THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale : **Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé [ED168 – CBS2]**

Unité de recherche : **Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier [IGMM – CNRS UMR 5535]**

Role of human innate lymphoid cells (ILCs) in the immune response against adenoviruses in a host with pre-existing immunity

Rôle des cellules lymphoïdes innées humaines (ILC) dans la réponse immunitaire contre les adénovirus chez un hôte avec une immunité préexistante

Présentée par **Océane PARIS**
Le **09 juillet 2021**

Sous la direction du **Dr. Eric J KREMER**

Devant le jury composé de

Pr. Edouard TUAILLON, PUPH, CHU de Montpellier - UMR INSERM U1058 - Montpellier	**Président du jury**
Pr. Matthieu PERREAU, Professeur associé, UNIL - CHUV - Lausanne, Suisse	**Rapporteur**
Dr. Emmanuel SCOTET, DR, CRCINA - INSERM U1232 - Nantes	**Rapporteur**
Dr. Carole BERRUYER, MCF, CIML - CNRS, INSERM - Marseille	**Examinatrice**
Dr. Eric J KREMER, DR1, IGMM - CNRS UMR 5535 - Montpellier	**Directeur de thèse**
Dr. Franck MENNECHET, MCF, INSERM U1058 – Montpellier	**Co-encadrant de thèse**

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

A travers ces mots, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé au bon déroulement de ma thèse, de près ou de loin, durant ces années au sein de l'IGMM.

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de lire avec attention mon manuscrit et d'évaluer mon travail de thèse. Merci à mes rapporteurs Pr. Matthieu PERREAU et Dr. Emmanuel SCOTET, et à mes examinateurs Dr. Carole BERRUYER et Pr. Edouard TUAILLON, qui a également accepté d'être président du jury.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Eric J KREMER, mon Directeur de thèse, pour m'avoir accueillie et formée dans son laboratoire de recherche depuis mon stage de Master 2. Merci de m'avoir fait confiance au niveau scientifique mais aussi dans mes choix de monitorat, et de m'avoir donné les opportunités pour grandir en tant que chercheur. Ta porte a toujours été ouverte et je te remercie du soutien que tu m'as apporté pendant toutes ces années en toutes circonstances. Je remercie également le Dr. Franck Mennechet de m'avoir accompagnée au cours de mon stage de Master 2, soutenue lors du monitorat et d'avoir co-encadré mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier les Dr Valérie Dardalhon, Dr Antoine Gross et Dr Jean-Pierre Molès pour avoir fait partie de mon comité de thèse, pour vos échanges scientifiques, vos conseils et vos encouragements.

J'adresse un très grand merci aux membres de l'équipe EKL pour leur accueil dès mon arrivée en stage de Master 2. Merci Marina pour ta disponibilité et l'aide que tu m'as apportée pour prendre mes marques dans le laboratoire, mais aussi d'avoir été là quand j'en ai eu besoin. Merci Bertrand pour tes conseils scientifiques et pour tes pâtisseries (surtout les chocolats fait maison). Merci Coraline pour m'avoir aidé dans mon projet quand j'en ai eu besoin. Merci Iria pour ta rigueur scientifique, tes conseils et d'avoir partagé ton expérience avec moi. Enfin, merci Amani, « mon amie pour 3 ans » (cette première phrase de ta part restera gravée dans ma mémoire), j'ai pu découvrir ton pays ainsi que ta culture et tu m'as beaucoup fait rire pendant ces années. A présent tu es la prochaine sur la liste, bon courage !

Merci à tous les doctorants pour les moments partagés notamment au cours de ces longues journées d'expérimentations en salle de culture car elles auraient semblé encore plus longues sans nos discussions (avec une mention spéciale au « Lebanese Gang »).

Je remercie également toutes les personnes travaillant à l'IGMM, tous services confondus (administration, laverie, MRI, SCII, magasin, les autres équipes) qui ont pu m'aider d'une quelconque manière au cours de ma thèse.

Je souhaite également particulièrement remercier le Professeur Catherine Braun-Breton pour m'avoir inspiré à travers ses cours et également pour son aide lors des étapes cruciales de mes études. Je remercie également le Dr Marie-Hélène Boyer de m'avoir fait confiance en tant que moniteur à l'université de Montpellier. Merci pour votre bienveillance et votre passion.

A titre plus personnel, je remercie mes amis et ma famille pour leur soutien. Merci à Justine pour tous les moments partagés au cours de ces années d'études.
Un remerciement particulier à Sam, mon amie depuis plus de 10 ans, malgré la distance tu as toujours été derrière moi pour que je n'abandonne jamais et que je suive mon chemin.

Je remercie sincèrement ma famille sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Vous avez toujours été derrière moi pour me soutenir en toutes circonstances. Merci pour vos sacrifices et vos conseils. Vous m'avez toujours encouragé malgré la distance et même si vous aviez du mal à comprendre ce que je faisais, vous avez toujours cru en moi. Merci à mes frères Benoît et Benjamin, d'avoir été là pour « leur petite sœur » pendant tout ce long périple. Un remerciement spécial à Benjamin pour avoir eu ce rôle de grand frère dont j'avais besoin au cours des moments difficiles que l'on a vécu cette année. Un merci particulier à ma sœur Mélanie, qui m'a donné le goût de la science et m'a permis de faire mes premiers pas dans un laboratoire. Merci pour ton soutien et tes conseils, toi qui comprenais le plus ce qu'était la vie d'une doctorante. Enfin, maman, tu as toujours tout fait pour moi, pour m'aider comme tu le pouvais et me soulager moralement. Tu as toujours été là et je ne t'en remercierais jamais assez.

Et enfin, à toi Sloan, qui a vécu ces années d'études et de thèse à mes côtés. A toi qui me supportes avec mes « blablas » scientifiques et mes heures d'études depuis plus de 6 ans sans jamais te plaindre. Tu m'as toujours soutenue et encouragée, surtout pour cette dernière ligne droite. Je ne pourrais jamais te remercier à la hauteur que tu mérites pour ta bienveillance, ton amour, ta patience, ta générosité et tes sacrifices tout au long de ces années d'études...

Du fond du cœur merci…

Sommaire

REMERCIEMENTS - 3 -
SOMMAIRE - 5 -
LISTE DES FIGURES - 8 -
Figures supplémentaires - 9 -
LISTES DES ABREVIATIONS - 11 -
PREFACE - 13 -
Résumé - 13 -
Abstract - 14 -
I. OBJECTIFS DE RECHERCHE - 15 -
II. INTRODUCTION - 18 -
1) La réponse anti-adénovirus préexistante - 18 -
2) Les acteurs et médiateurs de l'immunité innée impliqués dans la réponse anti-adénovirale - 21 -
i. Les cellules lymphoïdes innées (ILC) - 21 -
a. Origine des ILCs - 21 -
b. Rôle des ILCs - 23 -
ii. Les cellules épithéliales - 26 -
a. Les cellules épithéliales : première barrière face aux pathogènes - 27 -
b. Rôle des cellules épithéliales dans l'induction de la réponse immunitaire - 29 -
c. Les cellules épithéliales et les ILCs : partenaires lors d'une réponse anti-adénovirale ? - 30 -
iii. Les cellules dendritiques (DC) - 31 -
a. Origine des DC - 31 -
b. Rôles des DC au cours de l'induction de la réponse immunitaire - 32 -
iv. Marqueurs d'activation des ILCs : CD69 / CD161 ? - 34 -
3) Histoire et biologie des adénovirus - 35 -
i. Classification et nomenclature - 35 -
ii. Structure des adénovirus - 36 -
iii. Récepteurs cellulaires des adénovirus : HAdV-C5, HAdV-D26 et HAdV-B35 - 38 -
Récepteur HAdV-C5 - 38 -
Récepteur HAdV-D26 - 39 -
Récepteur HAdV-B35 - 39 -
4) Les adénovirus humains - 39 -
i. Transmission et physiopathologies des HAdVs - 39 -
ii. Epidémiologie - 40 -
iii. Utilisation des adénovirus humains en thérapie génique - 41 -
a. Vecteurs dérivés des HAdVs - 41 -
b. Historique des vecteurs dérivés des HAdVs - 43 -
c. Problèmes et solutions liés à l'utilisation des vecteurs dérivés des HAdVs - 43 -
5) Implication de l'immunité préexistante contre les adénovirus : cas concrets au cours de développement de vaccinations - 44 -
III. MATERIELS ET METHODES - 46 -
Vecteurs adénoviraux - 46 -
Test de neutralisation (étude préalable) - 46 -
Cellules primaires du sang périphérique et conditions de culture - 46 -
Isolation des cellules dendritiques (DC) - 47 -

Enrichissement et sélection des cellules lymphoïdes innées (ILC) - 47 -
Lignée cellulaire A549 et conditions de culture - 47 -
Infection directe des ILCs par vecteurs adénovirus - 47 -
Stimulation indirecte des ILCs par les Mo-DCs/cellules A549 - 48 -
Formation des complexes Ig - HAdVs - 48 -
Cytométrie en flux - 49 -
Criblage de cytokines (Cytometric Beads Assay) - 50 -
Analyses statistiques - 51 -
IV. RESULTATS - 52 -
1) Isolation et caractérisation des ILCs à partir de sang périphérique - 52 -
a. Comment isoler les ILCs humains circulants dans le sang périphérique ? - 52 -
b. Stratégie d'analyse phénotypique des ILCs humaines - 55 -
i. Les marqueurs d'identification - 55 -
ii. Récepteurs aux HAdVs - 56 -
iii. Récepteurs et marqueurs d'activation cellulaire - 58 -
2) Les ILCs peuvent être infectées puis activées par les HAdVs - 63 -
a. Infection des ILCs par l'HAdV-C5, -D26 et -B35 - 63 -
b. Infection des ILCs par les HAdVs en présence d'Ac spécifique - 64 -
c. Profils d'activation des ILCs par les HAdVs - 68 -
i. Expression du CD69 - 68 -
ii. Expression du CD161 - 71 -
iii. Distribution des ILCs - 73 -
iv. Criblage des cytokines sécrétées après une infection par les HAdVs - 74 -
v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une infection par les HAdVs - 77 -
3) Profils d'activation des ILCs suite à l'infection des cellules épithéliales par les HAdVs - 78 -
a. Profils d'activation des cellules épithéliales suite à l'infection par les HAdVs - 78 -
i. Infections des cellules A549 par les HAdVs - 78 -
ii. Expression du CMH-I par les cellules A549 - 79 -
b. Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation indirecte - 80 -
i. L'expression du CD69 - 81 -
ii. L'expression du CD161 - 84 -
iii. Distribution des ILCs - 84 -
iv. Criblage des cytokines sécrétées après une indirecte par les cellules A549 infectées par les HAdVs - 85 -
v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par les cellules A549 dans un contexte d'infection par différents HAdVs - 88 -
4) Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation par des DC infectées par les HAdVs - 89 -
a. Profils d'activation des DC à la suite d'une infection par les HAdVs - 89 -
i. Infections des DC par les HAdVs - 89 -
ii. Expression du CD83 et du CD86 - 90 -
b. Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation indirecte par les DC - 92 -
i. L'expression du CD69 - 92 -
ii. L'expression du CD161 - 95 -
iii. Distribution des ILCs - 95 -
iv. Criblage des cytokines sécrétées après une indirecte par les DC infectées par les HAdVs..... - 95 -

v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par les DC dans un contexte d'infection par différents HAdVs ..... *- 98 -*
5) Synthèse des résultats ..... - 99 -
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... **- 101 -**
Enrichissement et culture des ILCs ..... - 102 -
Récepteurs cellulaires aux HAdVs ..... - 103 -
Infection des ILCs par les HAdVs ..... - 104 -
Marqueurs d'activation ..... - 104 -
Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et antivirales ..... - 105 -
Distribution des ILCs ..... - 108 -
Stimulation indirecte des ILCs ..... - 109 -
Immunité préexistante ..... - 110 -
Perspectives ..... - 111 -
Conclusion ..... - 113 -
VI. FIGURES SUPPLEMENTAIRES ..... **- 114 -**
VII. ANNEXES ..... **- 132 -**
1) Annexe 1: Infection par les HAdVs et la réponse immunitaire associée ..... - 132 -
2) Revue 1: A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence ..... - 135 -
3) Article 1: Seroprevalence of Neutralizing Antibodies against Adenoviruses type -C5, -D26 and -B35 in Healthy and HIV-Infected Adults and Children from Burkina Faso and the Republic of Chad: impact on the use of HAdV-derived vaccines (soumis) ..... - 152 -
4) Article 2: Lactoferrin retargets human adenoviruses to TLR4 to induce an abortive NLRP3-associated pyroptotic response in human phagocytes ..... - 180 -
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... **- 196 -**

Liste des figures

Figure 1: Schéma récapitulatif du projet de thèse ..... - 17 -
Figure 2: Schéma de la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection par les HAdVs ... - 20 -
Figure 3: Voie de différenciation des cellules lymphoïdes innées (ILCs) à partir d'une cellule souche hématopoïétique ..... - 22 -
Figure 4: Description et fonction des ILC1, ILC2 et ILC3 chez l'Homme ..... - 25 -
Figure 5: Acteurs de la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection par les HAdVs au niveau du tractus pulmonaire ..... - 27 -
Figure 6: Schéma des jonctions présentes au niveau des cellules épithéliales ..... - 28 -
Figure 7: Récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et dans l'induction de la réponse immunitaire adaptée ..... - 29 -
Figure 8: Représentation de l'activation des cellules dendritiques ..... - 33 -
Figure 9: Classification des HAdVs selon l'espèce et le tropisme ..... - 36 -
Figure 10: Structure des HAdVs et des vecteurs exprimant la GFP ..... - 37 -
Figure 11: Estimation de la séroprévalence des HAdVs utilisés sous forme de vecteur ..... - 41 -
Figure 12: Schéma de l'organisation du génome des HAdVs ..... - 42 -
Figure 13: Représentation schématique du protocole d'isolation des ILCs à partir de sang périphérique humain et rendement ..... - 52 -
Figure 14: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de sang frais par cytométrie en flux ..... - 54 -
Figure 15: Stratégie d'analyse phénotypique des ILCs humaines fraichement enrichies à partir de sang frais par la technique de cytométrie en flux ..... - 55 -
Figure 16: Expression des récepteurs candidats aux HAdVs: CAR, DC-SIGN, CD46, CD49d et CD16 par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 57 -
Figure 17: Expression de différents TLRs par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 59 -
Figure 18: Expression des CMH-I (HLA-ABC) et CMH-II (HLA-DR) par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 60 -
Figure 19: Expression de différents marqueurs d'activation CD69, CD161, CD80 et CD86 par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 61 -
Figure 20: Tableaux récapitulatifs des résultats de quantification des différents récepteurs et marqueurs étudiés dans la première partie du projet ..... - 63 -
Figure 21: Evaluation de la capacité d'infection des ILCs par les HAdVs-GFP ..... - 64 -
Figure 22: Evaluation de la capacité d'infection des ILCs par les HAdVs-GFP en présence d'anticorps (AcN) ..... - 66 -
Figure 23: Représentation schématique de la capacité d'infection des ILCs humaines par les HAdVs en présence ou non d'Ac (AcN) ..... - 67 -
Figure 24: Expression du marqueur d'activation CD69 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 69 -
Figure 25: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'Ac (AcN) ..... - 70 -
Figure 26: Expression du CD161 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 72 -
Figure 27: Distribution des ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 74 -
Figure 28: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une infection par les HAdVs ..... - 75 -

Figure 29: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 76 -
Figure 30: Synthèse de l'activation/stimulation des ILCs après une infection par les HAdVs ..... - 78 -
Figure 31: Capacité d'infection des cellules A549 par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 79 -
Figure 32: Expression du CMH-I par les cellules A549 après une infection par les HAdVs..... - 80 -
Figure 33: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les surnageants des cellules A549 infectées par les HAdVs ..... - 83 -
Figure 34: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs ..... - 86 -
Figure 35: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les surnageants des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 87 -
Figure 36: Synthèse de la réponse mise en place par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs ..... - 89 -
Figure 37: Capacité d'infection des DC par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) .... - 90 -
Figure 38: Expression des marqueurs de maturation CD83 et de costimulation CD86 par les DC après une stimulation par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 91 -
Figure 39: Expression du CD69 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant de DC stimulées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)..... - 93 -
Figure 40: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les DC stimulées par les HAdVs ..... - 94 -
Figure 41: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC stimulées par les HAdVs ..... - 96 -
Figure 42: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs..... - 97 -
Figure 43: Synthèse récapitulative de la réponse mise en place par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC stimulées par les HAdVs ..... - 99 -
Figure 44: Représentation schématique du protocole de stimulation des ILCs en co-culture après une infection des cellules A549 par les HAdVs ..... - 112 -

Figures supplémentaires

Figure S1: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de couches leuco-plaquettaires par cytométrie de flux..... - 114 -
Figure S2: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de sang frais par cytométrie de flux ..... - 115 -
Figure S3: Evaluation de l'efficacité du protocole d'enrichissement des ILCs humaines par cytométrie de flux ..... - 116 -
Figure S4: Milieux testés pour la culture des ILCs et l'expression du marqueur CD127 ..... - 117 -
Figure S5: Observation des ILCs fraîchement enrichies à partir de sang frais par cytométrie en flux ..... - 118 -
Figure S6: Expression de CAR et DC-SIGN par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 119 -
Figure S7: Expression du CD46 et du CD49d (intégrine α4) par les ILCs humaines du sang périphérique ..... - 120 -
Figure S8: Expression du CD16 et de la DSG2 par les ILCs humaines du sang périphérique..... - 121 -
Figure S9: Expression de différents TLRs par les ILCs humaines de couches leuco-plaquettaires ..... - 122 -

Figure S10: Efficacité d'infection des ILCs humaines par l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35 ..... - 123 -
Figure S11: Tableaux récapitulatifs d'infection et d'activation/stimulation des ILCs par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 124 -
Figure S12: Expression du marqueur d'activation CD69 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 125 -
Figure S13: Tableaux récapitulatifs des résultats d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 126 -
Figure S14: Expression du CD161 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 127 -
Figure S15: Distribution des ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 128 -
Figure S16: Tableaux récapitulatifs des résultats d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) - 129 -
Figure S17: Expression du marqueur d'activation CD161 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) .. - 130 -
Figure S18: Distribution des ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN) ..... - 131 -

Annexe 1: Réponse immunitaire innée induite par une infection par les HAdVs ..... - 134 -

Listes des abréviations

ADN	*Acide Desoxyribonucléique*
AcN	*Anticorps Neutralisants*
Ag	*Antigène*
ALR	*AIM2-like receptor/ Récepteur AIM2-like*
APC	*Antigen-presenting cell/ Cellule présentatrice de l'antigène*
ARNm	*ARN messager*
BCR	*B cell receptor/ Récepteur des cellules B*
CAR	*Coxsackievirus-Adenovirus Receptor/ Récepteur des Coxsackievirus-Adénovirus*
CILP	*Common helper-like ILC precursor/ Précurseur commun aux ILCs*
CLP	*Common lymphocyte progenitor/ Progéniteur commun lymphoïde*
CMH-I/-II	*Complexe majeur d'histocompatibilité de classe -I ou de classe -II*
DAMPs	*Damage-Associated Molecular Patterns/ Motifs moléculaires associés aux dégâts*
DC	*Dendritic Cells / Cellules dendritiques*
DSG2	*Desmogléine 2*
FcRc	*Récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines*
HAdVs	*Human Adenovirus / Adénovirus humains*
HNP-1	*Human Neutrophil Peptide-1*
Id2	*Inhibitor of DNA binding 2*
Ig	*Immunoglobuline*
ILC	*Innate Lymphoid Cells/ Cellules lymphoïdes innées*
LPS	*Lipopolysaccharide*
LyB	*Lymphocytes B*
LyT	*Lymphocytes T*
- **Th1**	*T helper cells 1/ Lymphocytes T auxiliaires 1*
- **Th2**	*T helper cells 2/ Lymphocytes T auxiliaires 2*
- **Th17**	*T helper cells 17/ Lymphocytes T auxiliaires 17*
LTc	*Lymphocytes T cytotoxiques*
Mo-DC	*Monocyte-derived DC/ DC dérivés de monocytes*
Nfil3	*Nuclear factor interleukin 3 regulated*
NK	*Natural Killer (cells)*
NKT	*Natural Killer T cell/ Lymphocytes NKT*

NLR	*Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptor/ Récepteur NOD-like*
PAMPs	*Pathogen-Associated Molecular Patterns/ Motifs moléculaires associés aux pathogènes*
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cells / Cellules mononucléées du sang périphériques*
pDC	*Plasmocytoid DC/ DC plasmocytoïdes*
PRR	*Pattern recognition receptor/ Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires*
TLR	*Toll-like receptor/ Récepteur Toll-like*
TCR	*T cell receptor/ Récepteur des cellules T*
Tox	*Thymocyte selection-associated high mobility group box*

Préface

Résumé

Au cours de la dernière décennie, une nouvelle population cellulaire impliquée dans l'immunité innée a été identifiée chez la souris puis confirmée chez l'Homme. Ces cellules appelées cellules lymphoïdes innées (ou ILCs pour Innate Lymphoid Cells) sont caractérisées par une morphologie lymphoïde. Depuis 2013 une nomenclature a été proposée en fonction des similitudes de l'expression des facteurs de transcription et des profils de cytokines avec les lymphocytes T $CD4^+$. Il existe actuellement 3 groupes d'ILCs: ILC1, ILC2 et ILC3, qui reflètent respectivement les lymphocytes T $CD4^+$ Th1, Th2 et Th17/22.

Les études sur les ILCs ont été principalement réalisées chez la souris, tandis que l'étude des ILCs chez l'Homme aborde principalement leur rôle lors d'une réponse anti-allergique ou pro-inflammatoire. Les ILCs jouent un rôle crucial dans diverses fonctions biologiques et immunitaires. Elles sont impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium et de l'homéostasie, la réparation des tissus, ainsi que dans la réponse rapide contre les pathogènes. Les ILCs se trouvent dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes situés à travers l'organisme, mais principalement dans les tissus muqueux et la barrière de surface. Elles représentent l'une des premières cellules immunitaires rencontrées par les agents pathogènes. Cette multifonctionnalité suggère un rôle potentiel des ILCs lors des réponses antivirales.

Dans cette étude, je me suis intéressée à l'implication des ILCs dans une réponse adénovirale. Les infections à adénovirus sont l'une des infections les plus courantes dans toutes les populations, conduisant à la présence d'une immunité bien caractérisée. Nous examinons les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les anticorps, les ILCs et les adénovirus lors d'interactions dans le cadre de primo-infections et de vaccination.

Abstract

In the last decade a new cell population involved in innate immunity was identified in mice and then confirmed in humans. These cells dubbed innate lymphoid cells (or ILCs) are characterized by a lymphoid morphology. Since 2013 a nomenclature was proposed according to the similarities of the transcription factor expression and cytokines profiles to $CD4^+$ T cells. There are currently 3 groups of ILCs: ILC1, ILC2 and ILC3, which mirror of the Th1, Th2 and Th17/22 $CD4^+$ T cells, respectively.

ILCs studies have been performed most in mice, while the study of ILCs in humans mainly address their role during an anti-allergic or pro-inflammatory response. ILCs have a crucial role within various biological and immune functions. They are involved in maintaining the integrity of the epithelium and homeostasis, tissue repair, as well as in the rapid response against pathogens. ILCs are in lymphoid and non-lymphoid tissue located through the organism but mostly in mucosal tissue and surface barrier. They represent one of the first immune cells that pathogens encounter. This multi-functionality suggests a potential role of ILCs during antiviral responses.

In this study, I was interested by the implication of ILCs in an adenovirus response. Adenovirus infections are one of the most common infections in all populations leading to the presence of well characterized immunity. We are examining the epithelial cells, dendritic cells, antibodies, ILCs and adenovirus during interaction in the context of primo-infections and vaccination.

I. Objectifs de recherche

Au cours de ma thèse j'ai pu travailler sur différentes études dont une qui a débuté lors de mon stage de master 2 au sein de cette équipe. Cette étude correspond au projet principal de thèse de Mme Aline Ouoba. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'activation des cellules dendritiques (DC) par des complexes immunoglobulines (Ig) - adénovirus. Les infections par adénovirus humains (HAdVs) sont très répandues à travers le monde et aujourd'hui ils représentent un outil de traitement en santé humaine (vaccination, thérapies géniques notamment) largement utilisé. Cependant, pendant une infection virale, l'organisme met en place une réponse immunitaire spécifique *(voir paragraphe II.1)*. Cette immunité peut interférer avec le processus de vaccination utilisant des vecteurs dérivés d'HAdVs *(voir paragraphe II.4)*.

En vue des informations acquises lors de cette étude *(voir les annexes Revue 1 et Article 1)*, nous nous sommes interrogés sur le potentiel rôle d'une nouvelle population cellulaire impliquée dans l'immunité innée dans le même contexte, les cellules lymphoïdes innées (ou ILCs). Quelques études ont suggéré un rôle des ILCs lors de la mise en place de la réponse immunitaire suite à une infection par le virus influenza chez la souris[1,2,3]. Cependant la transposition de ces études chez l'Homme n'a pas encore été mise en évidence. Plus globalement, les connaissances sur l'impact des ILCs lors de la mise en place d'une réponse antivirale chez l'Homme sont encore très vagues. D'où la nécessité de s'intéresser à ces acteurs de l'immunité innée dans ce contexte de santé. L'enjeu de l'immunité préexistante dans la réussite des différents traitements basés sur les vecteurs d'HAdVs, notamment la vaccination, n'est pas négligeable. Voilà pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle des ILCs lors d'une infection par HAdVs dans un premier temps puis leur rôle de manière plus physiologique en coopération avec d'autres acteurs de l'immunité innée, en particulier les cellules épithéliales et les DC. Pour finir, l'impact de l'immunité préexistante sur la réponse mise en place par les ILCs dans cette dynamique immunitaire a aussi été étudié.

En parallèle, j'ai également pu participer à l'exploration de l'impact des peptides antimicrobiens (HNP-1 et lactoferrine) sur les infections adénovirales chez les DCs *(voir l'annexe Article 2)*. J'ai ensuite pu transposer cette étude au modèle ILCs (études préliminaires non présentées).

Le plan d'étude du rôle des ILCs lors d'une infection par adénovirus a été le suivant :

1. Dans un premier temps il était important d'apprendre à isoler, garder en culture et manipuler ce nouveau type cellulaire. Chez l'Homme nous retrouvons un très faible pourcentage de cellules dans le sang circulant. La rareté des ILCs dans le sang périphérique a été un point déterminant dans le choix de la technique utilisée. La première étape a donc été de mettre en place un protocole d'isolation et d'optimiser leur maintien en culture. Puis les questions sur les proportions d'ILCs présentes dans le sang périphérique ainsi que leurs caractéristiques ont été abordées.
2. La deuxième étape consistait à étudier si les ILCs pouvaient être directement infectées et activées par des adénovirus, ainsi que leurs profils d'activation. L'infection des ILCs par des HAdVs était encore méconnue. Leurs profils d'activation lors d'une réponse immunitaire antivirale étaient eux aussi peu décrit. Voilà pourquoi la question est primordiale dans un contexte où les ILCs semblent être impliquées dans l'orientation de l'immunité adaptative suite à une infection virale (mais aussi bactérienne et parasitaire)[4,5,6].
3. Ensuite, le profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par des cellules épithéliales préalablement infectées par des adénovirus a été étudié. Les ILCs étant majoritairement retrouvées dans les différents compartiments muqueux de l'organisme, le choix d'étudier des cellules épithéliales semble être le plus adapté. Étant donné qu'une partie importante des vecteurs adénoviraux utilisés en thérapies ont pour tropisme les cellules pulmonaires (notamment les HAdVs des espèces C et D), l'étude des cellules épithéliales pulmonaires a été opté. De plus, beaucoup d'études concernant l'infection des cellules pulmonaires par les HAdVs sont disponibles permettant ainsi d'avoir des bases solides pour l'étude de l'activation indirecte des ILCs par les cellules épithéliales pulmonaires.
4. De la même façon, le profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par des DC préalablement incubées avec des adénovirus a été étudié. De précédentes études chez la souris ont montré une coopération entre les DC et les ILCs au cours de la réponse immunitaire[7,8,9]. Nous souhaitons étudier les conséquences de la communication entre les DC et les ILCs sur leurs activations lors d'une réponse antivirale chez l'Homme.
5. En parallèle, l'impact de l'immunité préexistante sur l'activation des ILCs contre différents HAdVs sera évaluée et les conséquences dans l'utilisation de vecteurs

adénoviraux en vaccination seront discutées. De précédentes études ont mise en évidence la notion d'immunité préexistante[10] mais ont également montré l'impact de cette immunité préexistante sur la maturation/l'activation des DC au cours de la réponse antivirale[11]. Ces études décrivent notamment que la présence d'anticorps neutralisants (AcN) contre un adénovirus utilisé en tant que vecteur modifie non seulement le profil d'activation des DC mais aussi l'activation des lymphocytes T par ces derniers[12], et plus globalement l'activation de l'immunité adaptative[13].

