne peuvent être cultivées que pendant une durée limitée et enfin présentent une variabilité inter-individuelle et un approvisionnement inconstant³⁰⁴. Toutefois ce modèle permet un contrôle des phénotypes observés dans un modèle pertinent plus proche de l'*in vivo*. Des améliorations techniques ont permis d'optimiser ce modèle de PHH en culture³⁰⁵. Le second modèle historique nommé HepaRG consiste en une lignée cellulaire de progéniteurs hépatiques isolés depuis la tumeur d'un patient infecté HCV³⁰⁶. L'avantage de ce modèle cellulaire comparé aux autres lignées immortalisées est que les HepaRG présentent encore de nombreuses fonctions hépatiques essentielles telle qu'une immunité innée fonctionnelle très proche des PHH³⁰⁷ et sont tout aussi susceptibles à l'infection HBV/HDV une fois différenciées en hépatocytes²³⁹. Au-delà de ces deux modèles, deux lignées immortalisées d'hépatocytes nommées Huh7 et HepG2 étaient utilisées depuis longtemps pour étudier la biologie d'HDV par transfection de plasmides encodant le génome d'HDV et les protéines d'enveloppe d'HBV ou la biologie d'HBV par transfection de plasmide encodant le génome de ce dernier⁷⁸. L'identification du NTCP comme récepteur d'entrée pour ces deux virus a permis un renouveau de ces lignées en les rendant susceptibles à l'infection par HBV et HDV. Les deux nouvelles lignées créées HepG2-NTCP et Huh7-NTCP peuvent en effet être infectées par ces deux virus²⁰³.

2. *In vivo*

De part sa nature de virus infectant l'être humain, le modèle de choix pour l'étude d'HDV est le chimpanzé pour sa proximité avec l'Homo sapiens. Toutefois pour des raisons éthiques l'utilisation de ces modèles est en très grand recul voire stoppé selon les pays. En alternative, des modèles d'animaux de laboratoires ont été développés depuis 1980 afin d'étudier la biologie d'HDV. De manière surprenante, le premier modèle développé a été la marmotte. En effet chez cet animal il apparaît qu'HDV est capable d'infecter les hépatocytes³⁰⁸. De plus lorsque ce virus est co-infecté avec le WHV, la RNP d'HDV est capable d'en détourner l'enveloppe pour former des particules virales fonctionnelles qui seront sécrétées afin de réinfecter d'autres hépatocytes. En parallèle plusieurs modèles de souris ont été développés. Il est important de noter que contrairement à la marmotte, les hépatocytes de souris ne sont pas susceptibles à l'infection par HDV³⁰⁹. Afin de palier à cela, des modèles d'injection hydrodynamique de plasmides encodant le génome d'HDV ont permis d'observer une réplication dans les hépatocytes³¹⁰. Suite à la découverte du récepteur d'entrée NTCP, des souris transgéniques exprimant la version humaine de ce récepteur à la surface de leurs hépatocytes ont été développées afin d'étudier l'infection HDV. Toutefois un tel modèle n'était pas susceptible à l'infection par HBV, probablement de part l'absence de facteurs cellulaires humains essentiels et absents dans les hépatocytes de souris³¹¹. Le développement de souris à foie humanisé a permis l'apparition de modèles susceptibles à l'infection par HDV mais inadéquats pour l'étude de l'immunopathogénèse induite³¹². Des modèles de souris à foie et système immunitaire humanisés sont actuellement en développement et ont déjà été montré comme susceptibles à l'infection par HBV³¹³.

3. Réponse immunitaire innée et pathogénèse

a. Principe

Les eucaryotes ont développé un système immunitaire complexe afin de lutter contre les pathogènes. Celui-ci est divisé en deux parties : la réponse adaptative fondée sur la reconnaissance d'un Ag spécifique³¹⁴, et la réponse innée. Cette dernière est composée d'une barrière physique, empêchant l'entrée et la diffusion de l'agent

infectieux, et d'une barrière chimique reconnaissant des structures et motifs ubiquitaires chez les organismes entrants nommés PAMP pour Pathogens Associated Molecular Patterns. Cette reconnaissance activera le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site infecté par sécrétion de cytokines et chimiokines et *in fine* la transition vers l'immunité adaptative via les mécanismes de présentation antigénique. Lors de cette thèse nous allons principalement nous intéresser aux réponses intracellulaires aux pathogènes.

b. Notions de « pattern recognition receptor »

i. Principe

La détection précoce et non-spécifique des agents infectieux, qu'ils soient bactériens, parasitaires ou viraux, est très souvent médiée par des Pattern Recognition Receptors (PRR) divisés en quatre grandes familles : Toll-Like Receptors (TLR), Retinoic acid-inducible gene-Like Receptors (RLR), Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein-like Receptors (NLR) et C-type Lectin Receptors (CLR). Ces récepteurs reconnaissent des PAMP, motifs ou structures chimiques, lipides, sucres, protéines, ARN ou ADN retrouvés chez de nombreux pathogènes. Ainsi ils ne ciblent pas un organisme étranger particulier mais ont la capacité pour un seul d'entre eux, de reconnaître plusieurs agents infectieux différents et d'activer une immunité innée en réponse. Une fois l'interaction PRR – PAMP établie, plusieurs voies en aval sont activées impliquant :

- Un adaptateur et éventuellement un co-adaptateur ;
- Une ou plusieurs kinases ;
- Un ou des facteurs de transcription activant la transcription de plusieurs gènes cellulaires. Ceux-ci sont souvent divisés en deux familles avec d'un côté les gènes modulés par l'IFN et induits par les Interferon Regulatory Factor (IRF) et de l'autre les gènes pro-inflammatoires et induits par le complexe NFκB.

ii. Toll-like receptors

1. Principe

Plusieurs types cellulaires, allant des macrophages aux hépatocytes, expriment les TLR. Ceux-ci ont été les premiers récepteurs de l'immunité innée identifiés chez *Drosophila*³¹⁵. Cette famille de récepteurs est constituée de 10 membres chez l'Homme et 13 membres chez les souris classés selon le PAMP qu'ils reconnaissent et le compartiment cellulaire où ils sont localisés³¹⁶ (*i.e.* membrane cellulaire ou endosomale) (Figure 36). De plus leur expression varie selon le tissu considéré : seuls les TLR1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont observés dans l'hépatocyte humain³⁰⁷. Ce sont des protéines transmembranaires présentant une structure consensus :

- Une extrémité N-ter constituée de répétitions riches en leucines responsable de la reconnaissance du PAMP ;
- Un domaine transmembranaire ;
- Une extrémité C-ter caractérisée par un domaine cytoplasmique Toll Interleukine Receptor (TIR) interagissant avec son adaptateur cytoplasmique ;

Après reconnaissance du PAMP associé, l'activation d'un TLR se déroule en plusieurs étapes (Figure 37) :

- **(i)** Homo ou hétérodimérisation selon le TLR considéré,
- **(ii)** Recrutement d'un adaptateur variant selon le TLR considéré :
 - ✓ Le Myeloid factor 88 (Myd88), ubiquitaire aux TLR ;
 - ✓ Le TIR-domain-containing adaptor Inducing interferon (TRIF) associé au Myd88 au niveau des TLR3 et 4 ;
 - ✓ Le TIR-Associated Protein (TIRAP) associé à Myd88 au niveau du TLR2 ;
 - ✓ Le Myd88-adaptor-like (MAL ou le TRIF-Related Adaptor Molecule (TRAM) ;
- **(iii)** Recrutement et activation d'une kinase variant selon le TLR considéré : l'Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK), la TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) ou I-KappaB Kinase epsilon (IKK ϵ),
- **(iv)** Recrutement d'une ou plusieurs ubiquitines ligases Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor (TRAF),

- (v) Activation de différentes voies immunitaires nommées Nuclear Factor kappa B (NFκB), IFN de type I, Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)/p38 ou MAPK/c-Jun N-terminal Kinases (MAPK/JNK). Le dérèglement de telles voies immunitaires conduit à des maladies auto-immunes ou au contraire entraîner un déficit de réponse lors d'une infection.

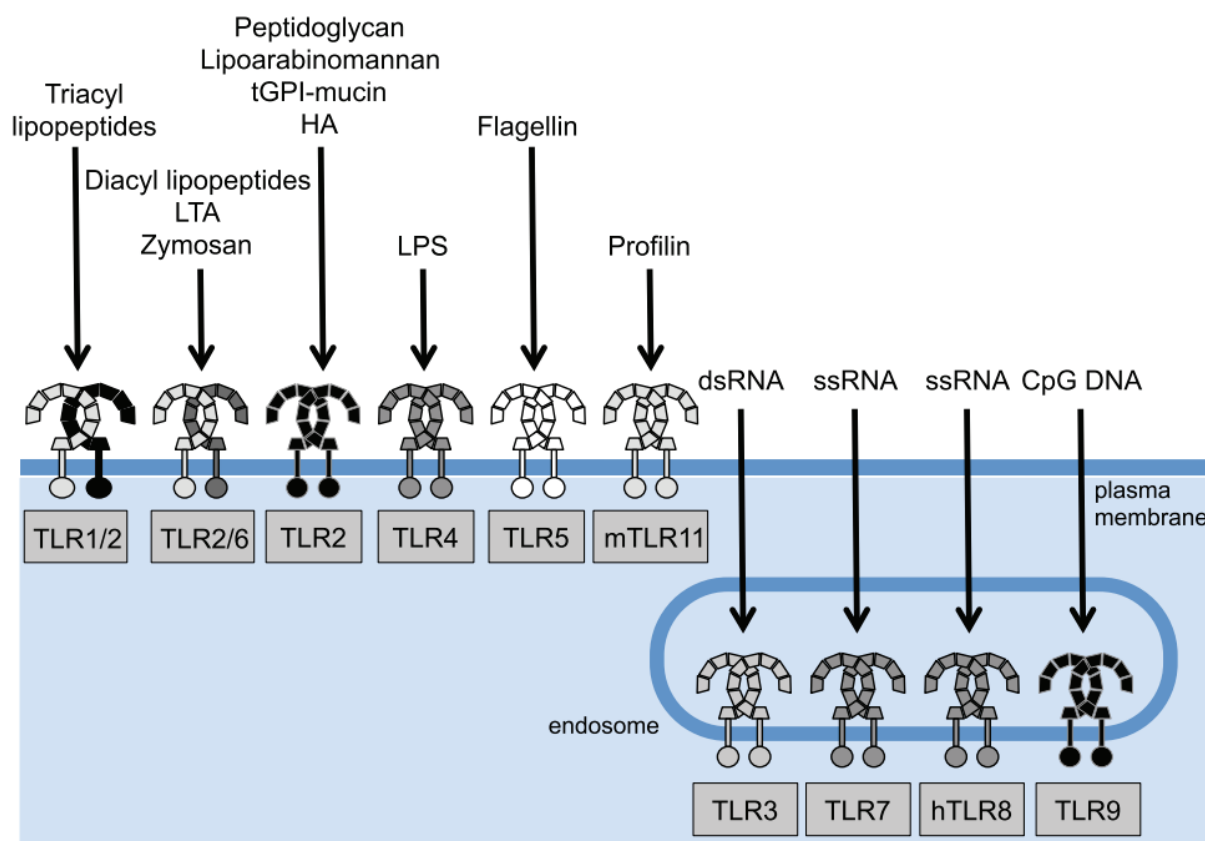


Figure 36. Localisation des différents TLR et PAMP reconnus. Les TLR se divisent entre récepteurs localisés à la membrane plasmique et récepteurs endosomaux. Ils reconnaissent différents types de PAMP, ARN ou ADN sb et db ainsi que des structures protéiques, lipidique et de sucres (adapté de Goulopoulou S *et al.*, 2016).

En réponse à une infection virale, une réponse de l'hôte sera souvent caractérisée par une production rapide d'IFN et cytokines pro-inflammatoires. Ce panel de protéines sécrétées agit de manière auto et paracrine afin d'induire de nombreux gènes cellulaires à activité antivirale et recruter des cellules de l'immunité adaptative³¹⁷. La reconnaissance d'un PAMP à la membrane cellulaire résultera majoritairement en une sécrétion de cytokines pro-inflammatoire tandis que la reconnaissance d'un PAMP au niveau des endosomes induit une réponse IFN de type

I. Ceci est probablement imputable au défaut d'accessibilité à la membrane pour l'adaptateur TRAF3 essentiel à l'induction des IFN³¹⁸. Une fois stimulé, plusieurs voies de signalisation seront activées selon le TLR considéré. De plus ces voies ne sont pas distinctes mais se croisent et se recroisent, ce qui rend compliqué leur compréhension globale afin d'en extraire un schéma consensus pour chaque récepteur et chaque pathogène :

- **Dans le cas de la voie NFκB**, après stimulation par un virus ou diverses cytokines comme le Tumor Necrosis Factor (TNF)-α et l'IL-1β, les membres des IKK sont activés et phosphorylent IκB ce qui active son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Le complexe NFκB alors libéré de son répresseur est exporté au noyau et régule la transcription de l'IFN-β et majoritairement des cytokines pro-inflammatoires³¹⁹.
- **Dans le cas des voies IRF3 et IRF7**, la reconnaissance d'un virus phospho- active les kinases TBK1 et IKKε qui s'associent à l'IKKγ et à TANK^{320,321}. Le facteur de transcription IRF3 ou IRF7 s'homodimérise alors et se lie aux promoteurs IRF3 ou 7 afin d'induire la transcription des IFN-α, β ou λ³²².

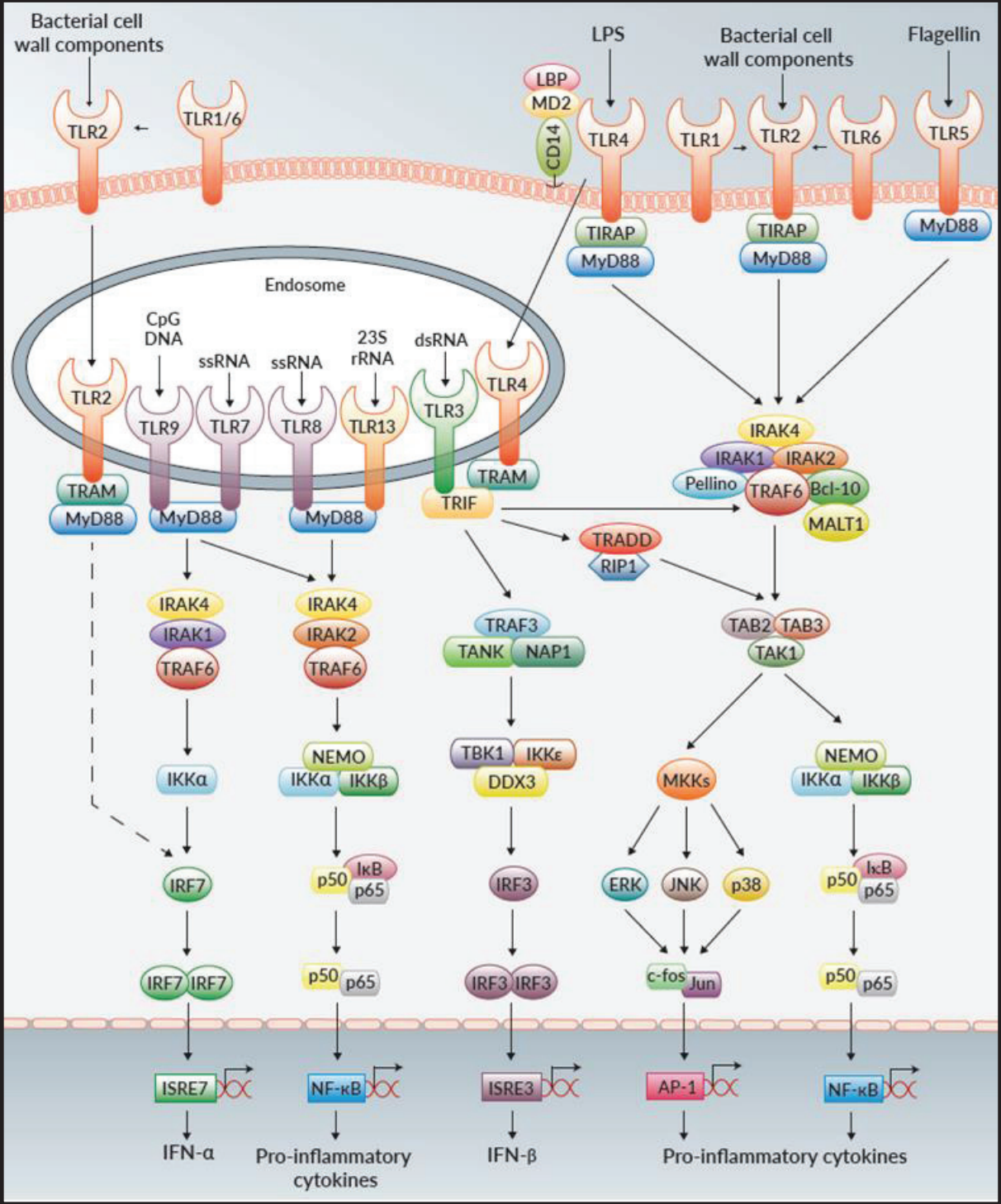


Figure 37. Voies des TLR. Suite à la stimulation du TLR par un PAMP, un adaptateur variable selon le récepteur considéré est recruté à l'extrémité cytosolique du PRR. Dans un second temps cette protéine recrutée active alors une ou plusieurs kinases variant selon le TLR et l'adaptateur. Enfin dans un troisième temps ce complexe adaptateur / kinase(s) activées recrute plusieurs ubiquitine ligases cellulaires afin d'activer différentes voies menant à une réponse immunitaire innée (adapté de Invivogen).

2. TLR2

a. Biologie

Contrairement aux TLR endosomaux qui reconnaissent des composants internes des agents viraux étant donné que ceux-ci se désassemblent fréquemment dans ce compartiment, le TLR2 situé à la membrane cellulaire se lie principalement aux protéines présentes à la surface des agents infectieux ou à des protéines virales sécrétées. Son expression est limitée aux cellules dendritiques (DC), macrophages/monocytes, lymphocytes B et T³²³, cellules épithéliales³²⁴, endothéliales³²⁵ et hépatocytes³⁰⁷, ce qui en fait l'un des TLR exprimés sur le plus de tissus différents. En opposition aux TLR qui s'homodimérisent, le TLR2 s'hétérodimérise avec les TLR1 et 6 localisés également à la membrane cellulaire. Ces trois TLR sont essentiels pour reconnaître les lipoprotéines et lipopeptides bactériens^{326,327}, exploitent le même binôme d'adaptateurs Myd88 et TIRAP³²⁸ mais reconnaissent des PAMP différents selon le dimère considéré :

- Le TLR1/2 reconnaît les lipopeptides tri-acylés³²⁹ ;
- Le TLR2/6 reconnaît les lipopeptides di-acylés³²⁸ ;

Un groupement acyle correspond à un acide carboxylique RCOOH ou RCONH₂, le R correspondant le plus souvent à une chaîne carbonée. Ces groupements acylés sont majoritairement observés sur les Cys des extrémités N-ter des lipoprotéines bactériennes.

b. Rôle

Une fois le récepteur activé, une forte réponse pro-inflammatoire est induite dans la cellule via la voie NFκB³³⁰ et a été longtemps supposée comme indépendante d'une réponse IFN. Toutefois une étude a montré l'induction de cette dernière après détection du Cytomégalovirus Murin (MCMV) par le TLR2³³¹. Depuis sa découverte, le TLR2 a été associé à la détection de très nombreuses lipoprotéines bactériennes et de plusieurs agents viraux, tels que les glycoprotéines d'enveloppe du CMV³³² et de l'HSV³³³, les hémagglutinines du virus de la rougeole³³⁴, les protéines core et NS3 de l'HCV³³⁵ et du virus d'Epstein-Barr³³⁶ (EBV).

c. Ciblage

L'induction du TLR2/6 par le FSL-1 a montré une capacité à diminuer l'infection par le HSV-2 sans effet indésirable détectable en modèle cellulaire et chez la souris³³⁷. De manière similaire, le ligand Pam2Cys (Figure 38) inhibe l'infection par le virus de la grippe en induisant la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, TNF- α) chez la souris³³⁸. Tan *et al.* ont observé une réduction de la perte de poids et de la mortalité associés à l'infection chez les animaux traités. Un variant du même ligand nommé Pam3CSK4 a été montré par notre équipe comme inhibant la réplication d'HBV *in vitro*³³⁹ (Figure 38). Les agonistes de TLR2 ont également été testés en tant qu'adjuvants de vaccins pour l'hépatite B en phase clinique I³⁴⁰. Des agonistes de TLR2 ont été testés comme adjuvants dans un vaccin anti-HIV sans aucun bénéfice clair par rapport au vaccin sans adjuvant³⁴¹.

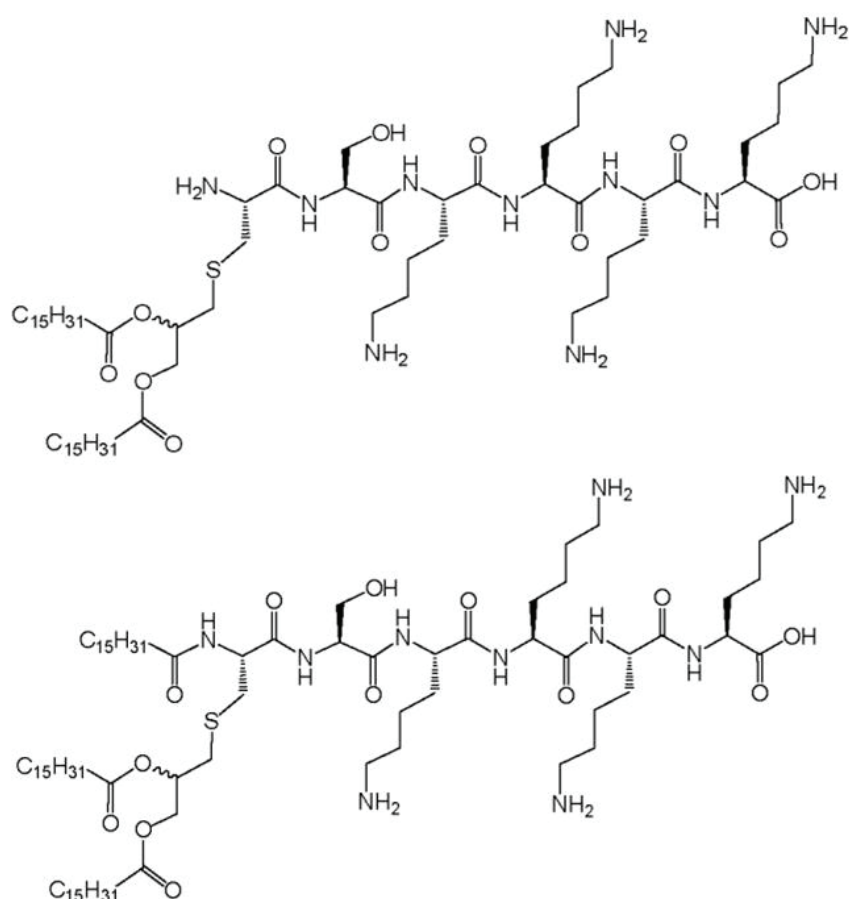


Figure 38. Structure moléculaire de Pam2 et Pam3CSK4. Un peptide Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys présente deux ou trois chaînes palmitoyl branchées par des groupement acyl sur une unité glycérol elle-même fixée à la Cys (adapté de Hamley IW *et al.*, 2014 Chem Com).

3. TLR3

a. Biologie

Le TLR3 fut l'un des premiers TLR identifiés. Celui-ci reconnaît les ADNdb, l'un des composants essentiels d'une grande partie des virus³⁴² et peut être stimulé par le polyI:C, un analogue synthétique de l'ARNdb³⁴². Ce récepteur est retrouvé au niveau de plusieurs types cellulaires et organes comme le foie, le poumon, le cœur, la rate, le cerveau et les cellules du système immunitaire³⁴³. Sa stimulation au niveau des endosomes active une voie TRIF dépendante et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN³⁴⁴.

b. Rôle

TLR3 est un PRR essentiel dans la mise en place d'une immunité innée vis-à-vis de nombreux pathogènes à ADNdb. Son absence a montré une hypersensibilité d'un modèle de souris au cytomégalovirus³⁴⁵ et au HSV-2³⁴⁶. Dans le cas du HSV-2, le système immunitaire est incapable de détecter le pathogène après son passage de la barrière hémato-encéphalique et d'induire une réponse IFN appropriée. De manière non-intuitive, TLR3 est également impliquée dans un effet antiviral dirigé contre des virus à ARN tel que le poliovirus, en induisant une réponse IFN médiée par TLR3 et TRIF en modèle souris³⁴⁷, tels que l'encéphalomyocarditis virus³⁴⁸ et le coxasackievirus³⁴⁹. Plus récemment, TLR3 a été identifié comme PRR reconnaissant les ARN d'HCV³⁵⁰ et de la Dengue (DENV), afin d'induire une réponse IFN antivirale³⁵¹.

c. Ciblage

Bien que le TLR3 n'ait pas été identifié comme reconnaissant l'HBV, l'Influenza virus, le HIV et le coronavirus, il semble que sa stimulation par le PolyI:C induise un effet antiviral contre ces pathogènes^{339,352-355}. L'entreprise Hemispherx Biopharma souhaite développer TLR3 sous le nom commercial d'Ampligen comme traitement anti-HIV, influenza virus, HBV et HCV³⁵⁶. Cet agoniste présente également des capacités d'adjuvant dans un vaccin anti-HIV en induisant le développement de lymphocytes CD8⁺³⁵⁷ et dans un vaccin anti-influenza en induisant un taux d'IgA et

IgG spécifiques plus élevés que le vaccin seul³⁵⁸. Un agoniste plus récent du TLR3 nommé Riboxsol a montré également des effets anti-HBV dans des PHH infectés³³⁹.

4. TLR4

a. Biologie

Le TLR4 fut le premier TLR identifié par Medzhitov R *et al.*³⁵⁹. Celui-ci reconnaît, les lipopolysaccharides (LPS), composés situés sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif³⁶⁰. Retrouvé à la surface de la majorité des cellules présentatrices d'Ag, il permet une réponse rapide face aux agents infectieux. Après fixation de son ligand, le TLR2 recrute les adaptateurs Myd88, MAL et TRIF³¹⁸ à son extrémité cytosolique pour activer les voies IRF3 ou NFκB et entraîner respectivement une réponse IFN de type I ou pro-inflammatoire³¹⁶.

b. Rôle

Bien que les LPS soient caractéristiques des bactéries, le TLR4 est également capable d'identifier des glycoprotéines d'enveloppe des virus. Il est impliqué dans des réponses IFN de type I et/ou pro-inflammatoires après détection de la glycoprotéine du VSV³⁶¹ et du virus Ebola³⁶².

c. Ciblage

La stimulation du TLR4 par des ligands synthétiques induit une immunité protectrice contre les infections par l'Influenza virus³⁶³ et l'HSV-2. De même un agoniste nommé monophosphoril lipid A (MPL) est approuvé comme adjuvant dans les vaccins de l'hépatite B et du papillomavirus humain^{364,365}. Le laboratoire GlaxoSmithKline a, entre autres, testé l'agoniste MPL en combinaison avec plusieurs autres adjuvants³⁶⁶.

5. TLR7/8

a. Biologie

Les TLR7 et 8 sont retrouvés au niveau des endosomes³⁶⁷. Ils reconnaissent les ARNs riches en AU et en GU des virus à ARN³⁶⁸ et sont stimulés *in vitro* par les imidazoquinolines³⁶⁹. Après stimulation, ces PRR recrutent l'adaptateur Myd88 pour induire la synthèse d'IFN de type I et III pour le TLR7³⁷⁰ ou de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α pour le TLR8³⁶⁹. Contrairement au TLR3, TLR7 et 8 semblent restreints aux DC plasmacytoïdes (pDC), aux lymphocytes B et aux monocytes/macrophages³⁷¹.

b. Rôle

De par leur présence répandue dans les endosomes des cellules immunitaires, les TLR7 et 8 sont impliqués dans la détection et la réponse immunitaire précoce aux infections par plusieurs virus à ARNs comme le HIV-1³⁷², le virus de Sendai³⁷³, le coxsackievirus B³⁷⁴, les coronavirus³⁷⁵ et plusieurs flavivirus comme l'Influenza Virus, HCV, le DENV et le WNV³⁷⁶⁻³⁷⁸.

c. Ciblage

L'imiquimod, une imidazoquinoline agoniste de TLR7 a montré une faculté à inhiber l'HSV. Une autre imidazoquinoline nommée Resiquimod (R848) a été testée pour le traitement du HIV³⁷⁹. Le traitement de monocytes de patient infectés a montré une induction de la production d'IL-12 et une diminution de la réplication du virus. De même le CL097, un autre agoniste de TLR7/8, a montré après traitement un rétablissement de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) dans les DC de patients infectées *in vitro* par le HIV³⁸⁰. L'isatoribine, autre agoniste du TLR7 et sa pro-drogue l'ANA-795 développés par Novartis, ont démontré en phase clinique I un effet anti-HCV intéressant en diminuant la charge virale chez les patients traités. Toutefois les essais ont été suspendus après l'observation de forts effets indésirables chez l'animal³⁸¹. L'ANA-773 (RG7795 ou RO6864018), un autre pro-drogue de l'isatoribine acquise puis cédée par l'entreprise Roche, a montré des effets anti-HCV similaires en parvenant à restaurer une réponse IFN de type I sans effet indésirable

notable. En essai clinique, l'effet sur la réponse immunitaire a pu être reproduit et une diminution de la virémie a été observée³⁸². Toujours dans le domaine des hépatites virales, le vesatolimod (GS9620), développé par Gilead, a montré un fort potentiel anti-HBV associé à une forte réponse IFN de type I en modèle chimpanzé³⁸³. Le test de cet agoniste de TLR7 en essai clinique a confirmé ces résultats précliniques avec une bonne tolérance du traitement sans effet indésirable important³⁸⁴. Toutefois son essai en phase clinique 2b a montré une faible efficacité associée à aucune diminution d'HBsAg significative chez les patients, cet agoniste a par conséquent été écarté³⁸⁵.

6. TLR9

a. Biologie

Le TLR9 reconnaît les motifs CpG non-méthylés au niveau des endosomes³⁸⁶ et peut être stimulé à l'aide d'oligodeoxynucléotides (ODN) de CpG synthétiques³⁸⁷. La nécessité de motifs CpG non-méthylés permet au TLR9 de discriminer entre l'ADN du soi et du non-soi. En effet les ADN de mammifères sont le plus souvent méthylés au contraire des ADN bactériens et viraux. Exprimé dans les endosomes de nombreuses cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes B et les pDC³⁸⁸, son activation recrute l'adaptateur Myd88, ceci conduisant à la dimérisation de l'IRF7 et à une forte réponse IFN ou une réponse pro-inflammatoire via la voie NFκB³⁸⁹. Cette dichotomie entre les voies induites n'est pas encore clairement élucidée mais il semble que selon le type cellulaire considéré l'une des voies soit privilégiée.

b. Rôle

Ce PRR reconnaît les ADN CpG non-méthylés de plusieurs virus tels que le MCMV³⁴⁵, les HSV-1 et 2^{390,391}, le virus du sarcome de Kaposi³⁹², les adénovirus³⁹³, l'EBV³⁹⁴ et les poxvirus³⁹⁵. Il a été montré une absence de réponse IFN productive dans des pDC TLR9 défectives et infectées par le MCMV. Le TLR9 détecte également, dans une certaine mesure, les ADNs des virus adéno-associés, pourtant considérés comme étant peu reconnus par le système immunitaire humain, ce qui réduit leur application en tant que vecteurs de thérapies³⁹⁶. Une coopération entre les TLR9 et 2 a également été établie, notamment dans les infections à EBV et HSV^{394,397}.

c. Ciblage

Des ODN riches en CpG non-méthylés comme CPG 10101 (ACTILON), un agoniste de TLR9, ont montré en essai clinique des résultats encourageants pour le traitement des patients chroniquement infectés par HCV en diminuant la charge virale et en rétablissant une réponse immunitaire lymphocyte B spécifique chez les individus testés³⁹⁸. L'IMO-2125, un ODN synthétique développé par Idera Pharmaceuticals a également montré un intérêt comme traitement anti-HCV en phase clinique II. De plus contrairement aux ODN précédemment testés, l'IMO-2125 a montré une meilleure stabilité. L'Heplisav-B, un vaccin dirigé contre l'hépatite B et comportant un agoniste de TLR9 comme adjuvant a également reçu l'autorisation de mise sur le marché de la Food and Drug Administration en 2018³⁹⁹.

c. Récepteurs de la famille du TNFR

i. Principe

La superfamille des Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) est une famille de récepteurs transmembranaires à cytokines, trimérisés et caractérisés par un domaine extracellulaire possédant un à six domaines riches en Cys⁴⁰⁰. Les ligands associés, au nombre de 27, partagent un domaine commun, appelé TNF homology domain, favorisant la formation d'homotrimères⁴⁰¹. Bien que ces ligands soient majoritairement transmembranaires, un certain nombre peuvent être clivés par protéolyse pour libérer leur extrémité extracellulaire afin de produire un ligand soluble. Plusieurs fonctions sont associées aux couples TNFR/TNF :

- **Induction de l'apoptose** via certains TNF ligands comme le TNF- α , FasL et TRAIL reconnaissant des TNFR à domaine intracellulaire de mort. L'activation de tels TNFR induit la formation d'un Death-Inducing Signaling Complex comprenant l'adaptateur Fas-associated death domain (FADD) et la procaspase 8 inactive⁴⁰². Cette dernière est alors maturée par le complexe et mène à l'apoptose⁴⁰³.
- **Signal de co-stimulation ou d'amplification de l'immunité innée** menant à l'activation des voies NF κ B et/ou MAPK. Les couples de TNFR/TNF impliqués sont alors : TNF- α /TNFR1A ou TNFR1B, LT- β /LT β R, CD40/CD40L,

CD27/CD70, 4-1BB/4-1BBL et OX40/OX40L, impliqués dans l'immunothérapie anticancéreuse et l'induction/réactivation de l'immunité acquise. On constate que le TNFR1 est à la fois un récepteur de mort mais également de transduction du signal.

- **Un troisième groupe de TNFR/TNF ne présente pas d'extrémité cytosolique et agit probablement comme des leurres.**

ii. TNFR1

Il est établi que l'activation du TNFR1A, également nommé TNFR1, p55 ou CD120a (34kDa), par le TNF- α ou la lymphotoxine (LT)- α induit principalement l'apoptose médiée par la TNF Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein (TRADD) mais peut également induire la voie NF κ B⁴⁰⁴ (Figure 39). Son expression est ubiquitaire. Une fois son ligand reconnu, le TNFR1 est exporté aux radeaux lipidiques et recrute TRADD et la protéine Receptor Interacting protein (RIP) 1. Cette dernière kinase recrute alors TRAF2 et est ubiquitinyllé en Lys63 par les cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 et 2 afin de recruter le complexe impliquant NF κ B Essential Modifier⁴⁰⁵ (NEMO) et activer la voie NF κ B canonique⁴⁰⁶. En réalité, ce complexe est associé dès le début à la protéine TRADD adaptatrice caractéristique de l'apoptose médiée par le TNFR1. La balance entre les deux voies n'est établie qu'une fois le statut d'ubiquitinylation de RIP1 déterminé.