6. La dernière étape consiste à étudier et comparer le profil d'activation des ILCs en coculture avec les configurations précédemment étudiées. Ainsi, le rôle des ILCs lors de la mise en place d'une réponse antivirale pourra être mieux appréhendé (*non présenté*).

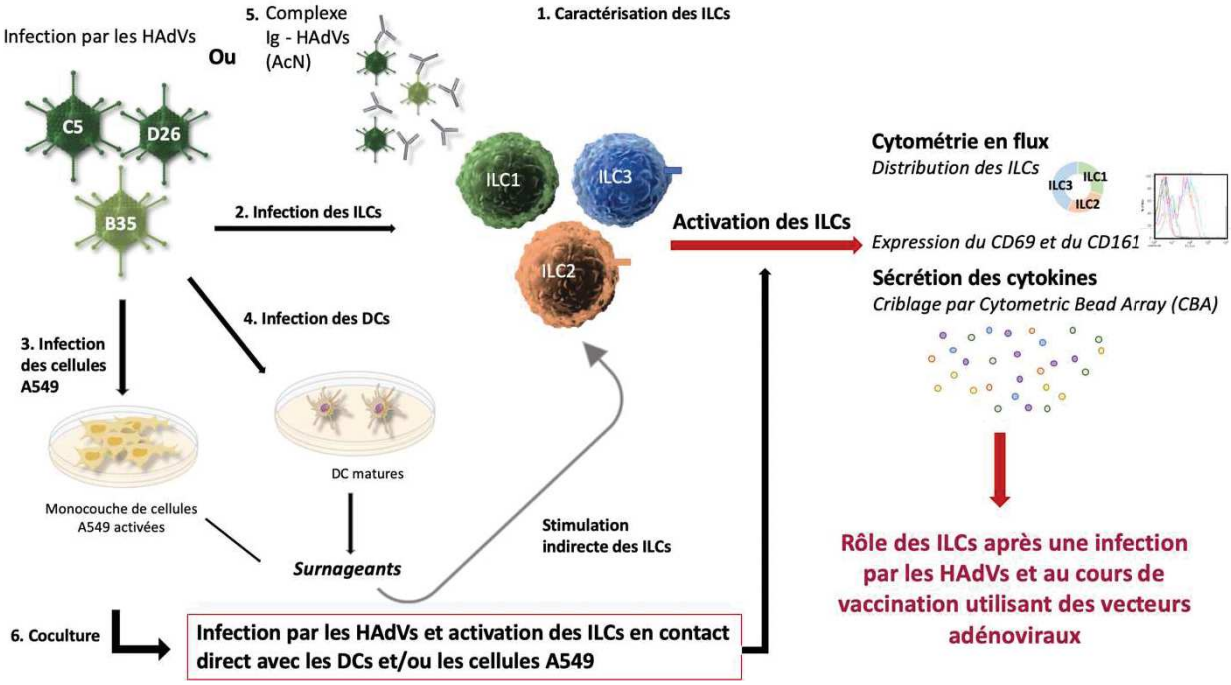


Figure 1: Schéma récapitulatif du projet de thèse
Récapitulatif du plan de recherche avec les différentes étapes effectuées et les techniques utilisées

II. INTRODUCTION

1) La réponse anti-adénovirus préexistante

Normalement, lors d'une infection microbienne, notre organisme met en place une réponse immunitaire afin de contrôler le pathogène. L'immunité est classiquement séparée en deux grandes voies : innée (ou immédiate) et adaptative (ou tardive). Selon la nature du microorganisme, la réponse immunitaire adaptative pourra être adaptée au pathogène. Nous nous intéresserons plus spécifiquement aux infections par les HAdVs. Les infections par les HAdVs sont fréquentes et la plupart des individus peuvent posséder une immunité spécifique dirigée contre un ou plusieurs types d'adénovirus. L'immunité préexistante de l'hôte pourrait alors modifier l'efficacité et/ou la toxicité des vecteurs thérapeutiques dérivés des HAdVs[14,15,16].

Au cours d'une première infection virale ou primo-infection, l'organisme va mettre en place une réponse pouvant créer une mémoire immunitaire[17,18]. Le système immunitaire inné va détecter la particule virale par l'intermédiaire de *pattern recognition receptors* (PRR) incluant les récepteurs Toll-like (TLR) dont les TLR2, 3, 4, 7 et 9[15,19,20] ***(Figure 2a)*** et le système du complément ce qui conduit à l'induction de cytokines pro-inflammatoires ***(Figure 2b)***. Les cellules présentatrices de l'antigène (APC) ***(Figure 2c)*** comme les DC *(cf paragraphe II.2.iii)* vont ensuite présenter les peptides obtenus par dégradation des particules virales aux lymphocytes T auxiliaires et aux lymphocytes T cytotoxiques (LTc) via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et de classe I (CMH-I) respectivement ***(Figure 2d)***. Les lymphocytes T auxiliaires vont à leur tour stimuler les lymphocytes B ***(Figure 2d)***, la production d'anticorps spécifiques et la génération d'une mémoire immunitaire durable[21,13] ***(Figure 2e)***. Bien que le rôle des lymphocytes T spécifiques commence à être étudié, la composante humorale de la réponse immunitaire anti-adénovirale semble majoritairement incriminée dans les mécanismes de neutralisation et de toxicité parfois observé lors de l'utilisation de vecteurs adénoviraux[17,22].

Lors d'une seconde infection ou de l'administration d'un vecteur thérapeutique, les anticorps spécifiques à l'HAdV d'intérêt vont former des complexes Ig - HAdVs[12,23,11] ***(Figure 2f)***. Ces complexes vont être directement pris en charge par les DC via les récepteurs aux fragments Fc (FcRc) des immunoglobulines[24,25] ***(Figure 2g)***. Il s'en suit la dégradation des complexes Ig - HAdVs, la maturation des fragments antigéniques viraux et leur présentation

via les molécules de CMH-I et -II afin de stimuler les lymphocytes T[12,13,26] ***(Figure 2h)***. Ces complexes Ig - HAdVs induisent également la mort d'une partie des DC par pyroptose[11] illustrant l'impact de l'immunité préexistante de l'hôte vis-à-vis de certains vecteurs thérapeutiques dérivés d'HAdVs[27,28]. Ainsi, au cours des thérapies géniques, la réponse immunitaire préexistante de chaque individu peut induire une réponse hyper-inflammatoire[15,29].

Afin d'éviter ou de contourner les effets indésirables de l'immunité préexistante de l'hôte lors de l'administration de vecteurs dérivés des HAdVs, plusieurs stratégies ont été développé telles que la sélection d'HAdVs avec différents tropismes[30,22], la construction de vecteurs chimériques[31,29], ou encore la modification directe du génome et/ou des protéines de capside[19]. Supprimer les épitopes ciblés par les anticorps en modifiant les antigènes de la capside virale permet d'échapper à l'immunité préexistante et donc augmenter la puissance thérapeutique[15,29,32,28]. Effectuer des modifications génomiques ou au niveau du revêtement de la capside peut également permettre d'atténuer la reconnaissance virale et de ce fait la réponse antivirale et la toxicité[14]. Pour finir, l'utilisation de vecteur adénoviraux d'origine animale ou d'un sérotype possédant une faible séroprévalence permet de contourner la réponse immunitaire préexistante de l'hôte[33,31,34].

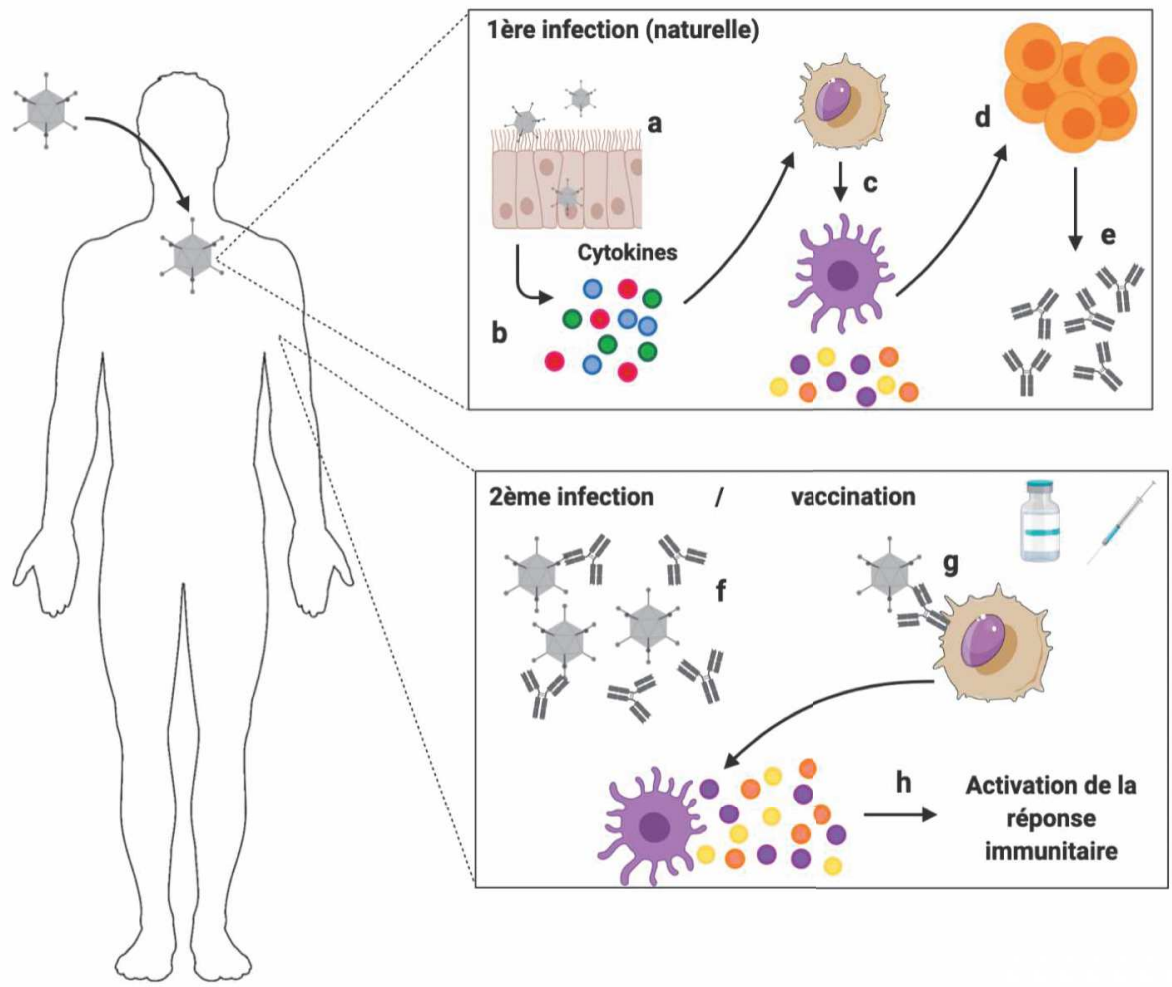


Figure 2: Schéma de la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection par les HAdVs

Première infection (*ou primo-infection*): **a.** Attachement et pénétration du virus au sein des cellules épithéliales, **b.** Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'infection virale, **c.** Maturation des cellules dendritiques (DC) par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées (immunité innée), **d.** Stimulation des lymphocytes T (Ly T) et B (Ly B) via les cytokines sécrétées par les DC activées et par présentation antigénique par les complexes CMH-I/II-peptide antigénique (immunité adaptative), **e.** Production d'anticorps spécifiques aux adénovirus par les Ly B.
Seconde infection/ vaccination: **f.** Liaison des anticorps provenant des Ly B mémoires spécifiques aux adénovirus (formation de complexes Ig - HAdVs), **g.** Fixation des complexes Ig - HAdVs aux récepteurs Fc à la surface des DC, internalisation des complexes et stimulation des DC, **h.** Activation de la réponse immunitaire spécifique aux HAdVs de façon plus rapide et plus intense que lors de la primo-infection.

Pour plus d'informations sur voies de détection du système immunitaire reconnaissant le virus par les cellules infectées voir l'Annexe 1.

2) Les acteurs et médiateurs de l'immunité innée impliqués dans la réponse anti-adénovirale

L'immunité innée correspond à la mise en place des premiers mécanismes à large spectre contre les pathogènes et également à l'orientation de l'immunité adaptative. Parmi les acteurs importants de cette réponse, nous comptons entre autres les cellules épithéliales[35], les DC[36] et les ILCs[37]. Contrairement aux cellules épithéliales et dendritiques[14,19], le rôle des ILCs est encore très mal caractérisé face aux infections virales chez l'Homme et sont au centre de ma thèse.

i. Les cellules lymphoïdes innées (ILC)

a. Origine des ILCs

En 2010, une nouvelle lignée immunitaire importante a été mise en lumière suite aux travaux effectué par Neill et ses collaborateurs chez la souris[38]. Ils ont découvert un type cellulaire capable de sécréter des cytokines de type Th2 de façon précoce après la détection de l'agent pathogène[39,40]. Ils ont appelé ces cellules des nuocytes[38]. Puis, ce même type cellulaire a été découvert chez l'Homme[1,41]. Les ILCs sont ainsi caractérisées et classifiées pour la première fois en 2013[42]. Cette classification se base sur leur profil fonctionnel et phénotypique, ce qui entraîne la distinction entre les cellules dites cytotoxiques correspondant aux cellules NK et les cellules non-cytotoxiques divisées en trois groupes : les ILC1, ILC2 et ILC3 sur la base des similarités présentes avec les lymphocytes T helper[43].

Elles dérivent d'une cellule souche qui va progressivement subir des étapes de maturation/différenciation (***Figure 3***). Chez l'Homme, les ILCs dérivent d'un précurseur hématopoïétique multipotent[44] (HSC) qui va donner lieu à un progéniteur restreint aux lignées lymphoïdes possédant un potentiel de différenciation pour les cellules T, B, NK ou ILCs mais aussi pour les DC lymphoïdes[45]. Ce progéniteur est aussi appelé progéniteur commun lymphoïde (ou CLP-like). A la suite de l'expression de certains facteurs de transcription, notamment des facteurs Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*), Tox (*thymocyte selection-associated high mobility group box*) et Nfil3 (*nuclear factor, interleukin 3 regulated*)[45,46], le progéniteur hématopoïétique va se différencier en précurseur commun aux ILCs nommé CILP (*common helper-like ILC precursor*). Le CILP ne peut pas générer de cellules NK. A noter qu'à cette étape de différenciation, le précurseur exprime non seulement l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ mais aussi le récepteur à l'IL-1 (IL-1R). L'expression du facteur Id2 est capitale car sans cette expression, le précurseur

lymphoïde est permissif à l'orientation vers la différenciation des lymphocytes T et B et non vers la différenciation en ILCs[47,48]. Il a été montré que l'induction de ce répresseur chez les progéniteurs thymiques humains, bloquait l'engagement des lymphocytes T dans leur voie de différenciation[46].

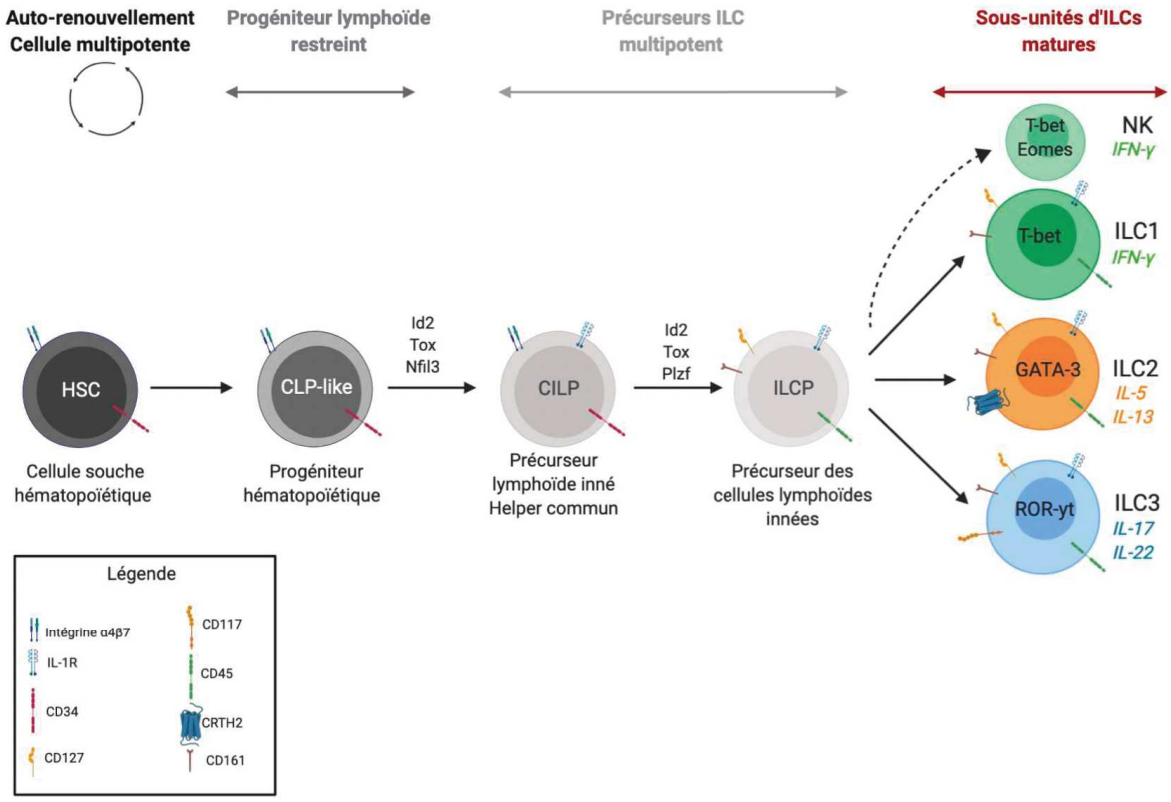


Figure 3: Voie de différenciation des cellules lymphoïdes innées (ILCs) à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Id2: Inhibitor of DNA binding 2, Nfil3: Nuclear factor, interleukine 3 regulated, Tox: Thymocyte selection-associated high mobility group box, CD34: marqueur de purification des cellules souches, CD45: marqueur des cellules nucléées d'origine hématopoïétique, CD127: chaîne α du récepteur de l'IL-7 , CRTH2: récepteur de la prostaglandine D2, CD117: proto-oncogène impliqué dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire, CD161 (= KLRB1; Killer cell Lectin-like Receptor subfamily B member 1): récepteur de la famille des lectines C exprimé sur la majorité des cellules NK

Le précurseur des ILCs (ou ILCP) exprime donc entre autres Id2 mais également le CD161 et le CD127, marqueur majeur de l'identification des ILCs. Les ILCP sont retrouvés au niveau de la circulation sanguine et également de quelques tissus.

Pour finir, à ce niveau de différenciation, les ILCP sont capables de donner les trois sous populations ILC1-3, en fonction des différents signaux environnementaux perçus par les précurseurs. Chez l'Homme, ainsi que chez les souris, nous pouvons observer une distribution hétérogène des différents groupes à travers différents organes (poumons, foie, rate, intestins,

peau et sang périphérique)[47]. Ces cellules sont « rares » au niveau du sang périphérique (~ 0,07% des cellules leucocytaires $CD45^+$[49] et 0,01 - 0,1% des lymphocytes chez l'adulte[37,50]), mais nous pouvons les retrouver en plus grandes proportions au niveau des compartiments muqueux[47].

En résumé, chez l'Homme, les ILCs sont tous Lin^- $CD45^+$ $CD127^+$ puis selon leur groupe, ils expriment de façon différentielle le CRTH2 et le CD117[51,37]. Le critère Lin^- signifie que les ILCs n'expriment pas de marqueurs d'identification des lignées cellulaires connues telles que les monocytes (CD14), les lymphocytes T (CD3), les lymphocytes B (CD19-CD20). Les ILC1 sont définis comme $CRTH2^-$ $CD117^-$, les ILC2 comme $CRTH2^+$ $CD117^{+/-}$, et les ILC3 comme $CRTH2^-$ $CD117^+$[52]. Le CD45 est exprimé par la plupart des cellules nucléées d'origine hématopoïétique, tandis que le CD127 correspond à la chaine α du récepteur de l'IL-7, cytokine nécessaire et impliquée dans le développement des ILCs *(cellules NK non comprises)*. Le CRTH2 correspond au récepteur de la prostaglandine D2, molécule sécrétée par les mastocytes au cours d'une réponse allergique et inflammatoire. Enfin, le CD117 est un proto-oncogène impliqué dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire ***(Figure 3)***.

b. Rôle des ILCs

A travers la littérature, les ILCs semblent avoir un rôle lors de la première ligne de défense contre les pathogènes[53,54]. Les ILCs sont localisées de manière stratégique à l'interface entre l'environnement et l'organisme, c'est à dire au niveau des compartiments muqueux[55]. Les ILCs sont capables de répondre de façon précoce à un pathogène notamment via la sécrétion de cytokines qui vont initier une réponse en synergie avec les cellules myéloïdes[7]. Les ILCs sont donc activées par la présence de cytokines ou chimiokines dans le milieu, préalablement sécrétées par les cellules épithéliales ou d'autres cellules de l'immunité innée activées[55]. Outre leur rôle dans un contexte pathologique, les ILCs sont aussi impliquées dans le maintien de l'homéostasie et l'intégrité de la barrière épithéliale, ou encore la réparation et le modelage tissulaire[37]. Cette ambivalence fait de ces cellules des acteurs émergeants clés dans la régulation et le maintien global de l'organisme[56]. Chez l'Homme, les trois groupes d'ILCs sont basés sur leur homologie avec les groupes de lymphocytes T helper[57]. Le groupe d'ILC1 est composé des cellules NK qui ont une activité cytotoxique et les ILC1 qui sont non-cytotoxiques, c'est-à-dire qu'ils ne sécrètent ni de granzyme B, ni de perforine. Les ILC1 expriment le facteur de

transcription T-bet contrairement aux cellules NK qui expriment en plus de T-bet le facteur de transcription Eomes[47,56]. Le facteur de transcription T-bet est exprimé par les lymphocytes Th1 impliqués généralement dans la réponse antivirale et auto-immune[58]. Les ILC1 sont capables de sécréter des cytokines de type *Th1-like* dont l'IFNγ et le TNF au cours d'une réponse auto-immune, suite à une infection, ou encore lors d'inflammation chronique[37,47] ***(Figure 4)***.

Le développement des ILC2 dépend de l'expression du facteur de transcription GATA-3[59]. Au cours d'une infection ou bien de pathologies plutôt pulmonaires[60], ils sont capables de sécréter des cytokines de type *Th2-like* notamment l'IL-5 et l'IL-13 [47,57]***(Figure 4)***.

Quant aux ILC3, l'expression du facteur de transcription ROR-γ*t* est requis pour leur développement. Lors d'infection ou bien de pathologies plutôt intestinales[61], les ILC3 produisent des cytokines de type *Th17-like* dont l'IL-17 et l'IL-22 pouvant induire une tolérance immunitaire[62] et un retour à l'homéostasie tissulaire[47,57] ***(Figure 4)***. Nous pouvons donc dire à travers cette description que les ILCs sont des cellules innées miroirs aux lymphocytes T avec un rôle pivot dans l'orientation de l'immunité adaptative[42]. Les cellules NK semblent être les homologues des lymphocytes T $CD8^+$, et quant aux ILC1, ILC2, ILC3 les homologues respectifs des lymphocytes T helper $CD4^+$ Th1, Th2, Th17/22[63]. Il est également important de noter que les ILCs partagent de nombreux gènes dont des master gènes, des gènes régulateurs avec les lymphocytes T[56].

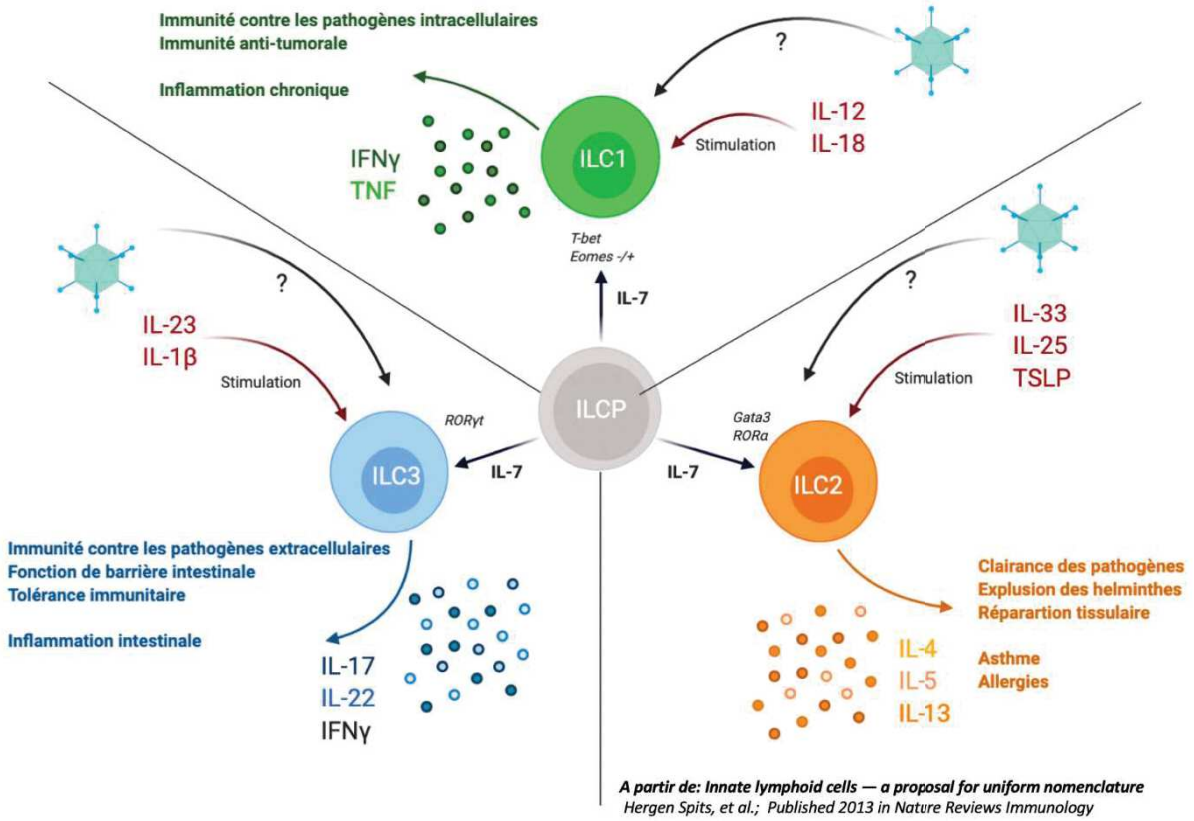


Figure 4: Description et fonction des ILC1, ILC2 et ILC3 chez l'Homme
Les ILC1 sont stimulées par la présence d'IL-12 et d'IL-18 dans le milieu et vont être impliquées dans l'immunité contre les pathogènes intracellulaires, l'immunité anti-tumorale et lors d'inflammation chronique. Au cours de la réponse, les ILC1 vont sécrétées de l'IFNγ et du TNF. Les ILC2 sont stimulées par la présence d'IL-33, d'IL-25 et de TSLP dans le milieu et vont être impliquées dans la clairance des pathogènes, l'expulsion des helminthes et lors de la réparation tissulaire. Au cours de la réponse, les ILC2 vont sécrétées de l'IL-5, l'IL-13 et de l'IL-4 en plus faible quantité. Les ILC3 sont stimulées par la présence d'IL-23 et d'IL-1β dans le milieu et vont être impliquées dans l'immunité contre les pathogènes extracellulaires, la tolérance immunitaire et lors d'inflammation intestinale. Au cours de la réponse, les ILC3 vont sécrétées de l'IL-17, l'IL-22 et de l'IFNγ. La réponse immunitaire mise en place par les ILCs lors d'une infection virale chez l'Homme est à approfondir.

Une autre grande caractéristique des ILCs est que, contrairement aux lymphocytes T et B, elles n'expriment pas de TCR et BCR. Cela nous amène à nous interroger sur les possibles voies d'activation de ces cellules, par contact direct avec les pathogènes ou seulement de manière indirecte via l'environnement cellulaire. Quelques études sur modèle murin ont mis en évidence l'expression d'un panel non-exhaustif de TLRs (*Toll-Like Receptor ; voir paragraphe II.2.ii.b)* sur les ILCs tels que le TLR2, 3 et 9[64] ou encore le TLR4, 5, 7 et 8[65]. Concernant l'Homme, des études ont mis en évidence l'expression des TLR2 et 9 sur les cellules NK du sang périphérique *(sachant aujourd'hui que les cellules NK appartiennent aux ILC1)*[66,67]. Spits et al. ont mis en lumière une expression fonctionnelle du TLR2 sur les ILCs ROR-γt$^+$

humaines[68]. Puis, une autre étude a montré que les ILC2 circulant exprimaient différents niveaux de transcrits pour les TLR1*, 2, 3, 4*, 5*, 6* *(* variation significative par rapport aux cellules Th2)* suite à une stimulation par un mix de ligands TLRs[69]. Il a également été observé en premier lieu chez la souris puis chez l'Homme, que les ILCs exprimaient les molécules du CMH-II[70,71]. Outres ces molécules, il existe un panel de marqueurs cellulaires que les ILCs partagent notamment avec les cellules NK[72], déjà bien connues. Il nous reste tout de même des aspects à élucider quant aux différentes molécules exprimées à la surface cellulaire des ILCs.