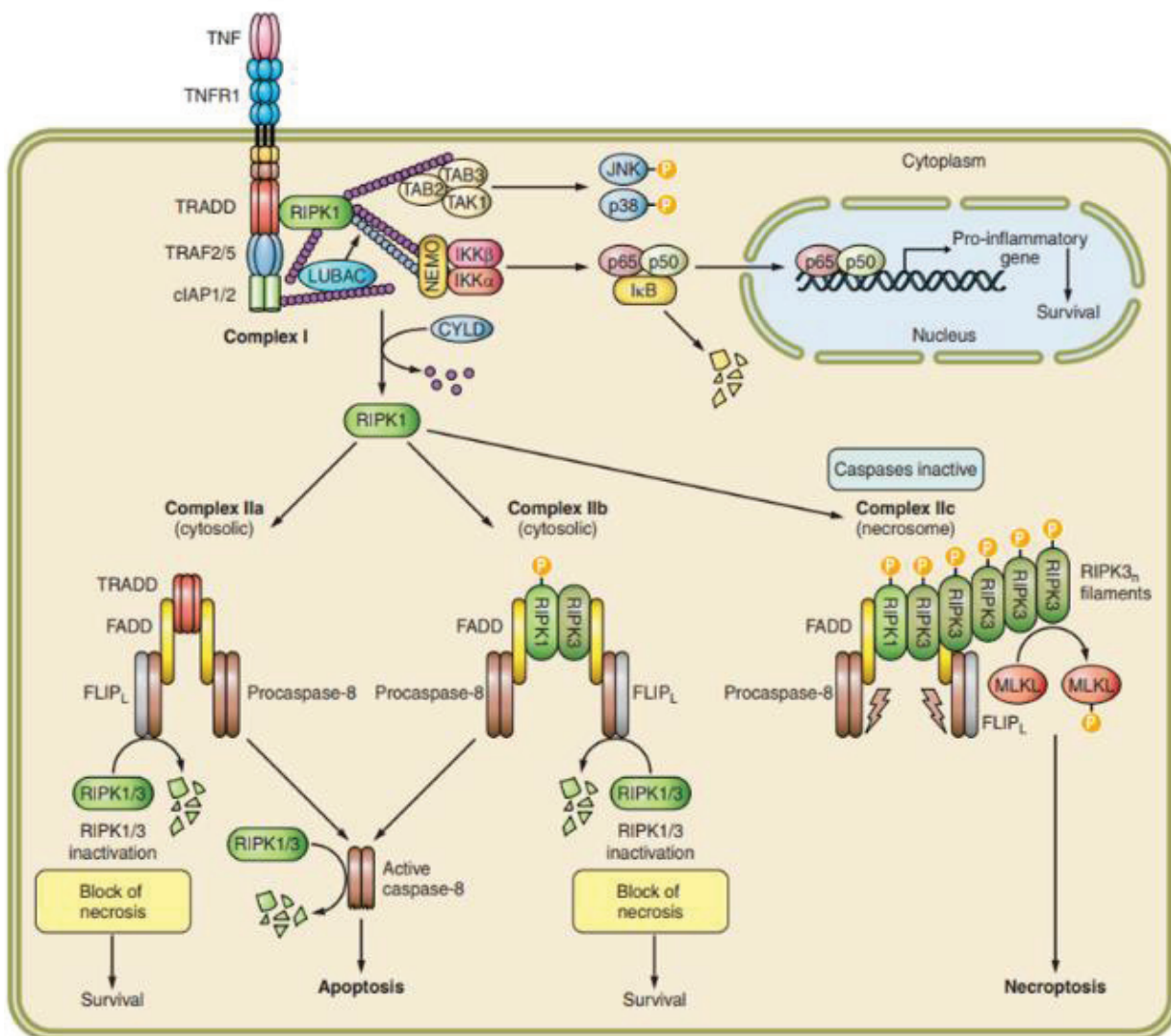


Figure 39. Voies de signalisations du TNFR1. L'activation du TNFR2 peut induire la voie NFκB ou des mécanismes de mort cellulaire. La balance entre ces deux voies sera médiée par le statut de l'adaptateur RIP1. Ubiquitinylé, la signalisation penchera vers une réponse pro-inflammatoire NFκB canonic médiée. Déubiquitinylé par l'enzyme CYLD et les cIAP1 et 2, les voies de mort cellulaire seront privilégiées (adapté de Dostert C *et al.*, 2019 *Physiol Rev*).

iii. TNFR2

1. Biologie

Le TNFR1B également nommé TNFR2, p75 ou CD120b est un récepteur de 34kDA qui reconnaît le TNF-α ou la LT-α (également nommée TNF-β) et induit la voie NFκB non-canonique (Figure 40). Contrairement au TNFR1, le TNFR2 semble exprimé principalement dans les cellules immunitaires et conduit à la survie cellulaire. Une fois son ligand reconnu, celui-ci recrute directement TRAF1, TRAF2 et TRAF3⁴⁰⁷ sans passer par l'intermédiaire de TRADD comme c'est le cas pour le TNFR1.

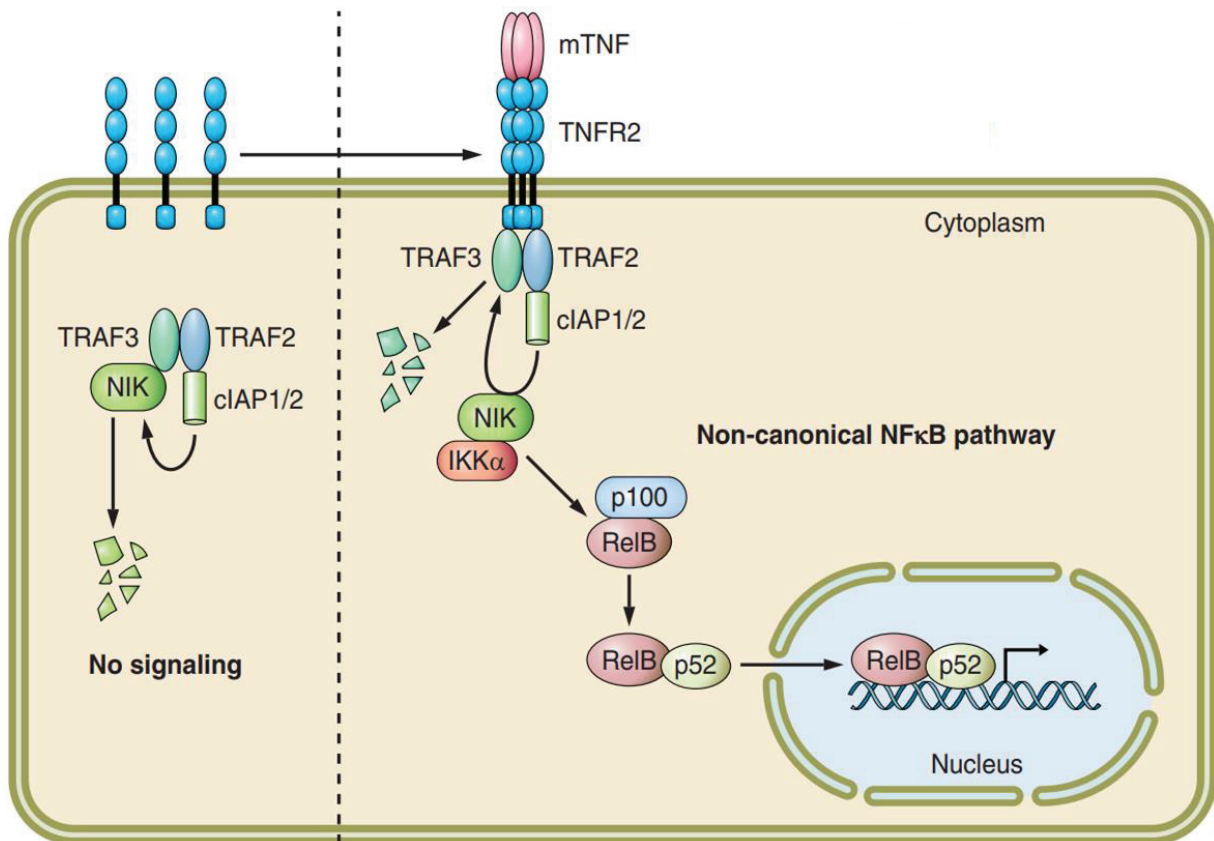


Figure 40. **Voie de signalisation du TNFR2.** En l'absence de stimulation du TNFR2 l'adaptateur NIK est constitutivement dégradé par l'ubiquitylation des cIAP1 et 2. Suite à la reconnaissance de son ligand, le TNFR2 recrute les TRAF1 à 3 et active la voie NFκB non-canonique (adapté de Dostert C et al., 2019 Physiol Rev).

2. Rôle

Concernant le rôle du TNFR2, plusieurs études ont révélé que ce récepteur est surexprimé dans plusieurs types de tumeurs, en faisant un facteur de mauvais pronostic⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ :

- **Favorise le développement tumoral** : dans le cas du cancer du sein, le TNFR2 protège les cellules cancéreuses des dommages à l'ADN induits par les chimiothérapies par activation de la voie AKT⁴¹¹ et la croissance tumorale par activation de la voie NFκB⁴¹². Des résultats similaires ont été obtenus dans le cancer colorectal^{413,414}. Des études de délétion du TNFR2 en modèle souris indique également que ce récepteur est impliqué dans l'angiogénèse⁴¹⁵. L'inhibition du TNFR2 est donc une perspective de choix dans le traitement du

cancer, en favorisant par exemple la mort des cellules tumorales dans le cas du cancer du poumon⁴¹⁶.

- **Induction et infiltration des lymphocytes Treg** : fortement exprimé à la membrane de ce type cellulaire, le TNFR2 favorise le développement⁴¹⁷ l'activation⁴¹⁸ et la prolifération⁴¹⁹ des Treg en permettant l'instauration d'un état immunosuppresseur au niveau de la tumeur. Une étude a mis en évidence une corrélation chez des patients présentant un cancer du poumon entre l'expression du TNFR2 et du facteur de transcription FoxP3 caractéristique des lymphocytes Treg⁴²⁰.
- **Induction des Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC)** : le TNFR2 inhibe l'apoptose de ce type cellulaire⁴²¹ et favorise le développement d'un état anti-inflammatoire par induction de la voie NFκB menant à la production d'IL-10, de TGF-β et de dérivés réactifs de l'oxygène⁴²².

3. Ciblage

Au vu de ces mécanismes liés au TNFR2 et promouvant le développement tumoral, le ciblage de ce récepteur est une option de choix pour de nouveaux traitements anti-cancéreux. Des Ac neutralisants anti-TNFR2 ont montré leur application possible en clinique en permettant la réduction de la population de Treg par inhibition de la voie NFκB et en favorisant la mort des cellules tumorales⁴²³. Une étude de 2018 montre que cet antagoniste du TNFR2 utilisé en bi-thérapie avec un agoniste du TLR9 est efficace pour traiter des souris modèles pour le cancer du colon⁴²⁴.

iv. LT-βR

1. Biologie

Dans les conditions physiologiques, les ligands LTα et β des Récepteurs à Lymphotoxine-β (LTβR) sont exprimés par les lymphocytes T et B et les cellules NK⁴²⁵. Ces deux ligands sont également produits par les hépatocytes lors des infections par

HBV⁴²⁶ ou HCV⁴²⁷. Mais cette sécrétion hépatocytaire peut être induite par induction de la voie NFκB après stimulation par l'IL-1β ou l'IL-6⁴²⁸. Le récepteur LTβR est majoritairement exprimé par les cellules épithéliales, les hépatocytes, les DC et les macrophages⁴²⁹. Une fois activé, et contrairement aux TLR, au TNFR1 et 2 et à l'IL-1R, ce récepteur est capable d'induire deux voies NFκB différentes nommées canonique et non-canonique⁴³⁰ (Figure 41). Les caractéristiques de ces deux voies immunitaires sont détaillées plus loin au cours de cette thèse.

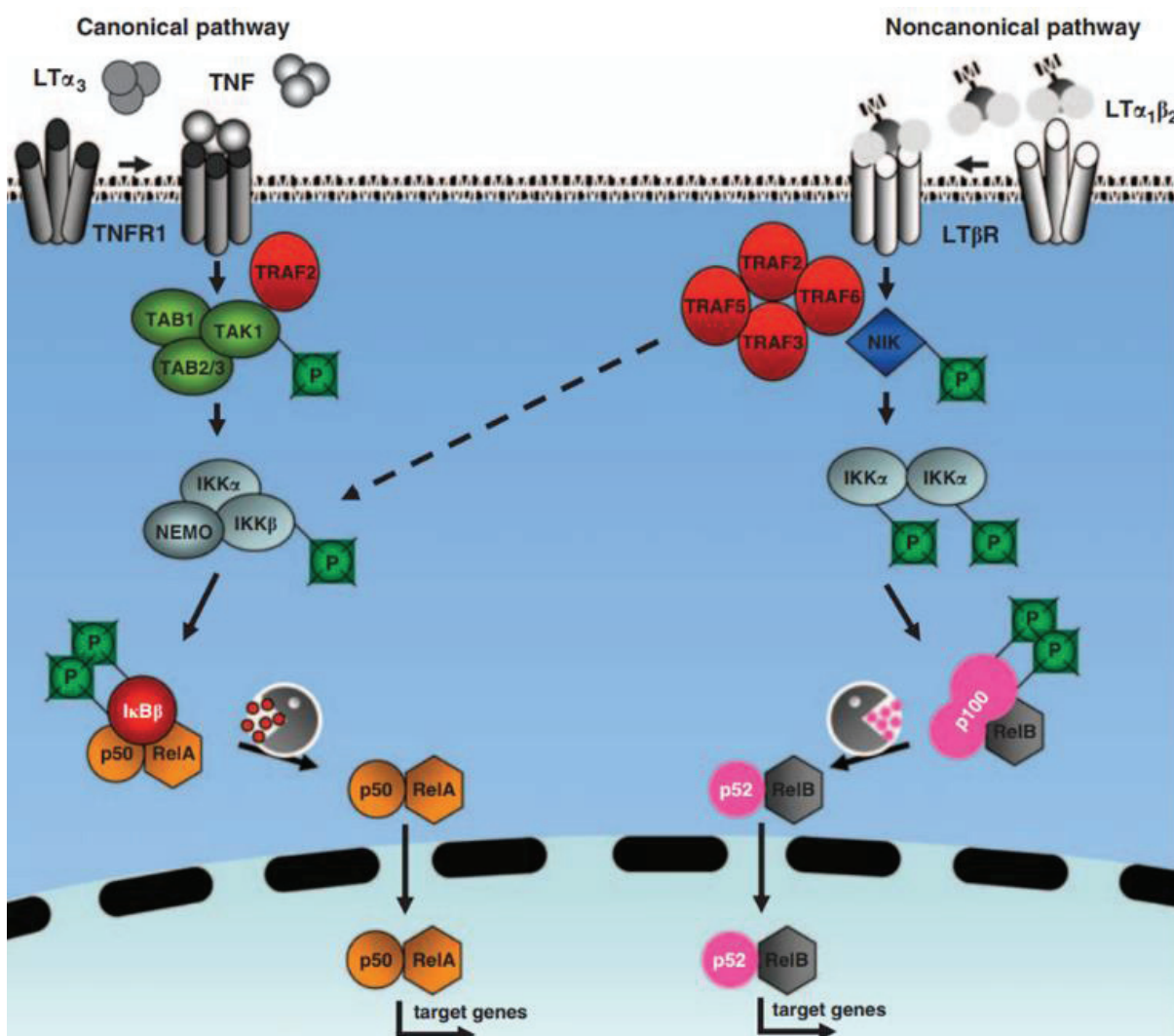


Figure 41. Voies de signalisation du LTβR. L'activation de ce récepteur peut induire les voies NFκB canoniques et non-canoniques (adapté de Wolf MJ *et al.*, 2010 Oncogene).

2. Rôle

La suppression du LT β R ou du ligand associé résulte chez des souris en un défaut de développement des nœuds lymphatiques et des plaques de Peyer, ainsi qu'un développement anarchique de la rate et du thymus⁴³¹. La voie de signalisation induite via le LT β R est essentielle dans le développement des organes lymphatiques. Un défaut de maturation de ces organes empêche l'établissement d'un microenvironnement adéquat pour l'interaction entre les cellules présentatrices d'Ag et des lymphocytes T spécifiques. Ce défaut de réponse immunitaire spécifique rend alors l'organisme susceptible à de nombreuses infections⁴³². De plus des études utilisant des souris déficientes pour le LT β R ou son ligand associé ont montré un défaut de réponse médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dans le cas de plusieurs infections virales comme le Vaccinia virus⁴³³, le LCMV⁴³³ et le HSV⁴³⁴.

Au-delà de la régulation de la maturation des organes lymphoïdes, le LT β R est responsable de l'induction d'un effet antiviral IFN de type I NF κ B-dépendant. Deux études distinctes ont montré que la stimulation du LT β R dans les fibroblastes infectés par le HCMV est capable d'induire la transcription du gène de l'IFN- β par induction de la voie NF κ B. De plus, cet effet antiviral induit empêche la propagation du virus⁴³⁵. La seconde étude menée par Iversen AC *et al.*, a montré que des cellules NK activées par l'IL-2 expriment le ligand LT β à leur surface, conduisant à l'activation de la voie NF κ B médiée par le LT β R dans les fibroblastes infectés par le HCMV et à la production d'IFN- β ⁴³⁶.

3. Ciblage

Une étude de 2005 a montré la faisabilité de l'induction du LT β R pour induire un état antiviral en stimulant ce récepteur à l'aide d'un agoniste. Banks TA *et al.* sont parvenus à rétablir une réponse IFN- β chez des souris infectées par le MCMV et déficientes pour le ligand LT α , améliorant *de facto* leur survie⁴³⁷. La stimulation du LT β R a également été testée pour favoriser un état anticancéreux. Il a été montré dès 2006 que l'activation de ce récepteur via l'Ac monoclonal CBE11 inhibait la croissance de tumeur colorectale et induisait l'infiltration de lymphocytes dans un modèle de souris greffées, améliorant leur survie⁴³⁸. Cette faisabilité a été confirmée en 2013

avec l'activation du $LT\beta R$ par l'Ac monoclonal BS1⁴³⁹. Hu X *et al.*, ont alors démontré que l'activation de ce récepteur de la famille du TNFR dans des modèles de cellules de carcinome colorectal et mammaires suffisait pour induire la voie NF κ B et inhiber la croissance tumorale. De plus une signature apoptotique liée aux capsases 8 et 3 activées a été mise en évidence, suggérant qu'un tel mécanisme de mort cellulaire serait impliqué dans l'effet anti-tumoral. Enfin, bien qu'il soit établi que l'inflammation liée à NF κ B soit plutôt pro-tumorale, les auteurs ont montré que l'inhibition de la voie NF κ B *in vivo* diminuait l'effet anti-tumoral de BS1, suggérant que, dans cette situation, cette voie immunitaire soit plutôt anti-tumorale en lien avec un processus apoptotique.

Plus récemment, Lucifora J *et al.*, ont montré l'applicabilité de la stimulation du $LT\beta R$ comme traitement de l'infection HBV¹⁵³. Ceux-ci ont stimulé le $LT\beta R$ dans des modèles cellulaires d'hépatocytes, à la fois par BS1 et CBE11. Ils ont montré que ces deux Ac activaient à la fois les voies canoniques et non-canoniques de NF κ B et permettaient une diminution du taux d'ADNccc d'HBV de près de 90% sans cytotoxicité détectable. De plus les auteurs ont observé des résultats similaires avec une diminution de l'ensemble des paramètres d'HBV chez des souris infectées après traitement par un Ac agoniste du $LT\beta R$ nommé ACH6. Toutefois des données existent sur un lien entre activation chronique du $LT\beta R$ et le développement d'CHC, cette approche thérapeutique est donc à aborder avec précaution⁴⁴⁰.

d. Réponses immunitaires associées

i. Réponse NF κ B

1. Principe

En 1986, Sen *et al.*, ont identifié une protéine reconnaissant une séquence d'ADN spécifique dans les lymphocytes B⁴⁴¹ qu'ils ont nommé NF κ B pour Nuclear Factor se liant à proximité de la séquence encodant la chaîne légère κ dans les lymphocytes B. Les facteurs de transcription NF κ B constituent une famille de protéines fortement conservées entre les espèces et fonctionnant en dimères pour la régulation précoce des processus immunitaires en réponse aux infections et traumatismes. Ce système présente un fort potentiel pour être exploité en thérapeutique pour traiter différentes maladies⁴⁴². Toutefois tout déséquilibre dans sa régulation est rapidement

source de nombreuses pathologies allant du cancer aux maladies inflammatoires et auto-immunes. Une meilleure compréhension de la dynamique de ces voies de signalisation est donc essentielle.

Chez les mammifères, le facteur NFκB inactif est séquestré de manière constitutive dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice masquant le signal d'adressage au noyau⁴⁴³. Plusieurs inhibiteurs nommés IκBα, IκBβ, IκBε, BCL-3, IκBZ, IκBNS et les extrémités C-ter clivées de p105 (IκBγ) et p100 (IκBδ) sont responsables de ces phénomènes et sont caractérisés par la présence d'un domaine de recrutement des caspases (CARD) nécessaire pour dissimuler le Nuclear Localisation Signal (NLS) des sous-parties des facteurs NFκB. Les dimères p50:p65 et p52:RelB prédominent. Toutefois près de quinze dimères alternatifs sont possibles et treize ont déjà été identifiés⁴⁴⁴ (Figure 42). Ceux comportant une protéine avec un domaine de transactivation de la transcription seront activateurs tandis que les autres auront une activité répressive. Chaque complexe NFκB étant différent, ceux-ci présentent donc

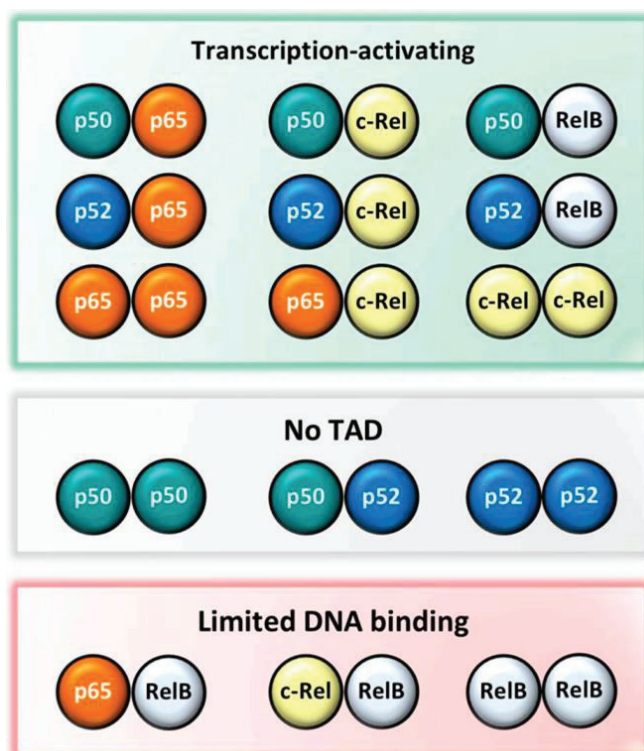


Figure 42 Dimères de NFκB potentiels. Les dimères envisageables sont divisés en trois groupes. Les dimères composés uniquement de p50 et p52 de manière homo ou hétérodimérique ne présentent pas d'activité d'activation de la transcription. Les homodimères de RelB ou hétérodimères de RelB associé à RelA ou c-Rel possèdent une activité d'activation de la transcription mais ne se lient que faiblement aux ADN. L'ensemble des autres dimères envisageables affichent une action d'activateurs de la transcription (adapté de Concetti J *et al.*, 2018).

des affinités variables selon la séquence ADN reconnue, permettant de nombreux profils d'expression génique différents.

En réponse à divers stimuli tels qu'une cytokine, la reconnaissance d'un pathogène, un trauma ou tout autre type de stress, le complexe NFκB constitué de deux des cinq protéines p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel sera exporté au noyau après retrait des IκB inhibitrices. Ce dimère régulera alors de manière variable l'expression de nombreux gènes différents selon le dimère considéré. Deux voies NFκB, nommées canonique et non-canonique ou alternative, prédominent alors. Le dimère p50:RelA est principalement associé à la voie canonique et aux récepteurs au TNFR, IL-1R de même que de nombreux PAMP. Au contraire, la voie alternative ne semble pas induite par ces mécanismes et est associée majoritairement au dimère p52:RelB⁴⁴⁵.

Une fois dans ce compartiment cellulaire, les dimères interagissent avec les promoteurs des gènes via leur Rel Homology Domain (RHD) de 300aa reconnaissant une séquence ADN consensus 5'-GGGRNWYYCC-3' (N : base aléatoire ; R : base purique ; W : adénine ou thymine ; Y : pyrimidine) nommée κB. Ce RHD est subdivisé en deux sections⁴⁴⁴ (Figure 43) :

- Une section N-ter comportant un domaine de reconnaissance de l'ADN séquence-spécifique ;
- Une section C-ter hydrophobe comportant un domaine d'homo ou hétérodimérisation ;

Les cinq composants du facteur NFκB comportent également en aval du RHD une séquence NLS responsable de leur exportation au noyau. Ils présentent une structure commune mais sont toutefois divisés en deux classes distinctes :

- Une classe composée de p50 et p52, deux protéines émanant du clivage du domaine de répétitions ankyrines de 33a en C-ter de deux précurseurs nommés p105 (NFκB1) et p100 (NFκB2).
- Une classe composée de RelA, RelB et c-Rel comportant déjà les domaines de transactivation de la transcription et ne présentant pas de répétition ankyrine.

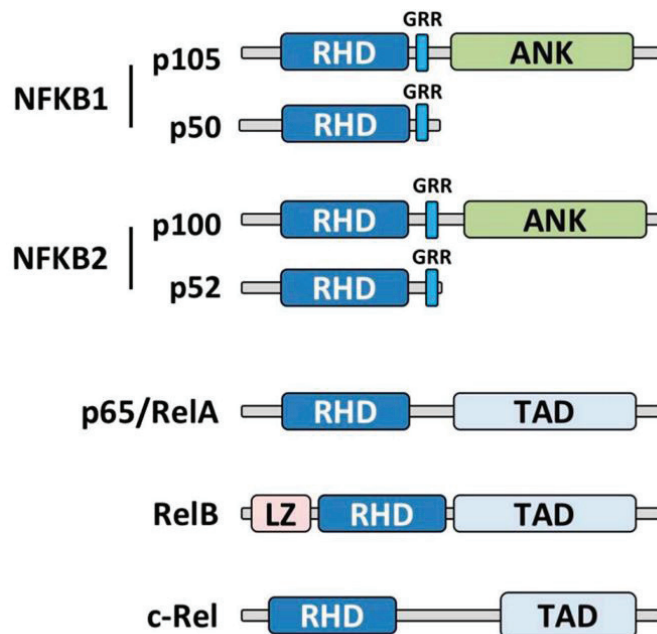


Figure 43. Structures des sous-unités du dimère NFκB. Chacun des sous-unités comportent un Rel Homology Domain (RHD) reconnaissant une séquence ADN consensus spécifique et nécessaire à l'association des sous-unités. Les précurseurs p105 et p100 présentent des répétitions ankyrines séparées du RHD par une séquence riche en glycines. Après maturation le domaine ANK est clivé pour donner respectivement les formes matures p50 et p52. RelA, RelB et c-Rel présentent un domaine de transactivation (TAD) essentiel pour l'activation de la transcription. RelB comporte également un domaine leucine zipper (LZ) (adapté de Concetti *et al.*, 2018).

2. Voies de signalisation NFκB

a. Voie canonique

La voie canonique est régulée par un complexe essentiel composé de la protéine NEMO (également nommé IKKγ) et deux protéines IκB kinases (IKKα et IKKβ) (Figure 44). A l'état latent le partenaire NEMO empêche l'activation des IKK composant ce complexe mais ces kinases sont activées de manières différentes selon le récepteur impliqué en amont (Figure 40) :

- (i) Suite à l'induction de la voie NFκB par activation du TNFR, la protéine TRADD recrute TRAF2 ;
- (ii) TRAF2 recrute la protéine RIP1 et génère une chaîne d'ubiquitinylation sur la Lys63 de ce dernier⁴⁴⁶ ;
- (1 bis) Suite à l'induction de la voie NFκB par activation de l'IL-1R ou d'un TLR, l'adaptateur Myd88 et les IRAK1 et 4 sont recrutés afin de former un complexe

nommé Myddosome. Ce complexe s'auto/transphosphoryle et est ubiquitinylé K63 par l'enzyme Pellino-3⁴⁴⁷ ;

- **(ii bis)** Ce complexe recrute la protéine TRAF6 qui réalise alors le même type de modification K63 de TRAF6 lui-même⁴⁴⁸ et de la protéine IRAK1⁴⁴⁹ ;
- **(iii)** Les chaînes d'ubiquitylation Lys63 recrutent les protéines TGF β -Activated kinase-Binding protein 1/2/3 (TAB1/2/3), TGF β -Activated Kinase 1 (TAK1) et le complexe NEMO/IKK α /IKK β ;
- **(iv)** La kinase TAK1 phosphoactive les IKK α et β ;
- **(v)** Les IKK activées phosphorylent les Ser32 et 36 d'IkB α et Ser19 et 23 d'IkB β répressives du facteur NF κ B afin d'induire leur ubiquitylation et leur dégradation par le protéasome⁴⁵⁰ ;
- **(vi)** Le signal NLS du dimère NF κ B initialement masqué par les IkB est alors exposé et permet l'adressage du dimère au noyau⁴⁵¹ afin de réguler la transcription de multiples gènes. Bien que l'ensemble des dimères NF κ B puissent être impliqués, dans le cas de la voie canonique le dimère p50/RelA prédomine⁴⁵² ;

Des boucles d'autorégulation permettent d'éviter un emballement de la signalisation NF κ B canonique et l'induction de pathologie associées. L'activation du complexe NF κ B induit la transcription et la génération de néo-IkB qui masqueront le NLS du dimère du facteur de transcription. Il semble que l'IkB ϵ puisse agir de la même manière⁴⁵³. Un autre mécanisme de rétrocontrôle similaire implique la protéine p100 encodée par le gène *nfk2* et précurseur du monomère p52. Lorsque ce précurseur p100 n'est pas clivé en p52, il est capable de fixer le dimère NF κ B et de se comporter comme un IkB répresseur alors nommé IkB δ ⁴⁵⁴.

b. Voie alternative

En parallèle de la voie canonique bien décrite, d'autres mécanismes existent pour moduler l'activité des dimères NF κ B. Une voie dite non-canonique active majoritairement le dimère RelB/p52 (Figure 44). Tout comme la voie canonique qui fonctionne autour du complexe NEMO/IKK α /IKK β , la voie non-canonique est majoritairement régulée par la maturation du monomère p100⁴⁵⁵ :

- **(i)** Après stimulation des récepteurs de la famille du TNFR tels que le LT- β R, la NF κ B-Inducing Kinase (NIK) est recrutée et dissociée du complexe TRAF afin d'empêcher son ubiquitinylation et sa dégradation ;
- **(ii)** La protéine NIK stabilisée phosphoryle IKK α qui se dimérise ;
- **(iii)** Ce dimère et une kinase inconnue phosphorylent à p100 sur les Ser99, 108, 115, 123⁴⁵⁶ 872 et Ser866 et 870 respectivement⁴⁵⁷ ;
- **(iv)** Ces phosphorylations recrutent l'ubiquitine ligase E3 β TrCP qui réalise une ubiquitinylation K48 sur la Lys855 de p100⁴⁵⁸ générant alors p52⁴⁵² ;
- **(v)** Le dimère p52:RelB majoritaire est alors exporté au noyau afin d'activer la transcription de nombreux gènes cellulaires ;

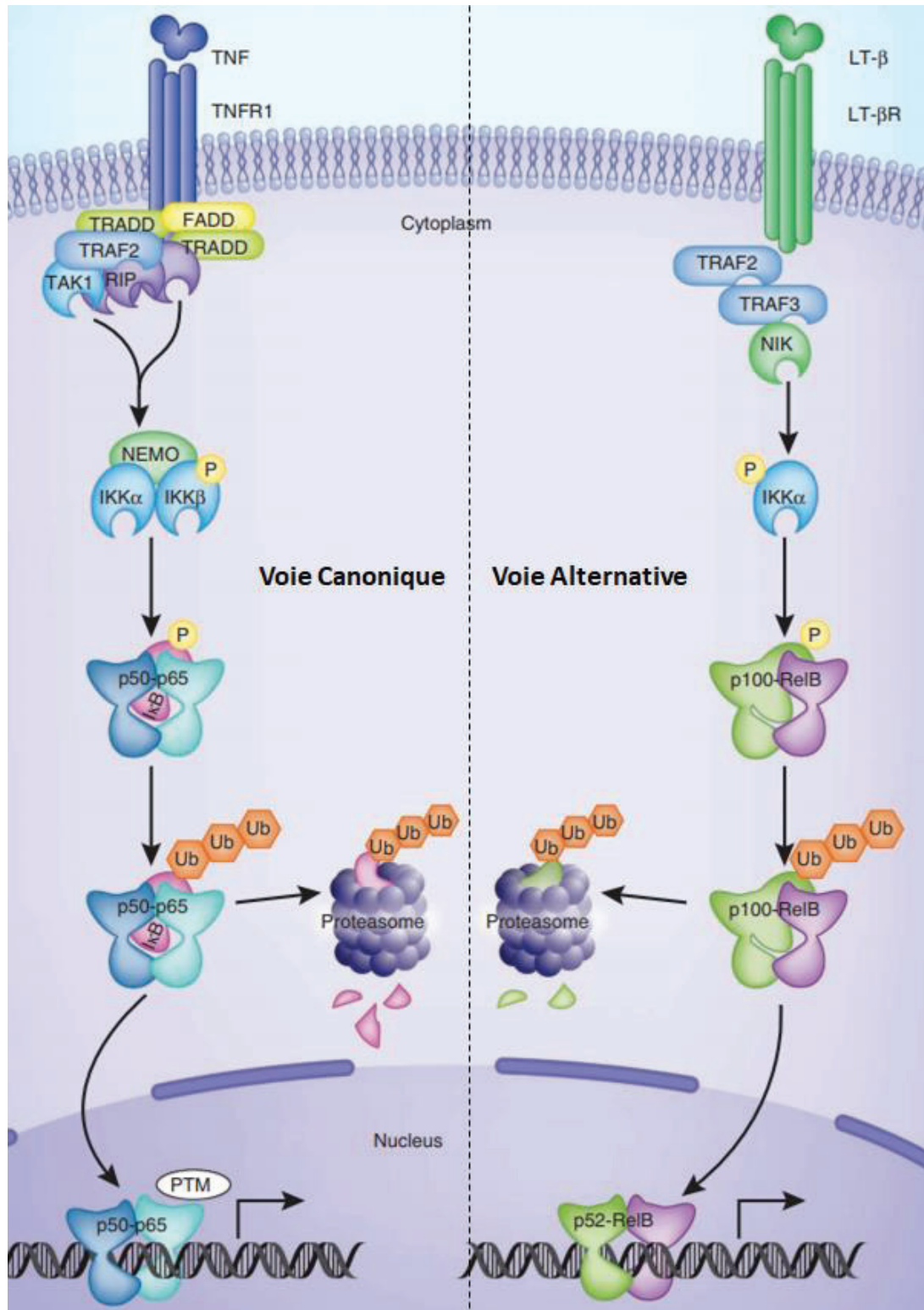


Figure 44. Voies canoniques et alternative de NFκB. Cette voie peut être induite via deux sous-voies distinctes. Dans la voie dite canonique le répresseur des IKK NEMO est polyubiquitinyllé et dégradé. Les kinases libérées phosphorylent IκBα qui se dissocie du complexe NFκB (p65:p50 & RelB:p50 dans l'exemple). Le complexe est exporté au noyau et exerce son activité d'activateur de transcription. Lors de la voie alternative, l'effecteur NIK phospho-active IKKα qui se dimérise. Ce dernier phosphoryle p100 ce qui active son clivage protéolytique et la génération de p52. Le dimère p52:RelB est exporté au noyau pour exercer son activité d'activateur de transcription (adapté de Hayden MS *et al.*, 2012).

3. Fonctions de la signalisation NFκB

a. Médiateur de l'inflammation

L'inflammation est une réponse de l'hôte aux infections et lésions des tissus, caractérisée par une vasodilatation permettant entre autres le recrutement de cellules immunitaires au site enflammé et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires⁴⁵⁹. NFκB est responsable de la transcription de plusieurs de ces facteurs sécrétés tels que le TNF-α, lui-même activateur de la voie permettant une auto-stimulation. L'ensemble de ces sécrétions régule l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes et des cellules endothéliales, permettant la vasodilatation et l'extravasation des leucocytes vers le site d'infection. L'absence du monomère p65 empêche chez la souris un tel recrutement des leucocytes⁴⁶⁰. Une fois ces cellules recrutées, le TNF-α induit l'apoptose par stimulation de la voie NFκB dans les populations de neutrophiles et éosinophiles afin d'éviter un emballement de la réponse⁴⁶¹. En parallèle, NFκB régule l'expression de nombreuses enzymes et cytokines comme l'IL-8, iNos et Cox^{462,463}. Ces protéines permettent la sécrétion par les leucocytes de molécules telles que les leucotriènes à activité chimiotactique pour ces mêmes cellules et les prostaglandines amplifiant la vasodilatation.

De manière indirecte, NFκB contrôle une structure majeure nommée inflammasome. Ce regroupement de protéines assemblées en réponse aux PAMP reconnus par les PRR est composé d'un NLR et de l'Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a CARD (ASC). Son activité principale est la maturation de la procaspase 1⁴⁶⁴. L'activation de ce complexe est responsable de la maturation des IL-1β et 18 et *in extenso* de l'induction d'un état pro-inflammatoire. Une fois le PAMP reconnu, le NLR se fixe à ASC via son domaine pyrine⁴⁶⁵. La pro-caspase 1 ou 18 se fixe alors à l'ASC via son domaine CARD, le complexe des trois protéines formant l'inflammasome. Les gènes encodant la pro-IL-1β et le NLR nommé NLRP3 sont ainsi majoritairement induits par l'activation de la voie NFκB par stimulation des TLR⁴⁶⁶, TNFR⁴⁶⁷ ou IL-1R⁴⁶⁸. Cette induction permet de générer un taux de NLRP3 suffisant pour assembler l'inflammasome mais nécessite un signal ultérieur d'activation médié par les PRR.

b. Activation et recrutement de cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée sont des acteurs essentiels des réponses rapides aux agents infectieux. Suite à l'activation d'un PRR, la voie NFκB est l'une des voies fréquemment activées résultant en l'induction de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines favorisant le recrutement de types cellulaires spécifiques et d'autres médiateurs de l'immunité innée. L'activation de la voie NFκB dans les macrophages permet la sécrétion de nombreux marqueurs de l'inflammation. Le TLR4 activé en réponse aux LPS bactériens permet la différenciation en macrophages pro-inflammatoires⁴⁶⁹. Ceux-ci ont alors un effet autocrine permettant l'activation en macrophage pro-inflammatoires, produisant notamment de l'IL-1, IL-6, IL-12, COX2 et du TNF-α⁴⁷⁰. Les cytokines et chimiokines IL-12, IL-23 et TNF sont alors majoritairement responsables de l'activation de la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes pro-inflammatoires Th1 et Th17⁴⁷¹.

c. Activation et régulation de l'immunité adaptative

L'activation d'un lymphocyte T fait suite à la reconnaissance par son T-Cell Receptor (TCR) d'un Ag présenté par un macrophage ou une DC via un CMH-II en réponse à une infection. Une fois le TCR activé, une réponse NFκB se met en place dans les lymphocytes. Le monomère p52 est alors majoritairement associé à C-Rel⁴⁷² pour induire la transcription de nombreux gènes dont des cytokines comme l'IL-2 aidant à la prolifération et la survie des lymphocytes T⁴⁷³. Ainsi il a été montré une absence de différenciation en Th1 suite à une infection dans des souris comportant une forme d'IκB⁴⁷⁴. Un phénomène identique associé à une absence de réponse IFN-γ a été observé avec des souris c-Rel déficientes⁴⁷⁵ et une étude a montré que le monomère p65 est essentiel à l'induction de cette réponse IFN⁴⁷⁶. Au contraire, l'inhibition de la voie NFκB dans les lymphocytes T activés semble favoriser la progression vers l'apoptose⁴⁷⁷. Ces études indiquent un rôle essentiel de la voie NFκB dans le développement des lymphocytes Th1 et de la réponse IFN-γ antivirale. Une fois activés, les lymphocytes T Th1 permettent la lutte contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus en favorisant la sécrétion d'IFN-γ.

La voie NFκB est également responsable de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th17 amplifiant la réponse pro-inflammatoire induite par les macrophages par production d'IL-17A, et d'IL-22 recrutant les monocytes et les neutrophiles. Des études ont en effet montré que des lymphocytes T c-Rel ou p65 déficientes étaient incapables de se différencier en Th17⁴⁷⁸ et ce phénotype a été associé à une perte d'expression du gène RORγt, facteur de transcription essentiel à la différenciation de ce type de lymphocyte.

La différenciation des lymphocytes Treg est également modulée par NFκB. Des souris déficientes pour C-Rel⁴⁷⁹, TAK1, l'IKKβ⁴⁸⁰ ou la protéine CARM1⁴⁸¹ essentielle à l'activation de l'IKKβ présentent une différenciation de leurs lymphocytes en Treg réduite probablement en modulant l'expression du facteur de transcription essentiel Foxp3⁴⁸².

Le développement des lymphocytes B est également régulé par la voie NFκB en protégeant de l'apoptose les cellules ayant subi un réarrangement de leur locus Igλ. Le déficit en p50, P65 ou p65 et C-Rel empêche la lymphopoïèse avant la formation du B-cell receptor⁴⁸³ (BCR), ce qui suggère que dans cette situation la stimulation de la voie NFκB induit des facteurs anti-apoptotiques. Cette théorie a par la suite été confirmée par la mise en évidence de l'expression du BCR concomitante avec l'induction de signaux anti-apoptotiques NFκB dépendants⁴⁸⁴. Il est probable que l'induction de la voie NFκB protège les lymphocytes B immatures de l'apoptose et que son extinction après maturation du BCR permette l'élimination de ceux non-maturés.

PARTIE II

Projet de Recherche

1. Projet et méthodologie de recherche

a. Projet

Le virus de l'Hépatite Delta (HDV) est un petit virus à ARN découvert en 1977 dans une cohorte de patient infectés par le virus de l'Hépatite B (HBV) et présentant des hépatites sévères¹⁸. Une particule virale d'HDV contient une ribonucléoprotéine composée d'un ARN simple brin circulaire de 1,6 Kb pseudo-apparié sur 70% de sa longueur associée à des protéines virales appelées antigènes de l'Hépatite Delta (HDAg). C'est un virus satellite qui détourne la machinerie de la cellule pour sa réplication et l'enveloppe des particules d'HBV pour sa sécrétion⁸⁰. Pendant sa réplication, il produit une molécule d'ARN complémentaire de son génome appelée anti-génome. Le brin anti-génomique code une seule petite protéine virale de 24 kDa (S-HDAg) essentielle pour la réplication d'HDV ; en effet il sert de matrice pour l'activité de l'ARN polymérase II ADN dépendante, malgré son statut d'ARN, pour produire l'ARNm viral correspondant. Plus tard lors du cycle viral, une édition du codon stop du cadre de lecture ouvert de S-HDAg par l'adénosine déaminase de l'ARN de type 1 (ADAR-1) mène à la synthèse d'une forme plus longue d'HDAg de 27 kDa. Cette L-HDAg est impliquée dans l'assemblage de la particule virale²⁶⁸.

La co-infection par les virus des Hépatite Delta et B constitue l'hépatite virale chronique la plus agressive. Des études montrent un risque 3,2 à 6 fois plus élevés de développement de carcinome hépatocellulaire (HCC) chez les patients chroniquement coinfectés HBV/HDV comparés aux patients mono-infectés HBV^{248,258}. Plusieurs études suggèrent qu'HDV est un facteur prédisposant à l'apparition d'HCC avec une prévalence plus élevée des cancers dans les cohortes de patients HBV/HDV comparées à celle dans les cohortes HBV. Un développement d'HCC à un âge précoce chez des patients HBV/HDV comparé à des patients HBV a été associé à un taux sanguin d'ARN HDV élevé, marqueur d'une réplication plus active²⁵⁹. Selon l'OMS, environ 15 à 20 millions de personnes sont co-infectées chroniquement par HBV et HDV ; il s'agit d'une des co-infections la plus répandue et difficile à combattre au monde. A noter que ces chiffres sont très probablement sous-estimés puisqu'il n'y a pas de dépistage systématique pour HDV. Bien qu'HDV ait besoin d'HBV pour sa

propagation, il n'est pas sensible aux analogues de nucléos(t)ides (comme le Ténofovir) actuellement utilisés pour diminuer les virémies HBV chez les patients mono-infectés. L'unique option thérapeutique pour les patients co-infectés par HBV et HDV repose sur l'utilisation d'interféron alpha pégylé (PEG-IFN- α) avec de très nombreux effets secondaires et une efficacité très limitée. En effet, seulement 25% de patients sont répondeurs et 75% d'entre eux rechutent après l'arrêt du traitement²⁷⁴. Très peu de molécules sont actuellement en développement. Le MyrcludexB, le Lonafarnib et REP2139 sont actuellement en essais cliniques. Les premières données montrent que les deux premières molécules ne contrôlent que temporairement le niveau d'ARN HDV^{285,288} et la troisième n'est efficace qu'en bithérapie avec le PEG-IFN- α ²⁹⁵. De plus, à priori, aucune de ces stratégies ne cible directement la réplication du virus (seulement son entrée ou sa sortie). Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies antivirales efficaces pour traiter les patients co-infectés par HBV et HDV. De plus une réplication active d'HDV signe une progression accélérée vers l'HCC chez les patients HBV/HDV. Des traitements diminuant la réplication virale permettraient de diminuer l'incidence de ces cancers.

Les traitements des infections virales chroniques comme HIV, le virus de l'hépatite C ou HBV reposent la plupart du temps sur l'utilisation de molécules ciblant directement les activités enzymatiques des virus. Or, la réplication d'HDV est principalement réalisée par le détournement d'enzymes cellulaires²⁶⁸. La seule activité enzymatique décrite pour HDV est une activité ribozyme mais très peu d'inhibiteurs de cette fonction sont disponibles et une grande toxicité a été observée quand ils ont été utilisés sur des cellules répliquant HDV. Lors d'une infection virale classique, plusieurs cytokines sont produites pendant les étapes précoces et tardives de l'infection. Plusieurs études ont montré une activation de la voie de signalisation de l'interféron par HDV *in vitro* et *in vivo*^{239,311}. Toutefois il n'y a aucune donnée sur l'activation de la voie « Nuclear factor-kappa B » (NF κ B) par HDV, et même une absence d'activation de celui-ci a déjà été proposée par notre laboratoire²³⁹. Notre objectif est de tester l'effet sur HDV de molécules ciblant des fonctions cellulaires nécessaires au virus ou stimulant les défenses naturelles de l'hôte. L'équipe a notamment montré que l'utilisation d'immunomodulateurs permet d'inhiber HBV^{153,339}. Le but de notre étude est d'étendre cette approche de modulation de l'immunité en testant l'effet d'inducteur de la voie NF κ B (canonique et alternative) sur l'infection à HDV. Celle-ci s'appuie sur

l'utilisation de modèles cellulaires présentant une réponse immunitaire innée fonctionnel. Nous avons utilisé des cellules HepaRG capables de se différencier en hépatocytes et des hépatocytes primaires humains (PHH) mis en culture au laboratoire à partir de résections de foie de patients. Les PHH et les HepaRG sont susceptibles à l'infection par HBV et HDV²³⁹ et expriment un grand nombre de récepteurs de l'immunité innée⁴⁸⁵. *In vitro*, il est possible de tester des molécules sur des cellules uniquement infectées par HDV (il y aura entrée et réplication du virus mais pas sécrétion) ou co-infectées par HBV et HDV.

b. Méthodologie

Axe 1 : Analyse phénotypique de l'effet anti-HDV d'inducteurs de la voie NFκB.

Différents inducteurs de la voie NFκB seront étudiés pour leur effet anti-HDV, en recherchant particulièrement un effet persistant et l'étape du cycle viral ciblée (inhibition de la réplication, déstabilisation des ARN viraux, déamination des ARN viraux, modification des protéines virales ou cellulaires fixées aux ARN). Des analyses de cinétiques permettront de commencer à étudier le phénotype. De plus il sera déterminé si la qualité et/ou la quantité de particules virales sécrétées (infectivité spécifique) sont altérées par les traitements avec comme finalité l'établissement d'une mutagénèse létale. Des études de toxicité seront également réalisées.

Axe 2 : Effecteurs impliqués dans l'effet anti-HDV. En parallèle de l'Axe 2, nous identifierons le ou les effecteurs responsables de l'effet anti-HDV. Un séquençage ARN d'échantillons traités par les différentes molécules sera réalisé afin d'identifier des modulations communes ou spécifiques aux inhibiteurs d'HDV. Après validation des résultats obtenus lors de ce séquençage par RTqPCR, des expériences de perte de fonction par CRISPR/Cas et de gain de fonction par lentivirus permettront d'identifier précisément le ou les composants cellulaires responsables de l'effet anti-HDV.

2. Article en soumission

Inhibition of Hepatitis Delta Virus by inducers of the NFκB pathway

Brieux Chardès^{1,*}, Dulce Alfaiate^{1,*}, Maud Michelet¹, Caroline Pons¹, Rayan Fahrat¹, Michel Rivoire², Stephane Daffis³, Simon Fletcher³, Fabien Zoulim^{1,4}, Anna Salvetti¹, Emmanuel Dejjardin⁵, Mathias Heikenwälder⁶, David Durantel^{1,\$} and Julie Lucifora^{1,\$}

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

² INSERM U1032, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

³ Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA

⁴ Department of Hepatology, Croix-Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵ Laboratory of Molecular Immunology and Signal Transduction, GIGA-R, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁶ Division of Chronic Inflammation and Cancer, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

* and \$ equal contribution

Correspondence

Dr. David Durantel and Dr. Julie Lucifora

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

Key Words

Hepatitis D virus; Hepatitis B virus; lymphotoxin beta receptor; toll-like receptor; NF-κB ; hepatocytes; antiviral activity

Author contributions

- study concept and design: JL, DD, ED, MH

- acquisition of data: BC, DA, MM, CP, RF, JL
- analysis and interpretation of data: BC, DA, MM, CP, RF, FZ, AS, DD, JL
- drafting of the manuscript: JL
- material support: MR, SD, SF

Financial support

This work was supported by a European grant from Infect-Era as well as French grants from ANRS (French national agency for research on AIDS and viral hepatitis) and INSERM. JL also received an award from the Gilead Sciences International Research Scholars Program in Liver Disease to support this work. BC received a PhD stipend from the ARC foundation (French Agency for Research against Cancer).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Alan Kay for the kind gift of anti-HDAg antibodies and Dr Stephen Urban for the gift of the HepG2 hNTCP cell line. The authors would also like to thank Laura Dimier, Jennifer Molle, Océane Floriot and Anaëlle Dubois for help with the isolation of primary human hepatocytes, as well as the staff from Prof Michel Rivoire's surgery room for providing us with liver resection.

Competing financial interest

SD and SF are employees of Gilead Science.

Abstract

HDV super-infection of chronically HBV-infected patients is the most aggressive forms of chronic viral hepatitis, with an accelerated progression towards fibrosis/cirrhosis and an increased risk of liver failure, hepatocellular carcinoma, and death. More than 25 million of people would be co-infected with both viruses, ranking this co-infection as one of the most prevalent and most clinically challenging worldwide. While HDV infection is not susceptible to available direct anti-HBV drugs, suboptimal responses are obtained with IFN- α based therapies, and the number of investigational drugs remains limited. We recently established *in vitro* models of HDV super/co-infection of HBV-infected cells based on primary human hepatocytes (PHH) and the HepaRG cell line that are relevant to explore new therapeutics. Using those models, we analyzed the effect of several immune-modulators on HDV replication in chronically infected cells. We further characterized the anti-HDV effects of Pam3CSK4, an agonist of TLR1/2 and BS1, an agonist of the Lymphotoxin Beta Receptor (LT- β R) that both induced dose dependent reductions of total intracellular HDV RNAs, as well as HDV proteins levels. Both molecules negatively affect HDV progeny release and specific infectivity. Off-drug rebound experiments revealed a long-lasting antiviral activity suggesting an irreversible effect on HDV replication and transcription templates. In conclusion, immune-modulators inducing NF- κ B pathways in hepatocytes can strongly inhibit HDV replication, and could be further developed as efficient therapeutic approaches for HBV/HDV chronically infected patients.

1 **Introduction**

2 Hepatitis Delta Virus (HDV) is a small virus discovered in a cohort of Hepatitis B Virus
3 (HBV) infected patients experiencing extremely severe hepatitis (1). Around 250 million
4 individuals are chronically infected by HBV and more than 25 million are likely
5 chronically co-infected with both HBV and HDV, ranking this co-infection as one of the
6 most prevalent worldwide (2). HDV/HBV co-infection is the most aggressive chronic
7 form of viral hepatitis that lead to fulminant hepatitis in 35% to 39% of the cases (3, 4)
8 with an 80% rate of mortality within 2-10 days after infection. An accelerated
9 progression towards fibrosis/cirrhosis followed by clinical liver decompensation and
10 related death have also been described as major complications for chronically
11 HDV/HBV infected patients (5). The risk of cirrhosis has been evaluated to be 23%,
12 41% and 77% after respectively 10, 20 and 30 years of co-infection (6). Studies
13 reported at least a three-time higher risk of hepatocellular carcinoma (HCC)
14 development in chronically HDV/HBV co-infected patients compared to HBV mono-
15 infected ones (7-9). Moreover, HDV was identified as the main comorbidity factor in
16 pluri-infected HIV patients in the national HIV Swiss cohort (10).

17 HDV virions contain a ribonucleoprotein composed of a circular single-stranded
18 negative RNA genome presenting a “quasi” double-stranded conformation and viral
19 proteins called HD antigens (HDAgs). HDV is a defective satellite virus that uses HBV
20 envelope proteins to egress from and re-enter into hepatocytes (11). Apart from those
21 steps, HDV intracellular RNA replication is thought to be independent of HBV but is
22 highly dependent of the cellular machinery. In the nucleus of infected cells, incoming
23 HDV genomes (Gs) serve as template for the synthesis of replicative intermediates
24 called anti-genomes (AGs), which are fully complementary to HDV genome sequence
25 and bear the ORF for HDAg proteins expression. AGs originate from genomic template

26 by the action of DNA-dependent/RNA-polymerase II (RNA Pol-II) and/or Pol-I, and vice
27 versa (AG→G), new genomes are generated from AGs (AG→G), via a rolling circle
28 process involving viral ribozyme activities that are responsible for the cleavage of
29 multimeric RNA molecules arising during replication (12, 13). These ribozymes
30 represent the only enzymatic activity reported for HDV. HDV mRNAs are transcribed
31 from HDV Gs (14, 15) and translated into the HDV proteins (S- and L-HDAg). HDV is
32 a highly replicative virus as 300,000 molecules of its Gs/AGs can be detected in
33 infected cells (16).

34 WHO recommended HBV vaccination to newborns in order to eliminate HBV, and
35 therefore probably also HDV, in highly endemic regions. However, total elimination
36 would require decades even in the absence of vertical transmission (17). In the
37 meantime, HBV and HDV will continue to result in new infections and subsequent
38 deaths from horizontal transmission. The resulting increased adult morbidity and
39 mortality represent an important medical and economical challenge for the countries
40 most affected by this co-infection. It is therefore urgent to develop antiviral treatment
41 targeting specifically both HBV and HDV.

42 Treatments of viral chronic infection such as HIV (human immunodeficiency virus),
43 HCV (hepatitis C virus) or HBV mostly rely on the use of direct acting agents (DAA)
44 i.e. molecules specifically targeting viral enzymatic activities. Some DAAs are very
45 potent and efficient as treatments. For instance, the use of HCV polymerase inhibitors
46 led to the cure of more than 95% of chronically HCV-infected patients within three
47 months of treatment (18). No specific treatments against HDV are currently approved
48 and management of chronic hepatitis Delta remains mostly empiric. Apart from the viral
49 ribozyme activity, HDV replication occurs through the hijacking of the cellular
50 enzymatic activities. Few ribozyme inhibitors have been described (19) but severe

51 toxicity was observed when applied to HDV replicating cells (20). It is therefore hardly
52 possible to target HDV by the use of DAA. Host targeting agents (HTA) usually yield
53 broad-spectrum antivirals and might be tested against HDV. Pegylated interferon alpha
54 (Peg-IFN- α) is the currently recommended regimen by international guidelines for the
55 treatment of chronic hepatitis Delta. However, Peg-IFN- α has been shown to suppress
56 HDV viremia in a limited number of patients (14 to 50%) and relapses after arrest of
57 treatment are very often reported (21). Only few other antiviral strategies are currently
58 under clinical evaluation for the treatment of chronic HDV infection. As HDV uses the
59 envelope of HBV, any HBV entry inhibitor should also inhibit HDV entry. For instance,
60 Myrcludex-B®, a peptide competing with HBV for the NTCP (Na⁺-taurocholate
61 cotransporting polypeptide) receptor, has proven its efficacy to also block HDV
62 infection (22) and is currently undergoing a phase-IIa trial. HDV assembly depends on
63 the farnesylation of L-HDAg (23) and prenylation inhibitors were shown to inhibit HDV
64 assembly and secretion. Results from the phase-IIa clinical trial to test the safety and
65 effectiveness of Lonafarnib are encouraging, but still limited by side effects (24).
66 Nucleic acids polymers were also reported to act on viral egress in patients (25).
67 We previously showed that hepatocytes (primary human hepatocytes (PHH) and
68 differentiated HepaRG cells (dHepaRG)) express a number of innate immune
69 receptors including toll like receptors (TLR) and wells as the lymphotoxin β receptor
70 (LT β R) (26, 27) that once activated, induce various inflammatory, anti-inflammatory,
71 pro- and anti-survival pathways (28, 29). Moreover, cytokines such as IFN- γ , TNF- α ,
72 IL-6 as well as agonization of TLRs and LT β R have been described to control HBV in
73 a non-cytopathic fashion (26, 27, 30-37). Using HDV mono-infected or HBV/HDV co-
74 or super-infected dHepaRG cells as well as primary human hepatocytes (PHH), we
75 analyzed the effect of several immune-modulators on HDV and found that agonists of

- 76 TLR1/2 and LT β R, inducing both the NF- κ B pathway, have a long-lasting antiviral
77 effect on HDV.

78 **Methods**

79 ***Cell culture and HBV infection***

80 HepaRG cells were cultured, differentiated, and infected by HBV and HDV as
81 previously described (38, 39). Primary human hepatocytes (PHH) were freshly
82 prepared from human liver resection obtained from the Centre Léon Bérard (Lyon) with
83 French ministerial authorizations (AC 2013-1871, DC 2013 – 1870, AFNOR NF 96 900
84 sept 2011) as previously described (40). HBV inocula were prepared from HepAD38
85 supernatants (41). HDV inocula were prepared from supernatants from co-transfected
86 HuH7 cells as previously described (39). Supernatants containing HBV or HDV
87 particles were concentrated with 8% PEG 8000 (Sigma-Aldrich). All virus preparations
88 were tested for the absence of endotoxin (Lonza). HepG2-NTCP were kindly provided
89 by Dr Stephan Urban (Univ. Heidelberg, Germany); they were cultivated in 10%-FCS
90 supplemented DMEM (4.5 g/L glucose) without DMSO until confluence and with 2%
91 DMSO after and infected as for HepaRG.

92

93 **Reagents**

94 Pam3CSK4 (TLR-1/2 agonist) was purchased from InvivoGen, recombinant human IL-
95 6 (rhIL-6) from R&D Systems, PEG-IFN- α (Roferon) from Roche and recombinant
96 human TNF- α (rh TNF- α) from Life Technologies. Neutralizing anti-IL-6 antibodies
97 (IgG1, #501110) and their isotype control antibodies (IgG2, #400414) were purchased
98 from Biolegend. Tenofovir was obtained from Gilead Sciences. QVD-OPH (a pan-
99 caspase inhibitor), Staurosporine (an inducer of apoptosis) and the farnesylation
100 inhibitor FTI-277 (FTI) were purchased from Sigma-Aldrich. To activate LT β R, we
101 used a super-agonistic tetravalent bi-specific antibody (BS1) (26, 42, 43).

102

103 **Western blot and immunofluorescence analysis**

104 Cells were harvested in RIPA lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris HCl pH=8,0 50 mM, SDS
105 0,1%, NP40 1%, Na Deoxycholate 0,5%) containing protease inhibitors (Protein
106 Cocktail Inhibitors from Sigma-Aldrich). Clarified lysates were subjected to SDS-PAGE
107 and Western Blot transfer onto nitrocellulose membranes using the iBlot2 apparatus
108 according to the manufacturer (Thermofisher Scientific). Detection was performed with
109 Gel Doc XR+ System (BioRad) and images were analysed with ImageJ software. To
110 perform immunofluorescence, cells were fixated with paraformaldehyde 4% and
111 permeabilied by Triton 0.3%. Cell nuclei were stained with 4.6-diamidino-2-
112 phenylindole (DAPI).

113 The anti-human Actin (clone C4, #08691002) was purchased from MP Biomedicals,
114 the anti-human β Tubulin was purchased from Acam. The anti-HDAg – polyclonal in-
115 house rabbit antibody was a kind gift from Alan Campbell Kay.

116

117 ***Nucleic acid extractions, reverse transcription and qPCR analyses***

118 Total intracellular RNA and DNA were extracted from cells with the NucleoSpin RNA
119 II kit and tissue kit respectively according to the manufacturer's instructions (Macherey-
120 Nagel). DNAs and RNAs from HBV or HDV particles were isolated from the cell
121 supernatants using the NucleoSpin RNA Virus kit (Macherey-Nagel) according to the
122 manufacturer's instructions.

123 RNA reverse transcription was performed using the Maxima RT (Life Technologies).

124 Quantitative PCR for HDV and HBV were performed using specific primers and
125 normalized to PRNP housekeeping gene as previously described (26, 39).

126

127 ***Northern Blot analyses***

128 Northern blot for HDV detection was performed as previously described (39).
129 Membrane-bound RNA was hybridized to DIG-labeled full HDV genome or anti-
130 genome specific probes. 18S and/or 28S rRNA were used as loading control.

131

132 ***Measurement of cytokines by Luminex***

133 IL-12p70, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-13, IL-15, IL-18, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7
134 and TNF- α were measured with a ProcartaPlex Human Th1/Th2 & Cytokine Panel 1C
135 (18 plex) kit (eBiosciences). Samples were analyzed using a Bio-Plex® 200 System
136 (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions.

137

138 **Viability/cytotoxicity assays**

139 Neutral red uptake assays were performed to estimate cell viability/cytotoxicity as
140 previously described (44).

141 **Results**

142 ***Antiviral effect on HDV of various immune modulators.*** In a preliminary screen,
143 dHepaRG cells, infected first by HBV then by HDV (39), were treated with Pam3CSK4
144 (TLR-1/2 agonist), BS1 (tetravalent bispecific antibody agonizing the LT β R), the
145 control IgG antibody, PEG-IFN- α , Tenofovir (a nucleoside analogue inhibiting the
146 reverse transcription of HBV) as well as with recombinant human (rh) IL-6 and rhTNF-
147 α . As expected and as already reported (26, 32, 33, 37) all those molecules, except
148 the control IgG, decreased the levels of total intracellular HBV DNAs (**Figure S1**). Also
149 as expected PEG-IFN- α , which is used to treated chronic HBV/HDV infections in clinic,
150 decreased the levels of total intracellular HBV DNA and HDV RNAs, as well as HDV
151 proteins. Interestingly, we also observed a significant reduction of the levels of total
152 intracellular HDV RNAs and proteins after treatment with Pam3CSK4, BS1, rhIL-6 and
153 rhTNF- α . Since rhIL-6 and rhTNF- α cannot be used as therapeutics due to severe side
154 effects, we focused the rest of our study on Pam3CSK4 and BS1.

155
156 ***Pam3CSK4 and BS1 reduced the levels of intracellular HDV RNAs and proteins***
157 ***without toxicity.*** HDV mono-infected, HBV/HDV co- or super-infected dHepaRG cells
158 were treated with Pam3CSK4 and BS1 for 11 days after establishment of the
159 infections. Upon stimulation of dHepaRG cells by Pam3CSK4 and BS1, we observed
160 a reduction in the levels of total intracellular HDV RNAs (50 to 75 %) and HDV proteins
161 in all the different setting of infections (**Figure 1A**). Northern blot analyses revealed a
162 reduction of both HDV Gs and HDV AGs upon treatment of infected cells with
163 Pam3CSK4 and BS1 (**Figure 1A**) suggesting that HDV replication and/or HDV RNAs
164 stability/integrity may be targeted. Of note, the decreases in the levels of total
165 intracellular HDV RNAs and HDV proteins observed upon treatments with Pam3CSK4
166 and BS1 were dose dependent (**Figure S2**) and still observed when increasing the

167 multiplicity of infection of both HBV and HDV (**Figure 1B**). As we reported already in
168 HBV-infected dHepaRG cells (26, 33), we did not observed significant toxicity in HDV
169 mono-infected or HBV/HDV super-infected dHepaRG cells treated with Pam3CSK4
170 and BS1 (**Figure S2**). Since a low amount of dHepaRG cells actually express viral
171 proteins (39), specific death of infected cells might not be detected by regular cell
172 survival assays. We therefore inhibited apoptosis using QVD-OPH (a pan caspase
173 inhibitor) and did not observe any alteration in the antiviral activity against HDV of
174 neither BS1 nor Pam3CSK4 (**Figure S3**). These data ruled out specific apoptosis of
175 infected hepatocytes upon BS1 or Pam3CSK4 stimulation. Moreover, we also
176 observed reduction in the levels of total intracellular HDV RNAs in HBV/HDV co-
177 infected PHH (having a higher rate of infection that dHepaRG cells) from two out of
178 three different donors (**Figure S3**).

179

180 ***Pam3CSK4 and BS1 reduced the levels and infectivity of secreted HDV particle.***

181 HBV/HDV co-infected dHepaRG cells were treated after establishment of the infections
182 with Pam3CSK4 and BS1 for 11 days. We confirmed a 70 to 75 % reduction in the
183 levels of total intracellular HDV RNAs upon treatments with Pam3CSK4 and BS1 and
184 no significant effect of the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 (FTI), as already
185 shown (39) (**Figure 2A**). The supernatants of treated cells (containing progeny HBV
186 and HDV, the latest being called HDV-2P) were collected and concentrated. As
187 expected due to its mechanism of action, FTI induced a 50 % reduction in the levels of
188 newly produced HDV particles (**Figure 2B**). Pam3CSK4 and BS1 also induced a
189 reduction in the levels of newly produced HDV particles (**Figure 2B**). The different
190 supernatants were subsequently used for inoculation of HepG2-NTCP cells with an
191 equal amount of vge per cell between the different condition and the amount of infected

192 cells were assessed by immunofluorescence detection of HDAg 6 days post second
193 round of infection. As we already showed (39), similar number of HepG2-NTCP cells
194 were positive for HDAg after infection with HDV-2P produced by HBV/HDV infected
195 non-treated dHepaRG cells or with HDV inoculum produced after transfection of HuH7
196 cells (**Figure 2C**). The levels of HDV positive HepG2-NTCP was similar also similar
197 after infection with similar amount of HDV-2P produced by dHepaRG cells treated with
198 FTI (**Figure 2C**) suggesting that FTI affect the secretion of HDV particles but not their
199 specificity infectivity. On the contrary, we observed a lower amount of HDV positive
200 HepG2-NTCP when infected with HDV-2P particles produced by dHepaRG cells
201 treated with Pam3CSK4 and BS1 compared to HepG2-NTCP cells infected with a
202 similar amount of HDV-2P produced by non-treated dHepaRG cells (**Figure 2C**).
203 These data suggest that Pam3CSK4 and BS1 affect HDV particles secretion as well
204 as the specific infectivity of the remaining secreted HDV particles.

205
206 ***Fast and long-lasting inhibition of HDV by Pam3CSK4 and BS1.*** In order to assess
207 the kinetics of HDV inhibition by Pam3CSK4 and BS1, HBV/HDV super-infected
208 dHepaRG cells were treated after establishment of the infections and the levels of total
209 intracellular HDV RNAs were monitored shortly after the first treatments or after arrest
210 of the treatments. First, we observed a 25% reduction of the levels of total intracellular
211 HDV RNAs already 48h after the first treatment with a 50 % reduction reached 96h
212 post-treatment (**Figure 3A**). Second, as we already described (26, 33), we observed
213 again a long lasting antiviral effect of Pam3CSK4 and BS1 on HBV contrary to a
214 nucleoside analogues such as Tenofovir, as shown here by monitoring the levels of
215 secreted HBV particles (**Figure 3B**). Interestingly, we did not observe any rebound in
216 the levels of total intracellular HDV RNAs 11 days after arrest of Pam3CSK4 or BS1

217 treatments (**Figure 3B**) suggesting an irreversible effect on HDV replication and
218 transcription template induced by these molecules.

219

220 ***IL-6 produced upon stimulation of dHepaRG cells by Pam3CSK4 is not***
221 ***responsible for the antiviral effect on HDV.*** As mentioned above, stimulation of

222 TLRs as well as the LT β R are thought to induce various inflammatory pathways (28,

223 29). In order to evaluate the quantity and quality of cytokines produced by dHepaRG

224 cells upon stimulation by Pam3CSK4 or BS1, we performed Luminex assays 24h after

225 a first stimulation or a second stimulation performed 3 days later. None of the cytokine

226 tested were detected in the supernatants of HBV-infected dHepaRG cells treated with

227 BS1 and IL-6 was the only cytokine tested detected in the supernatants of HBV infected

228 dHepaRG cells treated by Pam3CSK4 (**Figure 4A**). As we observed a decrease in

229 the levels of intracellular HDV RNAs in dHepaRG treated with rh-IL-6 (**Figure S1**), we

230 performed experiments with neutralizing anti-IL-6 antibodies to assess the role of

231 secreted IL-6 in the antiviral effect on HDV of Pam3CSK4. Despite using an amount of

232 anti-IL-6 antibodies able to neutralize more than 15 times the amount of IL-6 produced

233 by dHepaRG cells upon Pam3CSK4, we did not observe any change in the reduction

234 of the levels of intracellular HDV RNAs (**Figure 4B**). We therefore concluded that IL-

235 6 produced upon stimulation of dHepaRG cells by Pam3CSK4 is not responsible for

236 the antiviral effect on HDV.

237 **Discussion**

238

239 Despite leading to the most severe form of chronic viral hepatitis, HDV remains a
240 neglected pathogen and treatment options are limited and largely inefficient. Here we
241 showed that the stimulation of TLR-1/2 and LT β R not only inhibit HBV (26, 33) but also
242 HDV. Indeed, we observed that stimulation of hepatocytes by ligands of TLR1/2
243 (Pam3CSK4) and LT β R (BS1) efficiently decreased levels of intracellular HDV RNAs
244 and proteins. Both molecules also negatively affect HDV progeny release and specific
245 infectivity thereby potentially inhibiting viral spread. LT β R-agonists and Pam3CSK4
246 were active at low doses and we did not observe any toxicity in HDV replicating cells
247 as already reported for HBV infected cells (26, 33).

248 Pam3CSK4 and BS1-mediated antiviral effects against HDV were sustained after
249 arrest of the treatments, suggesting an irreversible effect on HDV replication and
250 transcription template. Underlying mechanisms, that are currently investigated, are
251 likely to involve either direct degradation of HDV RNAs, editing or negative epigenetic
252 regulations of the transcription from HDV genome. The antiviral effect of Pam3CSK4
253 and BS1 appeared to be independent from the production of cytokines (including IL-6)
254 and their secondary effect on cells via downstream pathways (45, 46), as shown by
255 our neutralization assays. These suggest that stimulation of hepatocytes by
256 Pam3CSK4 and BS1 would induce/activate intracellular effectors leading to the
257 antiviral effects. Identification of those effectors will be very important to fully uncover
258 the antiviral mechanism(s).

259 It is worth noting that the effect of Pam3CSK4 and BS1 could not be confirmed in all
260 PHH donors tested suggesting that (i) either dHepaRG are particularly efficient to
261 trigger innate cellular pathways and/or (ii) the low level of replication of HDV in HepaRG

262 is more prone to inhibition and/or (iii) PHH donor heterogeneity (e.g. genetic
263 background, alteration of liver function due the underlying donor disease or treatment)
264 may affect pathways triggering HDV inhibition. This also emphasizes the importance
265 of performing experiments with multiple PHH donors. This warrants further
266 investigation in PHH in vitro with invigorated treatment (e.g. dosing every day for a
267 longer period of time), as well as investigation in preclinical mouse models of HBV/HDV
268 infection (47).