Pour ajouter à une complexité déjà bien présente, les ILCs sont des cellules que l'on peut qualifier de plastique[73]. La transdifférenciation permet aux ILCs de passer d'un profil cellulaire à un autre en fonction des différentes cytokines présentes dans leur environnement afin de modifier la réponse[74] (ex : ILC3 ou ILC2 -> ILC1 sous l'influence d'IL-12 lors de réponse inflammatoire notamment au niveau des intestins ; les ex-ILC3 et ex-ILC2 expriment à leur tour T-bet et sécrètent l'IFNγ[75,76]; ou encore les ILC2 -> ILC3 ou ILC1 sous l'influence respectivement du mix IL-1β, IL-23, et TGF-β ou l'IL-12 au niveau pulmonaire[55,77]).

Aujourd'hui, nous savons que très peu d'informations concernant les ILCs au cours des infections virales. Voilà de quoi attiser notre curiosité y compris lors d'infection par les HAdVs ou l'utilisation de vecteurs dérivés des HAdVs au cours des vaccinations.

ii. Les cellules épithéliales

Une des premières barrières physiques de l'organisme contre les agents pathogènes après la peau correspond au tissu épithélial composé d'un ensemble de cellules juxtaposées et étroitement liées par des systèmes de jonction[78]. On en retrouve notamment au niveau pulmonaire ou encore intestinal en bordure des muqueuses comme couche superficielle hébergeant les différents acteurs de l'immunité ***(Figure 5)***. Les cellules épithéliales sont parfois qualifiées de cellules sentinelles ou d'immunocytes car elles jouent un rôle crucial dans le déclenchement et l'orientation de la réponse anti-pathogène[79].

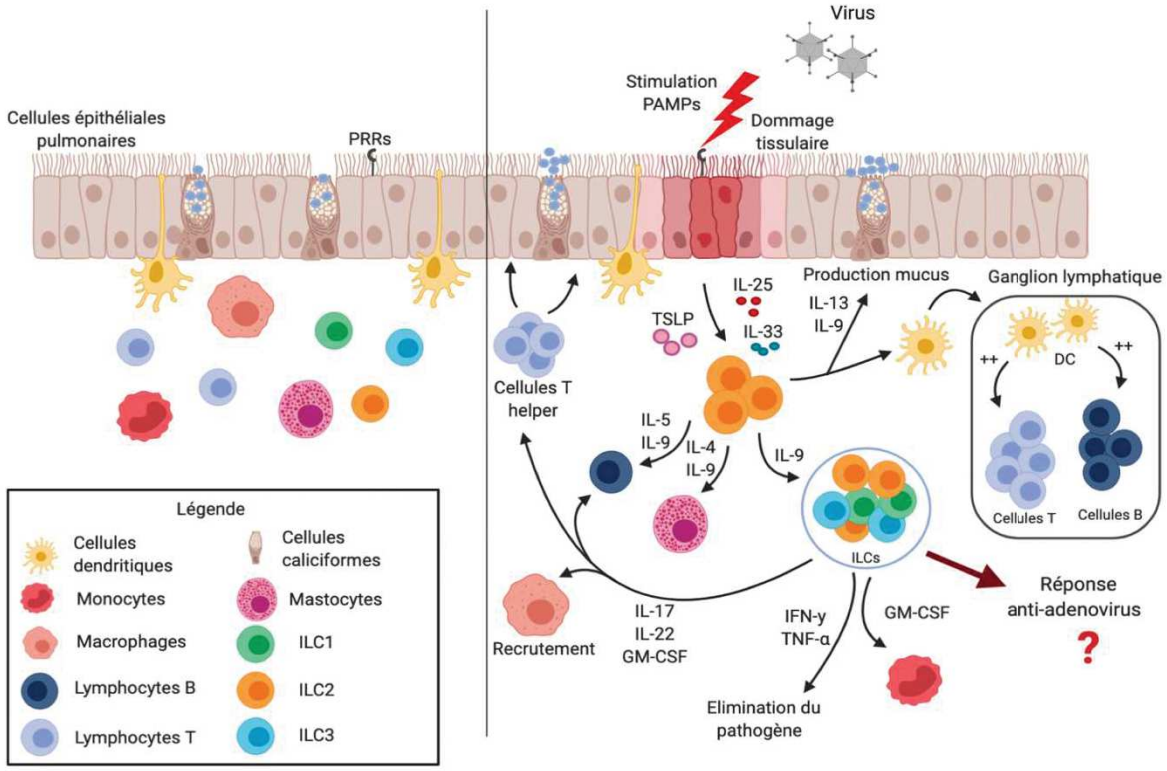


Figure 5: Acteurs de la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection par les HAdVs au niveau du tractus pulmonaire

Suite à une infection virale, les cellules épithéliales vont sécréter diverses moléculaires pro-inflammatoires (cytokines, alarmines). Ces molécules vont ensuite stimuler les autres acteurs de la réponse innée (cellules dendritiques, monocytes, macrophages) qui vont aider à l'orientation de la réponse adaptative spécifique aux HAdVs (Ly T, Ly B et production d'anticorps spécifiques). Le rôle joué par les ILCs dans la mise en place de cette réponse n'est pas encore bien définie, particulièrement chez l'Homme.

a. Les cellules épithéliales : première barrière face aux pathogènes

Plus globalement, les cellules épithéliales tapissent les surfaces internes et externes du corps ainsi que les cavités organiques[78]. L'épithélium possède une capacité de renouvellement tous les ~ 5 - 7 jours (dépendant de l'âge) lui permettant une fonction constante malgré les agressions extérieures. L'une des principales fonctions des cellules épithéliales est de protection via une barrière physique, nécessitant des contacts intercellulaires spécifiques tels que les desmosomes, les jonctions serrées, les jonctions gap ou encore les jonctions adhérentes notamment impliquées dans le maintien structural des cellules. Seules les jonctions serrées et adhérentes servent au maintien des cellules à la matrice extracellulaire sous-jacente[80,81,83] ***(Figure 6)***. Au niveau des cellules épithéliales, nous retrouvons également différents types de glycoprotéines transmembranaires impliquées dans les infections par les HAdVs: les

intégrines[82], les desmogléines[83] (localisées dans les desmosomes) et CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor).

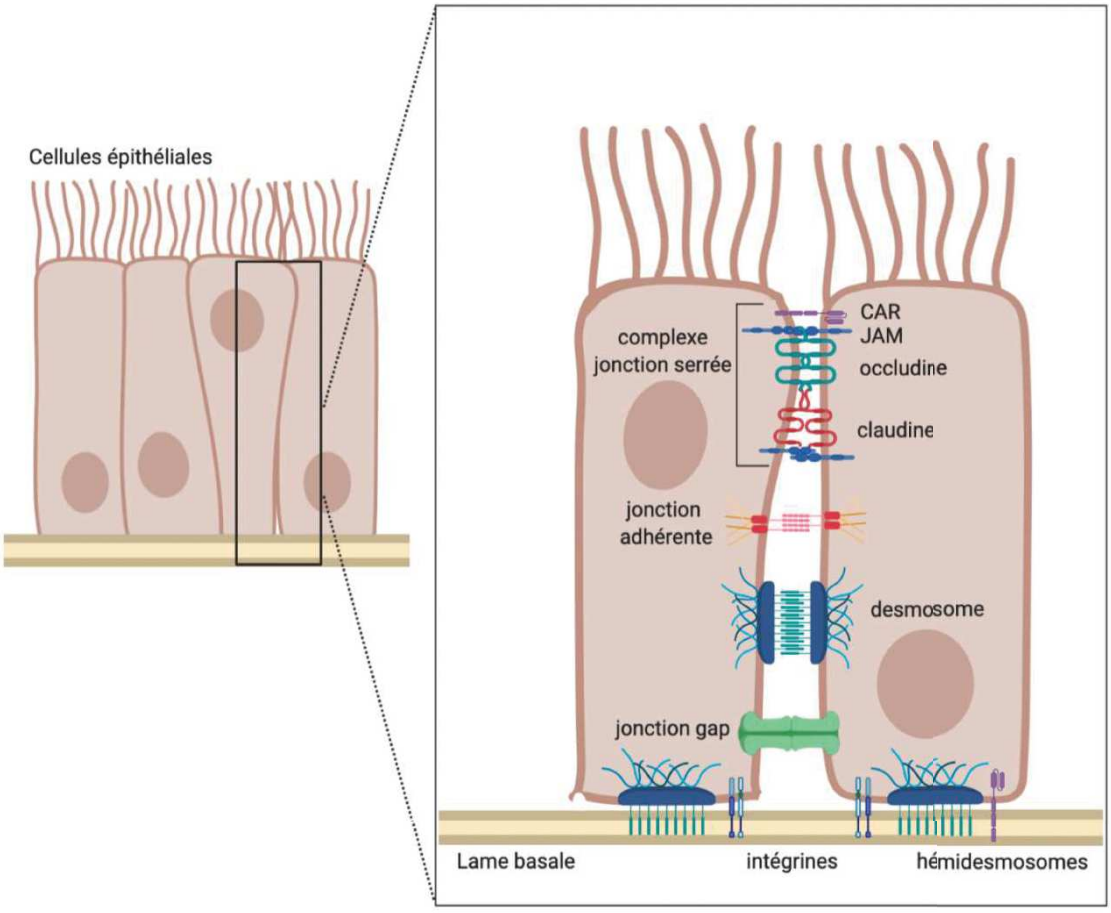


Figure 6: Schéma des jonctions présentes au niveau des cellules épithéliales
Le complexe des jonctions serrées se compose de différentes protéines membranaires dont les protéines JAM (*junctional adhesion molecule*), les protéines CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*), les occludines et les claudines ayant un rôle dans le maintien de la cohésion entre deux cellules de façon imperméable. Les jonctions d'ancrage correspondent aux jonctions adhérentes, aux desmosomes et aux hémidesmosomes et assurent l'adhésion intercellulaire ainsi que le maintien de la forme de la cellule épithéliale. Les desmosomes sont impliqués dans l'adhésion entre cellules et les hémidesmosomes sont nécessaires à l'attachement de la cellule à la lame basale. Les intégrines ont également un rôle dans l'ancrage de la cellule à la lame basale. Les jonctions gap (ou communicantes) permettent le passage de petites molécules (vitamines, acides aminés, etc) entre cellules voisines.

Parmi les cellules épithéliales, les cellules en gobelet sécrètent du mucus qui sert de barrière physico-chimique en limitant la pénétration de certaines molécules ou micro-organismes[84], mais aussi via des protéines appelées mucines en maintenant un pH = 4[85,86]. Le mucus contient des protéines impliquées dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes[87,88] et qui sont synthétisées de façon constitutive ou inductible suite à la détection d'un agent ou motif pathogène tel que le LPS (lipopolysaccharide), ou via la détection de molécules sécrétées

par les cellules avoisinantes comme des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1β). Une fois activée, les cellules épithéliales peuvent sécréter les lysozymes, les peptides antimicrobiens[89] ou encore participer à la trancytose des immunoglobulines A (IgA)[90] (au niveau intestinal)[91]. A la suite d'une stimulation, les cellules épithéliales produisent des cytokines, y compris des chimiokines, servant de signal d'alerte pour les cellules environnantes[79] ***(Figure 5)***.

b. Rôle des cellules épithéliales dans l'induction de la réponse immunitaire

Les cellules épithéliales peuvent également détecter le « danger » et communiquer avec la flore bactérienne de la lumière intestinale par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques nommés PRRs tels que les TLRs ou encore les NLRs (*nucleotide binding oligomerization domain-like receptor*, aussi appelés NOD-like receptors) ***(Figure 7)***.

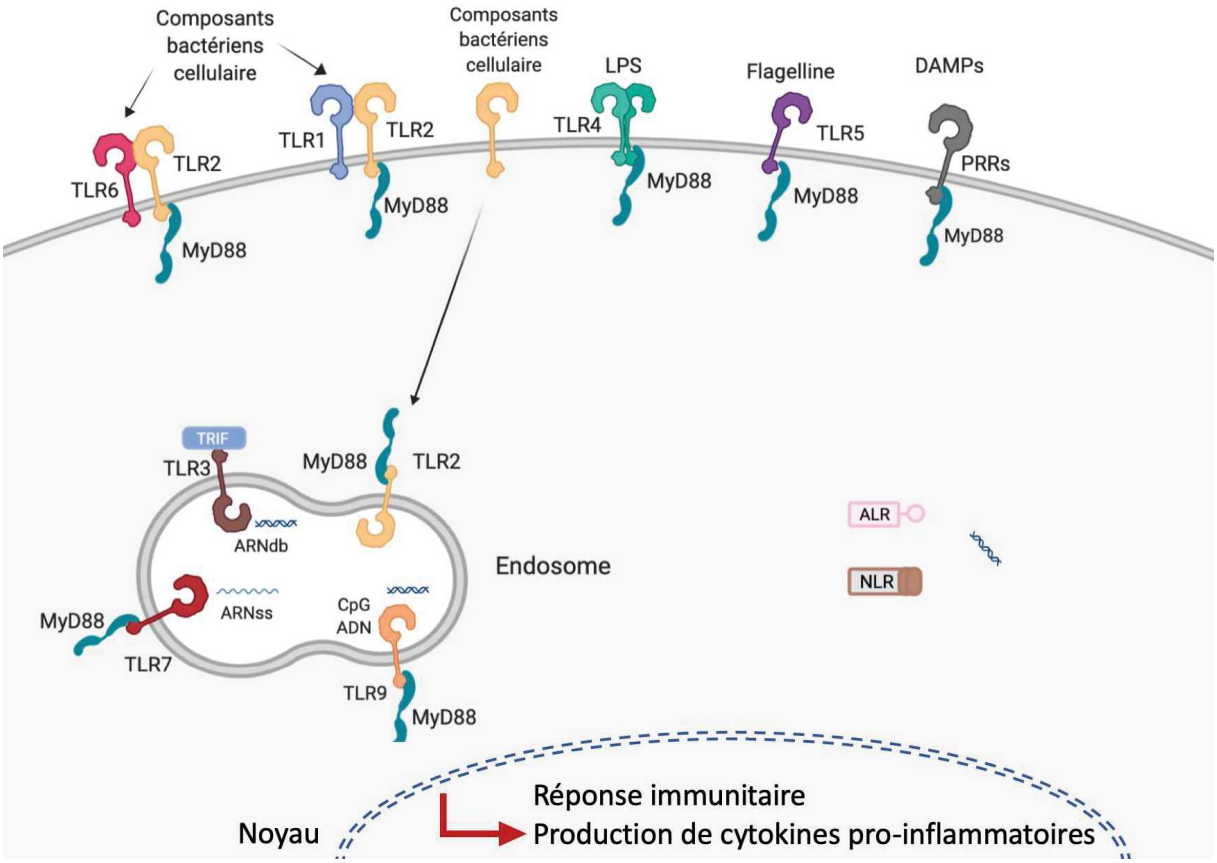


Figure 7: Récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et dans l'induction de la réponse immunitaire adaptée
La reconnaissance des pathogènes ou des composants microbiens s'effectue via des récepteurs transmembranaires à la membrane cellulaire ou endosomale comme les TLRs *(Toll-like receptors)*. Les récepteurs cytosoliques (ALRs: AIM2-like receptors; NLRs: NOD-like receptors) peuvent également reconnaître les composants microbiens dans le cytoplasme. La détection des pathogènes va entraîner la transduction d'un signal de reconnaissance aboutissant à l'induction d'une réponse immunitaire adaptée.

Les PRRs sont exprimés par la majorité des cellules nucléées de l'organisme. Les TLRs et les NLRs peuvent être différenciés entre autres par leur localisation. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires localisés à la membrane plasmique ou endosomale, tandis que les NLRs sont intracytoplasmiques[92]. Actuellement chez l'Homme nous comptons 13 membres de la famille des TLRs reconnaissant le plus souvent des composants microbiens très conservés appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)[93]. La reconnaissance des PAMPs par les TLRs conduit tout d'abord à l'activation de l'immunité innée, qui va participer à l'orientation et l'activation de l'immunité adaptative et donc à la réponse contre l'agent pathogène[94,95,96]. Aujourd'hui, 22 membres de la famille des NLRs ont été caractérisés dont 8 reconnaissant des PAMPs. L'activation de ces récepteurs a un rôle crucial dans la formation d'inflammasome[97,98], qui est un complexe qui favorise la maturation et la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 et qui est également impliqués dans le processus de pyroptose[97,99,100].

Les cellules épithéliales peuvent aussi, dans certains cas particuliers, faire fonction de cellules présentatrices de l'antigène « non-professionnelles ou facultatives », principalement dans le compartiment associé aux muqueuses. Une fois que le pathogène interagit avec le récepteur adéquat, ce dernier est internalisé puis dégradé afin d'être présenté sous forme de peptide antigénique aux lymphocytes T via les CMH-I/II. Cette étape correspond à l'apprêtement antigénique et précède la stimulation des lymphocytes T. La machinerie cellulaire des cellules épithéliales, peut également être détourné par certains virus pour échapper au système immunitaire, notamment aux LTc. Certaines protéines virales ont la capacité d'interférer avec l'expression du CMH-I à la membrane plasmique et de diminuer son expression[101]. Cette stratégie n'est pas la seule mise en place pour échapper à la réponse immunitaire. Les cellules NK répondent à l'absence ou la diminution de l'expression du CMH-I à la surface cellulaire[102,103], ce qui contraint les virus à trouver un équilibre entre « ne pas être détecté » et « ne pas stimuler » la réponse immunitaire. Ces mécanismes d'échappement immunitaire ont été bien caractérisés pour les HAdVs[104,105].

c. Les cellules épithéliales et les ILCs : partenaires lors d'une réponse anti-adénovirale ?

Les cellules épithéliales sont majoritairement décrites au cours des infections par les HAdVs car leur localisation leur confère la fonction de barrière contre les pathogènes[106,107,108]. Elles sont dites permissives à l'infection car elles expriment à leur surface cellulaire de nombreux récepteurs et corécepteurs permettant l'entrée virale[109,110,111] et permettent la réplication virale[112]. Si

les cellules épithéliales sont parmi les premières cellules à être infectés par les HAdVs et à participer au déclenchement de la réponse immunitaire[35,113,114,115,116], nous nous intéressons surtout à leur interaction avec les ILCs[117] dans un contexte d'infection naturelle ou de vaccination.

Les ILCs peuvent interagir avec les cellules épithéliales pulmonaires au cours d'infections microbiennes[1,118,119,120] ou de maladies[121,122,123,60,124] en participant à la réponse immunitaire[117,125,126] et au processus de remodelage tissulaire[117,127]. Ces études ont majoritairement été effectué chez le modèle murin. Dans ma thèse, nous décrivons principalement le rôle des ILCs humaines et de leurs interactions avec les autres acteurs de la réponse anti-adénovirale, notamment avec la lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine A549[35].

iii. Les cellules dendritiques (DC)

Les DC correspondent aux derniers acteurs ciblent de ma thèse, ce sont des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative[36].

a. Origine des DC

En 1973, Ralph Steinman a décrit pour la première fois chez la souris un nouveau type cellulaire présent en petite quantités dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer) et présentant des caractéristiques morphologiques très particulières (présence de dendrites)[128]. Dans les années suivantes, Steinman et son équipe ont montré que les DC expriment de façon constitutive les molécules de CMH-I et -II, signifiant qu'elles ont la capacité de déclencher une réponse adaptative[129,130]. De plus, les DC expriment une large gamme de PRRs leur permettant de répondre à un très large spectre de « danger » pouvant participer à la fois au déclenchement et à l'orientation de la réponse[131].

Les DC appartiennent à une famille très hétérogène. Il existe différents sous-types de DC ayant une localisation et une fonction propre[132,133,134]. Les DC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique pluripotent commun dérivant en 2 lignées : un précurseur myéloïde et un précurseur lymphoïde[132,135]. Selon la localisation des précurseurs, les environnements vont engendrer les différents sous-types de DC[136]: les DC interstitielles (localisées dans le tissu conjonctif de différents organes, les muqueuses)[137], les cellules de Langerhans (localisées dans les couche basale de l'épiderme)[138,139], les DC plasmacytoïdes (pDC) (localisées dans de

nombreux organes et le sang périphérique)[136] et les DC dérivant de monocytes (localisées dans les tissus inflammatoires)[132,140].

Le précurseur lymphoïde va donner naissance aux pDC, dit non conventionnelles[133,135], dont les principales différences avec la lignée myéloïde sont tout d'abord leur morphologie similaire aux plasmocytes (lymphocytes B producteurs d'anticorps) et leur capacité à sécréter une large quantité d'interféron de type I (IFN α et β) en réponse à une infection virale[141,142,143].

Le précurseur myéloïde va se différencier en DC myéloïdes ou classiques : les cellules de Langerhans, et les DC interstitielles. Ces cellules ont pour rôle principal de capturer, dégrader et présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs. Elles sont donc qualifiées de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et produisent une large quantité d'IL-12[144]. Une autre caractéristique est que les DC myéloïdes expriment les molécules de costimulations nécessaires à l'interaction avec les lymphocytes T et donc à l'orientation de la réponse[145].

Un autre type de DC myéloïde, les DC dérivés de monocytes (Mo-DC) possèdent les mêmes caractéristiques que les DC conventionnelles[132]. Mais à la différence de ces derniers, ils proviennent de la différenciation de monocytes en DC grâce aux cytokines présentent dans le milieu environnemental[142]. Au cours de ma thèse, nous étudierons l'activation des ILCs à travers l'infection des Mo-DC issus de sang humain périphérique.

b. Rôles des DC au cours de l'induction de la réponse immunitaire

Le plus grand réservoir de DC sont immatures et correspond aux DC interstitielles qui sont rapidement mobilisables à la suite d'une infection[36,137]. Les DC sont localisées dans tous les tissus et leur rôle est prépondérant dans les muqueuses[144,146,147]. Les DC immatures capturent l'antigène contrairement aux DC matures qui ont régulé négativement cette caractéristique[132,148]. Les DC immatures ont principalement un rôle de sentinelle au sein de l'organisme[148] ***(Figure 8)***. Ce sont des cellules phagocytaires possédant des dendrites leur permettant de détecter des pathogènes éloignés[133]. La principale caractéristique de ces cellules est de capturer l'antigène par macropinocytose, puis le dégrader afin de le présenter sous forme de peptides aux lymphocytes T par l'intermédiaire du CMH au niveau des organes lymphoïdes secondaires[149]. Une autre voie d'activation est l'interaction DC-antigène via les PRRs exprimés à leur surface cellulaire entrainant une internalisation du complexe antigène-récepteur puis dégradation et apprêtement des peptides ***(Figure 8)***. Cette étape permet la maturation des DC qui se caractérise par l'expression du CD83[150,151] , de molécules de costimulation comme le CD80[148,152] et le CD86[153,152],

et provoque leur migration vers les ganglions lymphatiques dans le but de présenter l'antigène aux lymphocytes T et B naïfs par la molécule de CMH-II[149,154]. Il est donc possible via l'expression du CMH-II (ou HLA-DR), du CD83 et du CD86 d'observer l'état de maturation et d'activation des DC ***(Figure 8)***. Ces marqueurs seront utilisés comme témoin d'activation dans nos tests.

Contrairement aux cellules épithéliales, les DC sont des APC professionnelles, et les seules capables de stimuler les lymphocytes T naïfs ***(Figure 8)***. Pour recruter les cellules immunitaires au site de l'infection, les DC activées vont sécréter des molécules dites chimio-attractantes[155]. De manière générale, lorsque les TLRs interagissent avec leur agoniste il y a production puis sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et immuno-stimulatrices afin de transmettre aux autres cellules la présence du danger. Les principales et premières cytokines sécrétées sont l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18 et le TNF[155]. Une infection virale est également marquée par la sécrétion d'IFN de type I[20].

Concernant l'activité des DC au niveau de l'épithélium, il est important de noter qu'elles ont la possibilité de capturer l'antigène directement à l'intérieur de la lumière intestinale grâce à leurs dendrites. Cette action est possible car elles possèdent les mêmes molécules d'adhérences que celles exprimées au niveau des jonctions intercellulaires[156] ***(Figure 6)***.

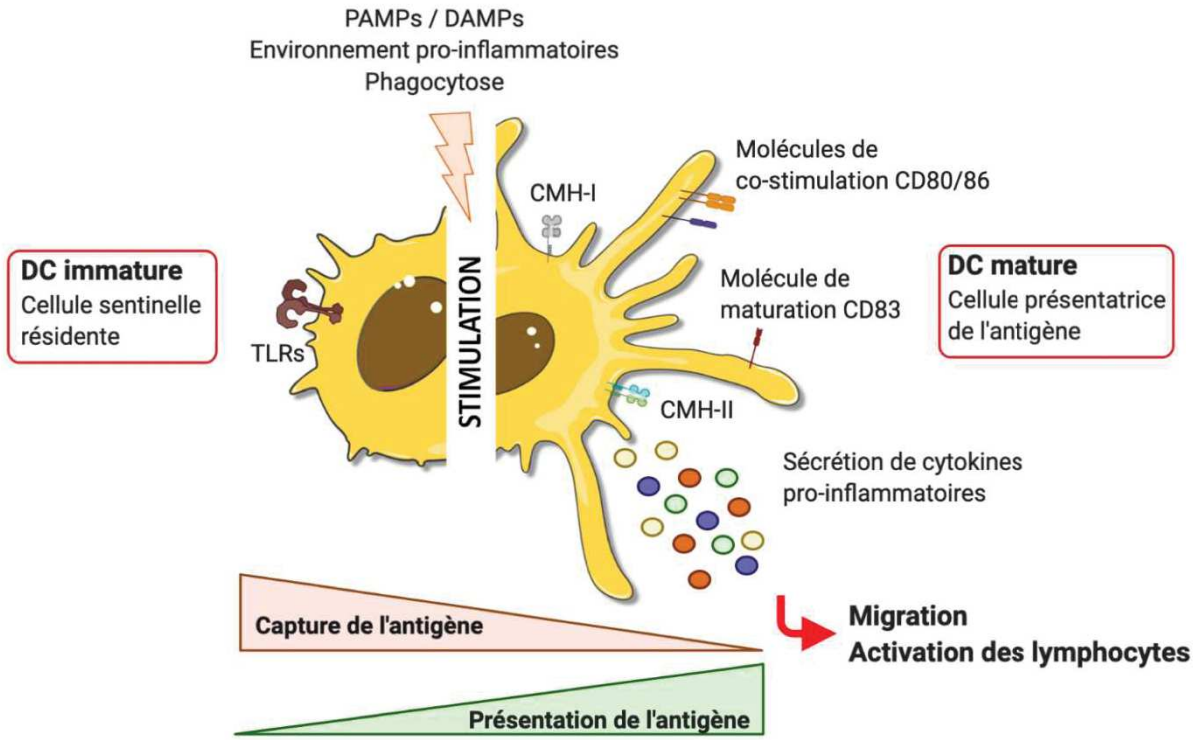


Figure 8: Représentation de l'activation des cellules dendritiques
Les DC immatures correspondent à des cellules sentinelles ayant pour rôle principal la capture de l'antigène. Les DC matures sont caractérisées de cellules présentatrices de l'antigène ayant un rôle dans l'activation des lymphocytes via la présentation de l'antigène, l'expression de molécules de costimulation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

En résumé, les DC sont des APC professionnelles qui permettent l'éducation, le développement et la maturation des lymphocytes T naïfs pour générer des lymphocytes T spécifiques à l'antigène[36].

iv. Marqueurs d'activation des ILCs : CD69 / CD161 ?

Pour observer l'activation des ILCs, nous nous intéressons à l'expression du CD69 et du CD161. Ces deux marqueurs sont connus comme étant exprimés par différents types de cellules immunitaires notamment les lymphocytes T[157,158,159].

Le CD69 appartient à la famille des récepteurs C-lectine de type II et est exprimé par un panel de cellules immunitaires résidentes des tissus comme les lymphocytes T mémoires, les lymphocytes T γδ, et les lymphocytes T auxiliaires[157,160,161]. L'expression du CD69 s'observe de façon précoce à la suite d'une stimulation lymphocytaire, d'un traitement[162] ou au cours d'une inflammation[163,164,161]. C'est un marqueur d'activation cellulaire et de rétention tissulaire[159,165]. C'est également un récepteur immuno-régulateur. Le CD69 agit sur la régulation de la différenciation des lymphocytes T régulateurs ou encore en influant sur la sécrétion de TNF, d'IFN-γ, d'IFN-α ou d'IL-17[166,167].