269 In contrast to agonists of TLR7 (e.g., GS-9620), TLR8 (e.g., GS-9688) and RIG-
270 I/NOD2 (e.g., SB-9200) that can be delivered orally to human, TLR2 ligands cannot
271 and will likely require strategy for delivery. In this respect, nanoparticles are currently
272 tested to reduce the active dose of ligands, protect these ligands from degradation and
273 specifically deliver specifically them to the liver, thereby preventing systemic exposure
274 and potential adverse effects (48). Of note, as antivirals, LT β R-agonists should only
275 be used for a limited time frame for which no adverse effects were observed in
276 preclinical settings (42). This is important since constitutive overexpression of
277 LT β for more than one year leading to activation of LT β R on hepatocytes has
278 been associated with inflammatory liver disease and hepatocellular carcinoma (49).

279 In conclusion, immune-modulators inducing the NF- κ B pathways in hepatocytes can
280 strongly inhibit HDV replication, and could be further developed as efficient treatment
281 for HBV/HDV chronically infected patients.

282 **References**

- 283 1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. 1977. Immunofluorescence detection
284 of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg
285 carriers. *Gut* 18:997-1003.
- 286 2. Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF, Chen WS, Goyal H, Pan S, Xu HG. 2018. Prevalence
287 and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*
288 doi:10.1136/gutjnl-2018-316601.
- 289 3. Smedile A, Farci P, Verme G, Caredda F, Cargnel A, Caporaso N, Dentico P, Trepo C, Opolon P, Gimson A,
290 Vergani D, Williams R, Rizzetto M. 1982. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* 2:945-7.
- 291 4. Govindarajan S, Chin KP, Redeker AG, Peters RL. 1984. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent.
292 *Gastroenterology* 86:1417-20.
- 293 5. Buti M, Homs M, Rodriguez-Frias F, Funalleras G, Jardi R, Sauleda S, Tabernero D, Schaper M, Esteban R.
294 2011. Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study. *J Viral Hepat*
295 18:434-42.
- 296 6. Yurdaydin C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi AM. 2010. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis.
297 *J Viral Hepat* 17:749-56.
- 298 7. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. 2000. Influence of hepatitis
299 delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action
300 on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 46:420-6.
- 301 8. Ji J, Sundquist K, Sundquist J. 2012. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for
302 hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 104:790-2.
- 303 9. Kushner T, Serper M, Kaplan DE. 2015. Delta hepatitis within the Veterans Affairs medical system in the United
304 States: Prevalence, risk factors, and outcomes. *J Hepatol* 63:586-92.
- 305 10. Beguelin C, Moradpour D, Sahli R, Suter-Riniker F, Luthi A, Cavassini M, Gunthard HF, Battegay M, Bernasconi
306 E, Schmid P, Calmy A, Braun DL, Furrer H, Rauch A, Wandeler G, Swiss HIVCS. 2017. Hepatitis delta-
307 associated mortality in HIV/HBV-coinfected patients. *J Hepatol* 66:297-303.
- 308 11. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. 1980. delta Agent: association of delta antigen
309 with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*
310 77:6124-8.
- 311 12. Sharmeen L, Kuo MY, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. 1988. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can
312 undergo self-cleavage. *J Virol* 62:2674-9.
- 313 13. Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. 1988. Characterization of self-cleaving RNA sequences on
314 the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol* 62:4439-44.
- 315 14. Gudima S, Wu SY, Chiang CM, Moraleta G, Taylor J. 2000. Origin of hepatitis delta virus mRNA. *J Virol*
316 74:7204-10.
- 317 15. Hsieh SY, Chao M, Coates L, Taylor J. 1990. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA
318 for delta antigen. *J Virol* 64:3192-8.
- 319 16. Macnaughton TB, Lai MM. 2002. Large hepatitis delta antigen is not a suppressor of hepatitis delta virus RNA
320 synthesis once RNA replication is established. *J Virol* 76:9910-9.
- 321 17. Goyal A, Murray JM. 2014. The impact of vaccination and antiviral therapy on hepatitis B and hepatitis D
322 epidemiology. *PLoS One* 9:e110143.
- 323 18. Miller MM. 2017. Sofosbuvir-velpatasvir: A single-tablet treatment for hepatitis C infection of all genotypes. *Am*
324 *J Health Syst Pharm* 74:1045-1052.
- 325 19. Yen L, Magnier M, Weissleder R, Stockwell BR, Mulligan RC. 2006. Identification of inhibitors of ribozyme self-
326 cleavage in mammalian cells via high-throughput screening of chemical libraries. *RNA* 12:797-806.
- 327 20. Buchmann B, Dohner K, Schirdewahn T, Sodeik B, Manns MP, Wedemeyer H, Ciesek S, von Hahn T. 2017. A
328 screening assay for the identification of host cell requirements and antiviral targets for hepatitis D virus infection.
329 *Antiviral Res* 141:116-123.
- 330 21. Yurdaydin C. 2012. Treatment of chronic delta hepatitis. *Semin Liver Dis* 32:237-44.
- 331 22. Volz T, Allweiss L, Ben MM, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, Alexandrov A, Urban S, Petersen J,
332 Lutgehetmann M, Dandri M. 2013. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading
333 in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol* 58:861-7.

- 334 23. Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen.
335 *Science* 256:1331-3.
- 336 24. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, Winters MA, Subramanya G, Cooper SL,
337 Pinto P, Wolff EF, Bishop R, Ai Thanda Han M, Cotler SJ, Kleiner DE, Keskin O, Idilman R, Yurdaydin C, Glenn
338 JS, Heller T. 2015. Oral prenylation inhibition with Isonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept
339 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis* 15:1167-74.
- 340 25. Al-Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A. 2016. Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and
341 Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive Bangladeshi Patients with HBeAg+ Chronic Hepatitis B
342 Infection. *PLoS One* 11:e0156667.
- 343 26. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz
344 T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Huser N, Durantel D, Liang TJ, Munk C, Heim MH, Browning JL,
345 Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. 2014. Specific and nonhepatotoxic degradation
346 of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343:1221-8.
- 347 27. Luangsay S, Ait-Goughoulte M, Michelet M, Floriot O, Bonnin M, Gruffaz M, Rivoire M, Fletcher S, Javanbakht
348 H, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. 2015. Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in
349 HepaRG cells. *J Hepatol* 63:1077-85.
- 350 28. Wolf MJ, Seleznik GM, Zeller N, Heikenwalder M. 2010. The unexpected role of lymphotoxin beta receptor
351 signaling in carcinogenesis: from lymphoid tissue formation to liver and prostate cancer development. *Oncogene*
352 29:5006-18.
- 353 29. Pandey S, Kawai T, Akira S. 2015. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors.
354 *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016246.
- 355 30. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, Chisari FV. 1994. Cytotoxic T lymphocytes
356 inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U*
357 *S A* 91:3764-8.
- 358 31. McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. 2000. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic
359 viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 74:2255-64.
- 360 32. Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hosel M, Michler T, Wisskirchen K, Cheng X, Zhang K, Chou
361 WM, Wettengel JM, Malo A, Bohne F, Hoffmann D, Eyer F, Thimme R, Falk CS, Thasler WE, Heikenwalder M,
362 Protzer U. 2016. Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV
363 Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 150:194-205.
- 364 33. Lucifora J, Bonnin M, Aillot L, Fusil F, Maadadi S, Dimier L, Michelet M, Floriot O, Ollivier A, Rivoire M, Ait-
365 Goughoulte M, Daffis S, Fletcher SP, Salvetti A, Cosset FL, Zoulim F, Durantel D. 2018. Direct antiviral
366 properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes. *Sci Rep* 8:5390.
- 367 34. Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, Fosdick A, Frey CR, Zheng J, Wolfgang
368 G, Halcomb RL, Tumas DB. 2013. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged
369 suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* 144:1508-17, 1517 e1-
370 10.
- 371 35. Lawitz E, Gruener D, Marbury T, Hill J, Webster L, Hassman D, Nguyen AH, Pflanz S, Mogalian E, Gaggar A,
372 Massetto B, Subramanian GM, McHutchison JG, Jacobson IM, Freilich B, Rodriguez-Torres M. 2015. Safety,
373 pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in treatment-naive
374 patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 20:699-708.
- 375 36. Menne S, Tumas DB, Liu KH, Thampi L, AlDeghaither D, Baldwin BH, Bellezza CA, Cote PJ, Zheng J, Halcomb
376 R, Fosdick A, Fletcher SP, Daffis S, Li L, Yue P, Wolfgang GH, Tennant BC. 2015. Sustained efficacy and
377 seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. *J*
378 *Hepatol* 62:1237-45.
- 379 37. Palumbo GA, Scisciani C, Pediconi N, Lupacchini L, Alfalate D, Guerrieri F, Calvo L, Salerno D, Di Cocco S,
380 Levrero M, Belloni L. 2015. IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear
381 cccDNA Minichromosome. *PLoS One* 10:e0142599.
- 382 38. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo
383 C. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655-60.
- 384 39. Alfaiate D, Lucifora J, Abeywickrama-Samarakoon N, Michelet M, Testoni B, Cortay JC, Sureau C, Zoulim F,
385 Deny P, Durantel D. 2016. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated
386 genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral Res* 136:19-31.
- 387 40. Lecluyse EL, Alexandre E. 2010. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue.
388 *Methods Mol Biol* 640:57-82.

- 389 41. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. 1997. Inducible expression
 390 of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening
 391 potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1715-20.
- 392 42. Lukashev M, LePage D, Wilson C, Bailly V, Garber E, Lukashin A, Ngam-ek A, Zeng W, Allaire N, Perrin S, Xu
 393 X, Szeliga K, Wortham K, Kelly R, Bottiglio C, Ding J, Griffith L, Heaney G, Silverio E, Yang W, Jarpe M, Fawell
 394 S, Reff M, Carmillo A, Miatkowski K, Amatucci J, Crowell T, Prentice H, Meier W, Violette SM, Mackay F, Yang
 395 D, Hoffman R, Browning JL. 2006. Targeting the lymphotoxin-beta receptor with agonist antibodies as a potential
 396 cancer therapy. *Cancer Res* 66:9617-24.
- 397 43. Hu X, M AZ, Bardhan K, Yang D, Waller JL, Liles GB, Lee JR, Pollock R, Lev D, Ware CF, Garber E, Bailly V,
 398 Browning JL, Liu K. 2013. Lymphotoxin beta receptor mediates caspase-dependent tumor cell apoptosis in vitro
 399 and tumor suppression in vivo despite induction of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*
 400 doi:10.1093/carcin/bgt014.
- 401 44. Isorce N, Testoni B, Locatelli M, Fresquet J, Rivoire M, Luangsay S, Zoulim F, Durantel D. 2016. Antiviral activity
 402 of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with
 403 hepatitis B virus. *Antiviral Res* 130:36-45.
- 404 45. Belloni L, Palumbo, G.A., Valente, S., Rotili, D., Pediconi, N., , Mai, A., Levrero, M. 2012. Mimicking Interferon-
 405 α (IFN α) inhibitory activity on hepatitis B virus (HBV) transcription and replication by targeting the epigenetic
 406 control of nuclear cccDNA minichromosome with epigenetic small molecules. *Hepatology* 56:369A.
- 407 46. Hosel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, Tedjokusumo R, Esser K, Arzberger
 408 S, Kirschning CJ, Langenkamp A, Falk C, Buning H, Rose-John S, Protzer U. 2009. Not interferon, but
 409 interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 50:1773-82.
- 410 47. Giersch K, Helbig M, Volz T, Allweiss L, Mancke LV, Lohse AW, Polywka S, Pollok JM, Petersen J, Taylor J,
 411 Dandri M, Lutgehetmann M. 2014. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently
 412 converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *J Hepatol* 60:538-44.
- 413 48. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for
 414 biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 107:163-175.
- 415 49. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, Bremer J, Iezzi G, Graf R, Clavien PA, Thimme
 416 R, Blum H, Nedospasov SA, Zatloukal K, Ramzan M, Ciesek S, Pietschmann T, Marche PN, Karin M, Kopf M,
 417 Browning JL, Aguzzi A, Heikenwalder M. 2009. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma.
 418 *Cancer Cell* 16:295-308.
- 419

Figures and legends

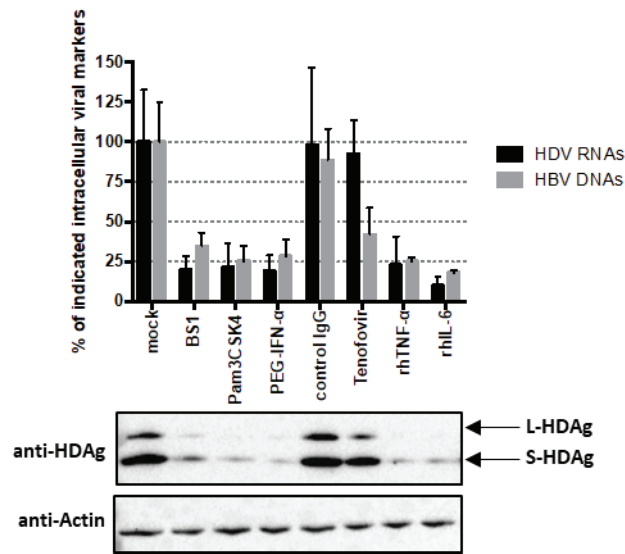


Figure S1: **Pam3CSK4 and BS1 reduced the levels of HBV and HDV RNAs.** dHepaRG cells were infected with HBV and with HDV 6 days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with BS1 (0,5 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,5 ug/mL), PEG-IFN- α (1000 U/mL), control IgG (0,5 ug/mL), Tenofovir (10 uM), TNF- α (50 ng/mL) or recombinant human IL-6 (rhIL-6, 100 ng/mL) for 11 days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs and HBV DNAs were analysed by RT-qPCR and qPCR respectively. The levels of HDV proteins were analysed by Western-blot. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments each performed with three biological replicates.

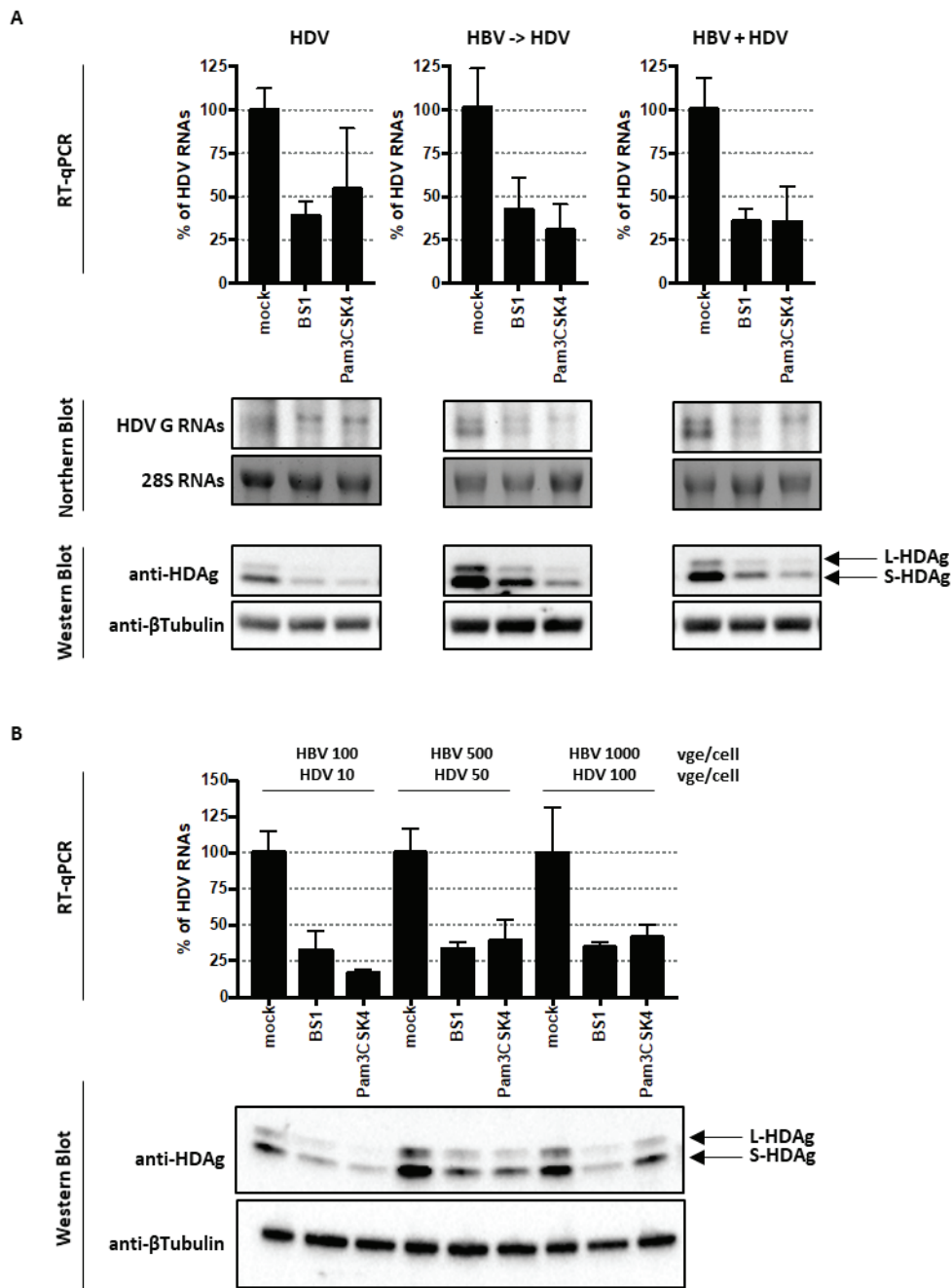


Figure 1: **Pam3CSK4 and BS1 reduced the levels of HDV RNA and proteins.** (A) dHepaRG cells were infected with HDV (HDV), HBV and with HDV 6 days later (HBV->HDV) or co-infected with HBV and HDV (HBV+HDV) with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with BS1 (0,1 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) for 11 days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs, HDV genome (HDV G) RNAs as well as the levels of HDV proteins were analysed by RT-qPCR, Northern or Western-blot respectively. Results are the mean +/- SD of 2 independent experiments each performed with four biological replicates. (B) dHepaRG cells were co-infected with HBV and HDV (HBV+HDV) with the indicated vge/cell. Cells were treated 6 days later with BS1 (0,1 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) for 11 days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs as well as the levels of HDV proteins were analysed by RT-qPCR or Western-blot respectively. Results are the mean +/- SD of 2 independent experiments each performed with three biological replicates.

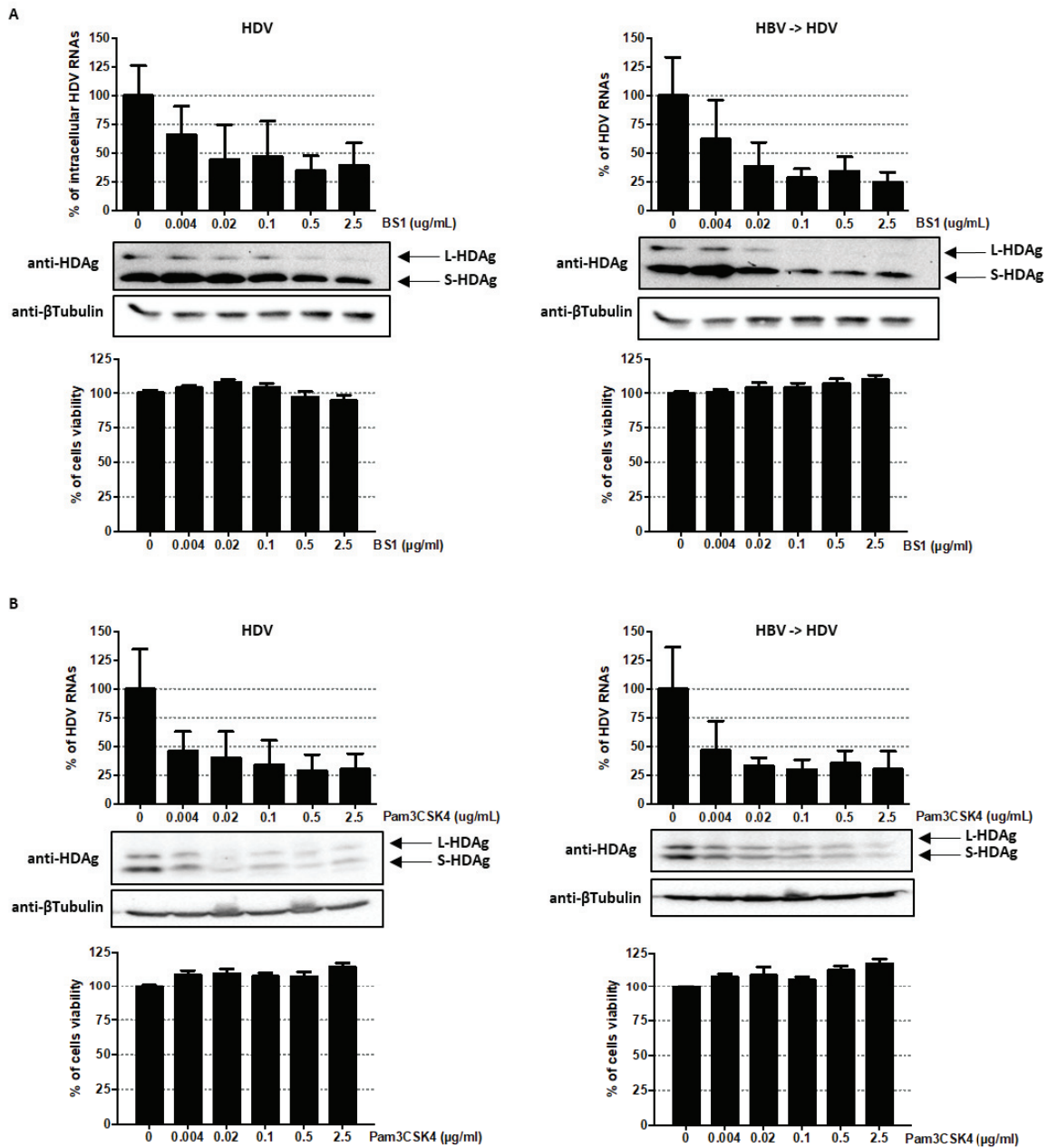


Figure S2: **Pam3CSK4 and BS1 dose dependently reduced the levels of HDV RNA and proteins without toxicity.** dHepaRG cells were infected with HDV (HDV) or HBV and with HDV 6 days later (HBV->HDV) with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with (A) BS1 or (B) Pam3CSK4 at the indicated concentration for 11 days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs and the levels of HDV proteins were analysed by RT-qPCR or Western-blot respectively. Cell survival was assessed by neutral red assays. Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments each performed with four biological replicates.

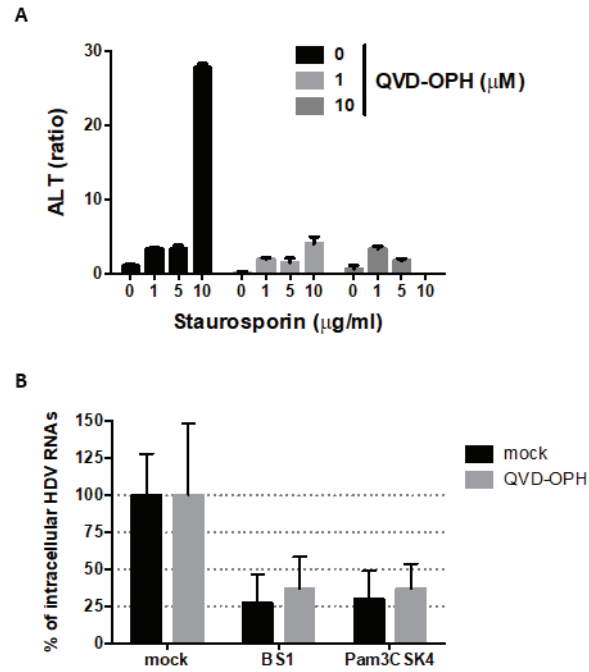


Figure S3: **Reduction of the levels of HDV RNA by Pam3CSK4 and BS1 is not due to apoptosis of infected cells.** (A) dHepaRG cells were treated with the indicated concentration of Staurosporin +/- QVD-OPH for 16 h. ALT were measured in the supernatant by enzymatic colorimetric assays. (B) dHepaRG cells were infected with HBV and with HDV 6 days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 2 days after HDV infection with 10 µM of QVD-OPH and with BS1 (0,1 µg/mL) or Pam3CSK4 (0,1 µg/mL) for 11 more days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments each performed with four biological replicates.

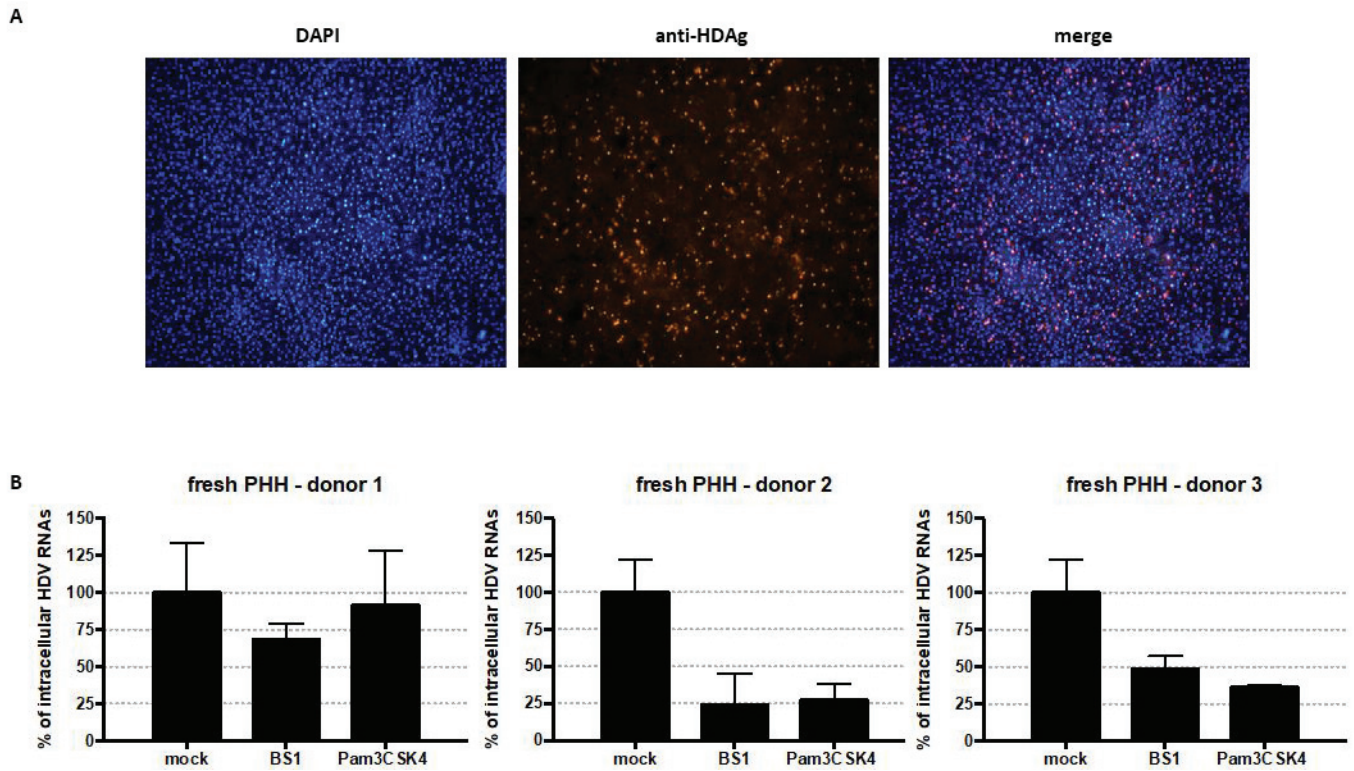


Figure S4. **Effect of Pam3CSK4 and BS1 stimulations of freshly isolated PHH on the levels of intracellular HDV RNAs.** (A) Freshly isolated Primary Human Hepatocytes (PHH) were infected with HDV with 10 vge/mL per cell. 6 days post infection, cells were stained with DAPI and with anti-HDAg antibodies. (B) Freshly isolated PHH from three distinct donors were infected with HBV and with HDV 4days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with BS1 (0,5 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) for 11 days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. Results are the mean +/- SD of three biological replicates.

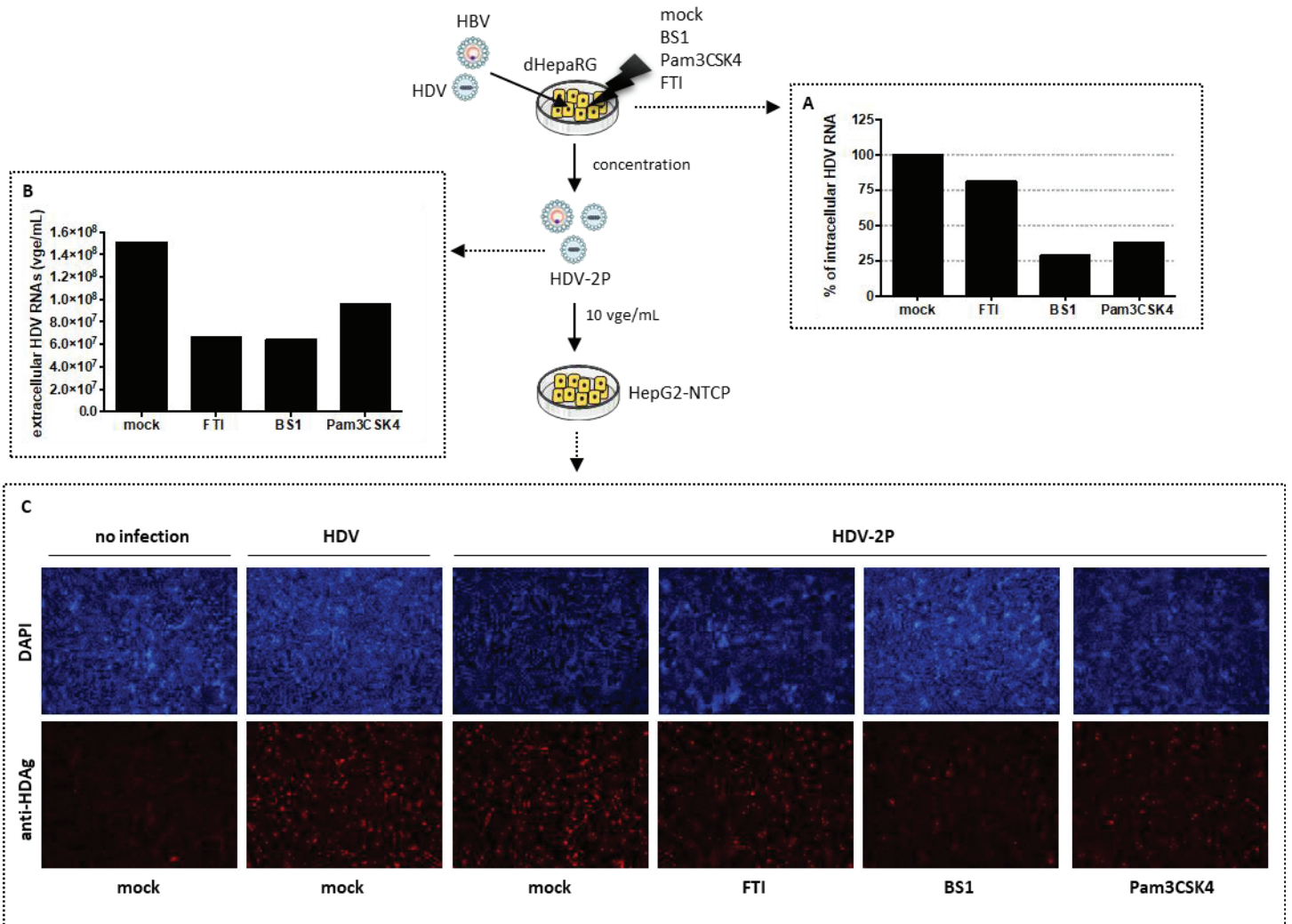


Figure 2. **Pam3CSK4 and BS1 reduced the infectivity of HDV particles.** dHepaRG cells were co-infected with HBV and HDV with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days later with BS1 (0,1 ug/mL), Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) or FTI (10 nM) for 11 days. (A) Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. (B) Supernatants were collected, concentrated and the levels of extracellular HDV RNAs (called HDV-2P for second passage) were assessed by qRT-PCR analyses. (C) Naïve HepG2-NTCP cells were infected with HDV or the different concentrated supernatants (HDV-2P) with 10 vge/cell. Six days later, cells were stained with DAPI and with anti-HDAg antibodies.

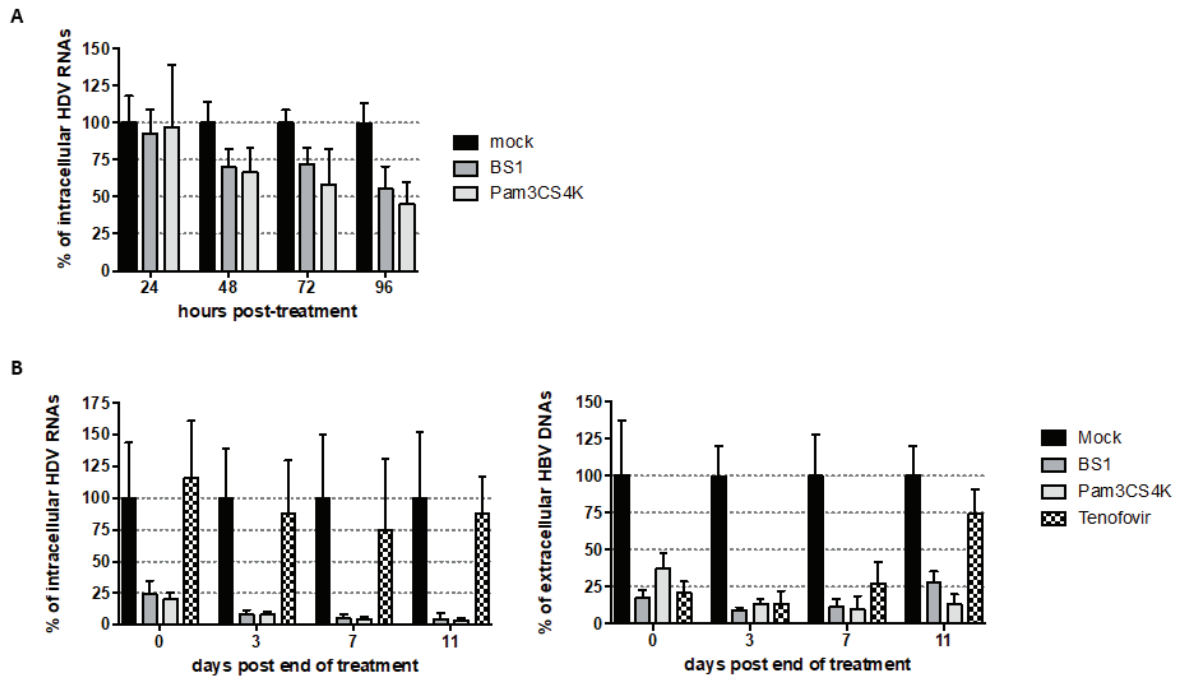


Figure 3: **Fast and long lasting inhibition of HDV by Pam3CSK4 and BS1.** (A) dHepaRG cells were infected with HBV and with HDV 6 days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with BS1 (0,5 ug/mL), Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) for 11 days. At the indicated time post-treatment, cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments each performed with three biological replicates. (B) dHepaRG cells were infected with HBV and with HDV 6 days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with BS1 (0,5 ug/mL), Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) or Tenofovir (10 uM) for 11 days. Treatments were stopped and cells further cultured. At the indicated time post end of the treatment, cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. Levels of HBV DNAs in the supernatants were assessed by qPCR analyses. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments each performed with three biological replicates.

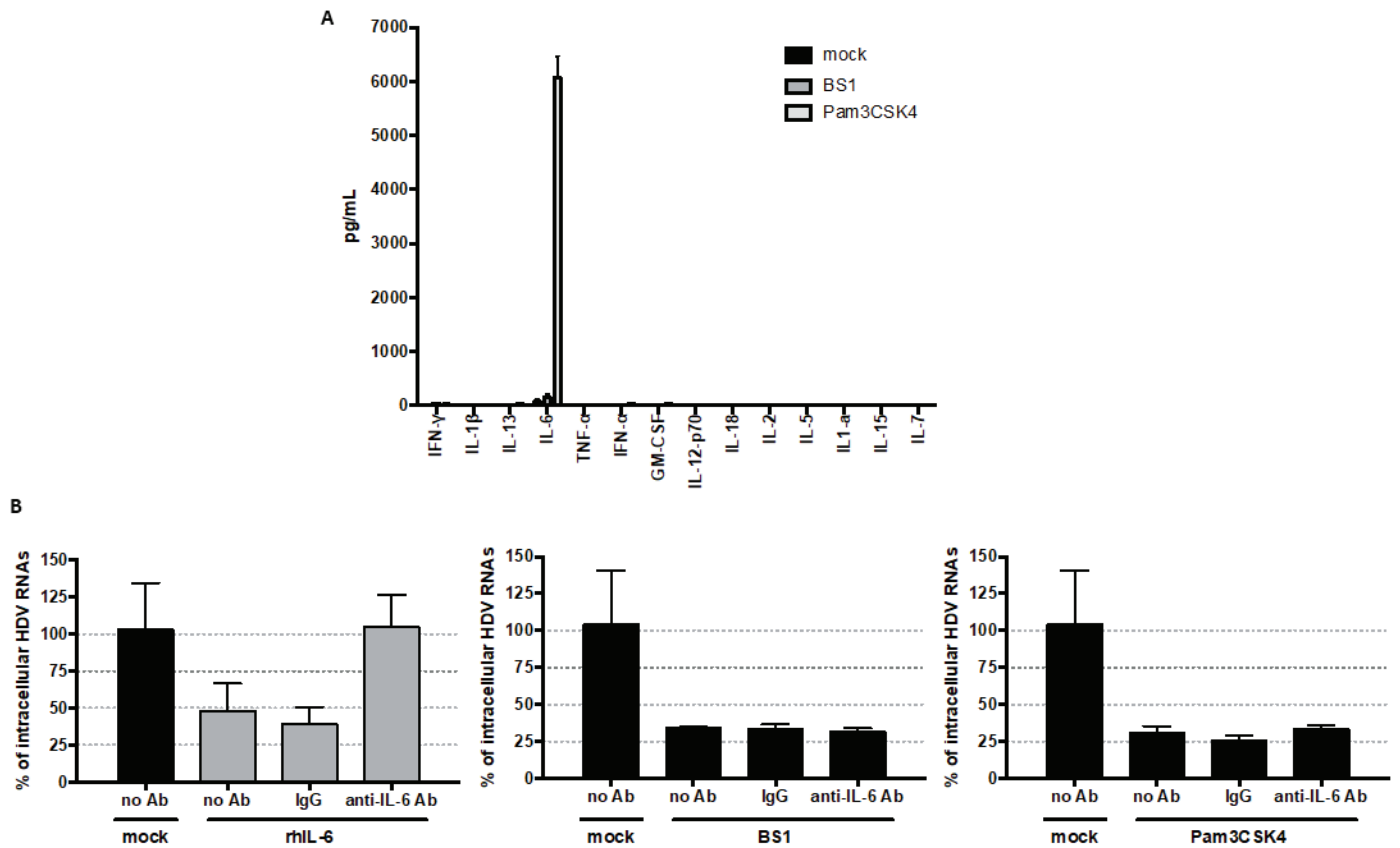


Figure 4: **IL-6 produced upon stimulation of dHepaRG cells by Pam3CSK4 is not responsible for the antiviral effect on HDV.** (A) dHepaRG cells were treated with BS1 (0,5 ug/mL), Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) for 24h. Supernatants were analysed for their cytokines contents by Luminex assays. Results are the mean +/- SD of one experiment performed with two biological replicates. (B) dHepaRG cells were infected with HBV and with HDV 6 days later with 100 vge/mL per cell for HBV and 10 vge/mL per cell for HDV. Cells were treated 3 days after HDV infection with IgG control antibodies (1 ug/mL) or neutralising anti-IL-6 antibodies (1 ug/mL) simultaneously with, recombinant human IL-6 (rhIL-6, 100 ng/mL), BS1 (0,5 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) for 11 more days. Cells were collected and the levels of total intracellular HDV RNAs were analysed by RT-qPCR. Results are the mean +/- SD of one experiment performed with three biological replicates.

3. Résultats additionnels

a. Phénotype anti-HBV de Pam3CSK4, BS1 et IL-1 β

i. Introduction

Les résultats ci-dessous constituent une annexe des données présentées précédemment dans l'article. Dans chacune des expériences de co-infections HBV/HDV où l'effet anti-HDV a été étudié, les paramètres viraux d'HBV (i.e. HBe et HBsAg sécrétés, ARN HBV intracellulaires) ont également été mesuré afin de servir de contrôle positif de nos expérimentations en comparaison aux données déjà publiées par l'équipe^{153,339}.

ii. Matériel et méthode

Culture cellulaire et infection HBV/HDV

Se référer à l'article présenté précédemment

Réactifs

Se référer à l'article présenté précédemment

Extractions d'ADN/ARN, rétrotranscription et analyses qPCR

Se référer à l'article présenté précédemment

ELISA

Des kits commerciaux d'immunoessais (Autobio Diagnostics Co., Chine) ont été utilisés pour la quantification des HBe et HBsAg dans le surnageant des cellules. Les résultats sont présentés en ratio par rapport à un échantillon contrôle. Les cut-offs des ELISA sont de 1 NC/ml (i.e. 1 NCU \approx 13 ng pour l'HBeAg et 2,5 ng/ml pour l'HBsAg).

iii. Résultats

Validation de différents inducteurs de la voie NF κ B pour leur effet anti-HBV

Des cellules dHepaRG infectées par HBV puis HDV ont été traitées avec le Pam3CSK4, BS1, un anticorps IgG contrôle, du PEG-IFN- α , du Tenofovir, de l'IL-6 ou

du TNF- α recombinants humains. Comme précédemment décrit^{153,339,486,487}, ces inducteurs excepté le contrôle anticorps IgG ont montré une capacité à diminuer les taux d'ARN HDV intracellulaires comme présenté précédemment (Figure S1 dans l'article). L'effet anti-HBV a également été estimé à travers une diminution des taux d'ADN HBV intracellulaires et d'HBe et d'HBsAg sécrétés par les dHepaRG dans le surnageant, et ceci pour l'ensemble des inducteurs de NF κ B testés excepté le contrôle négatif et le Tenofovir. Cette dernière observation appuie la force de notre modèle étant donné que les analogues de nucléosides sont connus pour inhiber l'étape de rétro-transcription d'HBV mais n'impactent en rien la transcription et la traduction des ARN viraux.

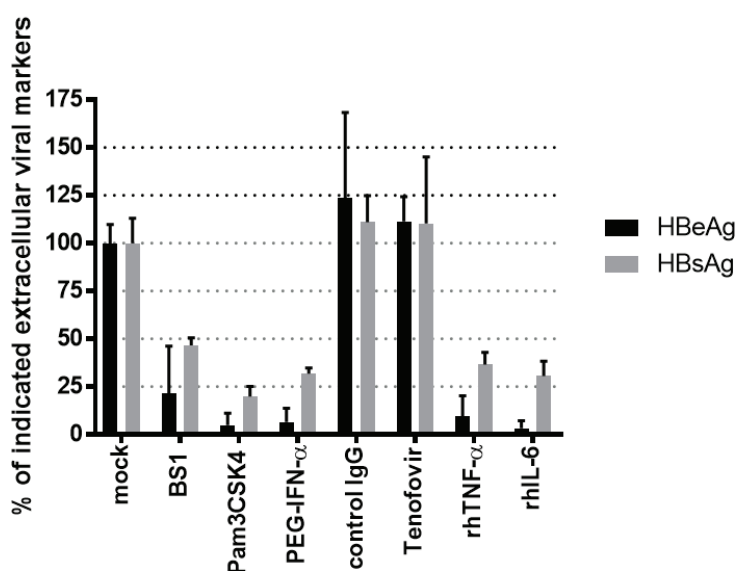


Figure 1: **Pam3CSK4 and BS1 réduisent les taux d'HBe et HBsAg sécrétés.** Des cellules dHepaRG cells ont été infectées avec HBV puis HDV 6 jours plus tard avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 3 jours après l'infection par HDV avec BS1 (0,5 ug/mL) or Pam3CSK4 (0,5 ug/mL), PEG-IFN- α (1000 U/mL), contrôle IgG (0,5 ug/mL), Tenofovir (10 uM), TNF- α (50 ng/mL) ou de l'IL-6 humaine recombinante (rhIL-6, 100 ng/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées et les taux d'HBe et HBsAg sécrétés ont été analysés par ELISA. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 3 expériences indépendantes chacune réalisée avec trois réplicats biologiques.

Pam3CSK4 et BS1 réduisent les taux d'ARN HBV intracellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés quel que soit le type d'infection et la quantité de particules virales infectantes considérés

Des cellules dHepaRG HBV/HDV co ou sur-infectées ont été traitées avec Pam3CSK4 et BS1 pendant 11 jours après établissement des infections. Après traitement par ces inducteurs nous avons observé une diminution des paramètres HDV (Figure 1 dans l'article ci-dessus). Les paramètres de l'infection HBV associée ont également été mesurés. Nous avons observé une diminution des ARN HBV

intracellulaires (Figure 2A) et des HBe et HBsAg sécrétés par les dHepaRG (Figure 2B). De plus cet effet anti-HBV était similaire quel que soit le type d'infection (i.e. co ou sur-infection) considéré. Enfin malgré une multiplication par 5 puis par 10 de la quantité de particules d'HBV et d'HDV infectant chaque cellule l'effet anti-HBV a persisté pour l'ensemble des paramètres viraux (Figure 2C et 2D).

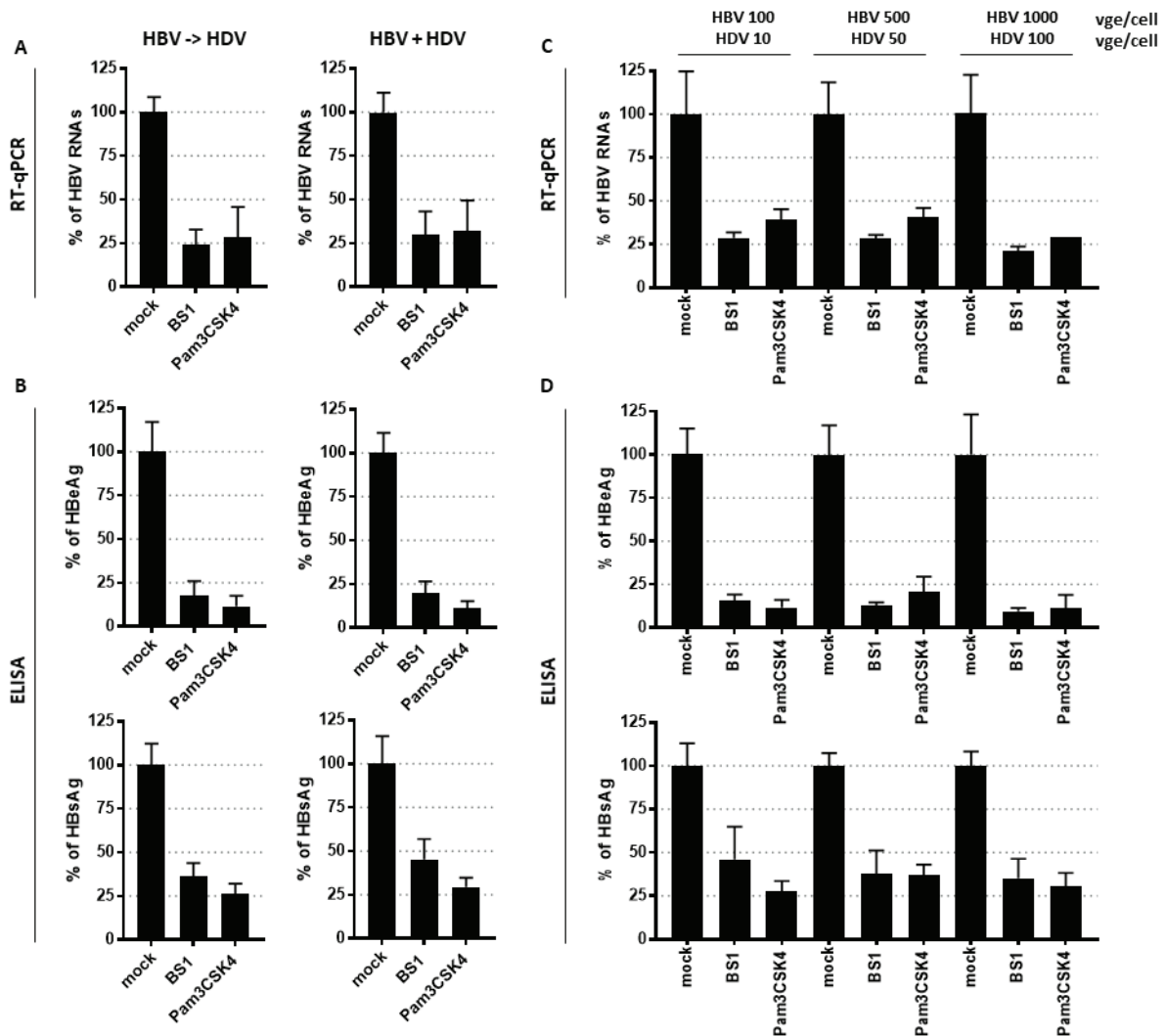


Figure 2: Pam3CSK4 et BS1 réduisent les niveaux d'ARN HBV, d'HBe et d'HBsAg quel que soit le type d'infection ou la quantité de particules virales considérés. (A et B) Des cellules dHepaRG ont été infectées avec HBV and puis HDV 6 jours plus tard (HBV->HDV) ou co-infectées avec HBV et HDV (HBV+HDV) avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 3 jours après l'infection HDV avec BS1 (0,1 ug/mL) ou Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées et les taux d'ARN HBV totaux intracellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés ont été analysés respectivement par RTqPCR et ELISA. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 4 expériences indépendantes chacune réalisée avec à minima trois réplicats biologiques. (C et D) Des cellules dHepaRG ont été co-infectées avec HBV et HDV (HBV+HDV) avec les particules virales/cellule indiquées. Les cellules ont été traitées 6 jours plus tard avec BS1 (0,1 ug/mL) ou Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées et les taux d'ARN HBV totaux intracellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés ont été analysés respectivement par RTqPCR et ELISA. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 4 expériences indépendantes chacune réalisée avec à minima trois réplicats biologiques.

Pam3CSK4 et BS1 réduisent les taux d'ARN HBV intra cellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés de manière dose-dépendante et également en hépatocytes primaires humains

Des cellules dHepaRG HBV/HDV sur-infectées ont été traitées avec des doses croissantes de Pam3CSK4 et BS1 pendant 11 jours après établissement des infections. Un effet anti-HDV dose-dépendant a été observé (Figure S2 dans l'article ci-dessus). L'effet anti-HBV déjà publié a été retrouvé avec une diminution également dose-dépendante des ARN HBV intracellulaires allant jusqu'à 75% (Figure 3A) et des HBe et HBsAg sécrétés (Figure 3B). De plus l'effet anti-HBV pour ces trois paramètres a également été observé en hépatocyte primaires humains chez trois donneurs différents, modèle plus relevant pour l'étude de composés antiviraux (Figure 4A et B).

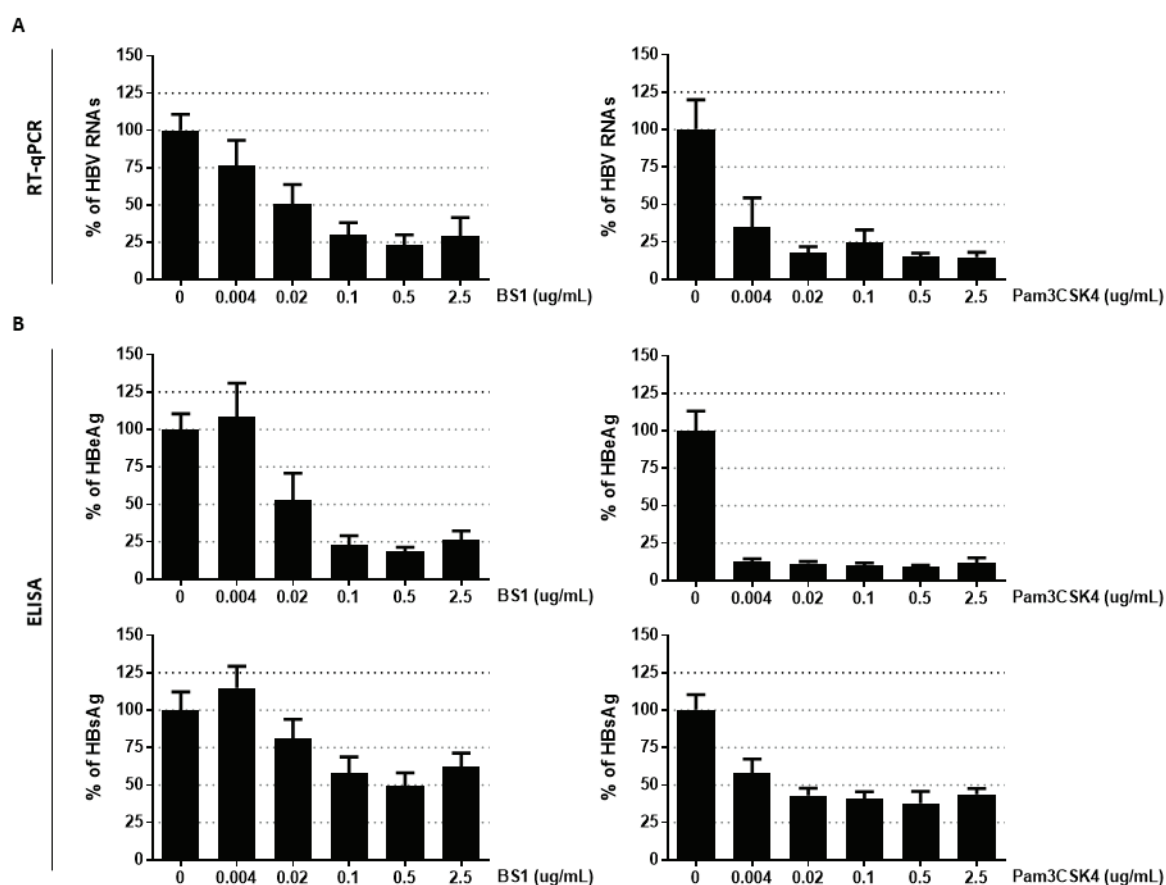


Figure 3: Pam3CSK4 et BS1 diminuent de manière dose-dépendante les niveaux d'ARN HBV, HBe and HBsAg. Des cellules dHepaRG ont été infectées avec HBV puis HDV 6 jours plus tard (HBV->HDV) avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 3 jours après l'infection HDV avec BS1 ou Pam3CSK4 aux concentrations indiquées et ceci pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées et les taux d'ARN HBV totaux intracellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés ont été analysés respectivement par RTqPCR et ELISA. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 3 expériences indépendantes chacune réalisée avec quatre réplicats biologiques.

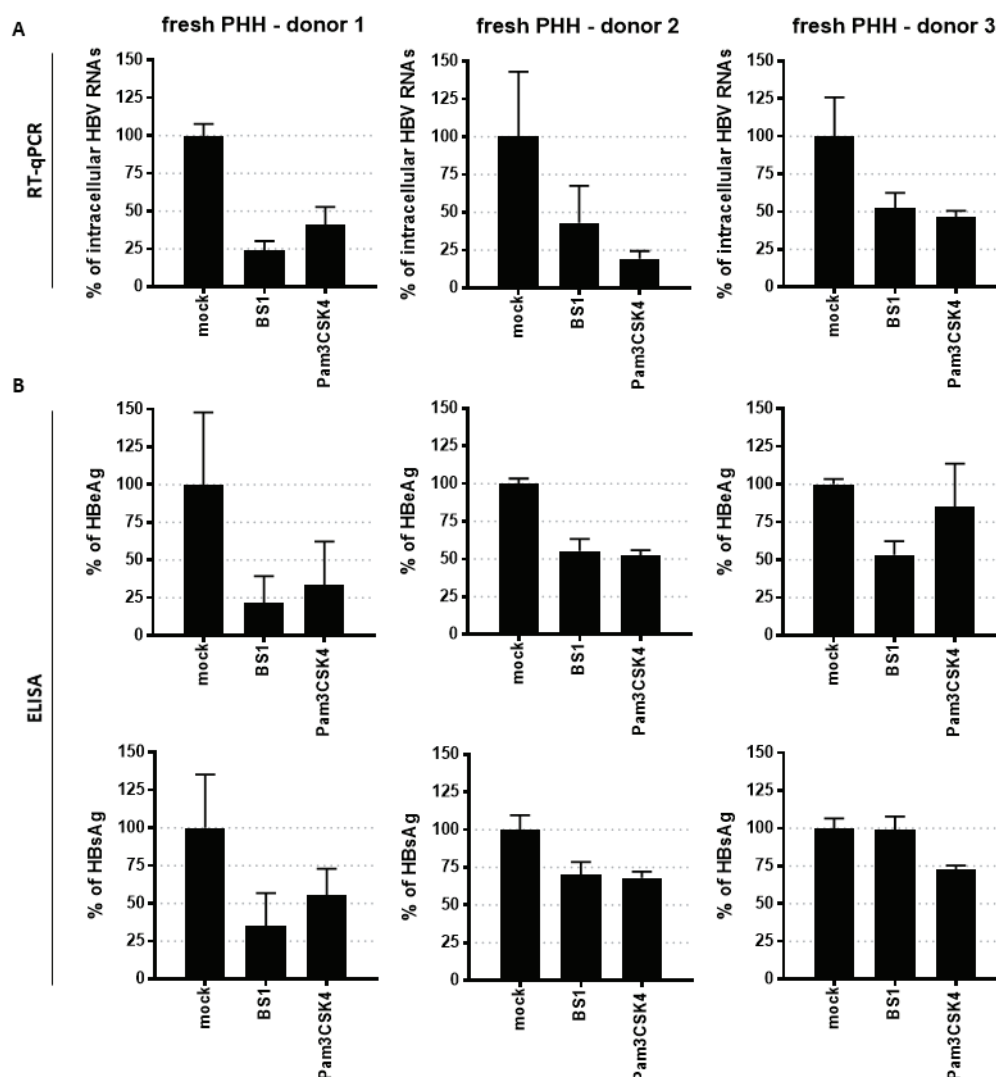


Figure 4. Effet de Pam3CSK4 et BS1 chez des PHH fraîches et isolées sur les taux d'ARN HBV intracellulaires et les sécrétions d'HBe et HBsAg. (A) Des PHH fraîchement isolées depuis 3 donneurs différents ont été infectées avec HBV puis HDV 4 jours plus tard (HBV->HDV) avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 3 jours après l'infection HDV avec BS1 (0,5 ug/mL) ou Pam3CSK4 (0,5 ug/mL) aux concentrations indiquées et ceci pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées et les taux d'ARN HBV totaux intracellulaires et d'HBe et HBsAg sécrétés ont été analysés respectivement par RTqPCR et ELISA. Les résultats sont la moyenne +/- SD de trois répliquats biologiques.

iv. Discussion

Bien que ces résultats soient déjà publiés par notre équipe et des collaborateurs en conditions de mono-infections HBV^{153,339}. Nous confirmons ici le potentiel de stimulation du TLR1/2 et du LTβR pour inhiber l'infection HBV et montrons que cette inhibition reste efficace lors d'une co et sur-infection HBV/HDV. Nous observons une diminution des taux d'ARN HBV intracellulaires associés à une chute de la sécrétion d'HBe et HBsAg. Cette atteinte des ARN d'HBV suggère une altération de la transcription des ARN ou de leur stabilité. Les mécanismes sous-jacents impliquent

probablement des régulations épigénétiques sur l'ADNccc ou une atteinte directe des ARN en induisant leur dégradation ou des mutations. En effet cette dernière hypothèse est envisageable étant donné qu'il a déjà été montré que l'effet anti-HBV médié par BS1 passe en partie par l'induction par APOBEC3B de déaminations sur l'ADNccc. Étant donné que les protéines de la famille des APOBECs ciblent majoritairement les ARN et que celles-ci sont déjà impliquées dans de nombreux effets antiviraux^{153,488,489}, leur implication dans ce phénotype diminuant les ARN HBV est envisageable. Des expériences de séquençage ARN d'échantillons infectés et traités ou non seront réalisés afin d'associer une signature de gènes modulés à un traitement et éventuellement identifier de potentiels effecteurs responsables de ce phénotype.

De plus cet effet anti-HBV en condition HBV/HDV reste visible à de très faibles concentrations de BS1 et Pam3CSK4 et ceci sans cytotoxicité observable comme rapporté dans l'article présenté plus haut, montrant la possible transposition *in vivo*. Il est intéressant de noter que cet effet anti-HBV est variable dans le modèle de PHH selon le donneur considéré, ce qui indiquerait que la variabilité inter-individuelle serait un facteur prépondérant lors d'une translation chez l'animal. Répéter ces expériences chez de nombreux donneurs semble essentiel afin d'établir une tendance de réponse et la dose optimale à administrer.

b. Séquençage ARN de cellules dHepaRG infectées HDV ou HBV+HDV et traitées par Pam3CSK4 ou BS1

i. Matériel et méthode

Culture cellulaire et infection HBV/HDV

Se référer à l'article présenté précédemment

Réactifs

Le Pam3CK4 (Agoniste du TLR-1/2) est vendu par InvivoGen, le PEG-IFN- α par Roche, le Riboxol (Agoniste du TLR-3) par Ribox. Le Tenofovir est fournis par Gilead Science et le BS1 (anticorps agoniste du LT β R) par l'équipe du Dr Mathias Heinkenwalder au DKFZ Institute de Heidelberg.

Extraction et contrôle des ARN pour séquençage

Les ARNm et ARNmi ont été extraits des cellules à l'aide du miRNeasy Kit sur un automate d'extraction QIAcube selon les instructions du fournisseur (Qiagen). Le contrôle qualité des ARN extraits pour séquençage ARN a été réalisé par l'équipe du Dr Mathias Heinkenwalder au DKFZ Institute de Heidelberg.

Séquençage ARN

Le séquençage des ARN a été réalisé par l'équipe du Dr Thomas Engleitner du DKFZ Institute de Heildeberg.

ii. Résultats

Les échantillons infectés HBV/HDV ou mono-infectés HDV et traités Pam3CSK4 ou BS1 envoyés au séquençage ARN présentent des phénotypes d'inhibition d'HBV et HDV

Des cellules dHepaRG HBV/HDV co-infectées ou HDV mono-infectées ont été traitées avec Pam3CSK4 à 0,1 ug/ml pendant 11 jours après établissement des infections. L'effet anti-HBV déjà documenté a été retrouvé à la fin des traitements avec une inhibition de plus de 75% des taux d'ARN HBV intracellulaires, d'HBe et HBsAg sécrétés dans les conditions traitées. L'effet anti-HDV a été également observé à l'arrêt des traitements avec une inhibition des ARN intracellulaires de 50 à 75% selon la condition considérée. A 48h post premier traitement l'effet anti-HBV de Pam3CSK4 et BS1 est plus léger avec une inhibition de 45 à 55% des taux d'ARN intracellulaires et d'HBeAg. De manière intéressante le paramètre HBsAg n'est pas encore altéré. L'effet anti-HDV induit par Pam3CSK4 et BS1 est également observé à 48h post premier traitement mais celui-ci n'est pas prononcé.

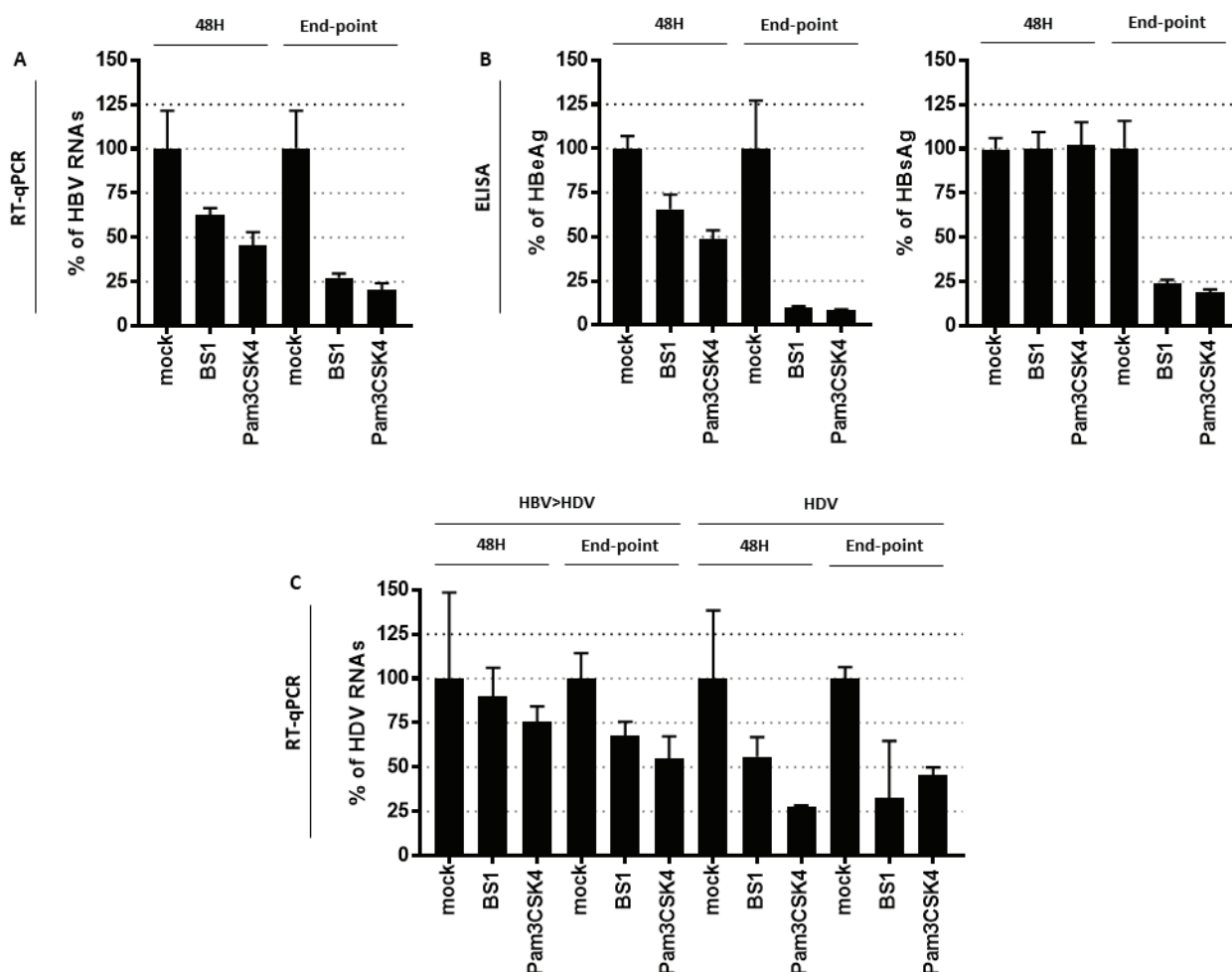


Figure 2: Pam3CSK4 et BS1 réduisent les niveaux d'ARN HBV, d'HBe et d'HBsAg à l'arrêt des traitements et partiellement à 48h post traitement. Des cellules dHepaRG ont été infectées avec HBV and puis HDV 6 jours plus tard (HBV->HDV) ou mono-infectées avec HDV (HDV) avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 3 jours après l'infection HDV avec BS1 (0,1 ug/mL) ou Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées à 48h post premier traitement et à l'arrêt des traitements et les taux d'ARN HBV totaux intracellulaires (A) et d'HBe et HBsAg (B) sécrétés ont été analysés respectivement par RTqPCR et ELISA à 48h et à l'arrêt des traitements. Les taux d'ARN HDV intracellulaires (C) ont été analysés par RTqPCR. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 1 expérience réalisée avec à trois réplicats biologiques.

Pam3CSK4 induit une forte signature NFκB, une réponse inflammatoire via les voies IL-6/TNF-α et inhibe la réponse IFN de type I dans les conditions HBV+HDV et HDV

Des cellules dHepaRG HBV/HDV co-infectées ou HDV mono-infectées ont été traitées avec Pam3CSK4 à 0,1 ug/ml pendant 11 jours après établissement des infections. Les échantillons 48h post premier traitement ont été séquencés et les signatures des grands mécanismes biologiques ont été établies en comparant la liste de gènes générée avec la base de donnée MSigDB^{490,491} dans le logiciel GSEA. Comme attendu, Pam3CSK4 induit de nombreuses voies de l'immunité. La voie la plus fortement induite est la voie NFκB avec respectivement de 74 à 61 gènes impliqués modulés significativement et un ES>2,5 selon l'infection HBV+HDV (Figure

2A) ou HDV (Figure 2B) considérée. De plus cette primo-induction induit de fortes réponses IL-6/JAK/STAT3 probablement auto ou paracrine. Un fort état inflammatoire semble être établi à travers cette dernière réponse et l'induction directe de la voie NFκB avec respectivement 44 et 39 gènes augmentés significativement. De manière intéressante, la réponse IFN déjà associée à l'infection HDV^{239,245,311} et montré comme inhibitrice du virus⁴⁹² n'est pas induite lors du traitement par Pam3CSK4. Enfin cet agoniste de TLR2 inhibe de nombreux mécanismes métaboliques tels que la

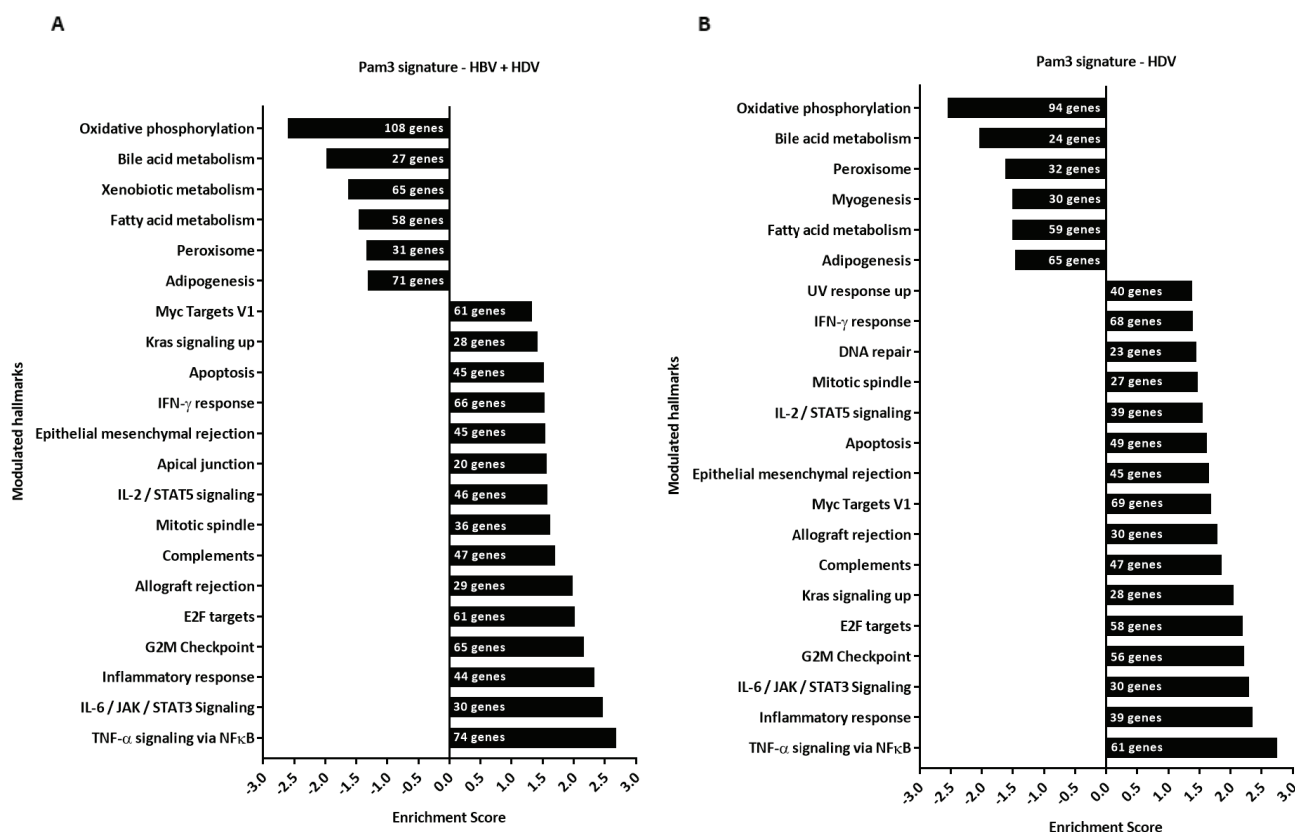


Figure 2. Voies et signatures biologiques modulées par Pam3CSK4 dans des dHepaRG HBV/HDV ou HDV infectées. (A et B) Des cellules dHepaRG ont été co-infectées avec HBV + HDV ou mono-infectées avec HDV avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 6 jours après l'infection HDV avec Pam3CSK4 (0,1 ug/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées toutes les 24h et les taux d'ARN HBV et HDV intracellulaires à 17 jours ont été analysés par RTqPCR. Après contrôle de l'effet antiviral et de la qualité des ARN, les ARN exprimés à 48h post premier traitement ont été séquencés. Les fold changes des gènes ont été calculés de manière différentielle en comparant la signature de gènes modulés par le traitement dans les conditions infectées avec la signature de gènes dans les conditions infectées non-traitées. Ceci permet de s'affranchir des gènes modulés par les virus de manière indépendante au traitement. Les gènes augmentés ou diminués avec une p-value-adj < 0,05 ont été sélectionnés. La liste de gène a été soumise au logiciel GSEA en se référant à la base de donnée MSigDB afin d'identifier les voies et signatures modulées. Les signatures sont représentées en bar-plots (FDR < 0,25). Les résultats sont la moyenne de 1 expérience réalisée avec deux réplicats biologiques.

phosphorylation oxydative, l'adipogénèse, et le métabolisme des acides biliaires et gras.