Le CD161 appartient à la famille des récepteurs de type C-lectine et est aussi appelé NKR-P1A[158]. Cette protéine est exprimée par les cellules NK, les lymphocytes T dont les lymphocytes T mémoires, les lymphocytes T γδ et αβ, et les cellules NKT[168,169,170]. Il correspond à un récepteur précoce lors de la maturation des cellules NK mais il est également associé à une expression au cours de l'inflammation[171,172,173]. C'est pourquoi il est qualifié de marqueur d'activation cellulaire[158,168] notamment concernant les cellules NK pro-inflammatoires avec une réactivité élevée aux cytokines[174], ou en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires[172,173]. Outre son action activatrice, le CD161 peut également transmettre des signaux inhibiteurs le qualifiant alors de récepteur immuno-régulateur[158,175].

Concernant les ILCs, le rôle de ces deux marqueurs restent à bien définir. En effet, étant un miroir inné des lymphocytes T, nous nous attendons à un profil d'action plus ou moins similaire pour l'expression du CD69 après stimulation des ILCs (infection, cancer, inflammation)[176,177]. Pour le CD161, il semble être utiliser dans un premier temps comme

marqueur d'identification pour certaines populations d'ILCs[178] mais possède-t-il également une fonction d'activation comme pour les cellules NK[41] ?

3) Histoire et biologie des adénovirus

i. Classification et nomenclature

La famille *Adenoviridae* est divisée en 5 genres : les *Mastadenovirus*[179] infectant les mammifères, les *Aviadenovirus* infectant les oiseaux[180], les *Atadenovirus* et les *Siadenovirus,* infectant respectivement les reptiles et les mammifères[181,182,183], et les *Ichtadenovirus* infectant les poissons[184,185].

Dans ma thèse, nous nous intéresserons aux HAdVs, qui appartiennent au genre *Mastadenovirus*[186]. Le premier adénovirus a été isolé en 1953 par Rowe et al[187] à partir de tissus adénoïdes d'enfants.

Ce sont des virus non-enveloppés possédant un génome ADN double brin linéaire. Les HAdVs sont regroupés en 7 espèces, de A à G ***(Figure 9)***. Aujourd'hui, nous dénombrons plus de 100 types d'HAdVs avec des tropismes variables[10,180,188,189]. Historiquement, la classification s'est basée sur différents critères : les propriétés d'hémagglutination, la neutralisation par des anticorps spécifiques, ainsi que la pathogénicité[190,191], de cette analyse a émergé environ 50 « séro » types d'HAdVs[192]. L'analyse des séquences génomique[193] est ensuite privilégiée à partir de l'HAdV-G52[194], grâce au potentiel du séquençage de nouvelle génération pour l'analyse du génome entier ou de trois régions spécifiques (penton, hexon et fibre)[195,196,197] *(informations actualisées sur http://hadvwg.gmu.edu/)*.

Globalement, les HAdVs des espèces A et C ciblent principalement les voies respiratoires, urinaires et gastro-intestinales. Les HAdVs de l'espèce B possèdent le tropisme le plus large car les membres de cette espèce peuvent affecter les voies respiratoires, urinaires, gastro-intestinales et oculaires[10]. Les HAdVs de l'espèce D ciblent les voies oculaires et gastro-intestinales, tandis que ceux de l'espèce E ont un tropisme pour les voies respiratoires et oculaires[186]. Concernant les HAdVs de l'espèce F et potentiellement G, l'infection cible particulièrement les compartiments intestinaux ***(Figure 9)***.

Notons que majoritairement les HAdV-Bs et les HAdV-Ds sont responsables de conjonctivites (ex: HAdV-D8, -D9, -D19,-D37)[186,198,199,200]. HAdV-E4 et B7 sont associés à des

maladies respiratoires aigües[186,201,202,203]. HAdV-F40 et HAdV-F41 sont principalement responsables de gastroentérites aigües avec état diarrhéique[186,194,204,205]. Parmi les HAdVs les mieux caractérisés, il y a l'HAdV-C5, qui est aujourd'hui l'un des adénovirus le plus décrit et utilisé en thérapie génique et en vaccination[206,207,208,209,210,211].

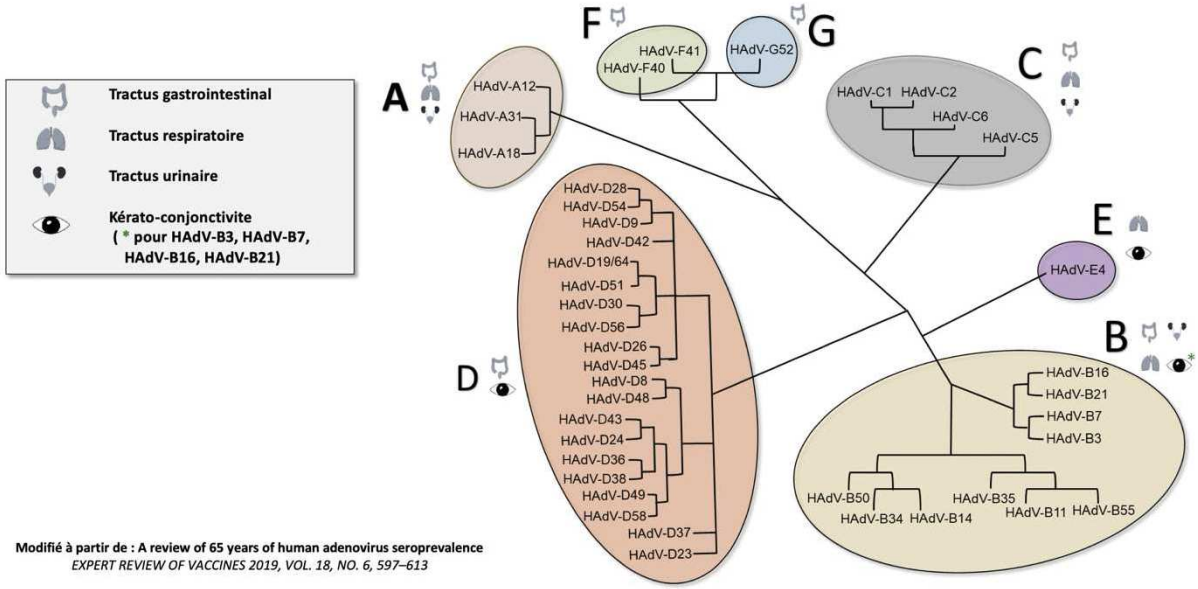


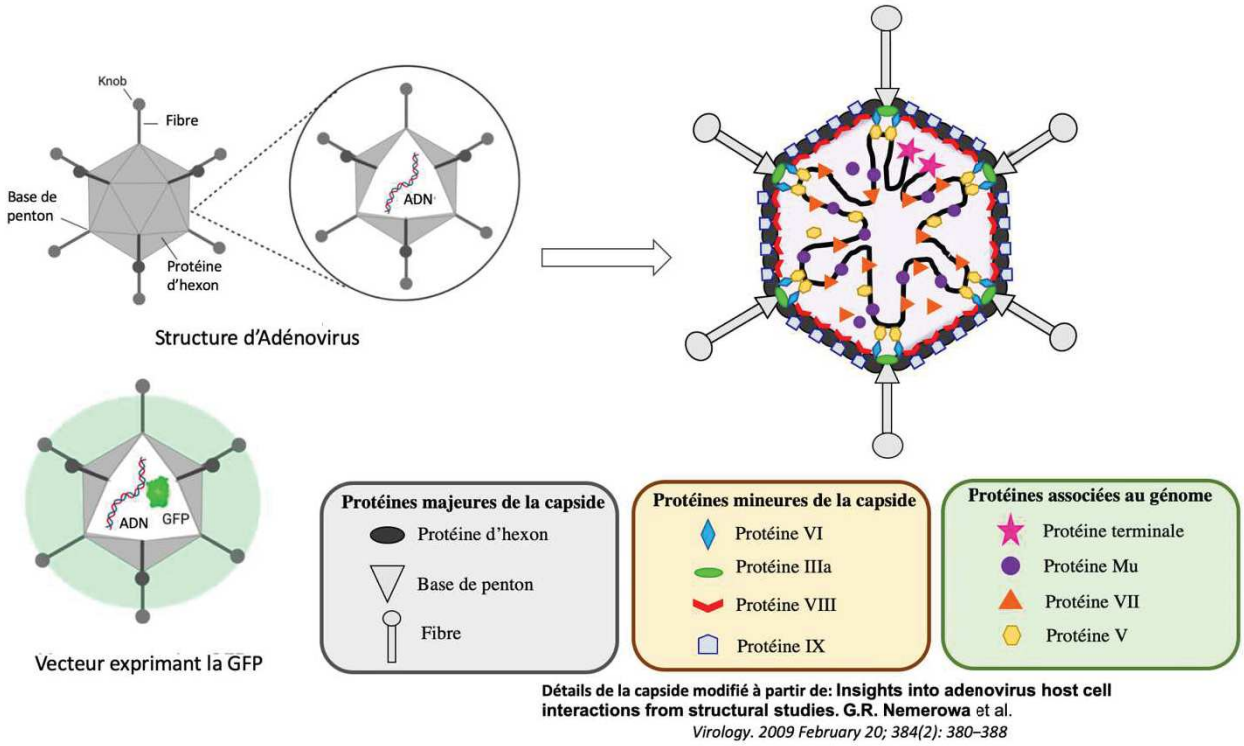
Figure 9: Classification des HAdVs selon l'espèce et le tropisme
Répartition d'une partie des HAdVs parmi les 7 espèces connues (A-G).

ii. Structure des adénovirus

Les particules des HAdVs ont une taille d'environ 90 nm de diamètre renfermant le génome viral et les protéines associées[190,212,213] ***(Figure 10)***. Le génome est d'approximativement 36 kb codant pour plus de 40 protéines dont 12 correspondent à des composants de la capside[214]. Deux grandes classes de protéines composent la particule virale : les protéines de capside correspondant aux protéines dites structurales, et les protéines de core associées au génome[215]. Parmi les protéines de capside, il existe deux groupes : les protéines majeures (hexons, pentons et fibres) et les protéines mineures (pIIIa, pVI, pVIII et pIX)[216]. La structure classique des virions comprend une capside de forme icosaédrique constituée de 20 faces triangulaires composées de protéines d'hexons[217] ainsi que de protéine de pentons[218] formant une structure pentamérique[190,219,220]. Au sommet de chaque penton nous retrouvons une projection de protéine virale, nommée fibre[221], au bout de laquelle se trouve le domaine *knob*. Ce domaine est souvent impliqué dans l'attachement aux récepteurs cellulaires en tant qu'interaction primaire pour certains HAdVs. Les protéines de pentons permettent l'entrée du virus au sein de la cellule par des interactions secondaires[190]. Les protéines d'hexons peuvent également participer au

mécanisme d'entrée virale pour d'autres HAdVs[222]. Les hexons et les fibres sont composés de différents domaines, soit hautement conservés entre les différentes espèces soit hypervariables[223,224,225,226,227]. Les domaines conservés auraient un rôle dans l'interaction virus-récepteurs cellulaires[212,224]. En plus de permettre l'infection de la cellule hôte, les protéines de pentons possèdent également une activité cytopathogène précoce contre la cellule cible[38]. De façon similaire aux hexons, les protéines de pentons possèdent des régions conservées entre les espèces mais aussi des régions variables exposées sur la face de la capside virale participant au tropisme cellulaire[228].

Les protéines mineures sont moins spécifiques à l'espèce d'HAdV, participant entre autres à la structure et la stabilité de la capside virale[229,230], ou encore à l'empaquetage du génome[231] ou à l'échappement endosomal[232]. Le génome viral est étroitement associé à différentes protéines au sein de la capside aussi appelées les protéines de core. Il existe de nombreuses copies de ces protéines conservées entre espèces (protéines V, VII, Mu et Terminale). Brièvement, les protéines de core ont une action directe sur l'ADN viral en permettant sa condensation et en facilitant la réplication de l'ADN viral[233], mais elles permettent aussi le maintien des interactions entre le génome et la capside.



Détails de la capside modifié à partir de: **Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. G.R. Nemerowa** et al.
Virology. 2009 February 20; 384(2): 380–388

Figure 10: Structure des HAdVs et des vecteurs exprimant la GFP
Description des protéines structurales majeures et mineures de la capside et des protéines associées au génome viral.

iii. Récepteurs cellulaires des adénovirus : HAdV-C5, HAdV-D26 et HAdV-B35

Pour l'attachement cellulaire, puis l'entrée au sein de la cellule hôte, les HAdVs lient leur récepteur principal via les protéines de fibres grâce au domaine distal de la fibre, le knob[234]. Une voie d'entrée virale non-classique via les protéines d'hexons peut également être impliquée[222]. Pour stabiliser la liaison et permettre l'internalisation virale par endocytose[228], certains HAdVs lient un récepteur secondaire via leurs protéines de pentons, plus précisément via les motifs conservés RGD (arginine, glycine et acide aspartique)[235] servant de ligand à différents types d'intégrines communément utilisés par les différents types d'HAdVs[236]. Les intégrines appartiennent à une grande famille de protéines transmembranaires composées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta[237]. Il existe plus d'une vingtaine de membres ayant pour cible privilégiée les motifs RGD majoritairement présents au niveau des matrix extracellulaire[81].

Dans ma thèse, nous nous focalisons sur trois types d'HAdVs appartenant à des espèces distinctes, l'HAdV-C5, l'HAdV-B35 et l'HAdV-D26. Nous avons sélectionné ces trois HAdVs car l'HAdV-C5 correspond au principal vecteur utilisé lors de thérapie génique et les HAdV-B35 et HAdV-D26 représentent de nouvelles stratégies vaccinales.

Récepteur HAdV-C5

CAR correspond à la protéine d'amarrage principale des HAdV-C5[238,239] et est également utilisé par d'autres virus[234,240]. CAR est une molécule d'adhésion cellulaire de 46 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines et est composé de 2 domaines extracellulaire Ig-like, un domaine typique transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique[82,241,242]. Au niveau des cellules épithéliales, CAR est impliqué dans les jonctions serrées en participant au maintien de l'intégrité de l'épithélium[241] ***(Figure 6)***. CAR permet l'ancrage d'HAdV-C5 à la cellule mais pas son internalisation[243]. Comme pour d'autres type d'HAdV, l'internalisation nécessite la présence d'un récepteur secondaire ou auxiliaire comme les intégrines[82,243], les plus connues sont notamment $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_3\beta_1$[244], $\alpha_5\beta_1$[245], $\alpha_v\beta_1$[246], $\alpha_v\beta_3$[247] ou encore $\alpha_v\beta_5$[81,248] . CAR va lier via son domaine D1 au knob, il s'agit ici de l'étape d'attachement[227,249]. Les intégrines vont ensuite lier les protéines de capside situées à proximité de la base de la fibre au niveau de motifs RGD permettant l'internalisation de l'HAdV[241,248,250]. Cependant, il existe des exceptions comme l'adénovirus canin

de type 2 (CAV-2) pouvant infecter des cellules exprimant seulement CAR, sans l'intervention d'intégrines[251].

Récepteur HAdV-D26

Le CD46 est un membre de la famille de protéines régulatrices du complément[252,253]. Le CD46 a longtemps été considéré comme le récepteur principal de l'HAdV-D26[254,255] associé à une interaction secondaire de faible affinité avec CAR (récepteur secondaire)[256]. Or, des études récentes décrivent le CD46 comme un récepteur secondaire[256] et l'acide sialique comme un récepteur primaire utilisé par l'HAdV-D26 pour l'entrée virale[257]. Aujourd'hui les données ne sont pas totalement claires mais ces deux molécules semblent être impliquées dans deux mécanismes distincts dans l'infection de l'HAdV-D26[222]. L'utilisation de l'acide sialique comme un récepteur primaire par plusieurs types d'HAdVs a déjà été observé notamment pour l'HAdV-D37[258]. Il est également possible que d'autres composants à la surface cellulaire aient un rôle dans l'entrée virale, comme le motif glycane GD1a retrouvé dans différentes glycoprotéines[259,260].

Récepteur HAdV-B35

Pour l'HAdV-B35, le CD46 semble être le récepteur principal du virus[209,250,254]. Il semblerait également que les intégrines jouent un rôle au niveau de l'interaction secondaire de manière similaire à ce qui a été précédemment décrit pour l'HAdV-C5 et l'HAdV-D26 aboutissant à l'internalisation virale[247,261].

4) Les adénovirus humains

i. Transmission et physiopathologies des HAdVs

Chez l'Homme, la plupart des infections aux HAdVs sont associées à des symptômes bénins le plus souvent respiratoires mais pas que. Il est estimé que 1/3 des infections par les HAdVs sont asymptomatiques. Si les infections par les HAdVs conduisent majoritairement à des pathologies de gravité modérée, le virus est parfois associé à des symptômes sévères chez les patients immunodéprimés (hépatites, cystites, encéphalites). Les infections par les HAdVs survenant notamment suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques[186] chez les enfants peuvent conduire à un taux de mortalité pouvant atteindre 80%[189,243].

La transmission de l'HAdV passe par différentes voies: l'inhalation d'aérosols, l'inoculation conjonctivale directe, la propagation fécale-orale ou encore par exposition à des tissus ou du sang infectés[262]. La période d'incubation varie en fonction du type d'HAdV concerné et est de 2 jours à 2 semaines[214,262].

Dans la majorité des cas les symptômes de l'infection se résorbent spontannément[263], suggérant un contrôle par la réponse immunitaire. Cependant, l'environnement immunitaire mis en place peut privilégier un état de persistance virale pouvant durer plusieurs années[264,265,266]. Lors d'une diminution de l'activité immunitaire, nous pouvons observer une réactivation virale sans réinfection apparente[267,268]. Il semblerait que certaines personnes possèdent un réservoir viral pouvant modifier les futures réponses immunitaires[268,269,270]. C'est pourquoi, il est primordial de s'intéresser aux cellules immunitaires pouvant jouer un rôle à proximité des sites infectieux ou réservoirs comme les ILCs.

ii. Epidémiologie

La distribution des types d'HAdVs n'est pas homogène à travers le monde[271,272] ***(Figure 11)***. En effet, les différentes régions mondiales ne possèdent pas la même prévalence pour un type d'HAdV donné[273,274]. La majorité des individus ont été infecté par plusieurs types d'HAdVs durant leur enfance[275,276]. Certains types d'HAdVs sont de plus associés à une séroprévalence mondiale particulièrement élevée (HAdV-C5 et HAdV-C2)[277,278].

La majorité des études épidémiologiques concernant les infections par les HAdVs a été réalisé sur des cohortes d'Amérique du Nord[272,279,280,281] ou d'Europe occidentale[275,276]. Les quelques études en Asie sont effectuées en Chine[10,282,283] et au Japon[284,285] et pour l'Afrique en Afrique du Sud[286]. En revanche, les données sont beaucoup plus limitées en ce qui concerne l'Afrique subsaharienne[287], l'Amérique du Sud[288,289], le Moyen-Orient[10] et l'Océanie[290,291]. Le regroupement de ces données indiquent que les types d'HAdVs des espèces C, D et B sont respectivement les plus observés à travers le monde[282]. La séroprévalence pour l'HAdV-C5 est la plus largement étudiée[278] principalement en raison de son utilisation historique et majoritaire en vaccination, et par comparaison avec des vecteurs dérivés d'HAdVs alternatifs ou non-humains[255,282,292]. Les HAdV-Ds montrent globalement une séroprévalence faible en Europe et Amérique du Nord mais élevée en Afrique et en Asie notamment pour l'HAdV-D26[208,293,33]. Enfin, les HAdVs de l'espèce B, en particulier l'HAdV-B35 ou l'HAdV-B11, semblent présenter une faible séroprévalence à travers le monde[33,282].

Cette faible séroprévalence fait de certains HAdVs des candidats pour le développement de vecteurs alternatifs pour la vaccination, notamment les HAdVs de l'espèce B avec l'HAdV-B35 ou encore certains HAdVs de l'espèce D[33,282,294,295].

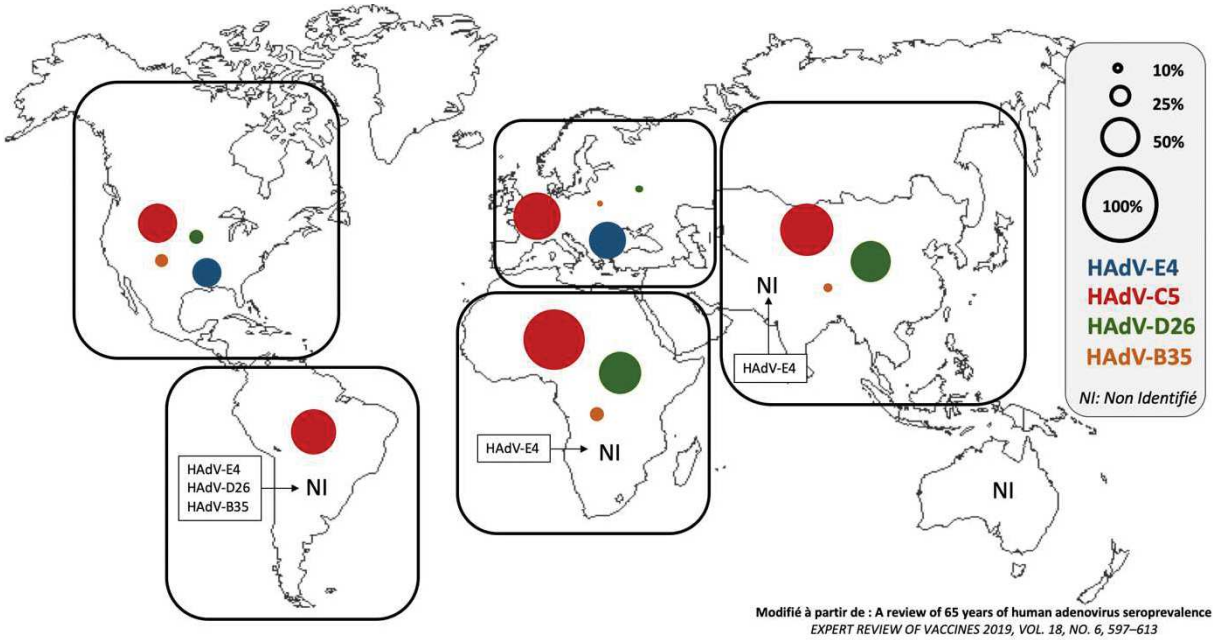


Figure 11: Estimation de la séroprévalence des HAdVs utilisés sous forme de vecteur
Les adénovirus HAdV-E4, HAdV-C5, HAdV-D26 et HAdV-B35 correspondent aux types les plus utilisés en clinique sous forme de vecteur.

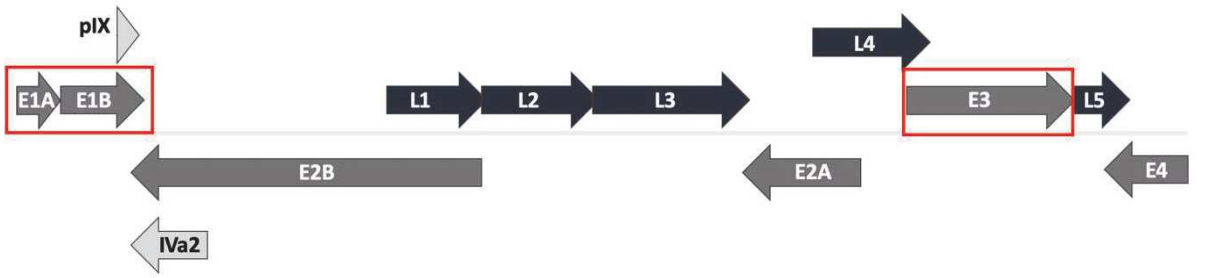
iii. Utilisation des adénovirus humains en thérapie génique

a. Vecteurs dérivés des HAdVs

Le génome des adenoviridae varie entre 26 à 42 kilobase (kb)[296,297]. Cette caractéristique leur confère la capacité de transporter de grands transgènes avec une stabilité génomique assuré par une ADN polymérase de haute-fidélité comparativement aux virus à ARN[189]. Le génome adénoviral est composé de 3 grandes classes de gènes *(précoces ou E*[298,299,300,301]*, intermédiaires*[302,303] *et tardifs ou L*[179,236]*)* qui ont respectivement pour rôle de préparer la cellule à la réplication de l'ADN viral (E), permettre l'expression et l'activation des gènes tardifs (Int), puis permettre la synthèse des protéines structurales de la capside virale (L) ***(Figure 12)***. Les vecteurs dérivés des HAdVs ont été amélioré au fil des années afin d'optimiser leur utilisation. La délétion des régions codant pour les gènes précoces (E1, E3 et E4) permet, en plus d'empêcher la réplication, de pouvoir intégrer un transgène pouvant atteindre ~ 7 kb. Les gènes E1 et E4 sont impliqués dans l'expression des autres gènes précoces, la régulation du cycle viral (E1)[298,304] et entre autres

la modulation du cycle cellulaire (E4)[305,306]. Les gènes E1 requis pour la réplication virale ont été intégrés dans des cellules dites « trans-complémentées »[307,308] afin de permettre la production et l'amplification des vecteurs *in vitro*.

Les gènes E3 sont quant à eux impliquées dans l'échappement envers le système immunitaire inné[309,310,311] et ne sont en revanche pas essentiels pour la réplication virale dans des cellules permissives à l'infection[307,308].



Modifié à partir de: Comparison of the life cycles of genetically distant species C and species D human adenoviruses Ad6 and Ad26 in human cells. Turner et al
December 2015 Volume 89 Number 24 Journal of Virology

Figure 12: Schéma de l'organisation du génome des HAdVs
Représentation des gènes précoces (flèches grises), des gènes intermédiaires (flèches gris clair) et des gènes tardifs (flèches gris foncé). Encadrés en rouge les gènes délétés lors de la création de vecteurs adénoviraux.

En 2017, une étude a mis en évidence que les HAdVs correspondaient aux premiers vecteurs utilisés lors d'essais cliniques, suivis de près par les rétrovirus[312]. La majorité des essais cliniques concerne les thérapies anti-tumorales et les traitements pour les maladies monogéniques et une minorité concerne la vaccination[313,314,315,316,317]. Cependant, les essais cliniques vaccinaux sont de grande ampleur et impliquent généralement une grande population d'étude[312].

Espèces	HAdV-A	HAdV-B	HAdV-C	HAdV-D	HAdV-E	HAdV-F	HAdV-G
Vecteurs adénoviraux candidats en thérapie génique/vaccinale	HAdV-A31	HAdV-B3 HAdV-B11 HAdV-B14 HAdV-B34 HAdV-B50	HAdV-C2 HAdV-C6	HAdV-D24 HAdV-D28 HAdV-D19/64 HAdV-D43 HAdV-D48 HAdV-D49 HAdV-D56		HAdV-F40 HAdV-F41	
Vecteurs adénoviraux testés en essai clinique *(clinicaltrials.gov)*		HAdV-B7 HAdV-B35	HAdV-C5	HAdV-D26	HAdV-E4		

Tableau 1: Tableau des HAdVs utilisés lors des essais clinique/candidats de vecteur vaccinal
Liste non-exhaustive des vecteurs HAdVs candidats utilisés en thérapies génique et vaccinale.

b. Historique des vecteurs dérivés des HAdVs

La première utilisation des HAdVs en clinique fût en 1956 dans le traitement de carcinome du col de l'utérus[318]. S'en est suivi en 1971 la première utilisation d'HAdV-E4[319] et d'HAdV-B7[320], en tant qu'agent vaccinal par voie orale sous forme lyophilisée par l'armée américaine[321,322,323,324,234]. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence la responsabilité des HAdV-E4 et HAdV-B7 dans les pathologies respiratoires aigües chez les soldats américains et européens[272,325,326,327,328,329]. En 1980, les premiers HAdVs sous forme de vecteur d'expression génique ont été mis en place à partir des HAdV-C5 et HAdV-C2[330,331,332]. Par la suite, au cours des années 1980, l'utilisation de vecteurs HAdVs notamment pour la vaccination a été reconnu par l'OMS[333]. En 1991, le premier transfert de gènes de bonne efficacité avec des vecteurs HAdVs in vivo a été effectué[334,335] confirmant leur potentiel thérapeutique. En 1993, le premier essai de thérapie génique utilisant l'HAdV-C5 au Clinical Center, NIH, a été effectué sur un patient de 23 ans atteint de mucovisidose[336,337,338]. Après plus de 30 ans, les HAdVs sont toujours les virus les plus utilisés en tant que vecteur dans divers essais cliniques lors de transfert de gènes dans le traitement des cancers, de maladies monogéniques ou encore en vaccination[335,339,340].

c. Problèmes et solutions liés à l'utilisation des vecteurs dérivés des HAdVs

Aujourd'hui l'immunogénicité induite par le vecteur HAdV a une place primordiale lors du développement de nouveaux vecteurs, c'est pourquoi les recherches se tournent vers des HAdVs entrainant une immunogénicité plus contrôlée[341,317,17]. Pour les HAdVs de l'espèce A, les stratégies de vaccination propose l'HAdV-A31 en raison de la réponse faible du système immunitaire de l'hôte[342].