Pam3CSK4 induit fortement des mécanismes de dégradation des ARN/ADN et de régulation de la transcription dans les conditions HBV+HDV et HDV

Les gènes significativement modulés lors du traitement de cellules dHepaRG HBV+HDV ou HDV infectés par Pam3CSK4 et communs aux deux conditions (Figure 3A) ont été modélisés sur le logiciel cytoscape afin de mettre en exergue des mécanismes cellulaires pouvant être à l'origine du phénotype de diminution des ARN HDV observé *in vitro*. Une pré-analyse exploitant le logiciel GSEA référencé à la base de données fournie par Reimand J *et al.*⁴⁹³ regroupant une base de données de Gene Ontology des processus biologiques et les voies biologiques connues a permis d'identifier divers mécanismes (Figure 3B). Pam3CSK4 induit une forte réponse immunitaire et également des mécanismes du catabolisme des ARN, de réponse aux dommages de l'ADN et de régulation de la transcription. Dans le cluster des gènes associés au catabolisme des ARN, les deux premiers gènes les plus augmentés ZC3H12A et RNASEH2A avec des LogFC respectifs de 2,7 et 1,22 encodent des RNase cellulaires^{494,495}. Enfin le gène encodant la ZFP36L2, une protéine activatrice de mécanismes du catabolisme des ARNm, est également augmentée⁴⁹⁶.

Des mécanismes de régulation de la transcription sont également induits par Pam3CSK4 : la protéine MAD2L2 avec un logFC de 0,42 est capable de réguler négativement la fixation à l'ADN d'un facteur de transcription recrutant la RNAP II⁴⁹⁷ et la protéine TRIM22 avec un logFC de 0,55 est capable d'inhiber la transcription du promoteur core d'HBV⁴⁹⁸. Enfin Pam3CSK4 induit très fortement de nombreux gènes associés aux réponses aux dommages à l'ADN tels que l'enzyme Exo1 (LogFC = 3,15) encodée par le gène éponyme et qui présente une activité exonucléase⁴⁹⁹.

Du côté des mécanismes diminués par Pam3CSK4 nous retrouvons l'inhibition du métabolisme des acides gras induit par Pam3CSK4. De nombreuses fonctions métaboliques des hépatocytes sont inhibées par l'agoniste du TLR1/2. Enfin la réponse aux IFN- α/β est le seul mécanisme associé à l'immunité innée qui apparaît diminué lors du traitement par Pam3CSK4 de cellules HDV infectées. Une dernière piste alternative intéressante pour l'étude de la mécanistique est l'inhibition du métabolisme des ribonucléosides induite par Pam3CSK4.

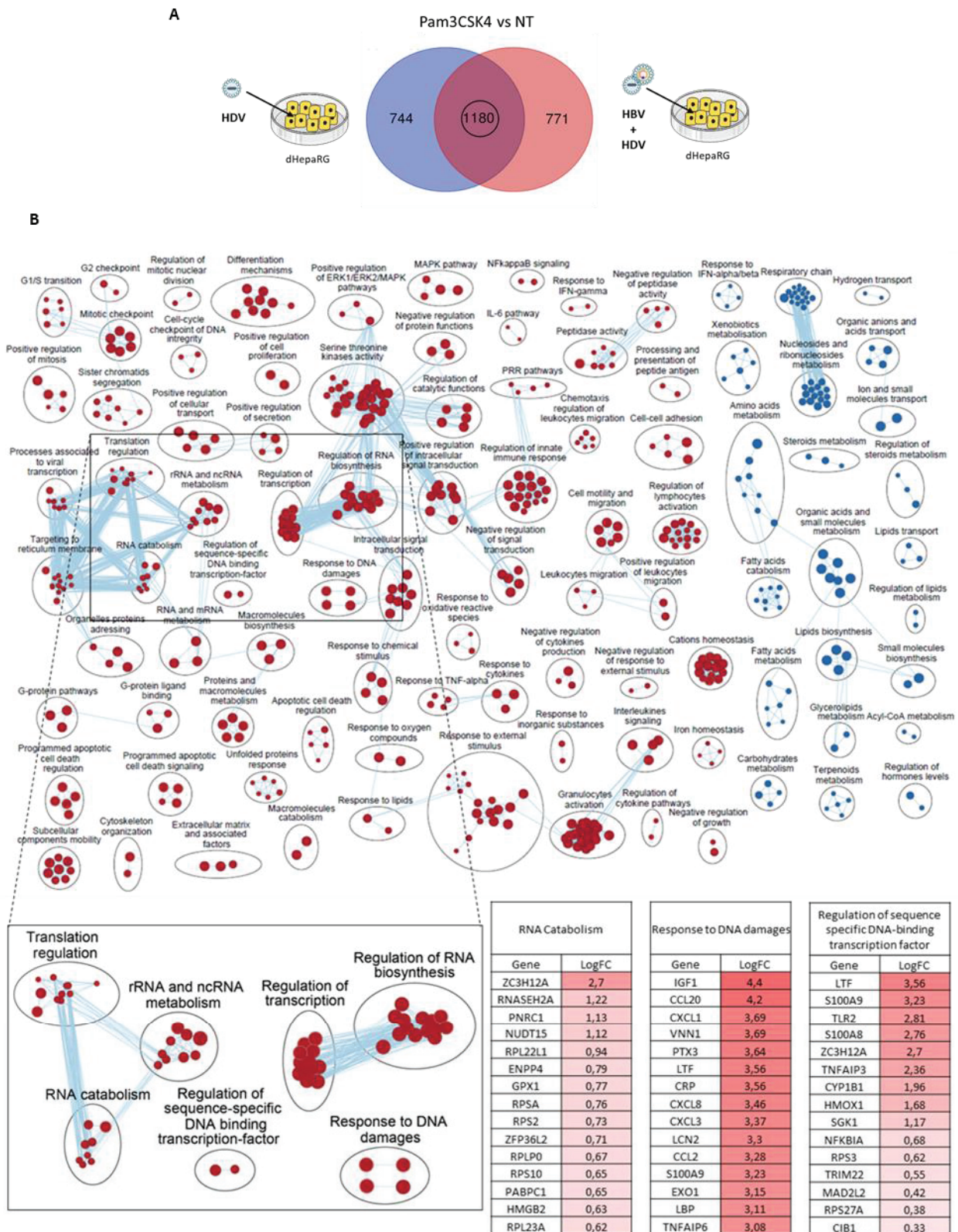


Figure 3. Voies et signatures biologiques modulées par Pam3CSK4 dans des dHepaRG HBV/HDV ou HDV infectées. (A) Des cellules dHepaRG ont été co-infectées avec HBV + HDV ou mono-infectées avec HDV avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 6 jours après l'infection HDV avec Pam3CSK4 (0,1 µg/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées toutes les 24h et les taux d'ARN HBV et HDV intracellulaires à 17 jours ont été analysés par RTqPCR. Après contrôle de l'effet antiviral de leur qualité, les ARN exprimés à 48h post premier traitement ont été séquencés. Les gènes augmentés ou diminués avec une p-value-adj < 0,05 ont été sélectionnés. La liste de gène a été soumise au logiciel GSEA en se référant à la base de donnée MSigDB afin d'identifier les voies et signatures modulées. (B) La modélisation a été réalisée avec le logiciel Cytoscape et l'application EnrichmentMap (FDR < 0,1 ; Node cut-off < 0,1 ; Edge cut-off < 0,3). Les clusters ont été générés avec l'application AutoAnnotate. Les quinze gènes les plus augmentés par Pam3CSK4 sont représentés ici dans les tableaux pour les trois clusters nous intéressant. Les résultats sont la moyenne de 1 expérience réalisée avec deux réplicats biologiques.

BS1 induit une signature NFκB variable selon le type d'infection considéré et inhibe que partiellement la réponse IFN de type I induite par HDV

Des cellules dHepaRG HBV/HDV co-infectées ou HDV mono-infectées ont été traitées avec BS1 à 0,1 ug/ml pendant 11 jours après établissement des infections. Les échantillons 48h post premier traitement ont été séquencés et les signatures des grands mécanismes biologiques ont été établies en comparant la liste de gènes générée avec la base de donnée MSigDB^{490,491} dans le logiciel GSEA. Étonnement, BS1 induit la voie NFκB de manière différentielle selon le type d'infection HDV considéré. Celle-ci est très fortement induite dans le cas de l'infection HBV+HDV (Figure 4A) avec un ES>2 et 38 gènes impliqués tandis qu'elle ne l'est que faiblement dans le cas de l'infection HDV (Figure 4B) avec un ES<1,5 et 28 gènes. Contrairement à Pam3CSK4, BS1 semble induire également une réponse IFN de type I partielle avec un ES=1,5 et respectivement 22 et 19 gènes dans le cas des infections HBV+HDV et HDV. Enfin, bien que les hépatocytes ne puissent pas générer de réponse IFN de type IIe, BS1 induit de nombreux gènes associés à une telle signature quel que soit le modèle d'infection HDV. L'inhibition du métabolisme des acides gras par Pam3CSK4 en condition HDV infectées est retrouvée ici lors du traitement par BS1 : ce profil redondant lors de l'induction de la voie NFκB devra être étudiée.

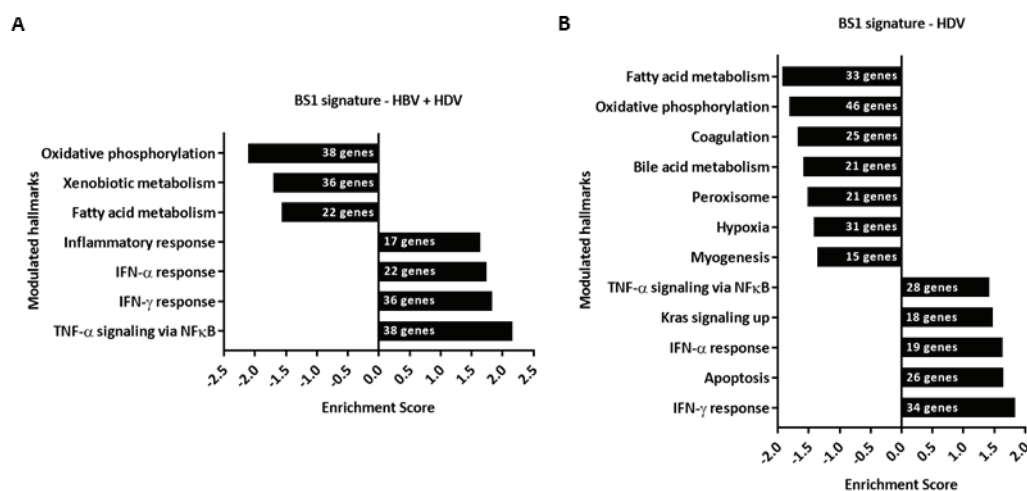


Figure 4. Voies et signatures biologiques modulées par BS1 dans des dHepaRG HBV/HDV ou HDV infectées. (A et B) Des cellules dHepaRG ont été co-infectées avec HBV + HDV ou mono-infectées avec HDV avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 6 jours après l'infection HDV avec BS1 (0,1 ug/mL pendant 11 jours). Les cellules ont été collectées toutes les 24h et les taux d'ARN HBV et HDV intracellulaires à 17 jours ont été analysés par RTqPCR. Après contrôle de l'effet antiviral et de la qualité des ARN, les ARN exprimés à 48h post premier traitement ont été séquencés. Les fold changes des gènes ont été calculés de manière différentielle en comparant la signature de gènes modulés par le traitement dans les conditions infectées avec la signature de gènes dans les conditions infectées non-traitées. Ceci permet de s'affranchir des gènes modulés par les virus de manière indépendante au traitement. Les gènes augmentés ou diminués avec une p-value-adj < 0,05 ont été sélectionnés. La liste de gène a été soumise au logiciel GSEA en se référant à la base de donnée MSigDB afin d'identifier les voies et signatures modulées. Les signatures sont représentées en bar-plots (FDR < 0,25). Les résultats sont la moyenne de 1 expérience réalisée avec deux réplicats biologiques.

Pam3CSK4 induit fortement des mécanismes de dégradation des ARN/ADN et de régulation de la transcription dans les conditions HBV+HDV et HDV.

Les gènes significativement modulés lors du traitement de cellules dHepaRG HBV+HDV ou HDV infectés par BS1 et communs aux deux conditions (Figure 5A) ont été modélisés sur cytoscape afin de mettre en exergue des mécanismes cellulaires pouvant être à l'origine du phénotype de diminution des ARN HDV observé *in vitro*. Une pré-analyse exploitant le logiciel GSEA référencé à la base de données fournie par Reimand J *et al.*⁴⁹³ regroupant une base de donnée de Gene Ontology des processus biologiques et les voies biologiques connues a permis d'identifier divers mécanismes divisés en clusters d'intérêt (Figure 5B). Tout comme Pam3CSK4, BS1 induit des facteurs cellulaires liés au catabolisme des ARN et de régulation de la transcription. Toutefois ceux-ci ne sont que faiblement induits mis à part le gène encodant la protéine NUDT10. Un cluster de gènes encodant des protéines de régulation de la transcription est également fortement induit avec quatre candidats intéressants pour leur proximité avec la voie NFκB : NFKB2, NFE2L3, RELB et JUNB. Enfin un dernier candidat atypique de par la diversité de ses activités est le gène HMGA1 qui n'est que partiellement induit.

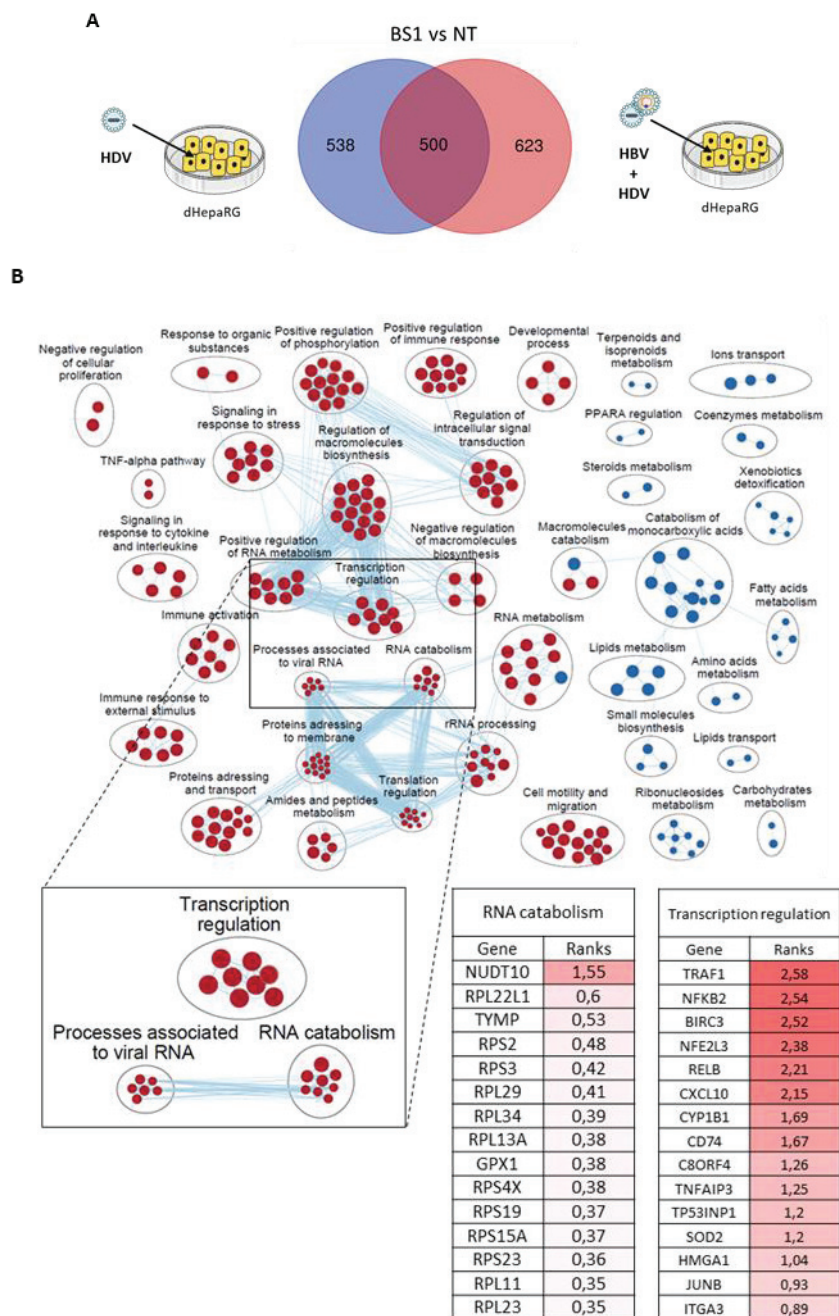


Figure 5. Voies et signatures biologiques modulées par BS1 dans des dHepaRG HBV/HDV ou HDV infectées. (A) Des cellules dHepaRG ont été co-infectées avec HBV + HDV ou mono-infectées avec HDV avec respectivement 100 et 10 particules virales/cellule pour HBV et HDV. Les cellules ont été traitées 6 jours après l'infection HDV avec BS1 (0,1 ug/mL) pendant 11 jours. Les cellules ont été collectées toutes les 24h et les taux d'ARN HBV et HDV intracellulaires à 17 jours ont été analysés par RTqPCR. Après contrôle de l'effet antiviral et de leur qualité, les ARN exprimés à 48h post premier traitement ont été séquencés. Les gènes augmentés ou diminués avec une p-value-adj < 0,05 ont été sélectionnés. La liste de gène a été soumise au logiciel GSEA en se référant à la base de donnée MSigDB afin d'identifier les voies et signatures modulées. (B) La modélisation a été réalisée avec le logiciel Cytoscape et l'application EnrichmentMap (FDR < 0,1 ; Node cut-off < 0,1 ; Edge cut-off < 0,3). Les clusters ont été générés avec l'application AutoAnnotate. Les quinze gènes les plus augmentés par BS1 sont représentés ici dans les tableaux pour les deux clusters nous intéressant. Les résultats sont la moyenne de 1 expérience réalisée avec deux réplicats biologiques.

iii. Discussion

Nous avons déjà montré que le traitement par un agoniste de TLR1/2 ou du LT β R de modèles d'hépatocytes infectés par HBV/HDV permettait de réduire les paramètres viraux d'HDV, et ainsi contrôler l'infection sur le long terme. Nous proposons ici des gènes candidats pour expliquer ces effets anti-HDV précédemment identifiés. Dans le cadre du traitement par Pam3CSK4 de dHepaRG infectées HDV, de fortes inductions de gènes signatures de la voie NF κ B et d'une réponse inflammatoire sont observées et comme montré précédemment avec Pam3CSK4 en traitement anti-HBV³³⁹ ou Pam2Cys en traitement anti-influenza³³⁸. De manière surprenante, la réponse IFN de type I déjà associée à l'infection HDV *in vitro*²³⁹ et *in vivo*³¹¹ et communément associée aux phénotypes antiviraux lors d'une infection⁵⁰⁰ n'est pas induite par l'agoniste du TLR1/2, ce qui suggère une activité anti-HDV indépendante d'une réponse IFN- α/β .

Dans le cadre de la recherche d'un effecteur cellulaire à l'origine de l'effet anti-HDV induit par Pam3CSK4 et/ou de mécanismes cellulaires responsables, plusieurs hypothèses sont proposées. Tout d'abord cet agoniste de TLR1/2 induit de nombreux gènes associés au catabolisme des ARN et notamment deux RNases en position une et deux des gènes les plus augmentés : les gènes encodant la RNASEH2A et la ZC2H12A. La RNASEH2A constitue un candidat intéressant et est associée à la dégradation des complexes ADN/ARN⁴⁹⁵. Il est possible que la nature ARNdb du génome d'HDV mimant un ADN puisse être reconnue par cette protéine. Mais de ces deux RNases, la ZC3H12A constitue l'un de nos meilleurs candidats car elle a déjà été associée *in cellulo* à une action antivirale médiée par son domaine RNase notamment dans les cas d'infections à HIV⁵⁰¹, à HCV⁵⁰², au DENV et au JEV⁵⁰³. Cette possible implication est corroborée par deux informations supplémentaires : (i) le rôle prépondérant déjà publié de ZC3H12A dans la régulation négative de la réponse IFN- β médiée par l'axe TBK1/IRF3⁵⁰⁴ ; (ii) L'augmentation d'une protéine activatrice du catabolisme des ARN nommée ZFP36L2⁴⁹⁶ partageant avec l'enzyme ZC3H12A un domaine de liaison aux extrémités 5'-UTR des ARNm^{494,496}. Un modèle tout à fait convainquant ferait alors de cette RNase l'effecteur final de la dégradation des ARN HDV et de l'inhibition de la réponse IFN de type I associée au virus par inhibition de la

voie TBK1 sollicitée⁴⁹². Une hypothèse connexe se fonde sur la très forte augmentation de gènes associés aux mécanismes de dommage à l'ADN induite par Pam3CSK4, suggérant que ce dernier soit capable d'induire ce type de modification dans les dHepaRG infectées HDV. Il est vrai que HDV est virus à ARN, toutefois sa structure d'ARN circulaire quasi double-brin lui confère la capacité de recruter la RNAP II cellulaire ADN dépendante. Il est donc envisageable cette capacité de l'ARN viral à mimer un ADN afin de détourner un mécanisme cellulaire à son profit puisse se retourner contre lui afin de le rendre sensible aux mécanismes cellulaires de dommages à l'ADN. L'enzyme Exo 1 à activité exonucléase⁴⁹⁹ dont le gène correspondant est fortement augmenté par Pam3CSK4 est un candidat intéressant pour cette hypothèse. Afin de confirmer ces deux hypothèses, des expériences d'inactivation par CRISPR/Cas des effecteurs identifiés associé à un suivi de la demi-vie des ARN d'HDV devront être réalisées. De même dans les conditions déjà utilisées, une inhibition de la transcription par traitement à l'actinomycine D permettra d'observer une possible accélération de la dégradation des ARN d'HDV lors des traitements.

Enfin une troisième hypothèse envisageable mais plus improbable est une régulation de l'activité transcriptionnelle du génome et de l'antigénome d'HDV. En effet il a déjà été montré que cette activité pouvait être influencée par l'interaction entre la S-HDAg et le facteur de transcription YY1 ou le complexe CBP/p300²⁴³. Nous avons montré dans notre modélisation que de nombreux gènes de régulation de la transcription sont induits par Pam3CSK4 dont notamment les gènes encodant les protéines MAD2L2 et TRIM22. Le premier a déjà été associé à des mécanismes d'inhibition de l'interaction ADN/facteur de transcription recrutant la RNAP II⁴⁹⁷ et le second est un ISG largement connu pour son activité antivirale⁵⁰⁵ et déjà associé à des mécanismes d'inhibition du promoteur core d'HBV⁴⁹⁸. Afin de tester cette hypothèse des expériences d'ARN immunoprécipitation seront réalisées afin de visualiser une possible fixation de ces facteurs de transcription sur l'ARN HDV. Des expériences de Run-on par marquage des ARN néo-transcrits puis analyse de ces populations d'ARN nous permettront de voir si Pam3CSK4 altère la transcription des ARN d'HDV.

En nous penchant sur les signatures de mécanismes cellulaires induits par BS1 nous avons confirmé des données déjà publiées associant l'activation du LTβR dans

un modèle d'hépatocytes par un agoniste en l'occurrence BS1 à une induction de la voie NFκB^{153,439}. Cette réponse est différente de celle induite par Pam3CSK4 car associée à une réponse IFN de type I déjà documentée et associée à un effet anti-CMV⁴³⁷. Mais HDV semble être un virus tolérogène pour ce type de réponse IFN^{239,311}, il est donc selon nous peu probable que celle-ci soit associée à l'effet anti-HDV observé dans notre modèle. Enfin bien que les hépatocytes soient incapables d'induire une réponse IFN de type II, BS1 active la transcription de nombreux gènes signatures d'une telle réponse, confirmant des résultats obtenus lors de la stimulation du LTβR comme approche anti-cancéreuse⁵⁰⁶ et encourageant la pertinence de BS1 comme traitement applicable en modèle *in vivo*. En effet ce ligand serait alors à même d'induire une réponse IFN de type II dans les cellules immunitaires *ad hoc* afin de potentialiser l'effet anti-HDV direct sur les hépatocytes.

Dans le cas du traitement par BS1, la liste de candidats effecteurs responsables de l'effet anti-HDV est plus succincte, ce qui est probablement imputable au temps court post-traitement (48h). Contrairement à Pam3CSK4, l'hypothèse d'un catabolisme induit des ARN viraux ne semble pas prépondérante. En effet les gènes associés à un tel mécanisme ne sont pas fortement augmentés mis à part le gène encodant l'enzyme NUDT10 impliquée dans le catabolisme de l'adénosine multi-phosphatée en ADP⁵⁰⁷ et déjà montrée comme exprimée dans le foie⁵⁰⁸. Toutefois les membres de la famille de protéines à laquelle NUDT10 appartient sont impliqués majoritairement dans l'hydrolyse des liaisons phospho-esters retrouvées par exemple entre les nucléotides et nucléosides et présentent pour certains d'entre eux une activité de retrait d'un complexe de coiffe atypique des ARNm⁵⁰⁹. Il est tout à fait envisageable que l'enzyme NUDT10 soit responsable d'un retrait de la coiffe des ARNm d'HDV dont la nature n'a jamais été étudiée. Un effet anti-HDV dirigé contre ces coiffes alternatives permettrait également d'expliquer les très faibles effets cytotoxiques observés. Cette théorie sera facilement validée par des expériences d'inactivation de NUDT10 par CRISPR/Cas.

Dans le cas de cet agoniste du LTβR c'est l'hypothèse d'une régulation de la transcription du génome d'HDV qui prédomine. En effet BS1 semble induire fortement de nombreux mécanismes de régulation de la transcription dont les gènes encodant NFκB2, NE2L3, RELB et JUNB, quatre facteurs de transcriptions induits par la voie

NFκB et déjà montrés comme induits par BS1 dans des dHepaRG infectés par HBV¹⁵³. De plus les facteurs de RELB et JUNB ont déjà présenté des activités de répresseurs de la transcription médiée par la RNAP II^{510,511}, polymérase détournée par HDV pour sa réplication. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante qu'il a déjà été montré que les facteurs de transcription de NFκB étaient capables de fixer des aptamères⁵¹², séquences d'oligonucléotides pouvant adopter une structure tridimensionnelle et une activité catalytique, par exemple un ribozyme⁵¹³. Une hypothèse serait donc une régulation transcriptionnelle négative du génome et de l'anti-génome d'HDV par fixation de facteurs de transcription NFκB directement sur le ribozyme viral. Celle-ci sera contrôlée par des expériences d'ARN-immunoprécipitation afin de potentiellement identifier ces facteurs fixés aux ARN d'HDV. Tout comme pour Pam3CSK4, des analyses de Run-on permettront d'étudier la possible altération de la transcription par BS1.

Enfin un dernier candidat potentiel et atypique à l'origine de cet effet anti-HDV de l'agoniste du LTβR est le gène HMGA1 induit par ce dernier. La protéine correspondante appartient à la famille des High Mobility Group (HMG). Ce sont des protéines non-histones impliquées dans la reconnaissance des dommages à l'ADN et notamment dans le cas du sous-groupe des HMGA dans la reconnaissance des structures d'ADN AT riches endommagées afin de remodeler la chromatine et les nucléosomes associés ou d'exercer une activité endonucléase de réparation de sites apuriniques ou apyrimidiques⁵¹⁴. Bien qu'il s'agisse ici d'une protéine reconnaissant les ADN, il est tout à fait envisageable que, comme présenté précédemment, l'ARN HDV mimant un ADNdb soit la cible de mécanismes de dommages à l'ADN induits par la voie NFκB. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que Lucifora J *et al.* ont déjà montré que BS1 induisait via cette voie immunitaire la protéine APOBEC3B responsable de modifications A>I dans le génome d'HBV¹⁵³. Mais les multiples activités de HMGA1 seraient également à l'origine d'une régulation transcriptionnelle du génome d'HDV en régulant sa compaction. En effet Samarakoon N *et al.* ont montré que la L-HDAg mime une région de l'histone H3 afin de remodeler la ribonucléoprotéine (Samarakoon N *et al.*, Abstract HBV Meeting 2017). Il est envisageable alors que HMGA1 altère cette capacité de remodelage et *in fine* module indirectement la structure tridimensionnelle du génome d'HDV et donc son relâchement permettant l'accès à la RNAP II.

A plus long terme les données de ce séquençage ARN seront exploitées pour étudier finement les voies NFκB induites par chacun des deux ligands. De plus dans le cas du BS1 ces données permettront de déterminer dans quelle proportion cet effet anti-HDV passe par la voie canonique ou non-canonique de NFκB. L'analyse des cytokines induites permettra également de prédire en partie la réponse immunitaire induite par ces inductions au niveau systémique et éventuellement les conséquences sur les cellules immunitaires circulantes.

4. Perspectives

a. Application *in vivo*

La suite logique de la caractérisation de ce phénotype anti-HDV *in cellulo* est l'observation de cet effet induit par Pam3CSK4 et BS1 dans un modèle *in vivo*. Dans l'objectif de tester ces deux inducteurs de la voie NFκB en modèle de souris, le modèle sélectionné sera un modèle souris à foie et système humanisé comme celui développé actuellement par Hélène Strick-Marchand et déjà montré comme susceptible à l'infection par HBV³¹³. Toutefois la capacité d'HDV à infecter ce modèle devra tout d'abord être démontrée. Par la suite l'objectif sera de pouvoir fonctionnellement infecter les hépatocytes greffés avec HBV et HDV, mais également de reproduire les phénomènes immunitaires déjà reliés au virus comme la réponse IFN de type I³¹¹ médiée par le récepteur MDA5⁴⁹² et parvenir à réactiver l'immunité à l'aide Pam3CSK4 et BS1. Cette dernière information est d'autant plus intéressante que : (i) lors de notre analyse transcriptomique la réponse IFN de type I est apparue comme inhibée par Pam3CSK4 ; (ii) l'enzyme ZC3H12A fortement augmentée par cet agoniste est connue pour réprimer la voie TBK1/IKKε essentielle à l'induction d'une réponse IFN de type I médiée par MDA5⁵⁰⁴.

i. Toxicité

L'étude de la toxicité de ces molécules sera une priorité. En effet la bonne tolérance des anticorps thérapeutiques chez les patients est principalement liée au fait qu'il s'agit d'anticorps détruisant la tumeur via le mécanisme d'Antibody-dependent

cell-mediated cytotoxicity sans activer l'immunité. Dans le cas de BS1, anticorps monoclonal, ou Pam3CSK4, petite molécule, l'induction de l'immunité générera très probablement une fenêtre thérapeutique étroite qu'il faudra déterminer avant toute étude plus poussée. Toutefois les études déjà réalisées exploitant CBE11 comme traitement anti-tumoral en souris suggèrent que l'activation du $LT\beta R$ n'induit que très peu ce mécanisme⁴³⁸. La capacité de carcinogénèse à long terme devra également être caractérisée bien que sur ce sujet des informations contraires existent^{438,515}. Le séquençage ARN sera exploité afin d'étudier les mécanismes de détoxification induits ou inhibés afin d'anticiper la pharmacocinétique et le devenir de chacun des molécules chez la souris. Pour Pam3CSK4 des mécanismes de catabolisme des lipopeptides seront recherchés. Concernant BS1 nous nous concentrerons préférentiellement sur les mécanismes d'endocytose et de protéolyse des lysosomes, mécanismes majoritairement impliqués dans la dégradation des anticorps⁵¹⁶ et sur sa fixation au récepteur Fc néonatal dans les tissus humanisés. En effet ce récepteur est responsable en très grande partie de l'augmentation de la demi-vie des anticorps monoclonaux thérapeutiques⁵¹⁷ et est notamment inductible par le $TNF-\alpha$ ⁵¹⁸. Il est donc envisageable que l'induction d'une réponse pro-inflammatoire par BS1 et la production de cytokines associées augmente indirectement la demi-vie et donc l'effet de ce dernier.

ii. Distribution, métabolisme et élimination

Dans le cas de la biodistribution et de la demi-vie les résultats seront très probablement différents selon l'agoniste considéré. Les anticorps thérapeutiques présentent généralement une demi-vie longue (1 à 30 jours) et diffusent très peu dans les tissus avec un volume de distribution très faible (3 à 8L équivalents aux espaces vasculaires et intersticiels). Au contraire les petites molécules nécessitent des prises répétées⁵¹⁹ et diffusent très largement. Des expériences d'imagerie en temps réel après traitement par Pam3CSK4 taggué rhodamine ou par BS1 radiomarqué iode 131 permettront d'évaluer l'excrétion dans les urines, l'accumulation dans le foie, la vitesse de distribution et la demi-vie dans un organisme sans sacrifice des animaux.

iii. Approche expérimentale

La toxicité de ces deux agonistes sera évaluée par un seul traitement avec des concentrations d'agonistes croissantes pour déterminer les doses-létales 50 et 90-1 traitement. L'objectif sera de déterminer la dose maximale sans effet nocif observable (DSENO-1 traitement). Chez l'ensemble des individus la toxicité sera évaluée par :

- (i) pesée et apparition de rash cutanés ;
- (ii) dénombrement des populations de lymphocytes T CD4, de monocytes et de macrophages dans des prélèvements sanguins ;
- (iii) profil cytokinique de la réponse pro-inflammatoire (Pour cela, un panel des cytokines à évaluer sera généré à partir des cytokines induites dans l'analyse transcriptomique) ;
- (iv) Analyse histologique du foie des souris décédées pour étudier l'atteinte hépatique induite par les traitements aux plus hautes doses ;
- (v) Analyses immunohistochimiques pour évaluer l'infiltration hépatique des cellules immunitaires induite ;

Le second objectif sera de traiter les souris infectées HBV/HDV avec des doses croissantes d'agonistes plafonnées à la DSENO-1 traitement afin de déterminer la relation dose-effet et donc les doses d'effet (DE)50 et 90-1 traitement. L'effet anti-HDV sera déterminé en évaluant l'effet anti-HDV par mesure de la charge virale sanguine et de la réplication hépatique. Les tests de cytotoxicité non-invasifs présentés plus haut seront à nouveau réalisés pour vérifier aucun abaissement de la DSENO-1 traitement lors des infections. Dans cette éventualité l'expérience sera répétée en augmentant le nombre d'administrations pour calculer les DSENO et DE90 correspondant à chaque schéma thérapeutique. La DE90 < DSENO nécessitant le moins d'administrations sera retenue pour les expériences suivantes.

Dans un troisième temps l'objectif sera de vérifier *in vivo* la persistance de l'effet anti-HDV constaté *in cellulo*. Suivant le même schéma d'infection et de traitement déterminé précédemment, l'effet anti-HDV sera contrôlé à la fin du traitement puis suivi une fois par semaine pendant trois mois. Dans l'éventualité où aucun rebond des paramètres d'HDV est observé, des anticorps anti-HDV et HBV seront recherchés.

L'impact de la bi-thérapie en association avec le PEG-IFN- α ou le MyrB sera par la suite estimé. Si l'addition des inducteurs NF κ B améliore l'effet anti-HDV du PEG-IFN- α la persistance de l'effet antiviral après l'arrêt du traitement sera étudiée. En effet il est connu que le PEG-IFN- α est peu efficace chez les patients HDV positifs et de plus les patients répondeurs présentent un fort taux de rechute après l'arrêt du traitement. Empêcher ce phénomène à l'aide d'une bi-thérapie PEG-IFN- α / inducteur de la voie NF κ B serait donc intéressant.

b. Conséquences des traitements sur les cellules de l'immunité innée et adaptative

i. HDV, inducteurs de la voie NF κ B et cellules présentatrices d'antigènes

Se restreindre aux hépatocytes dans l'étude de ligands activant l'immunité innée serait une erreur. En effet les récepteurs reconnus par ces ligands sont présents à la surface de nombreux types cellulaires, ajoutant un niveau de complexité pour chaque type cellulaire stimulé. Arriver à rétablir une immunité anti-HDV au niveau systémique sans pour autant emballer cette dernière est donc l'objectif final de nos traitements immunomodulateurs. Le foie présente la particularité de posséder ses propres CpAg que sont les cellules de Kupffer. Combinées aux monocytes, ces deux populations cellulaires sont des CpAg essentielles à la transition vers l'immunité adaptative⁵²⁰ dont la fonction peut être stimulée avec des immunomodulateurs⁵²¹.

L'interaction entre HBV et ces CpAg est largement documenté⁵²⁰. Il a été montré que la reconnaissance d'HBV par les cellules de Kupffer induit une sécrétion d'IL-18 et la stimulation des cellules NK⁵²². Au contraire lors d'une infection chronique ces macrophages résidents du foie vont installer une réponse immunotolérante par sécrétion d'IL-10, TGF- β et PD-L1 afin d'inhiber la réponse lymphocyte T⁵²³. Bien que l'impact d'HDV sur ces populations cellulaires n'ai pour l'instant jamais été étudié il semble que l'infection à HDV induise un phénotype similaire avec une induction de lymphocytes Th2 sécréteurs d'IL-10 anti-inflammatoire²³⁸ et une réponse NK inefficace²³⁷. De plus il a été montré que chez les patients HBeAg positif, l'expression

du TLR2 à la surface des hépatocytes, cellules de Kupffer et monocytes est altérée. Cette modification empêche *de facto* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α ⁵²⁴. Ce phénotype de patients HBeAg positifs a également été associé à une prolifération des M-MDSC inhibant la réponse lymphocyte T CD4⁺ Th1 et CD8⁺⁵²⁵. Au vu de la diminution des taux d'HBeAg *in vitro* résultant du traitement par nos inducteurs de la voie NF κ B, il serait intéressant d'étudier les conséquences de la possible réactivation de la réponse pro-inflammatoire de ces cCpAg sur l'infection à HDV.

Notre hypothèse est la suivante : la réversion du phénotype HBeAg induite par Pam3CSK4 et BS1, couplée à leur stimulation directe des CpAg et indirecte via la réponse immunitaire systémique induite permettrait de rétablir l'activité de présentation antigénique et un état antiviral des cellules de Kupffer et des monocytes. Pour cela nous proposons d'étudier l'impact des agonistes de NF κ B sur ces deux types cellulaires extraits de prélèvements de patients sains et préalablement rendus immunotolérants par exposition à HBV et HDV⁵²⁰. La réponse cytokinique induite sera étudiée et comparée à la signature des inducteurs de NF κ B issue l'analyse transcriptomique réalisée dans des hépatocytes afin de déterminer si le traitement par Pam3CSK4 ou BS1 parvient à inverser le phénotype anti-inflammatoire induit par HBV et HDV. La polarisation des monocytes en macrophages pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires sera également documentée par recherche d'expression respective des IRF5/iNOS/STAT et CD163/IRF4. A plus long terme, l'impact indirect des cytokines produites par des hépatocytes infectés et traités par Pam3CSK4 ou BS1 sera étudié. Pour cela nous prélèverons le surnageant de ces cellules pour traiter des cellules de Kupffer ou des monocytes préalablement rendus immunotolérants à HBV et HDV. Les échantillons générés lors de la caractérisation du phénotype anti-HDV des inducteurs de NF κ B *in vivo* permettront de valider ou invalider ces observations *in cellulo*.

ii. HDV, inducteurs de la voie NF κ B et réponse lymphocyte T CD4⁺

De plus, bien que les hépatocytes ne puissent induire de réponse IFN de type II, une telle signature a été associée au traitement par Pam3CSK4 lors de l'analyse du

séquençage ARN. Caractéristique de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ Th1, CD8⁺ et NK, une sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 par les lymphocytes T consécutivement à la reconnaissance d'un Ag a déjà été montrée chez les patients infectés par HDV²³⁴. Dix en plus tard deux nouvelles études ont confirmé cette activation des lymphocytes T avec l'observation de CMH-II spécifiques de l'HDAg et d'une réponse lymphocyte T CD4⁺ spécifique chez des patients contrôlant l'infection à HDV²³⁶. Ces deux observations montrent qu'il est tout à fait envisageable d'induire une réponse adaptative productive et spécifiquement dirigée contre HDV chez le patient. Toutefois au vu des phénotypes d'infections chroniques d'HDV observés, cette réponse adaptative ne parvient que rarement à être suffisante pour contrecarrer le virus.

Notre hypothèse est qu'au-delà d'avoir un effet anti-HDV direct intra-hépatocytaire, la réponse immunitaire systémique induite par Pam3CSK4 et BS1 serait capable d'activer *in fine* une réponse IFN- γ antivirale lymphocytaire d'un côté et une réponse immunitaire adaptative dirigée contre HDV de l'autre. Pour cela nous proposons tout d'abord d'étudier la capacité de cellules dendritiques à activer des lymphocytes T CD4⁺ Th1 par co-culture de ces cellules extraites d'échantillons sanguins de patients après exposition ou non au virus et traitement ou non par Pam3CSK4. La sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 servira de marqueur de l'activation. Dans l'éventualité où cet agoniste de TLR1/2 parviendrait à réactiver les lymphocytes T CD4⁺ Th1, nous étudierons la capacité de ces derniers à induire une réponse lymphocyte B HDV spécifique. Le schéma expérimental sera alors répété en présence de lymphocytes B immatures extraits des mêmes prélèvements et la production d'Ac anti HDAg sera recherchée.

c. Optimisation de Pam3CSK4 et BS1

Une optimisation de ces traitements devra également être envisagée. En effet les effets systémiques des immunomodulateurs sont connus pour leur induction de nombreux effets indésirables. Le challenge sera donc de cibler spécifiquement les hépatocytes afin de prévenir l'activation de TLR1/2 ou LT β R présents sur d'autres types cellulaires.

i. Optimisation de BS1

Pour s'affranchir de cette problématique, des anticorps bi-spécifiques^{526,527} ciblant à la fois le récepteur NTCP avec une forte affinité, et le LT β R avec une faible affinité permettraient d'éviter des fixations non-voulues et donc de possibles effets indésirables. L'affinité plus faible pour le LT β R serait alors contrebalancée par une plus forte avidité (imputable à la double fixation au récepteur NTCP et au LT β R). Le ratio entre ces deux récepteurs devra alors être étudié.

ii. Optimisation de Pam3CSK4

Quant à Pam3CSK4, en plus d'éviter sa fixation indésirable sur le TLR1/2 d'autres types cellulaires, l'un des plus grands challenges sera d'optimiser sa demi-vie probablement faible due à sa petite taille. Une solution répondant à ces deux problématiques serait de formuler ce ligand dans des nanoparticules afin de le protéger de la dégradation et de permettre une meilleure solubilisation dans le sang. Afin d'améliorer la spécificité aux hépatocytes, le coating des nanoparticules avec un peptide pré-S1 permettrait de cibler les cellules NTCP positives. La nanoparticule alors fixée aux hépatocytes libérerait au cours du temps le Pam3CSK4, permettant une meilleure spécificité et un allongement de la durée de vie. De plus, l'utilisation du MyrB dont la faculté à inhiber l'entrée d'HBV a déjà été largement démontrée²⁸⁸ permettrait un modèle de bi-thérapie anti-HBV tout à fait novateur. Une alternative à cette formulation en nanoparticule serait sa fixation à un groupement PEG permettant d'augmenter sa demi-vie. Ainsi le Pam3CSK4 PEGylé a déjà été testé avec succès pour la stimulation des lignées macrophagiques THP-1⁵²⁸.

iii. Approche expérimentale

Quelle que soit l'alternative sélectionné, l'ensemble des expériences de caractérisation du phénotype réalisé précédemment *in vitro* devront être réalisées en comparaison avec le ligand seul, incluant les expériences de rebond, dose-réponse et cytotoxicité. Dans un second temps il sera intéressant de déterminer si l'amélioration obtenue est imputable à une stimulation plus prolongée ou plus élevée du récepteur

associé. Pour cela la cinétique et la force d'induction de la voie NF κ B et la cinétique anti-HDV seront évaluées. Un marquage Pam3CSK4 rhodamine et BS1 iode 131 permettront d'évaluer une possible augmentation de la demi-vie des agonistes du TLR1/2 et du LT β R à la surface des hépatocytes.

Une fois ce phénotype anti-HDV à nouveau caractérisé, l'amélioration de ces formulations sur l'effet anti-HDV sera estimé *in vivo* en comparaison avec le ligand seul et suivant le schéma d'étude présenté au début de ces perspectives. Une augmentation de la demi-vie sera attendue, permettant éventuellement d'espacer les doses ou de diminuer le nombre de prises. La toxicité devrait également être moindre, permettant d'envisager des doses plus fortes ou plus rapprochées pour diminuer la durée du traitement des souris. Dans le cas du Pam3CSK4 formulé en nanoparticules il sera intéressant de rechercher l'apparition d'anticorps anti-HBsAg générés par le peptide pré-S1 immunogène.

BIBLIOGRAPHIE

1. Trepo, C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int.* **34 Suppl 1**, 29–37 (2014).
2. Seeff, L. B. *et al.* A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *N. Engl. J. Med.* **316**, 965–970 (1987).
3. Homologous Serum Hepatitis. *The Lancet* **250**, 691–692 (1947).
4. Havens, W. P. Period of infectivity of patients with homologous serum jaundice and routes of infection in this disease. *J. Exp. Med.* **83**, 441–447 (1946).
5. Neefe, J. R. & Stokes, J. Studies on the relationship of the hepatitis virus to persistent symptoms, disability, and hepatic disturbance (chronic hepatitis syndrome) following acute infectious hepatitis. *J. Clin. Invest.* **26**, 329–338 (1947).
6. Krugman, S., Giles, J. P. & Hammond, J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* **200**, 365–373 (1967).
7. Murray, R., Diefenbach, W. C., Ratner, F., Leone, N. C. & Oliphant, J. W. Carriers of hepatitis virus in the blood and viral hepatitis in whole blood recipients. II. Confirmation of carrier state by transmission experiments in volunteers. *J Am Med Assoc* **154**, 1072–1074 (1954).
8. Allison, A. C. & Blumberg, B. S. An isoprecipitation reaction distinguishing human serum-protein types. *Lancet* **1**, 634–637 (1961).
9. Blumberg, B. S., Alter, H. J., Riddell, N. M. & Erlandson, M. MULTIPLE ANTIGENIC SPECIFICITIES OF SERUM LIPOPROTEINS DETECTED WITH SERA OF TRANSFUSED PATIENTS. *Vox Sang.* **9**, 128–145 (1964).
10. Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visnich, S. A 'NEW' ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA* **191**, 541–546 (1965).
11. Alter, H. J. & Blumberg, B. S. Further studies on a 'new' human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood* **27**, 297–309 (1966).
12. Blumberg, B. S., Sutnick, A. I. & London, W. T. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull N Y Acad Med* **44**, 1566–1586 (1968).
13. London, W. T., Sutnick, A. I. & Blumberg, B. S. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann. Intern. Med.* **70**, 55–59 (1969).
14. Okochi, K. & Murakami, S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* **15**, 374–385 (1968).
15. Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**, 695–698 (1970).
16. Huang, S. N. *et al.* Virus-like particles in Australia antigen-associated hepatitis. An immunoelectron microscopic study of human liver. *Am. J. Pathol.* **67**, 453–470 (1972).
17. Barker, L. F. *et al.* Hepatitis B virus infection in chimpanzees: titration of subtypes. *J. Infect. Dis.* **132**, 451–458 (1975).

18. Rizzetto, M. *et al.* Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18**, 997–1003 (1977).
19. Rizzetto, M. *et al.* Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **141**, 590–602 (1980).
20. Rizzetto, M. *et al.* delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6124–6128 (1980).
21. Andrade, Z. A. *et al.* Fulminant hepatitis with microvesicular steatosis (a histologic comparison of cases occurring in Brazil--Labrea hepatitis--and in central Africa--Bangui hepatitis). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **25**, 155–160 (1992).
22. Schaefer, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* **13**, 14–21 (2007).
23. Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol.* **20**, 5427–5434 (2014).
24. Kramvis, A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* **57**, 141–150 (2014).
25. Landers, T. A., Greenberg, H. B. & Robinson, W. S. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* **23**, 368–376 (1977).
26. Simmonds, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J. Gen. Virol.* **82**, 693–712 (2001).
27. Tagawa, M., Omata, M. & Okuda, K. Appearance of viral RNA transcripts in the early stage of duck hepatitis B virus infection. *Virology* **152**, 477–482 (1986).
28. Lee, G. H., Wasser, S. & Lim, S. G. Hepatitis B pregenomic RNA splicing--the products, the regulatory mechanisms and its biological significance. *Virus Res.* **136**, 1–7 (2008).
29. Terré, S., Petit, M. A. & Bréchet, C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J. Virol.* **65**, 5539–5543 (1991).
30. Soussan, P. *et al.* The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J. Hepatol.* **38**, 343–348 (2003).
31. Chen, W.-N. *et al.* Interaction of the hepatitis B spliced protein with cathepsin B promotes hepatoma cell migration and invasion. *J. Virol.* **86**, 13533–13541 (2012).
32. Pol, J. G. *et al.* Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF- α -stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation. *FASEB J.* **29**, 1879–1889 (2015).
33. Heermann, K. H. *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* **52**, 396–402 (1984).
34. Eble, B. E., MacRae, D. R., Lingappa, V. R. & Ganem, D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3591–3601 (1987).

35. Pontisso, P. *et al.* Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology* **173**, 522–530 (1989).
36. Bock, C. T., Kubicka, S., Manns, M. P. & Trautwein, C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* **29**, 1236–1247 (1999).
37. Löffler-Mary, H., Werr, M. & Prange, R. Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* **235**, 144–152 (1997).
38. Bruss, V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* **71**, 9350–9357 (1997).
39. Sobotta, D. *et al.* Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *J. Gen. Virol.* **81**, 369–378 (2000).
40. Kuroki, K., Floreani, M., Mimms, L. T. & Ganem, D. Epitope mapping of the PreS1 domain of the hepatitis B virus large surface protein. *Virology* **176**, 620–624 (1990).
41. Ferrari, C. *et al.* Autopresentation of hepatitis B virus envelope antigens by T cells. *J. Virol.* **66**, 2536–2540 (1992).
42. Schödel, F., Milich, D. R. & Will, H. Hepatitis B virus nucleocapsid/pre-S2 fusion proteins expressed in attenuated Salmonella for oral vaccination. *J. Immunol.* **145**, 4317–4321 (1990).
43. Wounderlich, G. & Bruss, V. Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch. Virol.* **141**, 1191–1205 (1996).
44. Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Williams, R. W. & Steven, A. C. Hepatitis core antigen produced in Escherichia coli: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* **34**, 4919–4932 (1995).
45. Wynne, S. A., Crowther, R. A. & Leslie, A. G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* **3**, 771–780 (1999).
46. Nassal, M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* **66**, 4107–4116 (1992).
47. Chu, T.-H., Liou, A.-T., Su, P.-Y., Wu, H.-N. & Shih, C. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* **88**, 2530–2543 (2014).
48. Yeh, C. T., Liaw, Y. F. & Ou, J. H. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.* **64**, 6141–6147 (1990).
49. Pollicino, T. *et al.* Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* **130**, 823–837 (2006).
50. Belloni, L. *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19975–19979 (2009).

51. Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Zhao, J.-R., Zhang, J. & Yan, Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* **6**, 720–726 (2011).
52. Rabe, B. *et al.* Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.* **5**, e1000563 (2009).
53. Ou, J. H., Laub, O. & Rutter, W. J. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1578–1582 (1986).
54. Ganem, D., Pollack, J. R. & Tavis, J. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis* **3**, 85–93 (1994).
55. Lupberger, J., Schaedler, S., Peiran, A. & Hildt, E. Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis B virus polymerase. *World J. Gastroenterol.* **19**, 8000–8010 (2013).
56. Nassal, M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* **134**, 235–249 (2008).
57. Fallot, G., Neuveut, C. & Buendia, M.-A. Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer. *Curr Opin Virol* **2**, 467–473 (2012).
58. Tian, Y., Yang, W., Song, J., Wu, Y. & Ni, B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2810–2816 (2013).
59. Gao, F., Sun, X., Wang, L., Tang, S. & Yan, C. Downregulation of MicroRNA-145 Caused by Hepatitis B Virus X Protein Promotes Expression of CUL5 and Contributes to Pathogenesis of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **37**, 1547–1559 (2015).
60. Huang, J. *et al.* HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **6**, 33791–33804 (2015).
61. Kong, F. *et al.* The enhanced expression of death receptor 5 (DR5) mediated by HBV X protein through NF-kappaB pathway is associated with cell apoptosis induced by (TNF- α related apoptosis inducing ligand) TRAIL in hepatoma cells. *Virol. J.* **12**, 192 (2015).
62. Hong, Y., Zhou, L., Xie, H. & Zheng, S. Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 719–725 (2015).
63. Qadri, I., Fatima, K. & AbdeL-Hafiz, H. Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. *BMC Microbiol.* **11**, 48 (2011).
64. Rivière, L. *et al.* HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J. Hepatol.* **63**, 1093–1102 (2015).

65. Niu, C. *et al.* The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. *PLoS ONE* **12**, e0169648 (2017).
66. Seitz, S., Urban, S., Antoni, C. & Böttcher, B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J.* **26**, 4160–4167 (2007).
67. Hu, J. & Seeger, C. Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, a021386 (2015).
68. Gerelsaikhan, T., Tavis, J. E. & Bruss, V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J. Virol.* **70**, 4269–4274 (1996).
69. Dryden, K. A. *et al.* Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell* **22**, 843–850 (2006).
70. Blumberg, B. S. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* **197**, 17–25 (1977).
71. Schädler, S. & Hildt, E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* **1**, 185–209 (2009).
72. Ganem, D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **168**, 61–83 (1991).
73. Blumberg, B. S. Hepatitis B virus and the control of hepatocellular carcinoma. *IARC Sci. Publ.* 243–261 (1984).
74. Sakamoto, Y. *et al.* Full and empty particles of hepatitis B virus in hepatocytes from patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lab. Invest.* **48**, 678–682 (1983).
75. Jansen, L. *et al.* Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in Plasma and Is Associated With a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues. *J. Infect. Dis.* **213**, 224–232 (2016).
76. Schulze, A., Gripon, P. & Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**, 1759–1768 (2007).
77. Sureau, C. & Salisse, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* **57**, 985–994 (2013).
78. Verrier, E. R. *et al.* A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* **63**, 35–48 (2016).
79. Iwamoto, M. *et al.* Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 8487–8492 (2019).
80. Ni, Y. *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**, 1070–1083 (2014).

81. Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* **87**, 659–797 (2007).
82. Taylor, J. M. & Han, Z. Purinergic receptor functionality is necessary for infection of human hepatocytes by hepatitis delta virus and hepatitis B virus. *PLoS ONE* **5**, e15784 (2010).
83. Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H. & Helenius, A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **145**, 45–55 (1999).
84. Guo, H. *et al.* Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J. Virol.* **81**, 12472–12484 (2007).
85. Nassal, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* **64**, 1972–1984 (2015).
86. Qi, Y. *et al.* DNA Polymerase κ Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLoS Pathog.* **12**, e1005893 (2016).
87. Bock, C. T., Schranz, P., Schröder, C. H. & Zentgraf, H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* **8**, 215–229 (1994).
88. Liu, F. *et al.* Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003613 (2013).
89. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003 (2011).
90. Bock, C. T. *et al.* Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* **307**, 183–196 (2001).
91. Tu, T., Budzinska, M. A., Shackel, N. A. & Jilbert, A. R. Conceptual models for the initiation of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **35**, 1786–1800 (2015).
92. Gazina, E. V., Fielding, J. E., Lin, B. & Anderson, D. A. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J. Virol.* **74**, 4721–4728 (2000).
93. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 65–73 (2007).
94. Tuttleman, J. S., Pourcel, C. & Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**, 451–460 (1986).
95. Dhasan, M. S., Wang, J. C.-Y., Hagan, M. F. & Zlotnick, A. Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded. *Virology* **430**, 20–29 (2012).
96. Mangold, C. M., Unckell, F., Werr, M. & Streeck, R. E. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology* **211**, 535–543 (1995).

97. Lepère-Douard, C., Trotard, M., Le Seyec, J. & Gripon, P. The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J. Virol.* **83**, 11819–11829 (2009).
98. Lambert, C., Döring, T. & Prange, R. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J. Virol.* **81**, 9050–9060 (2007).
99. Tamandjou, C. R., Maponga, T. G., Chotun, N., Preiser, W. & Andersson, M. I. Is hepatitis B birth dose vaccine needed in Africa? *Pan Afr Med J* **27**, 18 (2017).
100. Kidd-Ljunggren, K., Holmberg, A., Bläckberg, J. & Lindqvist, B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *J. Hosp. Infect.* **64**, 352–357 (2006).
101. Komatsu, H. *et al.* Source of transmission in children with chronic hepatitis B infection after the implementation of a strategy for prevention in those at high risk. *Hepatol. Res.* **39**, 569–576 (2009).
102. Edmunds, W. J., Medley, G. F., Nokes, D. J., Hall, A. J. & Whittle, H. C. The influence of age on the development of the hepatitis B carrier state. *Proc. Biol. Sci.* **253**, 197–201 (1993).
103. Raimondo, G., Caccamo, G., Filomia, R. & Pollicino, T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol* **35**, 39–52 (2013).
104. Locarnini, S., Hatzakis, A., Chen, D.-S. & Lok, A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J. Hepatol.* **62**, S76-86 (2015).
105. Livingston, S. E. *et al.* Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* **133**, 1452–1457 (2007).
106. Manno, M. *et al.* Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology* **127**, 756–763 (2004).
107. Hsu, Y.-S. *et al.* Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **35**, 1522–1527 (2002).
108. Yeo, W. & Johnson, P. J. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology* **43**, 209–220 (2006).
109. Jiao, J., Friedman, S. L. & Aloman, C. Hepatic fibrosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**, 223–229 (2009).
110. D’Amico, G., Garcia-Tsao, G. & Pagliaro, L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J. Hepatol.* **44**, 217–231 (2006).
111. Sherman, M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin. Liver Dis.* **30**, 3–16 (2010).
112. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 16–27 (2016).
113. Amin, J. *et al.* Cancer incidence in people with hepatitis B or C infection: a large community-based linkage study. *J. Hepatol.* **45**, 197–203 (2006).

114. Chu, C. M. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15 Suppl**, E25-30 (2000).
115. Pazgan-Simon, M. *et al.* Hepatitis B virus treatment in hepatocellular carcinoma patients prolongs survival and reduces the risk of cancer recurrence. *Clin Exp Hepatol* **4**, 210–216 (2018).
116. Schulze, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat. Genet.* **47**, 505–511 (2015).
117. Donato, F. *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 323–331 (2002).
118. Ming, L. *et al.* Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* **36**, 1214–1220 (2002).
119. Singal, A. G. & El-Serag, H. B. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 2140–2151 (2015).
120. Chen, C.-J. *et al.* Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* **295**, 65–73 (2006).
121. Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. & Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **127**, S35-50 (2004).
122. Chan, H. L.-Y. *et al.* Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* **53**, 1494–1498 (2004).
123. Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W. & Harris, C. C. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* **26**, 2166–2176 (2007).
124. Li, H. *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342–1351 (2012).
125. Ding, D. *et al.* Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet.* **8**, e1003065 (2012).
126. Sung, W.-K. *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **44**, 765–769 (2012).
127. Ali, A. *et al.* Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10238–10248 (2014).
128. Hsieh, Y.-H. *et al.* Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* **25**, 2023–2032 (2004).
129. Wang, L. H.-C., Huang, W., Lai, M.-D. & Su, I.-J. Aberrant cyclin A expression and centrosome overduplication induced by hepatitis B virus pre-S2 mutants and its implication in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **33**, 466–472 (2012).

130. WHO | World Health Organization. *WHO* Available at: <http://www.who.int/en/>. (Accessed: 27th November 2015)
131. HEPAHEALTH Project Report. *EASL-The Home of Hepatology. European Association for the Study of the Liver*
132. Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R. T., Krause, G. & Ott, J. J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet* **386**, 1546–1555 (2015).
133. Ott, J. J., Stevens, G. A., Groeger, J. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* **30**, 2212–2219 (2012).
134. Lavanchy, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* **11**, 97–107 (2004).
135. WHO | Sixty-seventh World Health Assembly. *WHO* Available at: <https://www.who.int/mediacentre/events/2014/wha67/en/>. (Accessed: 2nd July 2019)
136. Lemoine, M. *et al.* Acceptability and feasibility of a screen-and-treat programme for hepatitis B virus infection in The Gambia: the Prevention of Liver Fibrosis and Cancer in Africa (PROLIFICA) study. *Lancet Glob Health* **4**, e559-567 (2016).
137. Sharma, S., Carballo, M., Feld, J. J. & Janssen, H. L. A. Immigration and viral hepatitis. *J. Hepatol.* **63**, 515–522 (2015).
138. Stanaway, J. D. *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **388**, 1081–1088 (2016).
139. Cornberg, M. *et al.* The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *J. Hepatol.* **66**, 398–411 (2017).
140. Castera, L. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology* **142**, 1293-1302.e4 (2012).
141. Lok, A. S. F. Hepatitis B: liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **33**, 911–915 (2009).
142. Bruix, J., Sherman, M. & American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**, 1020–1022 (2011).
143. Tabor, E. *et al.* Immunogenicity in chimpanzees of experimental hepatitis B vaccines prepared from intact hepatitis B virus, purified polypeptides, or polypeptide micelles. *J. Med. Virol.* **10**, 65–74 (1982).
144. Hepatitis B vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **84**, 405–419 (2009).
145. Pacific, W. H. O. R. O. for the W. *Hepatitis B control through immunization : a reference guide.* (Manila : WHO Regional Office for the Western Pacific, 2014).
146. WHO | Workers' health: global plan of action. *WHO* Available at: https://www.who.int/occupational_health/publications/global_plan/en/. (Accessed: 2nd July 2019)

147. Zuckerman, J. N. Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. *J. Med. Virol.* **78**, 169–177 (2006).
148. Liaw, Y.-F. Impact of therapy on the outcome of chronic hepatitis B. *Liver Int.* **33 Suppl 1**, 111–115 (2013).
149. Koumbi, L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol* **7**, 1030–1040 (2015).
150. Werle-Lapostolle, B. *et al.* Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* **126**, 1750–1758 (2004).
151. Marcellin, P. *et al.* Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* **381**, 468–475 (2013).
152. Glue, P. *et al.* Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 556–567 (2000).
153. Lucifora, J. *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–1228 (2014).
154. Gordien, E. *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J. Virol.* **75**, 2684–2691 (2001).
155. Wieland, S. F., Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.* **74**, 4165–4173 (2000).
156. Xu, C. *et al.* Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus. *J. Virol.* **84**, 9332–9340 (2010).
157. Micco, L. *et al.* Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **58**, 225–233 (2013).
158. Wong, V. W.-S. *et al.* Durability of peginterferon alfa-2b treatment at 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* **51**, 1945–1953 (2010).
159. Buster, E. H. C. J. *et al.* Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology* **137**, 2002–2009 (2009).
160. Triantos, C., Kalafateli, M., Nikolopoulou, V. & Burroughs, A. Meta-analysis: antiviral treatment for hepatitis D. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 663–673 (2012).
161. Viganò, M., Invernizzi, F., Grossi, G. & Lampertico, P. Review article: the potential of interferon and nucleos(t)ide analogue combination therapy in chronic hepatitis B infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **44**, 653–661 (2016).
162. Tsagris, E. M., Martínez de Alba, A. E., Gozmanova, M. & Kalantidis, K. Viroids. *Cell. Microbiol.* **10**, 2168–2179 (2008).
163. Brazas, R. & Ganem, D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* **274**, 90–94 (1996).

164. Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A. & Szostak, J. W. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* **313**, 1788–1792 (2006).
165. Webb, C.-H. T., Riccitelli, N. J., Ruminski, D. J. & Lupták, A. Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes. *Science* **326**, 953 (2009).
166. Rizzetto, M. The adventure of delta. *Liver Int.* **36 Suppl 1**, 135–140 (2016).
167. Le Gal, F. *et al.* Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1447–1450 (2006).
168. Dény, P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **307**, 151–171 (2006).
169. Wu, J. C., Chiang, T. Y. & Sheen, I. J. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 5)**, 1105–1113 (1998).
170. Ma, S.-P. *et al.* The complete genomic sequence of hepatitis delta virus genotype IIb prevalent in Okinawa, Japan. *J. Gen. Virol.* **84**, 461–464 (2003).
171. Casey, J. L. *et al.* Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J. Infect. Dis.* **174**, 920–926 (1996).
172. Wang, K. S. *et al.* Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* **323**, 508–514 (1986).
173. Taylor, J. M. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, (2015).
174. Lai, M. M. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 259–286 (1995).
175. Weiner, A. J. *et al.* A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *J. Virol.* **62**, 594–599 (1988).
176. Bichko, V. V., Khudyakov, Y. E. & Taylor, J. M. A novel form of hepatitis delta antigen. *J. Virol.* **70**, 3248–3251 (1996).
177. Kuo, M. Y., Sharmeen, L., Dinter-Gottlieb, G. & Taylor, J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **62**, 4439–4444 (1988).
178. Doudna, J. A. & Cech, T. R. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**, 222–228 (2002).
179. Ferré-D'Amaré, A. R., Zhou, K. & Doudna, J. A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **395**, 567–574 (1998).
180. Chen, P. J. *et al.* Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 8774–8778 (1986).
181. Hsieh, S. Y., Chao, M., Coates, L. & Taylor, J. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J. Virol.* **64**, 3192–3198 (1990).

182. Glenn, J. S., Taylor, J. M. & White, J. M. In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J. Virol.* **64**, 3104–3107 (1990).
183. Wong, S. K. & Lazinski, D. W. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15118–15123 (2002).
184. Casey, J. L. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **353**, 123–143 (2012).
185. Chao, M., Hsieh, S. Y. & Taylor, J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virol.* **64**, 5066–5069 (1990).
186. Chang, F. L., Chen, P. J., Tu, S. J., Wang, C. J. & Chen, D. S. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8490–8494 (1991).
187. Lee, C. Z., Lin, J. H., Chao, M., McKnight, K. & Lai, M. M. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *J. Virol.* **67**, 2221–2227 (1993).
188. Daigh, L. H., Griffin, B. L., Soroush, A., Mamedov, M. R. & Casey, J. L. Arginine-rich motifs are not required for hepatitis delta virus RNA binding activity of the hepatitis delta antigen. *J. Virol.* **87**, 8665–8674 (2013).
189. Alves, C., Freitas, N. & Cunha, C. Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* **370**, 12–21 (2008).
190. Zuccola, H. J., Rozzelle, J. E., Lemon, S. M., Erickson, B. W. & Hogle, J. M. Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *Structure* **6**, 821–830 (1998).
191. Cornillez-Ty, C. T. & Lazinski, D. W. Determination of the multimerization state of the hepatitis delta virus antigens in vivo. *J. Virol.* **77**, 10314–10326 (2003).
192. Hong, S.-Y. & Chen, P.-J. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J. Virol.* **84**, 1430–1438 (2010).
193. Tan, K.-P., Shih, K.-N. & Lo, S. J. Ser-123 of the large antigen of hepatitis delta virus modulates its cellular localization to the nucleolus, SC-35 speckles or the cytoplasm. *J. Gen. Virol.* **85**, 1685–1694 (2004).
194. Komla-Soukha, I. & Sureau, C. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* **80**, 4648–4655 (2006).
195. Lee, C. H., Chang, S. C., Wu, C. H. & Chang, M. F. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 8142–8148 (2001).
196. Alves, C., Cheng, H., Roder, H. & Taylor, J. Intrinsic disorder and oligomerization of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* **407**, 333–340 (2010).
197. Gudima, S., Chang, J., Moraleda, G., Azvolinsky, A. & Taylor, J. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J. Virol.* **76**, 3709–3719 (2002).

198. Ryu, W. S., Netter, H. J., Bayer, M. & Taylor, J. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J. Virol.* **67**, 3281–3287 (1993).
199. Mu, J.-J. *et al.* The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis. *Virology* **319**, 60–70 (2004).
200. Huang, C.-R., Wang, R. Y. L., Hsu, S.-C. & Lo, S. J. Lysine-71 in the large delta antigen of hepatitis delta virus clade 3 modulates its localization and secretion. *Virus Res.* **170**, 75–84 (2012).
201. Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M. & Gerlich, W. H. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* **58**, 945–950 (1986).
202. Gudima, S. *et al.* Assembly of hepatitis delta virus: particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes. *J. Virol.* **81**, 3608–3617 (2007).
203. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**, e00049 (2012).
204. Lamas Longarela, O. *et al.* Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS ONE* **8**, e58340 (2013).
205. Chou, H. C., Hsieh, T. Y., Sheu, G. T. & Lai, M. M. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J. Virol.* **72**, 3684–3690 (1998).
206. Taylor, J. M. Chapter 3. Replication of the hepatitis delta virus RNA genome. *Adv. Virus Res.* **74**, 103–121 (2009).
207. Macnaughton, T. B., Shi, S. T., Modahl, L. E. & Lai, M. M. C. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J. Virol.* **76**, 3920–3927 (2002).
208. Greco-Stewart, V. S., Miron, P., Abraham, A. & Pelchat, M. The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology* **357**, 68–78 (2007).
209. Greco-Stewart, V. S., Schissel, E. & Pelchat, M. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology* **386**, 12–15 (2009).
210. Li, Y.-J., Macnaughton, T., Gao, L. & Lai, M. M. C. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J. Virol.* **80**, 6478–6486 (2006).
211. Cao, D., Haussecker, D., Huang, Y. & Kay, M. A. Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA* **15**, 1971–1979 (2009).
212. Chang, J., Nie, X., Chang, H. E., Han, Z. & Taylor, J. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J. Virol.* **82**, 1118–1127 (2008).
213. Taylor, J. Introduction to HDV genome replication. *Prog. Clin. Biol. Res.* **382**, 1–4 (1993).