Les membres de l'espèce B possèdent une faible séroprévalence au sein des populations ce qui fait d'eux de bons candidats. L'HAdV-B35[343] est choisi pour divers essais pré-cliniques ou cliniques contre le VIH, le virus Ebola, le paludisme ou le virus respiratoire syncytial[344,345]. La piste des vecteurs recombinants est également explorée afin de pallier aux potentielles séroprévalences présentes[346] ainsi que d'augmenter l'efficacité et la couverture vaccinale[347].

Les HAdV-Cs[348] sont notamment utilisés pour lutter contre le VIH[349,350], le paludisme[351,352], la tuberculose[353], le virus Ebola[354,355,356] , le virus de la grippe[357], ou récemment au centre d'études pré-cliniques luttant contre le virus Zika[358,359], le virus de la rage[360,361], le virus de la dengue[362,363], Clostridium botulinum[364,365], et des coronavirus[366,367,368]. La forte séroprévalence mondiale pour

l'HAdV-C5 limite son utilisation pour la vaccination[278,282,294]. Cette limitation a le plus souvent été associé à la présence d'AcN produits par l'hôte[283,295,197], mais également par la présence de lymphocytes T résidents[369,370].

Parmi les HAdV-Ds, l'HAdV-D26 suscite le plus d'intérêt. Il est couramment décrit comme un vecteur alternatif prometteur[10,282]. Il est actuellement le seul membre de l'espèce D à avoir été évaluer lors d'essais clinique à grande échelle pour la vaccination contre le VIH[371,372,373,374], le virus Ebola[375,376] et le coronavirus[377,378]. Les autres candidats potentiels ou testés pour des études de vaccination pré-cliniques sont le D24[379], le D28[380], le D43[381], le D48[31], le D49[382] ou le D19[383] (renommé HAdV-D64[384]). Pour finir, le candidat HAdV-D56 a montré un profil d'efficacité et d'immunogénicité presque identique à l'HAdV-D26[385].

L'HAdV-E4 est utilisé comme candidat vaccin pour diverses maladies infectieuses notamment l'hépatite B[386], ou le Zika[387], et de futures explorations sont en cours[322]. Enfin, les HAdV-Fs ont un grand potentiel en tant que candidats vaccins par voie orale (ex : vaccination contre le VIH[388]) ou les thérapies géniques ayant pour cible le tractus gastro-intestinal ou les tissus muqueux[389,390,391]. En effet, il semblerait que les taux d'AcN dirigés contre cette espèce soient relativement faibles chez les enfants et les personnes âgées.

Malgré les avantages considérables qu'offre l'utilisation de vecteur dérivé d'HAdV, certaines limitations sont encore présentes[236]. Pour certains types, l'induction de puissantes réponses inflammatoires et surtout des niveaux élevés d'AcN sont les principaux inconvénients[22,392,393].

Ce dernier aspect a été développé dans la section II.1 et correspond à l'immunité dite préexistante. Pour contourner l'immunité préexistante les alternatives disponibles sont l'utilisation de vecteurs dérivés d'adénovirus humains alternatifs ou non-humains[394,395,396].

5) Implication de l'immunité préexistante contre les adénovirus : cas concrets au cours de développement de vaccinations

L'année 2020 a été marqué par l'émergence d'une nouvelle souche virale SARS-Cov-2 responsable de la maladie du COVID[397,398,399] et d'une pandémie impactant d'une manière non-négligeable le fonctionnement mondial humain et économique. Aujourd'hui une des nombreuses priorités est de mettre au point différentes stratégies vaccinales[400,401,402]. Beaucoup de

ces stratégies se basent sur l'utilisation d'adénovirus en tant que vecteurs[403,404,405,406], mais les stratégies choisies sont-elles les plus sûres[407] ?

Ces dernières années nous avons également pu être témoins d'émergence ou de réémergence virale plus ou moins mortelle comme le virus Ebola[408,409], le virus Zika[410,411,412] ou encore le virus de la fièvre jaune[413,414] nécessitant le développement de vaccins[414,415,416,417,418]. D'autres infections virales sont quant à elles étroitement surveillées pour un risque de pandémie comme l'infection au coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS CoV)[419] ou encore la grippe[420]. De par les évènements récents et les exemples que nous avons pu observer dans le passé, le développement de vaccins et de traitements efficaces est aujourd'hui une priorité pour la santé publique mondiale. Comme décrit précédemment, les HAdVs possèdent des avantages non-négligeables lorsqu'ils sont utilisés en tant que vecteur (défectifs pour la réplication, ne s'intègrent pas au génome et expression stable du transgène)[421,422]. Mais comme l'histoire nous l'a également montré, l'utilisation de vecteur adénoviraux n'est pas sans risques[21,12]. En effet, chez certaines populations la séroprévalence contre l'HAdV-C5 est supérieure à 90%[10,33,339]. Comme ont pu montrer les essais cliniques de vaccination contre le VIH STEP (HIV Vaccine Trial Network 425 (HVTN502 STEP))[423,424] et Phambili (HVTN 503 Phambili)[425,426] interrompu précocement en parti par manque d'efficacité, les sujets possédant un titre d'AcN élevé avaient un risque aggravé de contracter le VIH au cours des 18 mois post-vaccination[316,27]. Un autre essai de vaccination contre le VIH, le HVTN505, a été interrompu pour les mêmes raisons d'efficacité, bien qu'aucune preuve concernant le risque d'acquisition du VIH n'ait été démontré par la cohorte choisie[316,427]. Il a été observé que la présence d'AcN pour le vecteur choisi entraînait la formation de complexes Ig - HAdV-C5 pris en charge par les APC aboutissant à l'activation des lymphocytes T mémoires redirigés vers les tissus muqueux, pouvant favoriser les infections par le VIH[11,13,423,425]. Pour éviter ces complications d'autres outils sont à notre disposition comme l'utilisation d'HAdV de sérotype moins présent que l'HAdV-C5 comme l'HAdV-D26 ou avec une séroprévalence plus faible comme l'HAdV-B35, l'HAdV-D36 et l'HAdV-D38[33,428]. Une autre alternative doit être également évaluer, celle de l'utilisation d'adénovirus provenant de chimpanzé[394,429], de macaque[430], ou bien de chien (CAV)[431,432].

Aujourd'hui, il apparaît primordial de mieux caractériser l'impact de l'immunité préexistante chez les populations au cours du développement de vaccins utilisant les HAdVs. L'étude du rôle des ILCs au cours des infections par les HAdVs et plus globalement au sein de la dynamique immunitaire est donc indispensable.

III. Matériels et méthodes

Vecteurs adénoviraux

Dans ma thèse, les HAdVs utilisés (HAdV-C5, HAdV-D26, HAdV-B35) sont déplétés de la région E1 les rendant incapable de se reproduire dans les cellules infectées. Les vecteurs HAdV-C5 et HAdV-D26 expriment une cassette d'expression GFP[293] tandis que le vecteur HAdV-B35 exprime une cassette d'expression YFP[433]. Néanmoins, nous utilisons pour visualiser tous les vecteurs le laser de détection de la GFP par cytométrie en flux. Les vecteurs ont été amplifié soit dans des cellules de rétinoblaste embryonnaire humain 911 (HER 911) soit des cellules 293T E4-pIX puis purifié à 99% par deux gradients de densité de chlorure de césium (CsCl)[11,434].

Test de neutralisation (étude préalable)

Pour déterminer le titre d'anticorps neutralisants, les cellules HER 911 (10^5 cellules/puits) ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et des antibiotiques (Pénicilline 100 I.U./mL et streptomycine 100 µg/mL) dans une plaque de 24 puits. Après 24 h, les sérums testés ont été dilués de 1/40 à 1/2560 et incubés 30 minutes à 20°C avec les différents vecteurs (15 pp/cellule pour l'HAdV-C5, 500 pp/cellule pour l'HAdV-D26 et 100 pp/cellules pour l'HAdV-B35). Le virus seul et les complexes Ig - HAdVs *(voir paragraphe dédié)* ont été co-cultivés avec les cellules 911 pendant 24 h. Enfin, les cellules ont été collectées et l'expression de la GFP a été déterminée par cytométrie de flux (Calibur® et Novocyte®). Le pourcentage de cellules infectées permet d'évaluer la séroprévalence contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. Le titre d'anticorps neutralisants correspond à l'inverse de la dilution du sérum qui inhibe 50% de l'infection sans sérum. *(Résultats exposés dans l'annexe)*

Par la suite, l'activation des Mo-DC sera évaluée en présence ou non d'anticorps dit neutralisant avec l'utilisation de la même banque de sérum que les tests de neutralisations.

Cellules primaires du sang périphérique et conditions de culture

Les échantillons de sang humain (sang frais et couche leuco-plaquettaire) ont été obtenus auprès de donneurs anonymes adultes en bonne santé à la banque régionale du sang (EFS, Montpellier, France). Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont isolées sur un gradient Ficoll-Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Isolation des cellules dendritiques (DC)

A partir des PBMCs issues de couches leuco-plaquettaires, les monocytes sont purifiés grâce à l'expression du CD14 par sélection immuno-magnétique positive (système MACS, MiltenyiBiotec). Les cellules $CD14^+$ ont été générées pendant 6 jours en présence de 50 ng/ml de facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et de 20 ng/ml d'interleukine-4 (IL-4) (PeproTech®, Neuilly sur Seine, France). Le milieu utilisé pour la culture est le RPMI avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) et les antibiotiques pénicilline 100 I.U./mL (cat#243.000001.02, Sigma) et streptomycine 100 µg/mL (cat#S6501, Sigma).

Enrichissement et sélection des cellules lymphoïdes innées (ILC)

A partir des PMBCs issues de sang frais, les cellules lymphoïdes innées sont enrichies par sélection immuno-magnétique négative (kit EasySep™ d'enrichissement des Pan-ILC humains, cat#17975, StemCell™). Le kit contient un cocktail d'anticorps magnétiques ciblant les principales lignées cellulaires du système immunitaires excepté les ILCs. L'enrichissement a été effectué suivant les instructions du fabricant[49]. Les ILCs fraichement enrichies sont mises en culture dans un milieu complet constitué de RPMI supplémenté de 10% de sérum humain AB (sHAB), 10 ng/mL d'IL-7 (PeproTech®, Neuilly sur Seine, France), 1 mM de sodium pyruvate (Gibco) et des antibiotiques (pénicilline 100 I.U./mL et streptomycine 100 µg/mL). Différentes combinaisons de milieux ont été testé en présence d'IL-2, d'IL-12 et/ou d'IL-7 à différentes concentrations (à 5, 10, 20, 30 ou 90 ng/mL) ou encore un milieu commercial spécifique aux cellules NK (NK MACS Medium, cat#130-114-429, MiltenyiBiotec) avec une efficacité moindre (n = 2 par combinaison testée).

Lignée cellulaire A549 et conditions de culture

Les cellules épithéliales pulmonaires A549 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) sont maintenues en culture dans un milieu complet. Le milieu utilisé pour la culture est le DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et des antibiotiques (pénicilline 100 I.U./mL et streptomycine 100 µg/mL). Les différentes conditions de cultures se trouvent dans les paragraphes suivants.

Infection directe des ILCs par vecteurs adénovirus

Les ILCs (entre 2.10^4 cellules et 3.10^4 cellules dans 300 uL de milieu complet) sont incubées en présence de l'HAdV-C5-GFP, l'HAdV-D26-GFP ou l'HAdV-B35-YFP à 10^4 particules

physiques (pp)/cellule. 1000 pp/cellule et 2000 pp/cellules ont été également testé. Le milieu utilisé pour la phase d'infection ne contient pas de sérum humain. En effet, des tests préliminaires ont montré une neutralisation quasi-totale de l'infection lorsque le sHAB est présent à cette étape *(données non présentées)*. 6 h post infection, le sérum humain AB (10%) est ajouté aux conditions avec HAdV seul et sous forme de complexes Ig - HAdVs. Après 24 h d'incubation, l'activation des ILCs est observée via l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD161, ainsi que la sécrétion de cytokines antivirales et immunomodulatrices. Le détail des conditions dans le cas d'une stimulation par complexes Ig - HAdVs est décrit dans un paragraphe dédié.

Stimulation indirecte des ILCs par les Mo-DCs/cellules A549

La première étape de ce test consiste en la stimulation des Mo-DC ou des cellules A549 par les HAdVs seuls ou sous forme de complexes Ig - HAdVs.

Les Mo-DC (5.10^5 cellules dans 400 uL de milieu complet) sont incubées avec l'HAdV-C5-GFP, l'HAdV-D26-GFP ou l'HAdV-B35-YFP (10^4 particules physiques (pp)/cellule) pendant 6 h dans le milieu RPMI Mo-DC complet. Après ces 6 h post-infection, le surnageant des Mo-DC est jeté puis les cellules sont lavées au PBS et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min afin d'éliminer toutes traces d'HAdVs dans le milieu. Les cellules sont ensuite mises en culture dans du milieu ILC de base (RPMI + 10% sHAB + P/S). Environ 18 h après le changement de milieu (au total 24h post infection) le surnageant des Mo-DC activées est utilisé pour la mise en culture des ILCs fraichement isolées. Le même procédé est adapté pour la stimulation indirecte des ILCs par les cellules A549. La phase d'infection de 6 h est ici réalisée en présence de 10^3pp/cellules d'HAdVs dans le milieu A549 DMEM complet.

Après 24 h d'incubation en présence des surnageants des Mo-DC ou des cellules A549 stimulées, l'activation des ILCs est observée via l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD161, ainsi que la sécrétion de cytokines antivirales et immunomodulatrices.

Formation des complexes Ig - HAdVs

IVIg® ou "Intravenous Immunoglobulin" (Baxter SAS, Guyancourt, France) a été utilisé comme témoin pour la formation des IC et correspond à un mix à 95% d'IgG humaines issu de plasma de donneurs sains (1 000 à partir de 50 000 donneurs/lot). IVIg® est utilisé chez les

patients présentant des déficiences immunitaires acquises ainsi que des maladies auto-immunes. De façon commune aux ILCs, aux DC et aux cellules épithéliales, pour la formation des complexes Ig - HAdVs, l'HAdV-C5-GFP, l'HAdV-D26-GFP ou l'HAdV-B35-YFP ont été incubés en présence de sérums décomplémentés issus d'une banque de sérums du laboratoire pendant 25 min à température ambiante. Les sérums utilisés possèdent ou non des anticorps spécifiques aux différents HAdVs utilisés *(résultats des tests de neutralisation)*. Après incubation, les complexes Ig - HAdVs nouvellement formés sont mis en culture avec les différents types cellulaires pendant 24 h. Les ILCs (entre 2.10^4 cellules et 3.10^4 cellules) sont mis en présence de 10^4 particules physiques (pp)/cellule d'HAdVs, tout comme les Mo-DC (5.10^5 cellules), alors que les cellules épithéliales pulmonaires A549 (5.10^5 cellules) sont mises en présence de 10^3 particules physiques (pp)/cellule d'HAdVs.

Cytométrie en flux

Marquage extracellulaire

Les anticorps CD127 FiTC (cat#560549, BD Pharmingen™) ou PE-CF594 (cat#562397, BD Pharmingen™) clone HIL-7R-M21, CD3 PerCP-Cy5.5 (cat#560835, BD Pharmingen™) ou CD3 APC (cat#300412, Biolegend®) clone UCHT1, CRTH2 (CD294) PE clone BM16 (cat#563665, BD Pharmingen™), CD117 PE-Cy7 clone 104D2 (cat#339217, BD Pharmingen™) servent à identifier la population d'ILCs et d'exclure les lymphocytes T (contaminants potentiels de la déplétion). Le CD69 APC (cat#555533, BD Pharmingen™) ou FiTC (cat#347823, BD Biosciences™) et CD161 PE-Cy5 (cat#551138, BD Pharmingen™) servent à observer l'activation des ILCs après stimulation. L'expression de différents récepteurs cellulaires impliqués dans l'infection par les HAdVs a été observé par l'utilisation d'un panel d'anticorps: l'anti-hCXADR (CAR) (cat#AF336, R&D systems™) est utilisé au 1/10è avec l'anticorps secondaire Donkey anti-goat Alexa Fluor™ 488 (cat#A11055, Invitrogen), la Desmogléine 2 FiTC (DSG2) clone AH12.2[83] (cat#sc-80663FiTC, SantaCruz Biotechnology®), le CD46 APC (cible la protéine MCP) clone TLA-2-10 (cat#352405, Biolegend®), le CD49d APC (cible les intégrines α_4) clone 9F10 (cat#304307, Biolegend®), le CD16 (cible les FcγRIII) clone 3G8 (cat#302011, Biolegend®). Quelques récepteurs Toll-Like ont été exploré : le TLR2 FiTC (CD282) clone TL2.1 (cat#309706, Biolegend®), le TLR3 PE (CD283) clone TLR-104 (cat#315010, Biolegend®), le TLR4 PE (CD284) (cat#130-096-237, MiltenyiBiotec) et le TLR9 APC clone eB72-1665 (cat#560428, BD pharmingen™). Les marquages CD83

FiTC (cat#556910, BD Pharmingen™), (dans les conditions sans vecteur GFP/YFP), CD86 APC (cat#555660, BD Pharmingen™), HLA-DR PE alias CMH-II (cat#555812, BD Pharmingen™) (résultats du marquage HLA-DR non concluant) permettent d'observer l'activation des Mo-DC suite à la stimulation virale. Le HLA-ABC PE (cat#555553, BD Pharmingen™) alias CMH-I est utilisé pour observer l'activation des cellules A549 suite à la stimulation virale ainsi que le marquage HLA-DR FiTC (cat#555811, BD Pharmingen™) pour les conditions contrôles, qui a été exclu de l'analyse pour non expression. L'expression de la GFP/YFP par les cellules infectées (ILCs, Mo-DC, cellules A549) ainsi que d'autres marqueurs précédemment cités ont été évalué par cytométrie en flux (Novocyte®). Les volumes d'anticorps ont été adapté au nombre de cellules pour chaque type cellulaire à partir des instructions du fabricant. Chaque cellule a été incubé pendant 30 min à 4°C sur agitation douce. Les cellules sont ensuite lavées deux fois (1800 rpm, 4°C, 5 min) puis resuspendues dans 130uL de tampon (PBS + sérum de veau fœtal). Le marqueur 7-AAD (7-aminoactinomycin D) (cat#559925, BD Pharmingen™) est ajouté au 1/250è 10 min avant la lecture afin d'observer la viabilité cellulaire dans chaque échantillon. Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel NovoExpress®.

Criblage de cytokines (Cytometric Beads Assay)

Les surnageants sont collectés et la sécrétion des cytokines est mesurée par l'utilisation de deux panels de 13 cytokines (réponse antivirale et cytokines T helper) par la technique de quantification multiplexe de cytokines ou CBA. Les panels utilisés sont les *LEGENDplex™ HU Anti-Virus Response Panel (13-plex)* et *LEGENDplex™ HU Th Cytokine Panel (13-plex)* (cat#740390 et cat#740722, Biolegend) suivant les instructions du fabricant. Cette technique permet de connaître la concentration présente d'une large variété de cytokines dans un même échantillon. Elle utilise les mêmes principes de base que la technique ELISA en sandwich, par lesquels un analyte soluble est capturé entre deux anticorps, ici notre analyte correspond aux cytokines d'intérêts. Deux populations de billes qui diffèrent en taille expriment des niveaux de fluorescence intrinsèque différents en APC, ce qui nous permet de les distinguer. Chaque bille est conjuguée à un anticorps spécifique pour capturer l'analyte d'intérêt, puis des anticorps de détection biotinylés vont ensuite permettre la formation des complexes billes de capture-analyte-anticorps de détection. Pour observer ces complexes, la streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) va se lier aux anticorps de détection biotinylés donnant un signal fluorescent en PE dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'analyte liée. La concentration précise de chaque analyte va ensuite être quantifié par cytométrie en flux via l'intensité du signal et

déterminée à l'aide de courbe standard connue et du logiciel d'analyse fournit par le fabricant (Legendplex™). Nous sélectionnons les cytokines d'intérêts à partir d'une sécrétion 2 fois plus élevée que le contrôle pour les HAdVs et 2 fois plus élevée que la condition HAdV seul pour les formes immunes complexées.

Analyses statistiques

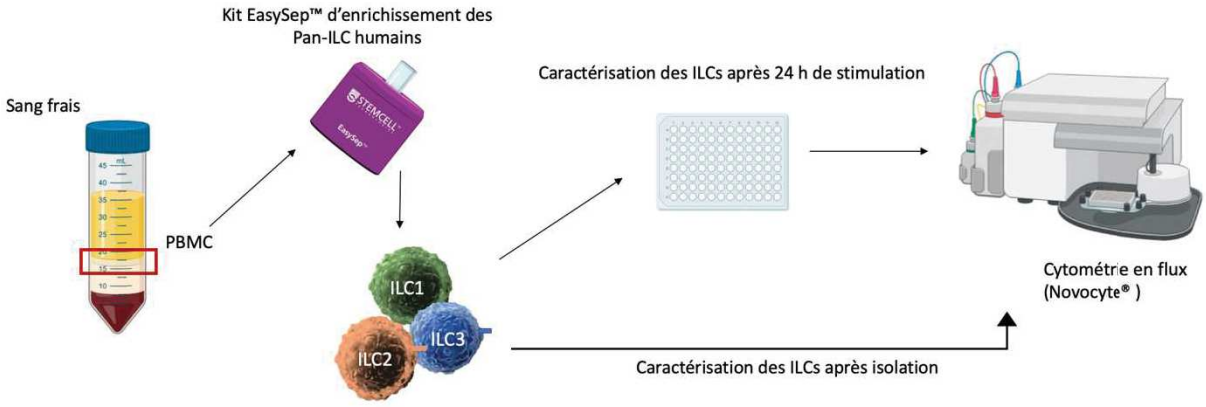
L'ensemble des données a été analysé par le logiciel GraphPad Prism 5. La significativité des résultats a été déterminé par l'utilisation du test *t* apparié de Student afin d'effectuer des comparaisons au sein de chaque donneur. Cette analyse nous permettra d'observer les variations présentes malgré l'hétérogénéité inter-donneur.

IV. Résultats

1) Isolation et caractérisation des ILCs à partir de sang périphérique

a. Comment isoler les ILCs humains circulants dans le sang périphérique ?

La première étape de ma thèse a été de mettre en place un protocole d'isolation et de culture des ILCs à partir des PBMCs du sang périphérique adulte humain. Les ILCs sont obtenues après enrichissement par une sélection immunomagnétique négative (kit EasySep™ , StemCell™) et sont étudiées immédiatement après isolation et après 24 h de culture optimisée ***(Figure 13)***.



60 donneurs

- Nombre : $9{,}1.10^4 - 3{,}4.10^5$ cellules/mL
  soit $2{,}7.10^5 \sim 9.10^5$ cellules / donneur
- Nombre moyen: $2{,}1.10^5$ cellules/mL
  soit $6{,}3.10^5$ cellules / donneur
- Rendement: 0.02% -0.7% */Moyenne: 0,18%*
- Théorie : 0.05-0.07% *des cellules mononucléées*

	ILC1	ILC2	ILC3
Pourcentage de variation	7 - 55 %	3 – 54 %	18 – 70 %

Figure 13: Représentation schématique du protocole d'isolation des ILCs à partir de sang périphérique humain et rendement

Les PBMCs isolés de sang frais sont utilisés comme matériel de départ pour l'enrichissement des ILCs humains par sélection immunomagnétique négative (StemCell™). Une partie des ILCs fraîchement isolées est directement caractérisées par cytométrie en flux, la seconde partie est mise en culture selon les différentes conditions souhaitées. Après 24 h sous stimulation, les ILCs sont à leur tour caractérisées par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sur 60 donneurs de sang frais sont indiqués ci-dessus avec le rendement moyen de l'isolation. Les pourcentages de chaque groupe d'ILCs sont également indiqués.

Nous avons effectué les premiers tests à partir de couches leuco-plaquettaires puis pour des raisons d'optimisation, le protocole a été transposé sur des poches de sang total. Pour évaluer la qualité de notre protocole, nous avons effectué un multi-marquage avant et après enrichissement sur des échantillons provenant de couches leuco-plaquettaires ***(Figure S1)*** et de sang frais ***(Figure 14, résultats complets Figure S2)*** (résultats obtenus par l'utilisation du cytomètre Navios, Beckman Coulter). Avant l'enrichissement (déplétion des cellules contaminantes), nous observons à partir d'échantillon de sang frais 0,53% de cellules Lin^- dont 31,4% exprimant le CD127. Après l'enrichissement, nous observons 84,5% de cellules Lin^- dont 91% exprimant le CD127 ***(Figure 14A)***. Notre protocole nous permet d'enrichir les ILCs totaux $CD127^+$ à 60% environ. Pour les différents groupes d'ILCs, les proportions d'enrichissement varient. Avant déplétion, nous observons 79,6% d'ILC1 ($CRTH2^-$ $CD117^-$), 23,2% d'ILC2 ($CRTH2^+$ $CD117^{+/-}$) et 20,4% d'ILC3 $NKp44^-$ et $NKp44^+$ ($CRTH2^-$ $CD117^+$). Après déplétion, nous observons 12,8% d'ILC1, 61,6% d'ILC2 et 86,3% d'ILC3 ***(Figure 14B)***. La proportion des cellules contaminantes NK, NKT, lymphocytes T et B, a également été quantifié avant et après déplétion ***(Figure S3)*** à l'aide du marqueur CD3 pour les lymphocytes T, du CD19 et CD20 pour les lymphocytes B et du CD16 et CD56 pour les cellules NK et NKT (selon la population étudiée). Le pourcentage résiduel des cellules contaminantes est globalement de: 0,4-7% de lymphocytes B, 0-2% de lymphocytes T et 0-5% de cellules NK et NKT ***(Figure S3)***.

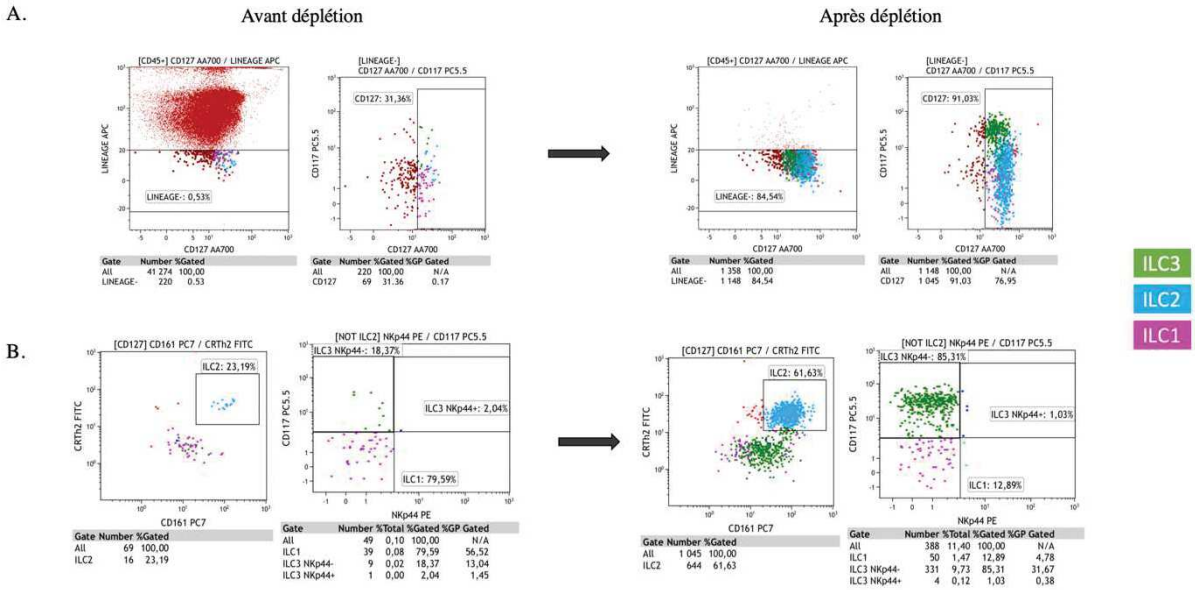


Figure 14: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de sang frais par cytométrie en flux

A. Comparaison de la population Lin$^-$ CD127$^+$ avant et après le protocole d'isolation des ILCs par sélection immunomagnétique négative. **B.** Observation de la distribution de chaque groupe d'ILCs avant et après enrichissement. La stratégie d'analyse est la suivante: Cellules vivantes → Cellules CD45$^+$ → Cellules Lin$^-$ → Cellules CD127$^+$ → ILC2, puis 'non-ILC2' : ILC1 - ILC3. Les ILC1 (CRTH2$^-$ CD117$^-$) sont identifiées en **fuchsia**, les ILC2 (CRTH2$^+$ CD117$^{+/-}$) en **bleu** et les ILC3 (CRTH2$^-$ CD117$^+$) en **vert**. Le marqueur NKp44 appartient à la famille des récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR) impliqués dans la reconnaissance de cellules infectées ou tumorales. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre Navios (Beckman Coulter) en collaboration avec Anne-Sophie Bedin (UMR_1058, Inserm, Montpellier) via leur protocole habituel.

Nous avons ensuite optimisé la culture des ILCs (tableau des milieux testés en ***Figure S4A)***. A travers cette étape, nous avons évalué la viabilité cellulaire, la dérive phénotypique et la capacité des ILCs à être activées. Le milieu optimal sélectionné est composé de RPMI, de sérum AB humain (10%), d'IL-7 (10 ng/mL), de sodium pyruvate (1 mM) et d'antibiotiques pénicilline-streptomycine. Néanmoins, l'IL-7 induit l'internalisation du CD127 (***Figure S4B)***, la chaine α du récepteur de l'IL-7. Par conséquent, nous ciblons en culture les cellules CD3$^-$ CD127$^{+/-}$, puis les marqueurs CRTH2 et CD117 pour identifier les différents groupes d'ILCs.

b. Stratégie d'analyse phénotypique des ILCs humaines

i. Les marqueurs d'identification

Après l'enrichissement, les ILCs sont caractérisées selon des critères morphologiques (lignée lymphoïde) ainsi que l'expression de marqueurs d'identification par cytométrie en flux (***Figure 15, Figure S5)***. Une première sélection morphologique en fonction de la taille et de la granulosité des cellules est effectuée sur la population lymphoïde ***(Figure 15-1)***. Au sein de cette population lymphoïde, les lymphocytes T sont exclus sur la base de l'expression du marqueur CD3 ***(Figure 15-2)***. Les lymphocytes T sont des cellules que nous voulons principalement éliminer en raison de leurs similarités avec les ILCs. Cette étape permet également de vérifier l'efficacité de la déplétion des lymphocytes T lors du protocole d'enrichissement. L'expression du CD127 permet de cibler les ILCs totaux $CD3^-$ $CD127^{+/-}$ ***(Figure 15-3)***. Ensuite, nous utilisons les marqueurs CRTH2 et CD117 pour identifier chaque groupe d'ILCs. Les marquages phénotypiques utilisés pour différencier chaque groupe d'ILCs au sein de la population lymphoïde $CD3^-$ $CD127^{+/-}$ sont les suivants: ILC1 ($CRTH2^-$ $CD117^-$), ILC2 ($CRTH2^+$ $CD117^{+/-}$) et ILC3 ($CRTH2^-$ $CD117^+$) ***(Figure 15-4).***

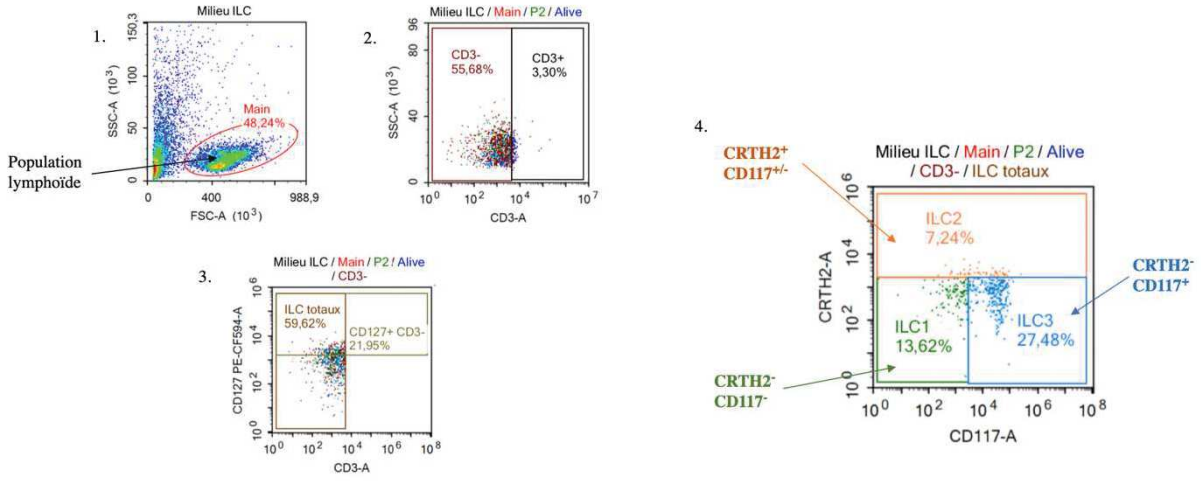


Figure 15: Stratégie d'analyse phénotypique des ILCs humaines fraichement enrichies à partir de sang frais par la technique de cytométrie en flux

La population lymphoïde est sélectionnée **(1)**. Les cellules $CD3^+$ (récepteur des Ly T) sont exclues **(2)**. Parmi les cellules $CD3^-$, l'expression du marqueur CD127 permet de mettre en évidence les ILCs totaux $CD3^-$ $CD127^{+/-}$**(3)**. L'expression des marqueurs CRTH2 et CD117 sur les cellules $CD3^-$ $CD127^{+/-}$ permet d'identifier chaque groupe d'ILCs **(4)**. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs du protocole d'enrichissement des ILCs utilisé.

ii. Récepteurs aux HAdVs

L'une des premières étapes de caractérisation des ILCs a consisté à explorer l'expression de différents marqueurs candidats pouvant être utilisé en tant que récepteurs d'entrée virale par les HAdVs ***(Figure 16).***

CAR est une molécule d'attachement primaire de l'HAdV-C5 lors de l'infection des cellules épithéliales. Nos résultats montrent que les ILCs fraîchement isolées n'expriment pas CAR à leur surface ***(Figure 16A, Figure S6A)***. Nous avons ensuite évalué l'expression de DC-SIGN (ou CD209)[435,436], un récepteur lectine de type C présent à la surface des macrophages, des DC myéloïdes, des pDC et des Mo-DC. Les ILCs n'expriment également pas DC-SIGN à leur surface ***(Figure 16A, Figure S6B).***

Le CD46 est un récepteur d'infection utilisé par l'HAdV-D26 et -B35. Nous observons une expression du CD46 par plus de 95% des ILCs (ILC1, ILC2 et ILC3) ***(Figure 16B, Figure S7A)***. Nous avons également évalué l'expression du CD49d (intégrines α_4) à la surface des ILCs, qui joue parfois le rôle de récepteur secondaire pour certains HAdVs. Nous observons une expression du CD49d par plus de 90% des ILCs, tous groupes confondus ***(Figure 16C, Figure S7B)***. Enfin, nous observons que la desmogléine 2 (DSG2), plus généralement utilisée par certains HAdVs des espèces B et D, n'est pas exprimée par les ILCs fraîchement isolées ***(Figure S8A)*** ou après une stimulation (données non montrées).

Nous avons par la suite exploré l'expression du CD16 (FcγRIII) pouvant être impliqué dans l'internalisation des HAdVs sous forme de complexes Ig - HAdVs en cas d'interactions. Ces données sont particulièrement intéressantes dans un contexte d'interaction hôte-pathogène pour explorer l'impact de l'immunité préexistante de l'hôte sur l'infection ou l'activation potentielle des ILCs. Nous observons une faible expression du CD16 à la surface des ILCs ***(Figure 16D, Figure S8B)***.

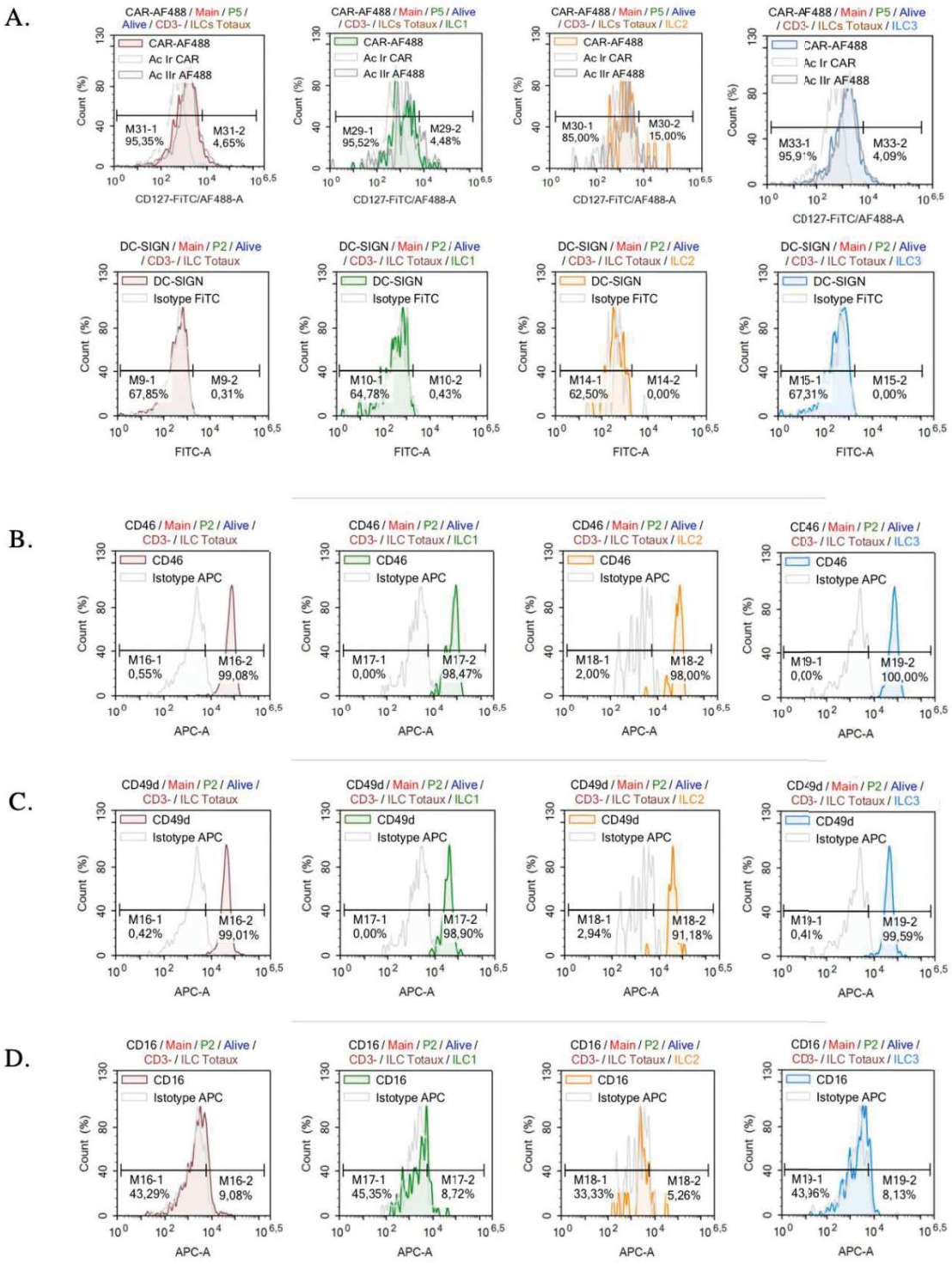


Figure 16: Expression des récepteurs candidats aux HAdVs: CAR, DC-SIGN, CD46, CD49d et CD16 par les ILCs humaines du sang périphérique

A. Expression de la protéine CAR et DC-SIGN par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. **B**. Expression de la protéine CD46 par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. **C.** Expression de la protéine CD49d par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. **D.** Expression de la protéine CD16 (FcγRIII) par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. La Desmogléine 2 (DSG2) a également été observée *(Figure S8)*. Les populations cellulaires ont été normalisé à 100%. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 2 à 4 donneurs indépendants.

iii. Récepteurs et marqueurs d'activation cellulaire

Afin d'évaluer l'activation des ILCs, nous avons testé différents PRRs et marqueurs pouvant servir de contrôle fiable d'activation cellulaire. Nous avons à la fois exploré les récepteurs candidats permettant d'activer les ILCs mais aussi les marqueurs d'activation tels que les molécules de CMH, le CD69, le CD161, le CD80 ou le CD86 permettant d'évaluer le niveau d'activation des cellules.

Nous avons commencé par caractériser l'expression d'un panel non-exhaustif de TLRs par les ILCs du sang périphérique. Les tests ont d'abord été effectué sur des échantillons de couches leuco-plaquettaires ***(Figure S9)*** puis sur des échantillons de sang frais ***(Figure 17)*** pour les TLR2, 3, 4 et 9**.** Les TLR2 et 4 sont situés sur la membrane plasmique et les TLR3 et 9 sur les membranes endosomales.

Nous observons pour les ILCs enrichies à partir de sang frais une faible expression moyenne des TLR2 *(<5%)*, 4 *(<7%)* et 9 *(<5%)*. Notons que les résultats varient (entre 3% et 20%) en fonction des donneurs. En revanche, le TLR3 est exprimé par environ 45% des ILCs $CD3^-$ $CD127^{+/-}$ ***(Figure 17)***.

Nous observons des variations dans l'expression de certains TLRs entre les ILCs enrichies de couches leuco-plaquettaires et les cellules enrichies à partir de sang frais. Les TLR2 et 3 ont une expression similaire entre les deux types d'échantillons cellulaires. Cependant, nous observons une expression plus élevée pour les TLR4 et 9 sur les cellules issues de couches leuco-plaquettaires, respectivement ~ 25% (TLR4) et ~ 40% (TLR9) ***(Figure S9)***.

Ensemble, ces résultats montrent que les ILCs sont hypothétiquement capable de détecter des PAMPs (ex: LPS) ou des DAMPs via l'expression de TLRs et ainsi déclencher une réponse immunitaire le cas échéant.

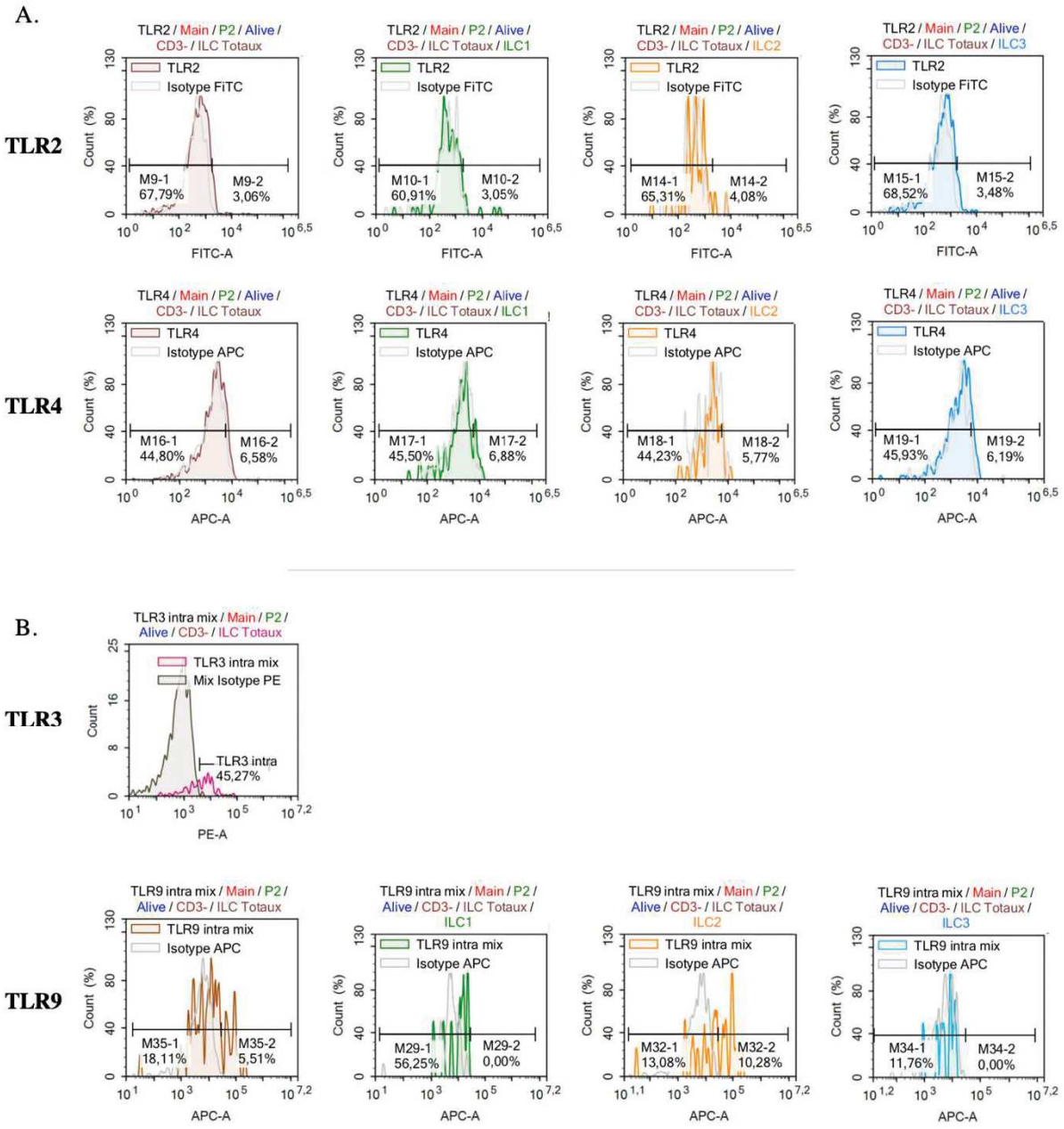


Figure 17: Expression de différents TLRs par les ILCs humaines du sang périphérique

A. Expression des TLR2 et TLR4 par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. **B.** Expression du TLR3 par les ILCs totaux et du TLR9 par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. Les populations cellulaires ont été normalisées à 100%. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 2 à 5 donneurs indépendants.

Nous avons ensuite exploré l'expression à la membrane plasmique des molécules de CMH-I (HLA-ABC) et de CMH-II (HLA-DR) ***(Figure 18)***. Les molécules de CMH-I et de CMH-II sont notamment impliquées dans la présentation des peptides associés aux lymphocytes T au cours de la mise en place de la réponse immunitaire. Nous observons que plus de 95% des ILC1, 2 et 3 expriment le CMH-I ***(Figure 18A)*** quelques soit le donneur. A

contrario, nous quantifions une faible expression du CMH-II par les ILCs ***(Figure 18B)***, mais aussi de fortes variations d'expression en fonction des donneurs. Globalement, le CMH-II est exprimé en moyenne par un peu moins de 20% des ILCs totaux. Une stimulation virale ou bactérienne par du LPS des ILCs n'augmente pas l'expression du CMH-II à la surface des cellules (données non montrées).

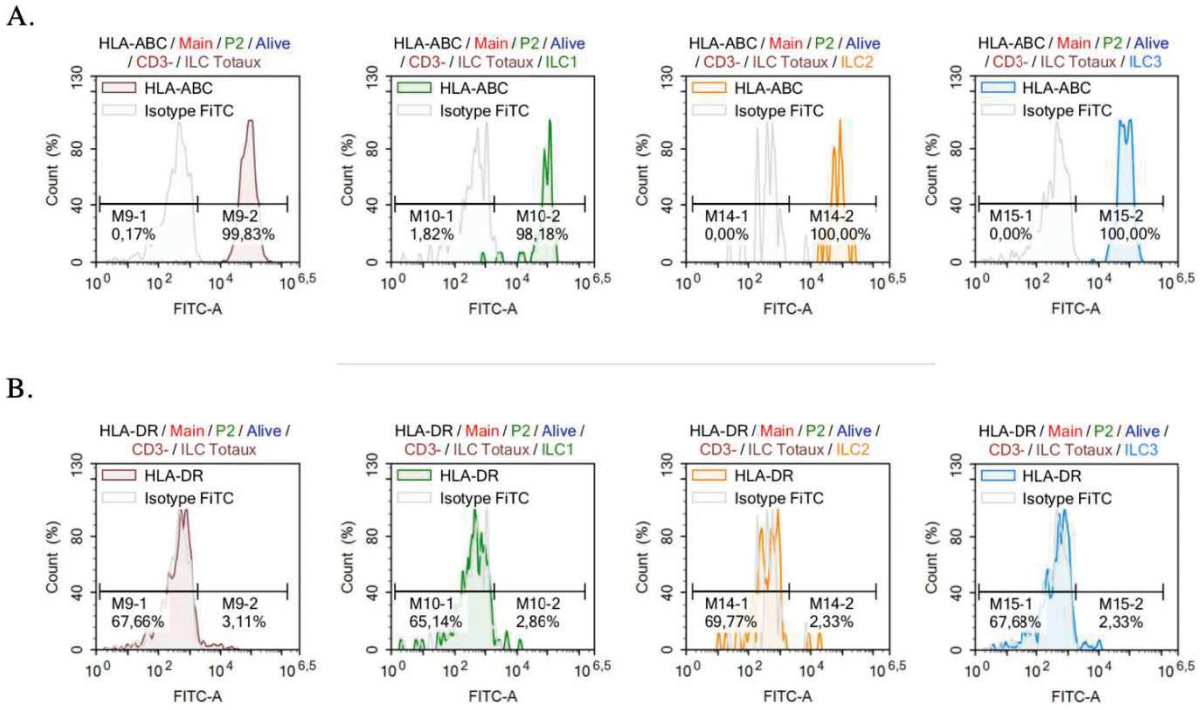


Figure 18: Expression des CMH-I (HLA-ABC) et CMH-II (HLA-DR) par les ILCs humaines du sang périphérique

Expression du CMH-I **(A)** et du CMH-II **(B)** par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. Les populations cellulaires ont été normalisées à 100%. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocye ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 3 donneurs indépendants pour le CMH-I. Pour le CMH-II, en raison de fortes variations entre les donneurs, les résultats ne représentent qu'un seul donneur.

Nous avons ensuite évalué l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD161 ***(Figure 19A-B)***. Le CD69 est un marqueur d'activation précoce exprimé par les cellules lymphoïdes (notamment les Ly T) et le CD161 est un marqueur dont l'expression augmente au cours de l'inflammation, principalement sur les cellules NK. Nous observons qu'un faible pourcentage d'ILCs fraîchement isolées exprime le CD69 (< 20%) après l'enrichissement ***(Figure 19A)***. Le CD161 est exprimé par environ la moitié des ILCs fraîchements isolées (40% - 47%) ***(Figure 19B)***. Cependant, nous remarquons que les niveaux d'expression du CD69 et du CD161 varient entre les donneurs.

Pour finir, l'étude des marqueurs CD80 et CD86, qui sont des molécules de co-activations clefs de la réponse inflammatoire participant au développement de la réponse adaptative[437], indique qu'ils ne sont pas exprimés par les ILCs fraîchement isolées ***(Figure 19C-D)***.

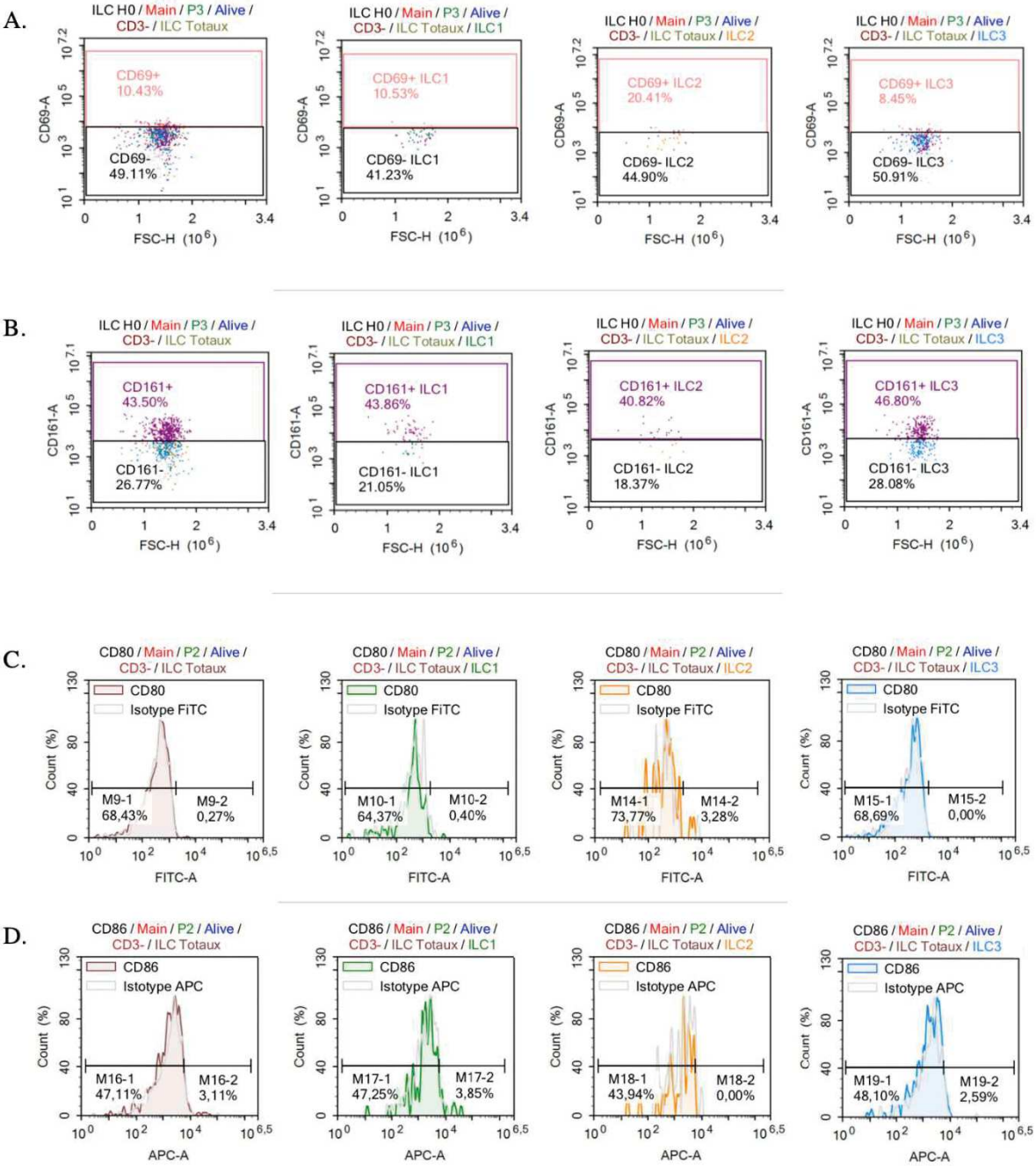


Figure 19: Expression de différents marqueurs d'activation CD69, CD161, CD80 et CD86 par les ILCs humaines du sang périphérique

Expression du marqueur CD69 (**A**), CD161 (**B**), CD80 (**C**) et CD86 (**D**) par les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. Les populations cellulaires ont été normalisées à 100%. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress. En raison de fortes variations entre les donneurs, les résultats présentés ne représentent qu'un seul donneur parmi les 30 testés (CD69), les 26 testés (CD161) et les 3 testés (CD80 et CD86).

L'expression des molécules de co-activations CD80 et CD86 par les ILCs a ensuite été évalué après une stimulation des ILCs de manière directe et indirecte. Une stimulation directe correspond à une infection des ILCs par des HAdVs et une stimulation indirecte correspond à l'infection préalable de cellules autre que les ILCs, dont les surnageants de culture sont utilisés pour stimuler les ILCs.

Avec une stimulation directe par du LPS, ou avec une infection par des HAdVs, l'expression du CD80 et du CD86 par les ILCs ne varie pas de façon significative (données non montrées).

La stimulation indirecte des ILCs augmente l'expression du CD80 et du CD86 d'environ 15% (n = 1, données non montrées). D'après nos résultats préliminaires, l'expression du CD80 et du CD86 varie davantage lors d'une stimulation indirecte des ILCs. Pour la suite de l'étude, l'expression de ces marqueurs ne sera pas évaluée.

Les résultats d'expression du CD69 et du CD161 par les ILCs après une stimulation seront présentés dans les paragraphes suivants. Pour la suite du projet, nous utiliserons le LPS comme contrôle positif d'activation des ILCs, car malgré une faible expression du TLR4, nos résultats indiquent une activation cellulaire élevée après une stimulation.

La ***Figure 20*** synthétise l'ensemble de nos résultats concernant l'expression des différents marqueurs étudiés dans cette partie du projet.

Après les étapes d'optimisation de purification, de mise en culture et de caractérisation des ILCs, nous avons ensuite évalué la capacité des HAdVs à infecter les ILCs.

A.

	Récepteurs cellulaires candidats aux HAdVs / complexes Ig - HAdVs					
	CAR	DC-SIGN	CD46	CD49d	DSG2	CD16
ILC1	X	X	> 90%	> 90%	< 10%	< 10%
ILC2	X	X				
ILC3	X	X			X	

B.