214. Wu, T. T., Netter, H. J., Lazinski, D. W. & Taylor, J. M. Effects of nucleotide changes on the ability of hepatitis delta virus to transcribe, process, and accumulate unit-length, circular RNA. *J. Virol.* **71**, 5408–5414 (1997).
215. Modahl, L. E. & Lai, M. M. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *J. Virol.* **72**, 5449–5456 (1998).
216. Huang, W.-H., Chen, Y.-S. & Chen, P.-J. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *J. Virol.* **82**, 692–699 (2008).
217. Chen, Y.-S., Huang, W.-H., Hong, S.-Y., Tsay, Y.-G. & Chen, P.-J. ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *J. Virol.* **82**, 9345–9358 (2008).
218. Huang, W. H., Chen, C. W., Wu, H. L. & Chen, P. J. Post-translational modification of delta antigen of hepatitis D virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **307**, 91–112 (2006).
219. Li, Y.-J., Stallcup, M. R. & Lai, M. M. C. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J. Virol.* **78**, 13325–13334 (2004).
220. Wadkins, T. S., Perrotta, A. T., Ferré-D'Amaré, A. R., Doudna, J. A. & Been, M. D. A nested double pseudoknot is required for self-cleavage activity of both the genomic and antigenomic hepatitis delta virus ribozymes. *RNA* **5**, 720–727 (1999).
221. Reid, C. E. & Lazinski, D. W. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 424–429 (2000).
222. Lo, K., Hwang, S. B., Duncan, R., Trousdale, M. & Lai, M. M. Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA. *Virology* **250**, 94–105 (1998).
223. Yamaguchi, Y., Mura, T., Chanarat, S., Okamoto, S. & Handa, H. Hepatitis delta antigen binds to the clamp of RNA polymerase II and affects transcriptional fidelity. *Genes Cells* **12**, 863–875 (2007).
224. Polson, A. G., Bass, B. L. & Casey, J. L. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* **380**, 454–456 (1996).
225. Tavanez, J. P. *et al.* Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* **8**, 637–646 (2002).
226. Macnaughton, T. B. & Lai, M. M. C. Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing. *J. Virol.* **76**, 3928–3935 (2002).
227. O'Malley, B. & Lazinski, D. W. Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen. *J. Virol.* **79**, 1142–1153 (2005).
228. Hwang, S. B. & Lai, M. M. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J. Virol.* **67**, 7659–7662 (1993).

229. Sureau, C., Guerra, B. & Lee, H. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *J. Virol.* **68**, 4063–4066 (1994).
230. Perez-Vargas, J. *et al.* Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun* **10**, 2098 (2019).
231. Verme, G. *et al.* A histological study of hepatitis delta virus liver disease. *Hepatology* **6**, 1303–1307 (1986).
232. Zachou, K. *et al.* Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int.* **30**, 430–437 (2010).
233. Cole, S. M., Gowans, E. J., Macnaughton, T. B., Hall, P. D. & Burrell, C. J. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology* **13**, 845–851 (1991).
234. Magrin, S. *et al.* Interleukin-2, interleukin-2 receptor and gamma-interferon synthesis by peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis delta virus infection. *J. Hepatol.* **8**, 358–366 (1989).
235. Accapezzato, D. *et al.* Generation of an MHC class II-restricted T cell epitope by extracellular processing of hepatitis delta antigen. *J. Immunol.* **160**, 5262–5266 (1998).
236. Nisini, R. *et al.* Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J. Virol.* **71**, 2241–2251 (1997).
237. Lunemann, S. *et al.* Effects of HDV infection and pegylated interferon α treatment on the natural killer cell compartment in chronically infected individuals. *Gut* **64**, 469–482 (2015).
238. Aslan, N. *et al.* Analysis and function of delta-hepatitis virus-specific cellular immune responses. *Journal of Hepatology* **38**, 15–16 (2003).
239. Alfaiate, D. *et al.* HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral Res.* **136**, 19–31 (2016).
240. Williams, V. *et al.* Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *J. Viral Hepat.* **19**, 744–753 (2012).
241. Choi, S.-H., Jeong, S.-H. & Hwang, S. B. Large hepatitis delta antigen modulates transforming growth factor-beta signaling cascades: implication of hepatitis delta virus-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* **132**, 343–357 (2007).
242. Liao, F.-T. *et al.* Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 1124–1134 (2009).
243. Huang, W.-H., Mai, R.-T. & Lee, Y.-H. W. Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication. *J. Virol.* **82**, 7313–7324 (2008).
244. Goto, T. *et al.* Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. *J. Infect. Dis.* **187**, 820–828 (2003).

245. Williams, V. *et al.* Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J. Gen. Virol.* **90**, 2759–2767 (2009).
246. Deterding, K. *et al.* Clearance of chronic HCV infection during acute delta hepatitis. *Infection* **37**, 159–162 (2009).
247. Farci, P. & Niro, G. A. Clinical features of hepatitis D. *Semin. Liver Dis.* **32**, 228–236 (2012).
248. Fattovich, G. *et al.* Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* **46**, 420–426 (2000).
249. Romeo, R. *et al.* A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **136**, 1629–1638 (2009).
250. Rosina, F. *et al.* Changing pattern of chronic hepatitis D in Southern Europe. *Gastroenterology* **117**, 161–166 (1999).
251. Su, C.-W. *et al.* Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* **130**, 1625–1635 (2006).
252. Wu, J. C. *et al.* Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet* **346**, 939–941 (1995).
253. Casey, J. L., Brown, T. L., Colan, E. J., Wignall, F. S. & Gerin, J. L. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 9016–9020 (1993).
254. Caredda, F., Antinori, S., Pastecchia, C. & Moroni, M. HBV/HDV coinfection. *Lancet* **2**, 455 (1987).
255. Negro, F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a021550 (2014).
256. Krogsgaard, K. *et al.* Delta-infection and suppression of hepatitis B virus replication in chronic HBsAg carriers. *Hepatology* **7**, 42–45 (1987).
257. Castelnau, C. *et al.* Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* **44**, 728–735 (2006).
258. Ji, J., Sundquist, K. & Sundquist, J. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 790–792 (2012).
259. Oliveri, F., Brunetto, M. R., Actis, G. C. & Bonino, F. Pathobiology of chronic hepatitis virus infection and hepatocellular carcinoma (HCC). *Ital J Gastroenterol* **23**, 498–502 (1991).
260. Grabowski, J. & Wedemeyer, H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. *Dig Dis* **28**, 133–138 (2010).
261. Benegiamo, G. *et al.* Hepatitis delta virus induces specific DNA methylation processes in Huh-7 liver cancer cells. *FEBS Lett.* **587**, 1424–1428 (2013).

262. Rizzetto, M. & Ciancio, A. Epidemiology of hepatitis D. *Semin. Liver Dis.* **32**, 211–219 (2012).
263. Huo, T. I. *et al.* Decreasing hepatitis D virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 747–751 (1997).
264. Cross, T. J. S. *et al.* The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. *J. Med. Virol.* **80**, 277–282 (2008).
265. Patel, E. U., Thio, C. L., Boon, D., Thomas, D. L. & Tobian, A. A. R. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis D Virus Infections in the United States, 2011-2016. *Clin. Infect. Dis.* (2019). doi:10.1093/cid/ciz001
266. Gish, R. G. *et al.* Coinfection with hepatitis B and D: epidemiology, prevalence and disease in patients in Northern California. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 1521–1525 (2013).
267. Chen, H.-Y. *et al.* Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* (2018). doi:10.1136/gutjnl-2018-316601
268. Sureau, C. & Negro, F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* **64**, S102–S116 (2016).
269. Chen, X. *et al.* A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology* **66**, 1739–1749 (2017).
270. Olivero, A. & Smedile, A. Hepatitis delta virus diagnosis. *Semin. Liver Dis.* **32**, 220–227 (2012).
271. Jardi, R. *et al.* Comparative analysis of serological markers of chronic delta infection: HDV-RNA, serum HDAg and anti-HD IgM. *J. Virol. Methods* **50**, 59–66 (1994).
272. Niro, G. A. & Smedile, A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Curr Infect Dis Rep* **14**, 9–14 (2012).
273. Wedemeyer, H. *et al.* Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. *N. Engl. J. Med.* **364**, 322–331 (2011).
274. Heidrich, B. *et al.* Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* **60**, 87–97 (2014).
275. Gunsar, F. *et al.* Two-year interferon therapy with or without ribavirin in chronic delta hepatitis. *Antivir. Ther. (Lond.)* **10**, 721–726 (2005).
276. Craddock, A. L. *et al.* Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol.* **274**, G157-169 (1998).
277. Iwamoto, M. *et al.* Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 808–813 (2014).
278. Nkongolo, S. *et al.* Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731 (2014).

279. Nakabori, T. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver. *Sci Rep* **6**, 27782 (2016).
280. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J. Virol.* **79**, 1613–1622 (2005).
281. Engelke, M. *et al.* Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* **43**, 750–760 (2006).
282. Volz, T. *et al.* The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **58**, 861–867 (2013).
283. Schieck, A. *et al.* Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology* **58**, 43–53 (2013).
284. Lütgehetmann, M. *et al.* Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* **55**, 685–694 (2012).
285. Bogomolov, P. *et al.* Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B - first results of a Phase Ib/IIa study. *J. Hepatol.* (2016). doi:10.1016/j.jhep.2016.04.016
286. Haag, M. *et al.* Quantitative bile acid profiling by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry: monitoring hepatitis B therapy by a novel Na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide inhibitor. *Anal Bioanal Chem* **407**, 6815–6825 (2015).
287. Schulze, A., Schieck, A., Ni, Y., Mier, W. & Urban, S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J. Virol.* **84**, 1989–2000 (2010).
288. Wedemeyer, H. *et al.* Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *Journal of Hepatology* **68**, S3 (2018).
289. Kocisko, D. A. *et al.* Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1034–1044 (2006).
290. Vaillant, A. *et al.* Phosphorothioate oligonucleotides inhibit human immunodeficiency virus type 1 fusion by blocking gp41 core formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1393–1401 (2006).
291. Bernstein, D. I. *et al.* Amphipathic DNA polymers exhibit antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2727–2733 (2008).
292. Lee, A. M. *et al.* Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology* **372**, 107–117 (2008).
293. Noordeen, F., Vaillant, A. & Jilbert, A. R. Nucleic acid polymers prevent the establishment of duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5299–5306 (2013).
294. Al-Mahtab, M., Bazinet, M. & Vaillant, A. Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive

- Bangladeshi Patients with HBeAg+ Chronic Hepatitis B Infection. *PLoS ONE* **11**, e0156667 (2016).
295. Bazinet, M. *et al.* Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2**, 877–889 (2017).
296. Quinet, J. *et al.* Nucleic acid polymer REP 2139 and nucleos(T)ide analogues act synergistically against chronic hepadnaviral infection in vivo in Pekin ducks. *Hepatology* **67**, 2127–2140 (2018).
297. Blanchet, M., Sinnathamby, V., Vaillant, A. & Labonté, P. Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15 cells. *Antiviral Res.* **164**, 97–105 (2019).
298. Liu, M. *et al.* Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Res.* **58**, 4947–4956 (1998).
299. Chow, L. Q. M. *et al.* A phase I safety, pharmacological, and biological study of the farnesyl protein transferase inhibitor, lonafarnib (SCH 663366), in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **62**, 631–646 (2008).
300. Bordier, B. B. *et al.* A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* **76**, 10465–10472 (2002).
301. Bordier, B. B. *et al.* In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J. Clin. Invest.* **112**, 407–414 (2003).
302. Koh, C. *et al.* Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis* **15**, 1167–1174 (2015).
303. Canini, L. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics modeling of lonafarnib in patients with chronic hepatitis delta virus infection. *Hepatol Commun* **1**, 288–292 (2017).
304. Zeisel, M. B. *et al.* Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut* **64**, 1314–1326 (2015).
305. Levy, G. *et al.* Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1264–1271 (2015).
306. Andersson, T. B., Kanebratt, K. P. & Kenna, J. G. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, 909–920 (2012).
307. Luangsay, S. *et al.* Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J. Hepatol.* **63**, 1077–1085 (2015).
308. Fu, L., Hu, H., Liu, Y., Jing, Z. & Li, W. Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry. *Virology* **505**, 1–11 (2017).
309. Netter, H. J., Kajino, K. & Taylor, J. M. Experimental transmission of human hepatitis delta virus to the laboratory mouse. *J. Virol.* **67**, 3357–3362 (1993).

310. Chang, J., Sigal, L. J., Lerro, A. & Taylor, J. Replication of the human hepatitis delta virus genome Is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences. *J. Virol.* **75**, 3469–3473 (2001).
311. He, W. *et al.* Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS Pathog.* **11**, e1004840 (2015).
312. Giersch, K. *et al.* Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *J. Hepatol.* **60**, 538–544 (2014).
313. Dusséaux, M. *et al.* Viral Load Affects the Immune Response to HBV in Mice With Humanized Immune System and Liver. *Gastroenterology* **153**, 1647-1661.e9 (2017).
314. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S33-40 (2010).
315. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
316. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
317. Borden, E. C. *et al.* Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 975–990 (2007).
318. Kagan, J. C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 361–368 (2008).
319. Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460–469 (2007).
320. Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**, 491–496 (2003).
321. Guo, B. & Cheng, G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J. Biol. Chem.* **282**, 11817–11826 (2007).
322. Onoguchi, K. *et al.* Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* **282**, 7576–7581 (2007).
323. Flo, T. H. *et al.* Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 474–481 (2001).
324. Yao, X.-D. & Rosenthal, K. L. Herpes simplex virus type 2 virion host shutoff protein suppresses innate dsRNA antiviral pathways in human vaginal epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **92**, 1981–1993 (2011).
325. Alard, J.-E. *et al.* TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I. *J. Immunol.* **185**, 1550–1557 (2010).
326. Takeuchi, O. *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**, 933–940 (2001).
327. Takeuchi, O. *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10–14 (2002).

328. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G. & Choi, S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* **39**, 421–438 (2007).
329. Dunne, A. & O'Neill, L. A. J. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett.* **579**, 3330–3335 (2005).
330. Oliveira-Nascimento, L., Massari, P. & Wetzler, L. M. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol* **3**, 79 (2012).
331. Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R. M. & Barton, G. M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* **10**, 1200–1207 (2009).
332. Boehme, K. W., Guerrero, M. & Compton, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* **177**, 7094–7102 (2006).
333. Leoni, V., Gianni, T., Salvioli, S. & Campadelli-Fiume, G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF- κ B. *J. Virol.* **86**, 6555–6562 (2012).
334. Bieback, K. *et al.* Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* **76**, 8729–8736 (2002).
335. Dolganiuc, A. *et al.* Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* **127**, 1513–1524 (2004).
336. Ariza, M.-E., Glaser, R., Kaumaya, P. T. P., Jones, C. & Williams, M. V. The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **182**, 851–859 (2009).
337. Rose, W. A., McGowin, C. L. & Pyles, R. B. FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection. *Virology* **6**, 195 (2009).
338. Tan, A. C. L. *et al.* Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice. *Mol. Pharm.* **9**, 2710–2718 (2012).
339. Lucifora, J. *et al.* Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes. *Sci Rep* **8**, 5390 (2018).
340. Livingston, B. D. *et al.* The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* **159**, 1383–1392 (1997).
341. Launay, O. *et al.* Cellular immune responses induced with dose-sparing intradermal administration of HIV vaccine to HIV-uninfected volunteers in the ANRS VAC16 trial. *PLoS ONE* **2**, e725 (2007).
342. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
343. Nishimura, M. & Naito, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 886–892 (2005).

344. Matsukura, S. *et al.* Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like receptor 3 depending on NF-kappaB and/or IRF-3 in airway epithelial cells. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 1049–1062 (2006).
345. Tabeta, K. *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 3516–3521 (2004).
346. Reinert, L. S. *et al.* TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 1368–1376 (2012).
347. Abe, Y. *et al.* The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* **86**, 185–194 (2012).
348. Hardarson, H. S. *et al.* Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H251-258 (2007).
349. Richer, M. J., Lavallée, D. J., Shanina, I. & Horwitz, M. S. Toll-like receptor 3 signaling on macrophages is required for survival following coxsackievirus B4 infection. *PLoS ONE* **4**, e4127 (2009).
350. Wang, N. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J. Virol.* **83**, 9824–9834 (2009).
351. Tsai, Y.-T., Chang, S.-Y., Lee, C.-N. & Kao, C.-L. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell. Microbiol.* **11**, 604–615 (2009).
352. Isogawa, M., Robek, M. D., Furuichi, Y. & Chisari, F. V. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Virol.* **79**, 7269–7272 (2005).
353. Guillot, L. *et al.* Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J. Biol. Chem.* **280**, 5571–5580 (2005).
354. Zhou, Y. *et al.* A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology* **131**, 40–49 (2010).
355. Mazaleuskaya, L., Veltrop, R., Ikpeze, N., Martin-Garcia, J. & Navas-Martin, S. Protective role of Toll-like Receptor 3-induced type I interferon in murine coronavirus infection of macrophages. *Viruses* **4**, 901–923 (2012).
356. Connolly, D. J. & O'Neill, L. A. J. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 510–518 (2012).
357. Fujimoto, C., Nakagawa, Y., Ohara, K. & Takahashi, H. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **16**, 55–63 (2004).
358. Ichinohe, T. *et al.* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* **9**, 1333–1340 (2007).

359. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
360. Nagai, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**, 667–672 (2002).
361. Georgel, P. *et al.* Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* **362**, 304–313 (2007).
362. Okumura, A., Pitha, P. M., Yoshimura, A. & Harty, R. N. Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1. *J. Virol.* **84**, 27–33 (2010).
363. Shinya, K. *et al.* The TLR4-TRIF pathway protects against H5N1 influenza virus infection. *J. Virol.* **86**, 19–24 (2012).
364. Casella, C. R. & Mitchell, T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3231–3240 (2008).
365. Didierlaurent, A. M. *et al.* AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J. Immunol.* **183**, 6186–6197 (2009).
366. Levy, O. *et al.* Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF- α induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J. Immunol.* **173**, 4627–4634 (2004).
367. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
368. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 5598–5603 (2004).
369. Gorden, K. B. *et al.* Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J. Immunol.* **174**, 1259–1268 (2005).
370. Kawai, T. *et al.* Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**, 1061–1068 (2004).
371. Hornung, V. *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531–4537 (2002).
372. Gringhuis, S. I. *et al.* HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **11**, 419–426 (2010).
373. Melchjorsen, J. *et al.* Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J. Virol.* **79**, 12944–12951 (2005).
374. Triantafilou, K. *et al.* Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell. Microbiol.* **7**, 1117–1126 (2005).

375. Cervantes-Barragan, L. *et al.* Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* **109**, 1131–1137 (2007).
376. Wang, J. P. *et al.* Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J. Immunol.* **177**, 7114–7121 (2006).
377. Town, T. *et al.* Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* **30**, 242–253 (2009).
378. Takahashi, K. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7431–7436 (2010).
379. Nian, H. *et al.* R-848 triggers the expression of TLR7/8 and suppresses HIV replication in monocytes. *BMC Infect. Dis.* **12**, 5 (2012).
380. Cardoso, E. C. *et al.* TLR7/TLR8 Activation Restores Defective Cytokine Secretion by Myeloid Dendritic Cells but Not by Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV-Infected Pregnant Women and Newborns. *PLoS ONE* **8**, e67036 (2013).
381. Xiang, A. X. *et al.* Discovery of ANA975: an oral prodrug of the TLR-7 agonist isatoribine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **26**, 635–640 (2007).
382. Bergmann, J. F. *et al.* Randomised clinical trial: anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 443–453 (2011).
383. Lanford, R. E. *et al.* GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* **144**, 1508–1517, 1517.e1–10 (2013).
384. Lopatin, U. *et al.* Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of GS-9620, an oral Toll-like receptor 7 agonist. *Antivir. Ther. (Lond.)* **18**, 409–418 (2013).
385. Agarwal, K. *et al.* Safety and efficacy of vesatolimod (GS-9620) in patients with chronic hepatitis B who are not currently on antiviral treatment. *J. Viral Hepat.* **25**, 1331–1340 (2018).
386. Latz, E. *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **5**, 190–198 (2004).
387. Honda, K. *et al.* Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035–1040 (2005).
388. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863–869 (2001).
389. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 1–20 (2008).
390. Krug, A. *et al.* Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433–1437 (2004).

391. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513–520 (2003).
392. West, J. A., Gregory, S. M., Sivaraman, V., Su, L. & Damania, B. Activation of plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* **85**, 895–904 (2011).
393. Basner-Tschakarjan, E. *et al.* Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9-dependent maturation and IFN- α production. *J Gene Med* **8**, 1300–1306 (2006).
394. Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K. & Gosselin, J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **185**, 3620–3631 (2010).
395. Samuelsson, C. *et al.* Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest.* **118**, 1776–1784 (2008).
396. Zhu, J., Huang, X. & Yang, Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2388–2398 (2009).
397. Sørensen, L. N. *et al.* TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J. Immunol.* **181**, 8604–8612 (2008).
398. McHutchison, J. G. *et al.* Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* **46**, 1341–1349 (2007).
399. Cooper, C. & Mackie, D. Hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine: a review of HEPLISAV™ safety and efficacy. *Expert Rev Vaccines* **10**, 417–427 (2011).
400. Naismith, J. H. & Sprang, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 74–79 (1998).
401. Banner, D. W. *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431–445 (1993).
402. Peter, M. E. & Krammer, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* **10**, 26–35 (2003).
403. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Caspase activation. *Biochem. Soc. Symp.* 233–242 (2003).
404. Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181–190 (2003).
405. Vince, J. E. *et al.* TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- κ b and to prevent tnf-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **284**, 35906–35915 (2009).
406. Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. & Goeddel, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387–396 (1996).

407. Cabal-Hierro, L. *et al.* TRAF-mediated modulation of NF- κ B AND JNK activation by TNFR2. *Cell. Signal.* **26**, 2658–2666 (2014).
408. Babic, A. *et al.* Soluble tumour necrosis factor receptor type II and survival in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **114**, 995–1002 (2016).
409. Yang, F., Zhao, Z. & Zhao, N. Clinical implications of tumor necrosis factor receptor 2 in breast cancer. *Oncol Lett* **14**, 2393–2398 (2017).
410. Zhang, T. *et al.* Aberrant frequency of TNFR2+ Treg and related cytokines in patients with CIN and cervical cancer. *Oncotarget* **9**, 5073–5083 (2018).
411. Yang, F., Zhao, N. & Wu, N. TNFR2 promotes Adriamycin resistance in breast cancer cells by repairing DNA damage. *Mol Med Rep* **16**, 2962–2968 (2017).
412. Rivas, M. A. *et al.* TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* **314**, 509–529 (2008).
413. Yang, D. *et al.* Progranulin promotes colorectal cancer proliferation and angiogenesis through TNFR2/Akt and ERK signaling pathways. *Am J Cancer Res* **5**, 3085–3097 (2015).
414. Jain, S. S. & Bird, R. P. Elevated expression of tumor necrosis factor-alpha signaling molecules in colonic tumors of Zucker obese (fa/fa) rats. *Int. J. Cancer* **127**, 2042–2050 (2010).
415. Sasi, S. P. *et al.* Breaking the 'harmony' of TNF- α signaling for cancer treatment. *Oncogene* **31**, 4117–4127 (2012).
416. Sasi, S. P. *et al.* Therapeutic non-toxic doses of TNF induce significant regression in TNFR2-p75 knockdown Lewis lung carcinoma tumor implants. *PLoS ONE* **9**, e92373 (2014).
417. Mahmud, S. A. *et al.* Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 473–481 (2014).
418. Chopra, M. *et al.* Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J. Exp. Med.* **213**, 1881–1900 (2016).
419. Okubo, Y., Mera, T., Wang, L. & Faustman, D. L. Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2. *Sci Rep* **3**, 3153 (2013).
420. Yan, F. *et al.* Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 1475–1485 (2015).
421. Polz, J. *et al.* Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity. *Immun Inflamm Dis* **2**, 121–130 (2014).
422. Hu, X. *et al.* Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.* **192**, 1320–1331 (2014).
423. Torrey, H. *et al.* Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci Signal* **10**, (2017).
424. Nie, Y. *et al.* Blockade of TNFR2 signaling enhances the immunotherapeutic effect of CpG ODN in a mouse model of colon cancer. *Sci Signal* **11**, (2018).

425. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
426. Lee, S. H., Park, S. G., Lim, S. O. & Jung, G. The hepatitis B virus X protein up-regulates lymphotoxin alpha expression in hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1741**, 75–84 (2005).
427. Lowes, K. N., Croager, E. J., Abraham, L. J., Olynyk, J. K. & Yeoh, G. C. T. Upregulation of lymphotoxin beta expression in liver progenitor (oval) cells in chronic hepatitis C. *Gut* **52**, 1327–1332 (2003).
428. Subrata, L. S. *et al.* Hepatic expression of the tumor necrosis factor family member lymphotoxin-beta is regulated by interleukin (IL)-6 and IL-1beta: transcriptional control mechanisms in oval cells and hepatoma cell lines. *Liver Int.* **25**, 633–646 (2005).
429. Ware, C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 787–819 (2005).
430. Dejardin, E. *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525–535 (2002).
431. Randall, T. D., Carragher, D. M. & Rangel-Moreno, J. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 627–650 (2008).
432. Spahn, T. W., Eugster, H.-P., Fontana, A., Domschke, W. & Kucharzik, T. Role of lymphotoxin in experimental models of infectious diseases: potential benefits and risks of a therapeutic inhibition of the lymphotoxin-beta receptor pathway. *Infect. Immun.* **73**, 7077–7088 (2005).
433. Eugster, H. P. *et al.* Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Int. Immunol.* **8**, 23–36 (1996).
434. Kumaraguru, U., Davis, I. A., Deshpande, S., Tevethia, S. S. & Rouse, B. T. Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J. Immunol.* **166**, 1066–1074 (2001).
435. Benedict, C. A. *et al.* Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus détente. *Immunity* **15**, 617–626 (2001).
436. Iversen, A.-C., Norris, P. S., Ware, C. F. & Benedict, C. A. Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *J. Immunol.* **175**, 7568–7574 (2005).
437. Banks, T. A. *et al.* A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **174**, 7217–7225 (2005).
438. Lukashev, M. *et al.* Targeting the lymphotoxin-beta receptor with agonist antibodies as a potential cancer therapy. *Cancer Res.* **66**, 9617–9624 (2006).
439. Hu, X. *et al.* Lymphotoxin β receptor mediates caspase-dependent tumor cell apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo despite induction of NF-kB activation. *Carcinogenesis* **34**, 1105–1114 (2013).
440. Haybaeck, J. *et al.* A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **16**, 295–308 (2009).

441. Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921–928 (1986).
442. Baud, V. & Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 33–40 (2009).
443. Jacobs, M. D. & Harrison, S. C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* **95**, 749–758 (1998).
444. Smale, S. T. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-κB family of transcription factors. *Immunol. Rev.* **246**, 193–204 (2012).
445. Nishikori, M., Ohno, H., Haga, H. & Uchiyama, T. Stimulation of CD30 in anaplastic large cell lymphoma leads to production of nuclear factor-kappaB p52, which is associated with hyperphosphorylated Bcl-3. *Cancer Sci.* **96**, 487–497 (2005).
446. Newton, K. *et al.* Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* **134**, 668–678 (2008).
447. Butler, M. P., Hanly, J. A. & Moynagh, P. N. Kinase-active interleukin-1 receptor-associated kinases promote polyubiquitination and degradation of the Pellino family: direct evidence for PELLINO proteins being ubiquitin-protein isopeptide ligases. *J. Biol. Chem.* **282**, 29729–29737 (2007).
448. Deng, L. *et al.* Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361 (2000).
449. Conze, D. B., Wu, C.-J., Thomas, J. A., Landstrom, A. & Ashwell, J. D. Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3538–3547 (2008).
450. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034 (2009).
451. Ben-Neriah, Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* **3**, 20–26 (2002).
452. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
453. Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S. & Hoffmann, A. IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J. Cell Biol.* **173**, 659–664 (2006).
454. Basak, S. *et al.* A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* **128**, 369–381 (2007).
455. Sun, S.-C. The noncanonical NF-κB pathway. *Immunol. Rev.* **246**, 125–140 (2012).
456. Xiao, G., Fong, A. & Sun, S.-C. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 30099–30105 (2004).

457. Liang, C., Zhang, M. & Sun, S.-C. beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell. Signal.* **18**, 1309–1317 (2006).
458. Amir, R. E., Haecker, H., Karin, M. & Ciechanover, A. Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene* **23**, 2540–2547 (2004).
459. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001651 (2009).
460. Alcamo, E. *et al.* Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J. Immunol.* **167**, 1592–1600 (2001).
461. Ward, C. *et al.* NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**, 4309–4318 (1999).
462. Catley, M. C. *et al.* IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett.* **547**, 75–79 (2003).
463. Thompson, C. *et al.* CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 697–704 (2006).
464. Davis, B. K., Wen, H. & Ting, J. P.-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 707–735 (2011).
465. Kufer, T. A. & Sansonetti, P. J. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat. Immunol.* **12**, 121–128 (2011).
466. Harder, J. *et al.* Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J. Immunol.* **183**, 5823–5829 (2009).
467. Franchi, L., Eigenbrod, T. & Núñez, G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol.* **183**, 792–796 (2009).
468. Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791 (2009).
469. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
470. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* **5**, 614 (2014).
471. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
472. Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* **26**, 203–234 (2012).

473. Gerondakis, S. & Siebenlist, U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000182 (2010).
474. Aronica, M. A. *et al.* Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. *J. Immunol.* **163**, 5116–5124 (1999).
475. Hilliard, B. A. *et al.* Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* **110**, 843–850 (2002).
476. Balasubramani, A. *et al.* Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls Ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. *Immunity* **33**, 35–47 (2010).
477. Jeremias, I. *et al.* Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* **91**, 4624–4631 (1998).
478. Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2321–2333 (2011).
479. Isomura, I. *et al.* c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3001–3014 (2009).
480. Schmidt-Supprian, M. *et al.* Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4566–4571 (2004).
481. Medoff, B. D. *et al.* Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development. *Eur. J. Immunol.* **39**, 78–84 (2009).
482. Ruan, Q. *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* **31**, 932–940 (2009).
483. Grossmann, M. *et al.* The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11848–11853 (1999).
484. Jimi, E. *et al.* Activation of NF-kappaB promotes the transition of large, CD43⁺ pre-B cells to small, CD43⁻ pre-B cells. *Int. Immunol.* **17**, 815–825 (2005).
485. Luangsay, S. *et al.* Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **63**, 1314–1322 (2015).
486. Xia, Y. *et al.* Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* **150**, 194–205 (2016).
487. Palumbo, G. A. *et al.* IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear cccDNA Minichromosome. *PLoS ONE* **10**, e0142599 (2015).
488. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646–650 (2002).
489. Mahieux, R. *et al.* Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Gen. Virol.* **86**, 2489–2494 (2005).

490. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–15550 (2005).
491. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417–425 (2015).
492. Zhang, Z. *et al.* Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β/λ responses in hepatocytes. *J. Hepatol.* **69**, 25–35 (2018).
493. Reimand, J. *et al.* Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* **14**, 482–517 (2019).
494. Mizgalska, D. *et al.* Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS J.* **276**, 7386–7399 (2009).
495. Figiel, M. *et al.* The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutières syndrome defects. *J. Biol. Chem.* **286**, 10540–10550 (2011).
496. Adachi, S. *et al.* ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10037–10049 (2014).
497. Hong, C.-F., Chou, Y.-T., Lin, Y.-S. & Wu, C.-W. MAD2B, a novel TCF4-binding protein, modulates TCF4-mediated epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 19613–19622 (2009).
498. Gao, B., Duan, Z., Xu, W. & Xiong, S. Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. *Hepatology* **50**, 424–433 (2009).
499. Tomimatsu, N. *et al.* DNA-damage-induced degradation of EXO1 exonuclease limits DNA end resection to ensure accurate DNA repair. *J. Biol. Chem.* **292**, 10779–10790 (2017).
500. Raftery, N. & Stevenson, N. J. Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2525–2535 (2017).
501. Liu, S. *et al.* MCPIP1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 19083–19088 (2013).
502. Lin, R.-J. *et al.* MCPIP1 suppresses hepatitis C virus replication and negatively regulates virus-induced proinflammatory cytokine responses. *J. Immunol.* **193**, 4159–4168 (2014).
503. Lin, R.-J. *et al.* MCPIP1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3314–3326 (2013).
504. Chen, X., Zhao, Q., Xie, Q., Xing, Y. & Chen, Z. MCPIP1 negatively regulate cellular antiviral innate immune responses through DUB and disruption of TRAF3-TBK1-IKK ϵ complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**, 830–836 (2018).
505. van Gent, M., Sparrer, K. M. J. & Gack, M. U. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol* **5**, 385–405 (2018).

506. Wilson, C. A. & Browning, J. L. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* **9**, 1321–1333 (2002).
507. Hidaka, K. *et al.* An adjacent pair of human NUDT genes on chromosome X are preferentially expressed in testis and encode two new isoforms of diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **277**, 32730–32738 (2002).
508. Leslie, N. R., McLennan, A. G. & Safrany, S. T. Cloning and characterisation of hAps1 and hAps2, human diadenosine polyphosphate-metabolising Nudix hydrolases. *BMC Biochem.* **3**, 20 (2002).
509. Julius, C. & Yuzenkova, Y. Noncanonical RNA-capping: Discovery, mechanism, and physiological role debate. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **10**, e1512 (2019).
510. Ruben, S. M. *et al.* I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev.* **6**, 745–760 (1992).
511. Schütte, J. *et al.* jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and transactivating activities of c-jun. *Cell* **59**, 987–997 (1989).
512. Huang, D.-B. *et al.* Crystal structure of NF-kappaB (p50)₂ complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9268–9273 (2003).
513. Brackett, D. M. & Dieckmann, T. Aptamer to ribozyme: the intrinsic catalytic potential of a small RNA. *Chembiochem* **7**, 839–843 (2006).
514. Summer, H. *et al.* HMGA2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNA-damage-induced cytotoxicity during chemotherapy. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4371–4384 (2009).
515. Hehlhans, T. *et al.* Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res.* **62**, 4034–4040 (2002).
516. Ryman, J. T. & Meibohm, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **6**, 576–588 (2017).
517. Kim, J., Hayton, W. L., Robinson, J. M. & Anderson, C. L. Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. *Clin. Immunol.* **122**, 146–155 (2007).
518. Kuo, T. T. *et al.* Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J. Clin. Immunol.* **30**, 777–789 (2010).
519. Ovacik, M. & Lin, K. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development. *Clin Transl Sci* **11**, 540–552 (2018).
520. Faure-Dupuy, S. *et al.* Characterization of Pattern Recognition Receptor Expression and Functionality in Liver Primary Cells and Derived Cell Lines. *J Innate Immun* **10**, 339–348 (2018).
521. Giraldo, D. M., Hernandez, J. C. & Urcuqui Inchima, S. Impact of in vitro costimulation with TLR2, TLR4 and TLR9 agonists and HIV-1 on antigen-presenting cell activation. *Intervirology* **58**, 122–129 (2015).

522. Boltjes, A. *et al.* Kupffer cells interact with hepatitis B surface antigen in vivo and in vitro, leading to proinflammatory cytokine production and natural killer cell function. *J. Infect. Dis.* **211**, 1268–1278 (2015).
523. Ju, C. & Tacke, F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 316–327 (2016).
524. Visvanathan, K. *et al.* Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* **45**, 102–110 (2007).
525. Yang, F. *et al.* Hepatitis B e antigen induces the expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells to dampen T-cell function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog.* **15**, e1007690 (2019).
526. Ji, C. *et al.* Targeted delivery of interferon- α to hepatitis B virus-infected cells using T-cell receptor-like antibodies. *Hepatology* **56**, 2027–2038 (2012).
527. Uzé, G. & Tavernier, J. High efficiency targeting of IFN- α activity: possible applications in fighting tumours and infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 179–182 (2015).
528. Heuking, S. *et al.* Stimulation of human macrophages (THP-1) using Toll-like receptor-2 (TLR-2) agonist decorated nanocarriers. *J Drug Target* **17**, 662–670 (2009).