	Molécules intervenant dans l'immunité									
	TLR2	TLR3	TLR4	TLR9	CMH-I	CMH-II	CD80	CD86	CD69	CD161
ILC1	X	40 % - 50% ILCs totaux	< 10%	X	> 95%	< 20%	X	X	> 10%	< 10%
ILC2	X			< 10%			X	X	> 20%	
ILC3	X			X			X	X	< 10%	

Figure 20: Tableaux récapitulatifs des résultats de quantification des différents récepteurs et marqueurs étudiés dans la première partie du projet

Synthèse de l'expression des récepteurs cellulaires **(A)** impliqués dans l'infection par les HAdVs seuls ou sous forme immun complexée, et des molécules intervenant dans la reconnaissance des pathogènes, la présentation antigénique ou l'activation cellulaire **(B)** par les ILC1, ILC2 et ILC3 fraîchement isolées à partir de sang frais. (*X = Pas d'expression)*

2) Les ILCs peuvent être infectées puis activées par les HAdVs

a. Infection des ILCs par l'HAdV-C5, -D26 et -B35

Nous avons d'abord incubé des vecteurs HAdV-C5, -D26 ou -B35 avec les ILCs ***(Figure 21A-D)***. Ces vecteurs exprimant la GFP ou le YFP, nous pouvons visualiser par cytométrie en flux le pourcentage de cellules infectées. Nous observons que les trois HAdVs testés (à 10^4 pp/cellule) infectent comparablement les ILCs totaux avec des taux d'infection moyen après 24 h de 13,5% pour l'HAdV-C5, 13% pour -D26 et 17% pour -B35 ***(Figure 21A)***.

Ensuite, la comparaison pour chaque HAdV de l'expression de la GFP par les sous populations d'ILCs indique que pour l'ensemble des virus, les ILC2 sont les plus efficacement infectées, suivies des ILC1 pour l'HAdV-C5 et l'HAdV-B35 et des ILC3 pour l'HAdV-D26 ***(Figure 21B-D)***.

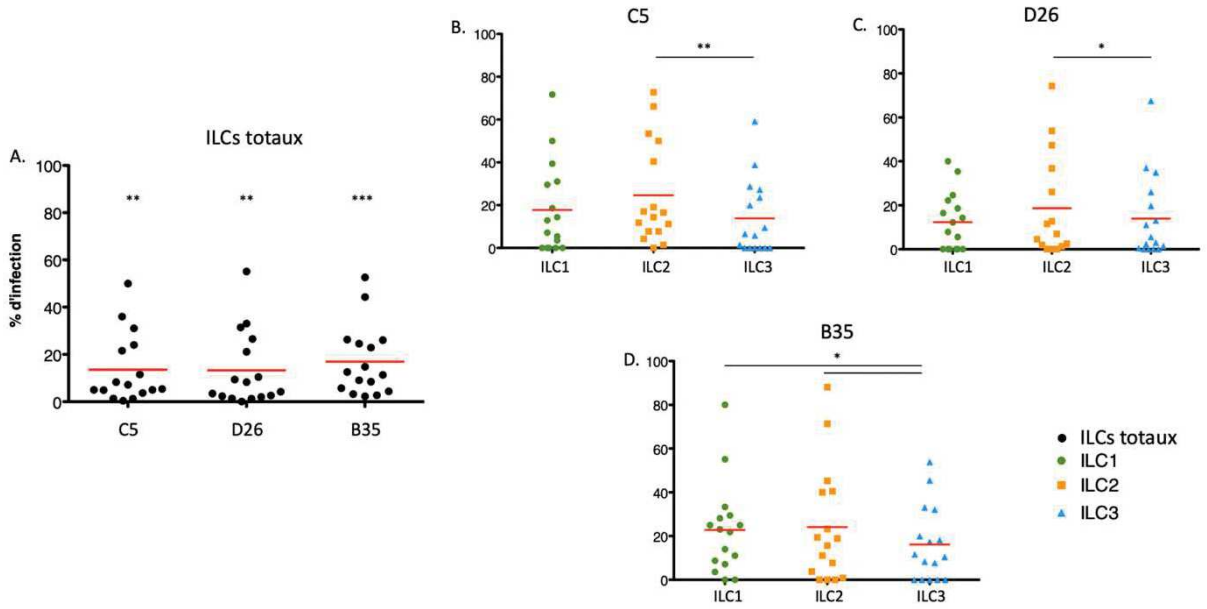


Figure 21: Evaluation de la capacité d'infection des ILCs par les HAdVs-GFP

L'expression de la GFP par les ILCs totaux ou les différents groupes a été mesurée 24 h post-infection par l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 ou l'HAdV-B35 (n = 16). **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant la GFP après l'infection. **B-D.** Pourcentages moyens des groupes d'ILCs exprimant la GFP après l'infection par l'HAdV-C5 **(B)**, l'HAdV-D26 **(C),** ou l'HAdV-B35 **(D)**. Les analyses statistiques par test de Student *t* apparié ont été effectué par comparaison avec les cellules non infectées et entre les groupes d'ILCs pour chaque HAdV *(ns, $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

Le profil d'infection de chaque HAdV pour un groupe d'ILC donné ***(Figure S10 et Figure 21)***, montre que les ILC1 sont préférentiellement infectées par l'HAdV-B35, suivies de -C5 et -D26 ***(Figure S10A)***. Les ILC2 sont plus infectées par l'HAdV-C5 et -B35 ***(Figure S10B)***. Enfin, les ILC3 montrent un profil similaire aux ILC1 ***(Figure S10C)***.

Chaque groupe d'ILC montre donc un profil d'infection relativement variable en fonction des différents HAdVs. Globalement, les ILCs semblent être plus permissives à l'HAdV-B35. Nous pouvons également remarquer une grande variabilité des infections entre les donneurs d'ILCs, passant d'une infection nulle à presque 80% de cellules exprimant le GFP ***(Figure 21)***.

b. Infection des ILCs par les HAdVs en présence d'Ac spécifique

Au cours d'une infection, l'organisme met en place un ensemble de mécanisme visant à éliminer le pathogène. L'un de ces mécanismes corresponds à la production d'Ac spécifiques pouvant directement se fixer au pathogène. La réponse Ac de l'hôte est considérablement plus efficace lors de la seconde rencontre avec le pathogène grâce à l'établissement de la mémoire

immunitaire. Cette composante humorale peut, de plus, fortement interférer avec les vaccins dérivés des HAdVs. Nous allons ici nous intéresser à l'impact de l'immunité humorale préexistante sur l'infection des ILCs par des HAdVs.

Pour cette partie du projet, nous utilisons une gamme de sérums préalablement testés par test de neutralisation pour la présence d'Ac neutralisants (AcN) dirigés contre l'HAdV-C5, -D26 et -B35 (Ouoba A & Paris O, soumis). Notre contrôle « IVIg », correspond à un pool de 95% d'IgG humaines issues de plasma d'une multitude de donneurs sains utilisé comme témoin de formation de complexes Ig - HAdVs principalement pour l'HAdV-C5. Le sérum E (SE) affiche un titre très élevé en AcN pour l'HAdV-C5 (3500) mais pas d'AcN pour l'HAdV-D26 ou -B35. Le sérum A (SA) possède un titre élevé en AcN pour l'HAdV-D26 (2500) et des titres faibles pour l'HAdV-C5 (50) et -B35 (0). Le sérum 14 (S14) possède des titres élevés en AcN pour l'HAdV-B35 (2200) et l'HAdV-C5 (2000) et un titre faible pour l'HAdV-D26 (120). Il s'agit du seul sérum parmi l'éventail testé (n > 400) pour lequel nous avons décelé la présence d'un titre élevé en AcN dirigés contre l'HAdV-B35. C'est pour cette raison que malgré sa positivité contre l'HAdV-C5, nous l'avons utilisé comme contrôle pour la formation de complexes Ig - HAdVs en présence de l'HAdV-B35. Il est utile de souligner pour cette partie du projet qu'un Ac peut être neutralisant, ou au contraire facilité l'infection en fonction des cellules ciblées. Ce phénomène d'ADE *(antibody-dependent enhanement)* favorisant l'infection virale par les Ac sera développé dans la partie discussion.

Pour les ILCs totaux, nous observons une meilleure expression de la GFP par l'HAdV-C5 et -D26 sous forme de complexes Ig - HAdVs en comparaison des vecteurs seuls. En revanche, pour l'HAdV-B35, nous observons en présence d'AcN (S14) une diminution de l'expression de la GFP ***(Figure 22A)***.

Pour les ILC1 et les ILC2, nous observons une augmentation de l'expression de la GFP en présence de complexes Ig - HAdVs comparable à celle observée pour les ILCs totaux ***(Figure 22B-C)***. En revanche, pour les ILC3 avec le complexe HAdV-C5-SE, nous observons une légère diminution de l'expression de la GFP ***(Figure 22D).***

Si nous comparons les groupes d'ILCs entre eux, les ILC2 (34%) et les ILC1 (29%) sont plus permissives au complexe HAdV-D26-SA que les ILC3 (19,5%) (données non montrées). De plus, les ILC1 (15%) affichent une expression de la GFP significativement supérieure à celle des ILC3 (7,5%) après une infection par le complexe HAdV-B35-S14 (données non montrées).

Globalement, les ILC3 semblent être les moins permissives aux infections par les HAdVs sous forme nue ou immun-complexée. A contrario, les ILC2 semblent être les ILCs les plus permissives aux infections par les HAdVs en présence ou non d'AcN.

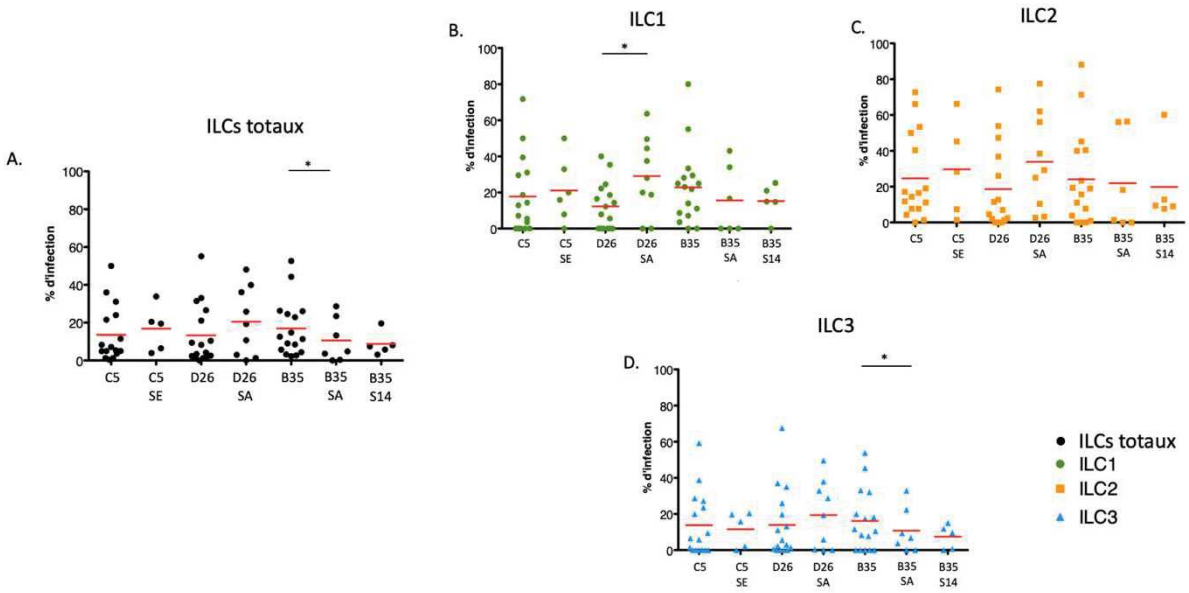


Figure 22: Evaluation de la capacité d'infection des ILCs par les HAdVs-GFP en présence d'anticorps (AcN)

L'expression de la GFP par les ILCs a été mesurée 24 h post-infection avec chaque HAdV avec ou sans AcN pour les ILCs totaux, ILC1, ILC2 et ILC3 ($n \geq 5$). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant la GFP après une infection avec ou sans AcN. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant la GFP après une infection avec ou sans AcN. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées et entre les différents adénovirus *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

Les résultats obtenus concernant l'infection des ILCs par les HAdVs avec ou sans la présence d'Ac spécifiques sont synthétisés schématiquement dans la ***Figure 23***. Le récapitulatif sous forme de tableau est disponible dans le ***Figure S11***.

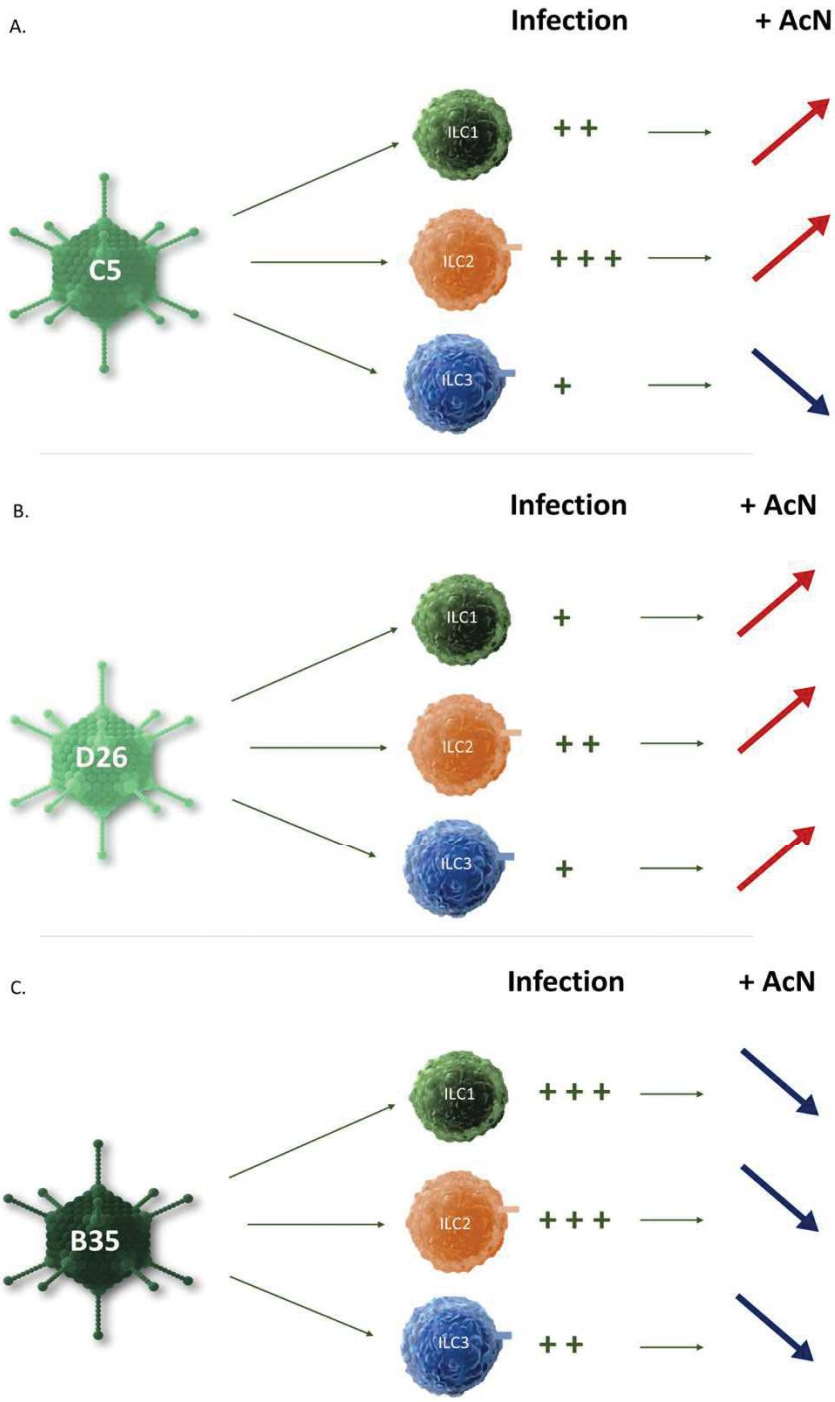


Figure 23: Représentation schématique de la capacité d'infection des ILCs humaines par les HAdVs en présence ou non d'Ac (AcN)

Synthèse de l'infection des ILCs par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** et l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

Après avoir caractérisé la capacité des HAdVs à infecter les ILCs sous forme nue ou immun-complexée, nous avons étudier le profil d'activation des ILCs par les HAdVs à travers l'expression de marqueurs d'activation, la distribution des groupes d'ILCs et le profil de cytokines sécrétées.

c. Profils d'activation des ILCs par les HAdVs

Afin d'évaluer l'activation des ILCs après une infection par les HAdVs, nous mesurons l'expression du CD69 et du CD161. Notre objectif est également d'évaluer si le choix de ces marqueurs est pertinent pour mesurer l'activation des ILCs dans notre modèle. Nous avons estimé le pourcentage d'ILCs exprimant les marqueurs d'intérêts en raison du faible nombre de cellules disponibles et des difficultés d'analyses des moyennes d'intensité de fluorescente (MFI). La distribution des ILCs dans les différentes conditions sera aussi examiné en comparaison des proportions observées pour les ILCs non-stimulées en raison des propriétés de plasticité des ILCs. En parallèle, la sécrétion de cytokines par les ILCs après une infection par les HAdVs sera examinée afin de mieux définir la participation des ILCs dans la réponse immunitaire inflammatoire et antivirale.

i. Expression du CD69

Le CD69 est un marqueur d'activation précoce exprimé par les cellules lymphoïdes. Environ 30% des ILCs expriment le marqueur CD69 en l'absence de stimulation (***Figure 24***). Nous observons une légère augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD69 en présence de LPS (35%), notamment sur les ILC3 (40%) (données non montrées). Le LPS semble donc activer préférentiellement les ILC3, corrélant avec le rôle décrit des ILC3 lors de réponse antibactérienne.

Nous observons de légères variations dans l'expression du CD69 par les différents groupes d'ILCs ***(Figure 24)***. Les ILC2 (33,5%) et les ILC3 (31,5%) semblent en moyenne exprimer plus de CD69 que les ILC1 (25%) en absence de stimulation.

Après l'infection par les HAdVs, nous observons globalement une tendance à l'augmentation de l'expression du CD69 par les ILCs totaux et une diminution de l'expression du CD69 en présence d'AcN ***(Figure 24)***. Nous observons également d'importantes variations dans le profil d'expression du CD69 entre chaque groupe d'ILCs. Tous les groupes d'ILCs semblent globalement exprimer moins de CD69 à la suite d'une infection par les HAdVs en présence d'AcN, mais les variations ne sont pas significatives, en raison d'un échantillonage limité et d'une forte hétérogénéité entre les donneurs ***(Figure 24)***.

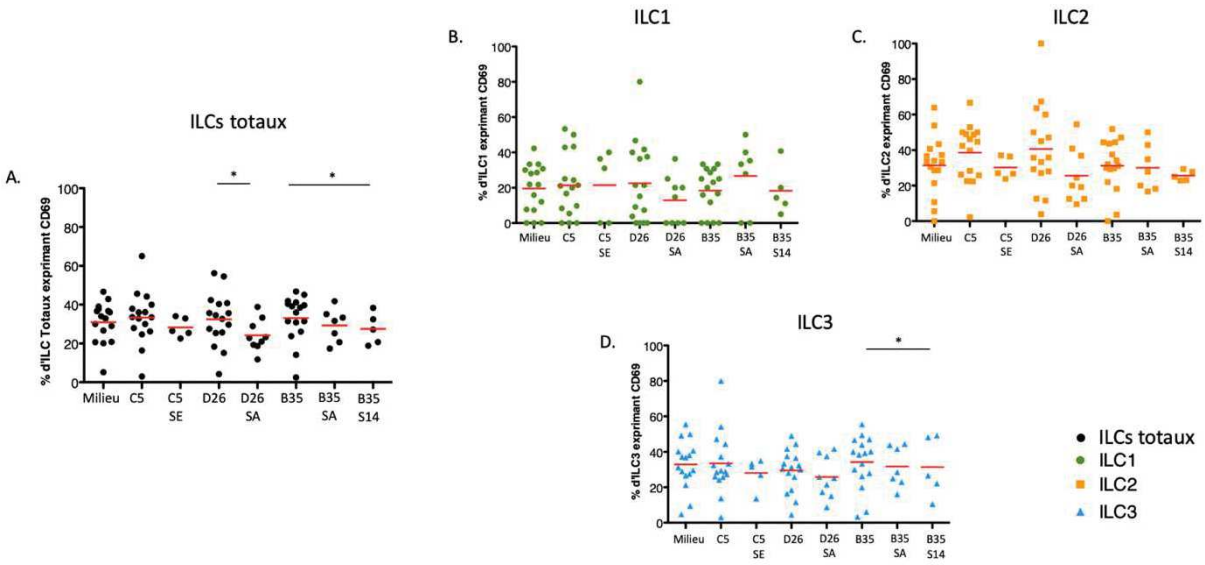


Figure 24: Expression du marqueur d'activation CD69 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD69 a été mesurée 24 h post-infection pour chaque HAdV avec ou sans AcN pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs (n ≥ 5). Les sérums E, A et 14 possèdent des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35 respectivement. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant le CD69. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant le CD69. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées et entre les différents adénovirus *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

Les résultats obtenus concernant l'expression du CD69 par les ILCs après l'infection par les HAdVs avec ou sans la présence d'Ac spécifiques sont synthétisés schématiquement dans la ***Figure 25*** et sous forme de tableau dans la ***Figure S11***.

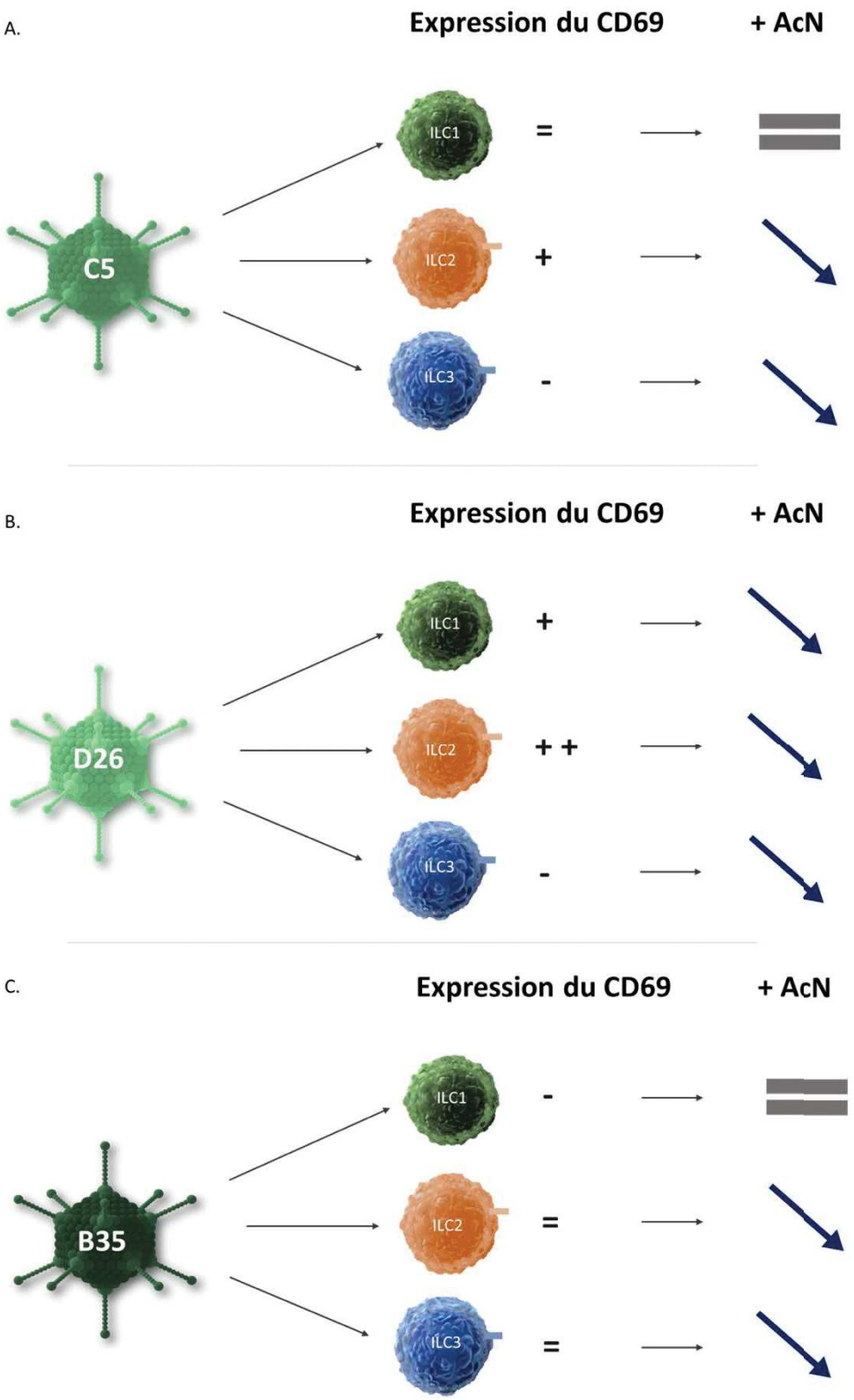


Figure 25: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'Ac (AcN)

Synthèse de l'expression du CD69 par les ILCs après une infection par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

Pour conclure, nous observons une diminution du pourcentage d'ILCs exprimant le CD69 après une infection sous forme immun-complexée en comparaison des HAdVs seuls. Globalement, nous montrons un pourcentage d'expression du CD69 plus élevé pour les ILC2 puis les ILC3, suivit des ILC1 pour toutes les conditions.

ii. Expression du CD161

Le CD161 est un marqueur exprimé au cours de l'inflammation notamment pour les cellules NK, qui appartiennent aux groupes des ILC1. Nous avons donc évalué l'expression de ce marqueur dans notre modèle.

En l'absence de toute stimulation, environ 60% des ILCs expriment le CD161. Le pourcentage d'expression du CD161 est globalement plus élevé par les ILC2, suivi des ILC3 et des ILC1 (***Figure 26***). Nous observons une légère augmentation d'expression du CD161 en présence de LPS notamment pour les ILC2 (83%) (données non montrées).

Le nombre restreint d'échantillons et le pourcentage élevé d'ILCs exprimant le CD161 en absence de stimulation ne nous permet pas d'observer de variations significatives. L'infection par les HAdVs seuls n'induit pas d'augmentation du pourcentage d'ILCs exprimant le CD161. Cependant, une tendance semble se dégager pour les ILCs totaux où nous observons une expression du CD161 légèrement plus élevée avec l'HAdV-C5 (63,6%) en comparaison de l'HAdV-B35 (58,3%) ***(Figure 26A)***. Nous constatons le même profil d'expression du CD161 pour les ILC3 lors d'une infection par l'HAdV-D26 (68,2%) en comparaison avec l'HAdV-B35 (60%) ***(Figure 26D)***. Il semblerait qu'en revanche, l'infection par l'HAdV-B35 induise une légère diminution du pourcentage d'ILCs totaux et plus spécifiquement des ILC1 exprimant le CD161 par rapport aux autres HAdVs et au contrôle négatif.

En présence d'AcN, les variations d'expression du CD161 par les ILCs ne sont dans l'ensemble pas significatives. Nous observons cependant pour les ILC1, une augmentation de l'expression du CD161 au cours de l'infection par le complexe HAdV-B35-SA (54,6%) en comparaison de l'HAdV-B35 seul (29,1%) alors que pour le complexe HAdV-B35-S14, nous observons un profil opposé ***(Figure 26B)***. En revanche pour les ILC3 et l'HAdV-B35, le pourcentage de cellules exprimant le CD161 augmente en présence de SA (78,4%) et de S14 (70,8%) en comparaison du virus seul (60,1%) ***(Figure 26D)***.

Globalement, après une infection par les HAdVs, nous observons une plus forte expression du CD161 par les ILC3 que par les ILC1 pour tous les virus testés. En présence d'HAdVs sous forme immun-complexée, nous observons un pourcentage d'expression du CD161 plus élevé pour les ILC3 que pour les ILC1. Ce profil d'expression n'est pas observé en présence de sérum ne possédant pas d'AcN contre l'HAdV-B35 (SA) (données non montrées).

Cependant, pour les ILC1 et les ILC3 principalement nous avons été confrontés à de fortes variations dans le pourcentage d'expression du CD161 entre les donneurs. Bien que nécessitant des investigations plus poussées, nos données actuelles indiquent que le CD161 n'est pas un candidat idéal pour le suivi de l'activation des ILCs dans notre modèle.

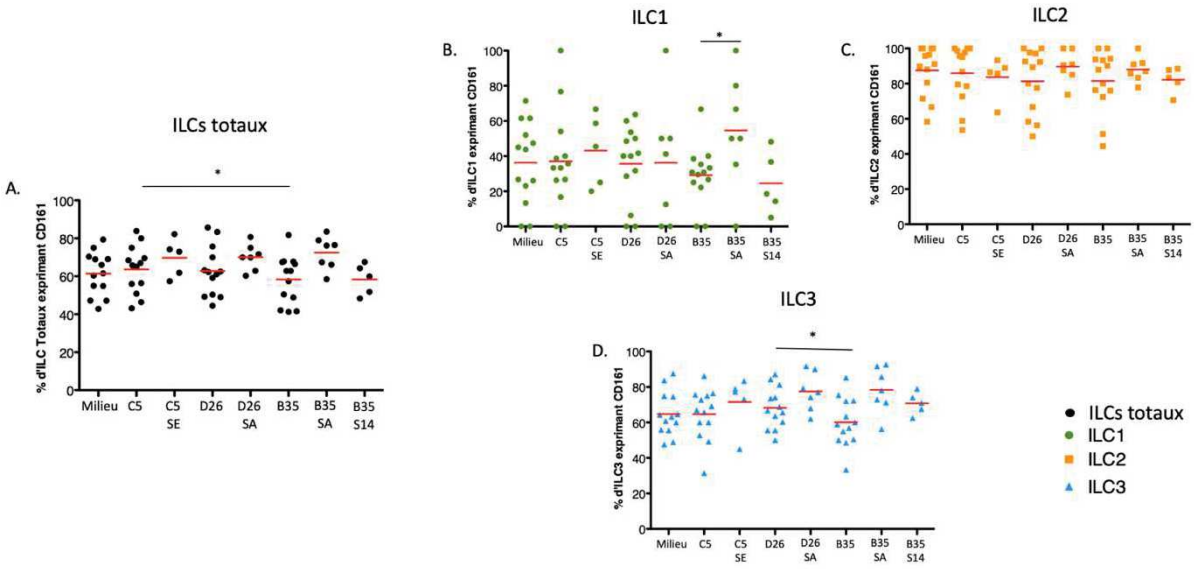


Figure 26: Expression du CD161 par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD161 par les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs est mesurée 24 h post-infection avec chaque HAdV avec ou sans AcN (n ≥ 5). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant le CD161. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant le CD161. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées et entre les différents adénovirus *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

iii. Distribution des ILCs

Les ILCs sont des cellules capables de dériver d'un groupe à un autre en fonction des stimulations reçues dans leur environnement. La présence de cytokines dans le milieu peut influencer l'expression des différents facteurs de transcription régissant le devenir des ILCs en ILC1 (T-bet), ILC2 (GATA-3) ou ILC3 (ROR-γ*t*) permettant d'orienter plus efficacement la réponse immunitaire. C'est pourquoi, nous avons étudié les variations potentielles du profil de distribution phénotypique des ILCs dans notre modèle d'infection par les HAdVs.

Pour cette étude, nous avons déterminé le pourcentage d'ILCs totaux présent dans la population lymphoïde préalablement isolée, puis nous avons évalué le pourcentage des différents groupes d'ILCs. Les pourcentages obtenus pour chaque condition sont comparés avec le témoin négatif. Nous avons été confrontés à des variations dans le pourcentage d'ILCs totaux entre donneur (de 40% à 90%). Ces variations sont dépendantes de l'échantillon sanguin (variation inter-donneur et qualité de l'échantillon), mais aussi de la qualité de l'isolement des cellules, impactée par la rareté des ILCs dans le sang.

Encore une fois, la limitation de notre échantillonnage et les variations entre donneurs ne permettent pas d'observer de variations significatives concernant la distribution des ILCs dans les conditions testées.

Néanmoins, nous observons dans l'ensemble significativement plus d'ILC3 que d'ILC2 et d'ILC1 dans nos échantillons ***(Figure 27)***. Nous avons également systématiquement observé une diminution des ILCs totaux entre le contrôle sans virus et la condition HAdV-C5 ***(Figure 27A)***.

Globalement en présence d'AcN, nous n'observons également pas de variations significatives dans la distribution de chaque groupe d'ILCs par rapport aux conditions HAdVs seuls. Nous observons une légère augmentation du pourcentage d'ILCs totaux et des ILC1 avec le complexe HAdV-B35-S14 en comparaison des contrôles. Nous avons également observé une légère augmentation du pourcentage d'ILC3 avec le complexe HAdV-C5-SE (41%) en comparaison avec le virus seul (34,6%) ***(Figure 27D)***.

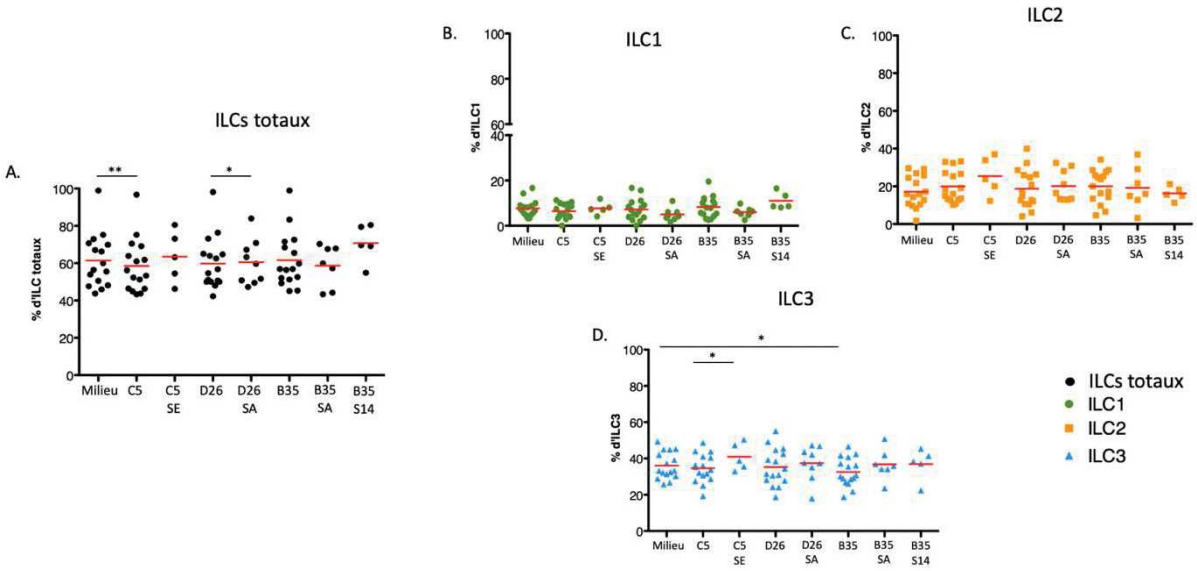


Figure 27: Distribution des ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

La distribution des ILCs est étudiée 24 h post-infection pour chaque HAdV avec ou sans AcN pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs (n ≥ 5). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)**. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées et entre les différents adénovirus *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

Globalement l'infection par les HAdVs avec ou sans AcN n'induit pas de changement significatif dans la distribution des groupes d'ILCs, à l'exception des ILC3 et de la quantité d'ILCs totaux. Cependant, les informations recueillies dans notre modèle ne nous permettent pas de conclure que les HAdVs peuvent influencer le profil de distribution phénotypique des ILCs.

iv. Criblage des cytokines sécrétées après une infection par les HAdVs

Les ILCs sont particulièrement sensibles à leur environnement et participent au développement et à l'orientation de la réponse immunitaire par la production de cytokines. Nous nous sommes donc interrogés sur la nature des cytokines sécrétées par les ILCs après une infection par les HAdVs. En raison du nombre limité de cellules nous avons travaillé sur les ILCs totaux uniquement. Le rôle de chaque cytokine sélectionnée sera abordé dans la discussion.

Nous avons effectué un criblage à l'aide de deux panels de 13 cytokines impliquées principalement dans la réponse antivirale, et dans le déclenchement ou l'orientation de la

réponse pro-inflammatoire et de l'immunité adaptative (Ly T helper) ***(Figure 28)***. Certaines cytokines sont communes aux deux panels (l'IL-6, le TNF, l'IFN-γ et l'IL-10).

Lors du criblage, le niveau de sécrétion de chaque cytokine a été normalisé par rapport au profil sans infection. Le profil de cytokines obtenu après une stimulation via le LPS, nous a permis de contrôler le potentiel sécrétoire des ILCs. Suite à l'infection des ILCs par les HAdVs, nous avons pu discriminer 3 groupes de cytokines classées selon le niveau de sécrétion moyen mesuré pour l'ensemble des conditions et des donneurs (***Figure 28***). Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées.

Pour le panel 1, le niveau de sécrétion de l'IL-1β, du TNF, de l'IFN-λ_1 et de l'IFN-γ est inférieur à 100 pg/mL. Pour l'IL-8 et l'INF-β, la sécrétion moyenne mesurée est comprise entre 100 et 200 pg/mL. Enfin, l'IFN-$\lambda_{2/3}$ est sécrétée à une concentration sécrétion supérieure à 200 pg/mL (***Figure 28A***). Concernant le panel 2, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IFN-γ, le TNF et l'IL-21 sont produits à des concentrations inférieures à 100 pg/mL (***Figure 28B***). Concernant les cytokines communes aux deux panels, les résultats sont comparables pour le TNF et l'IFN-γ. En revanche, nous détectons la production d'IL-6 dans le surnageant des ILCs avec le panel 2 uniquement.

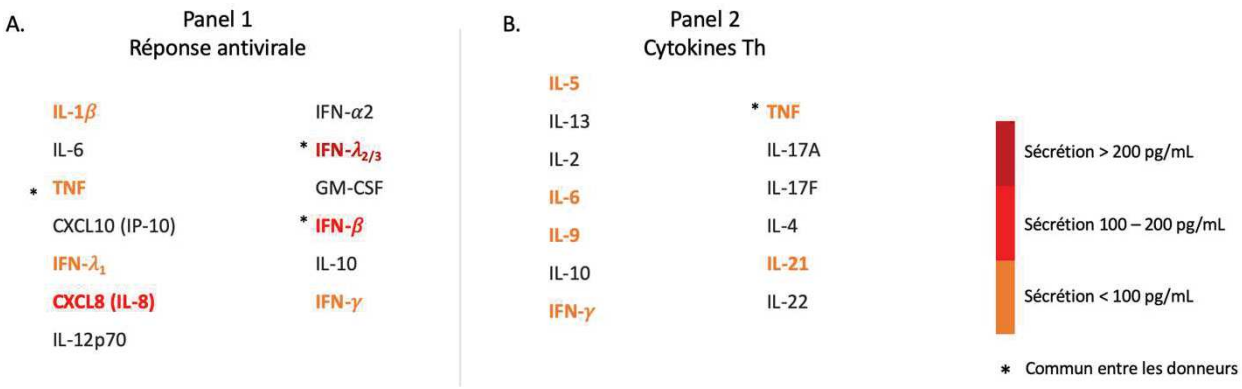


Figure 28: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une infection par les HAdVs

La présence de cytokines appartenant à un panel antiviral (**A**) et un panel de cytokines Th (**B**) dans le surnageant des ILCs infectées par les HAdVs a été évaluée par le système CBA (*cytometric bead array*) (n = 5). Les cytokines présentant une sécrétion moyenne inférieure à 100 pg/mL sont représentées en **orange**, celles sécrétées en moyenne entre 100 et 200 pg/mL en **rouge** et celles ayant une sécrétion supérieure à 200 pg/mL sont en **rouge foncé**. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel LegendPlex™.

Le schéma de synthèse des résultats est disponible dans la ***Figure 29*** et sous forme de tableau en ***Figure S11***.

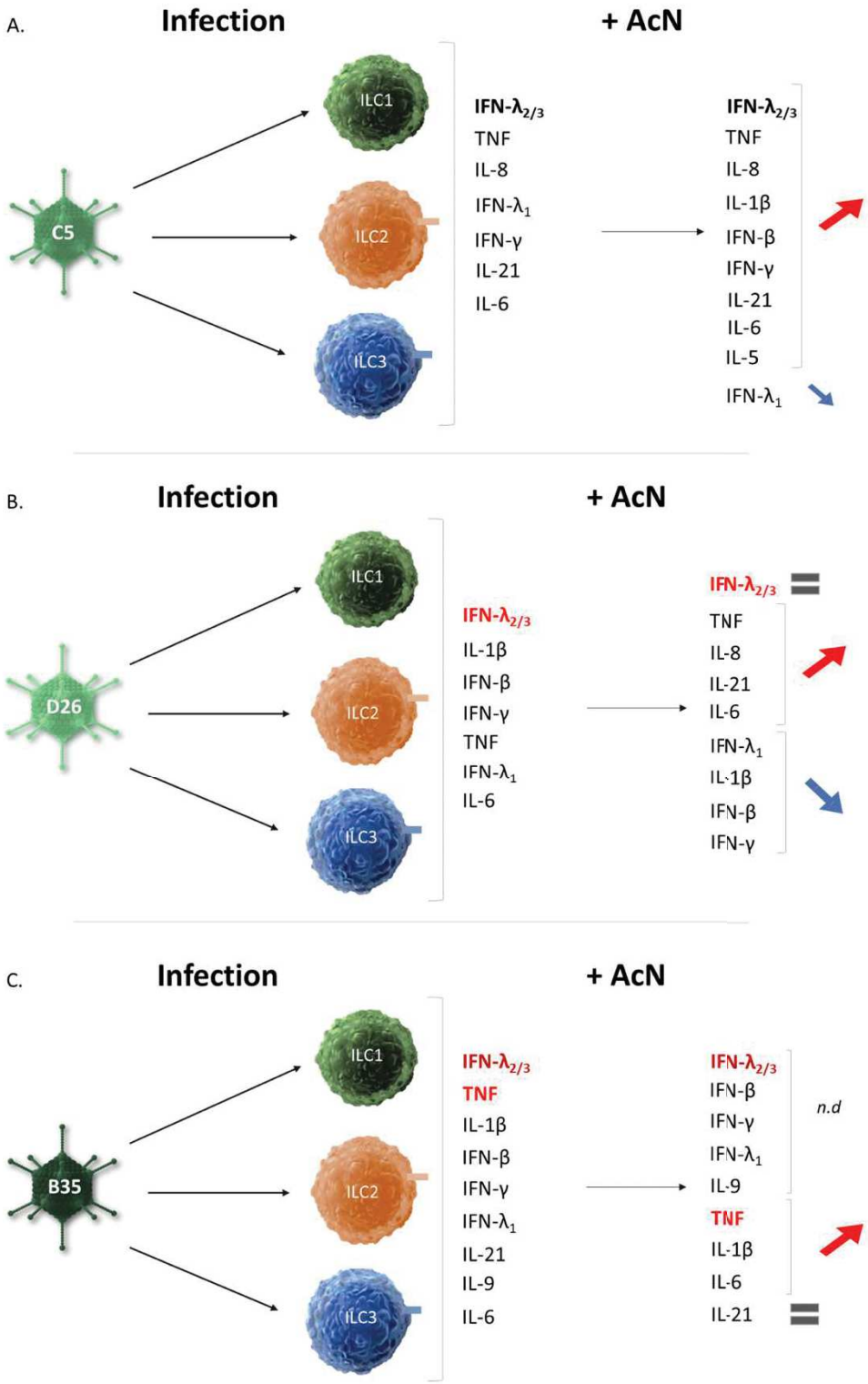


Figure 29: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une infection par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

Synthèse des cytokines sécrétées par les ILCs après une infection par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

Pour conclure, l'infection par les HAdVs induit la production de cytokines à activité pro-inflammatoire et antivirale par les ILCs comparable à un profil Th1 et associée à une infection virale.

v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une infection par les HAdVs

Nous avons observé à travers les différents paramètres étudiés des profils variables concernant la capacité d'infection des ILCs par les HAdVs, mais aussi l'expression du marqueur CD69 et le profil de cytokines sécrétées (***Figure S11***).

Pour résumer cette première partie, nous constatons que les 3 HAdVs infectent les ILCs, mais que l'HAdV-B35 infecte le mieux. Sous forme de complexes Ig - HAdVs, les HAdVs semblent infecter plus efficacement les ILCs en comparaison des HAdVs seuls. Les ILC2 sont globalement les plus permissives aux infections par les HAdVs. Selon nos différentes stratégies d'évaluation de l'activation des ILCs, nous montrons que les ILC1 et les ILC2 sont sensibles à la stimulation par les HAdVs. Enfin, lors de la stimulation des ILCs par les HAdVs, nous observons la sécrétion d'un profil de cytokines correspondant plutôt à celui des ILC1 (TNF et IFN-γ) associé à la production de cytokines possédant une activité antivirale directe, telles que les interférons de type I (INF-β) et III (IFN-λ).

L'ensemble des résultats concernant l'infection et l'activation/stimulation des ILCs par les HAdVs sont synthétisées schématiquement dans le ***Figure 30***.

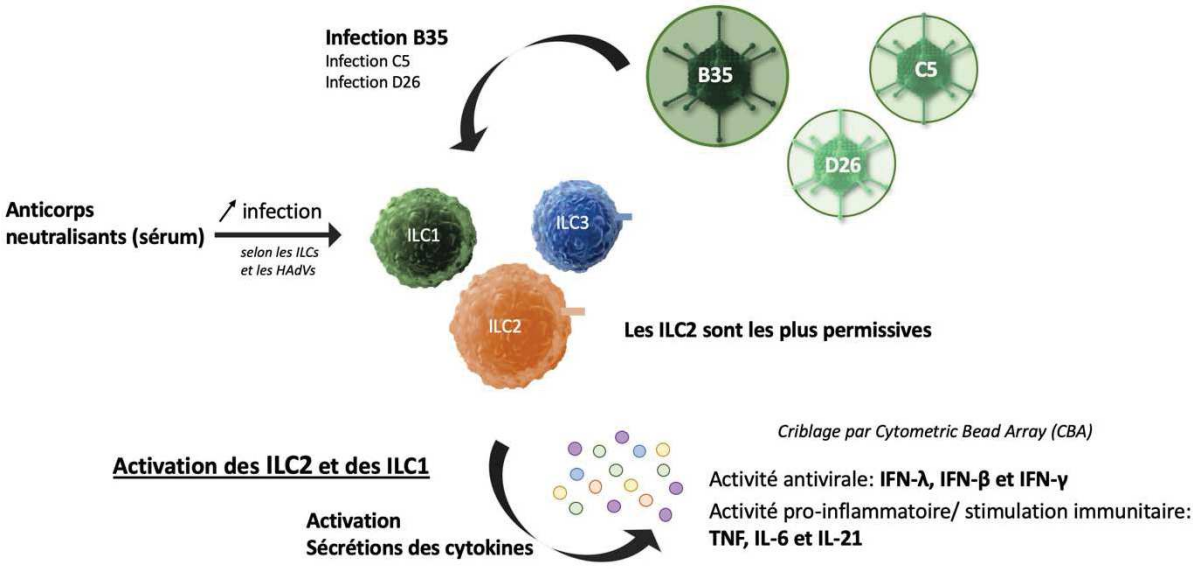


Figure 30: Synthèse de l'activation/stimulation des ILCs après une infection par les HAdVs

Nous avons évalué l'activation des ILCs par l'expression des marqueurs CD69 et CD161, leurs distributions et la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire.

L'étape suivante consiste à déterminer si l'environnement inflammatoire/antiviral généré par d'autres types cellulaires en réponse aux HAdVs peut indirectement impacter le profil d'activation des ILCs. Nous avons commencé par évaluer l'activation des ILCs à travers les cellules épithéliales pulmonaires A549 puis à travers les DC.

3) Profils d'activation des ILCs suite à l'infection des cellules épithéliales par les HAdVs

Parce que les ILCs sont localisées dans les muqueuses, et que leurs interactions avec les cellules épithéliales avoisinantes sont des évènements cruciaux dans l'induction et l'orientation de la réponse immunitaire, nous avons évalué ces interactions *in vitro* dans un contexte d'infection par les HAdVs.

a. Profils d'activation des cellules épithéliales suite à l'infection par les HAdVs

i. Infections des cellules A549 par les HAdVs

La première étape consiste à évaluer la capacité d'infection des cellules A549 par les HAdVs en présence ou non d'AcN ***(Figure 31)***. Après l'infection directe des cellules A549,

nous observons un pourcentage d'infection de 57% pour l'HAdV-C5, 46% pour -D26 et 84% pour -B35 (à 10^3 pp/cellules) ***(Figure 31A)***. La présence d'AcN réduit fortement l'infection par rapport aux conditions HAdVs seuls. Les complexes Ig - HAdVs formés avec IVIg servent de témoins d'infection. La présence d'IVIg fait chuter l'infection des cellules A549 par l'HAdV-C5 contrairement aux conditions avec D26-IVIg et B35-IVIg (qui présentent un profil d'infection similaire aux HAdVs seuls) ***(Figure 31B)***. Comparativement, les complexes C5-SE, D26-SA et B35-S14 montrent respectivement 7% d'infection, 1% d'infection et 11% d'infection. En présence d'un sérum sans AcN contre l'HAdV-B35 (SA), le pourcentage de cellules infectées GFP^+ est comparable à celui obtenu avec l'HAdV-B35 seul ***(Figure 31B)***.

Ces résultats confirment l'efficacité des AcN à réduire l'infection des cellules A549 par les HAdVs.

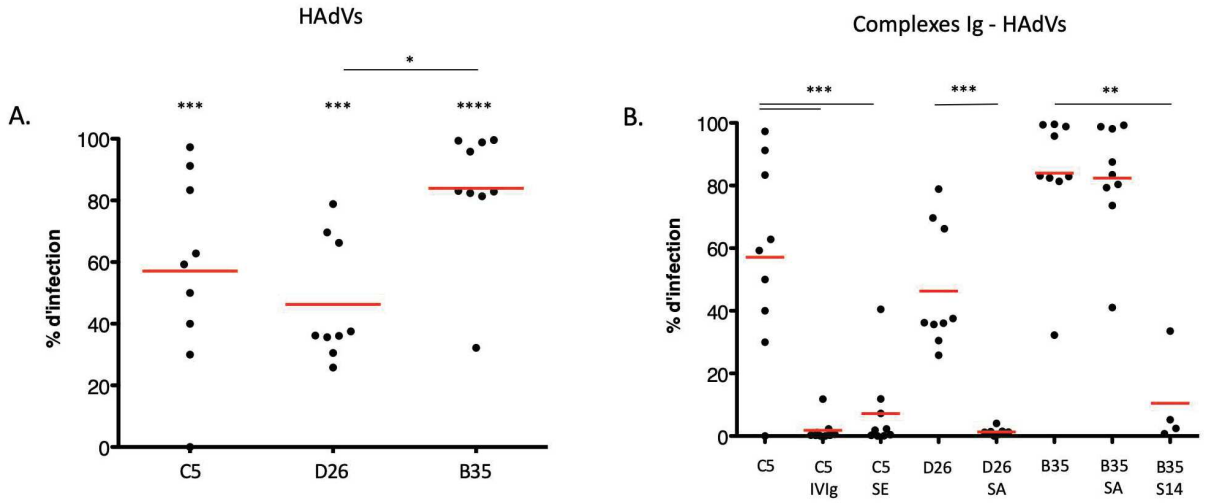


Figure 31: Capacité d'infection des cellules A549 par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'infection des cellules A549 a été mesurée 24 h post-infection avec chaque HAdV en absence **(A)** (n = 9) ou en présence d'AcN **(B)** (n ≥ 4). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les contrôles *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

ii. Expression du CMH-I par les cellules A549

Nous utilisons le CMH-I comme marqueur d'activation des cellules A549[101]. Environ 65% des cellules A549 expriment le CMH-I en moyenne ***(Figure 32)***. Les sérums seuls ne modifient pas l'expression du CMH-I (résultats non montrés). Nous observons une diminution

de l'expression des molécules du CMH-I après 24 h d'infection par les 3 HAdVs. En revanche, sous forme de complexes Ig - HAdVs, l'expression du CMH-I est comparable à l'expression basale des cellules A549.

L'utilisation de sérums sans AcN contre les HAdVs utilisés entraîne un profil d'expression du CMH-I similaire aux conditions d'infection par les HAdVs seuls (***Figure 32***).

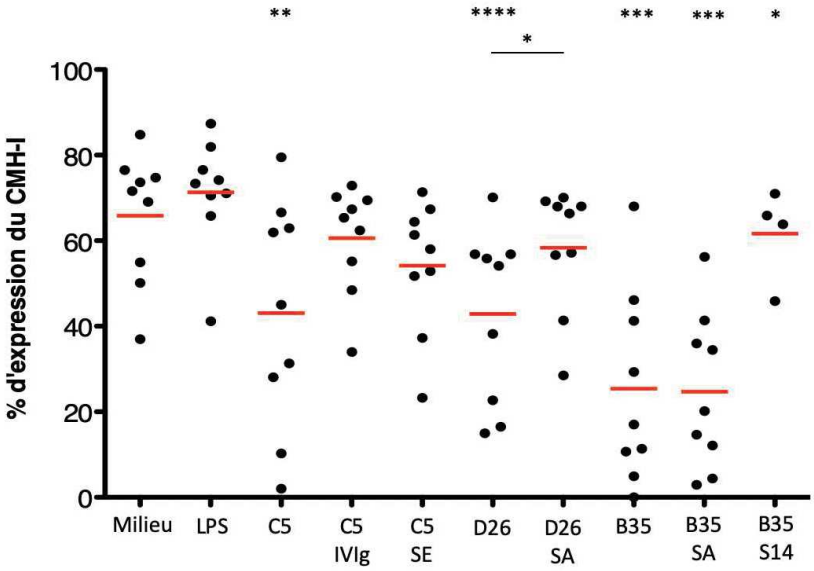


Figure 32: Expression du CMH-I par les cellules A549 après une infection par les HAdVs
L'expression du CMH-I par les cellules A549 a été mesurée 24 h post-infection avec chaque HAdV (n ≥ 4). Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

En résumé, nous observons qu'une infection par les HAdVs induit une diminution de l'expression du CMH-I par les cellules A549 dans notre contexte d'étude. En présence d'AcN spécifiques, l'infection des cellules A549 par les HAdVs est réduite et les cellules retrouvent un profil d'expression basal du CMH-I. Les HAdVs ont donc la capacité d'infecter et d'activer les cellules A549, que nous évaluons par les variations d'expression du CMH-I. Nous utiliserons ces observations pour évaluer l'effet indirect des HAdVs sur l'activation des ILCs par l'intermédiaire des cellules épithéliales (***Figure 5*** *paragraphe II.2.ii*).

b. Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation indirecte

A présent, évaluons le profil d'activation des ILCs dans un contexte de stimulation indirecte via les cellules A549. Les ILCs participent en coopération avec d'autres cellules de

l'immunité à la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. Ici, les cellules A549 ont été préalablement infectées par l'HAdV-C5, -D26 ou -B35. Nous souhaitons déterminer si dans un contexte d'infection naturelle par les HAdVs ou de vaccination, les cellules épithéliales peuvent influencer sur la physiologie des ILCs. Le surnageant de 24 h des cellules A549 activées/infectées est utilisé pour stimuler les ILCs.

Dans cette optique, nous évaluons l'expression du CD69 et du CD161, la distribution des ILCs, ainsi que la sécrétion de cytokines.

i. L'expression du CD69

Les sérums seuls n'induisent pas de variation de l'expression du CD69 par rapport au contrôle milieu seul. Nous ne constatons globalement pas de différences pour l'expression du CD69 par les ILCs totaux $CD3^-$ $CD127^+$ en milieu ILC et en présence du surnageant des cellules A549 (***Figure S12***). Cependant, nous observons une augmentation du pourcentage d'ILCs exprimant le CD69 après une stimulation au LPS (***Figure S12A***). Le même profil est observé après une stimulation par le LPS pour les ILC2 et les ILC3 (***Figure S12C-D)***. A contrario, le pourcentage d'ILC1 exprimant le CD69 diminue en présence de LPS (***Figure S12B***).

Brièvement, nous observons à l'exception des ILC1, que le pourcentage de cellules exprimant le CD69 augmente après une stimulation par le surnageant des cellules A549 infectées par les 3 HAdVs (***Figure S12***). Pour les ILC1, le pourcentage de cellules exprimant le CD69 diminue avec l'HAdV-C5 et l'HAdV-B35, mais augmente après une stimulation par le surnageant des cellules A549 infectées par l'HAdV-D26 (***Figure S12B***). En présence d'AcN, à l'exception de l'HAdV-C5, nous observons une légère diminution du pourcentage de cellules exprimant le CD69 (***Figure S12***).

Si nous comparons entre chaque groupe d'ILCs les profils obtenus pour chaque condition, nous observons une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD69 pour les ILC2 et les ILC3 après une stimulation par le LPS. Avec l'HAdV-C5, nous observons une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD69 pour les ILC2 et les ILC1, alors qu'avec l'HAdV-B35, cet effet est observé principalement pour les ILC2 et les ILC3.

Globalement, nous pouvons observer à la suite d'une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant de cellules A549 infectées, des profils différents en fonction des groupes d'ILCs étudiés. Nous quantifions un pourcentage basal de cellules exprimant le CD69 plus élevé pour

les ILC3 et les ILC2, que pour les ILC1. Ce profil confirme les résultats vus dans la ***Figure 24*** après une infection directe des ILCs par les HAdVs. La stimulation indirecte des ILCs par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs ne montre pas un impact élevé sur le pourcentage de cellules exprimant le CD69 à l'exception des ILC1 pour l'HAdV-D26 et des ILC2 pour l'HADV-C5. Les AcN semblent diminuer le pourcentage de cellules exprimant le CD69 pour les ILC1 et les ILC2, à l'exception de l'HAdV-C5.

La synthèse des résultats obtenus est disponible schématiquement dans la ***Figure 33*** et sous forme de tableau dans la ***Figure S13***.

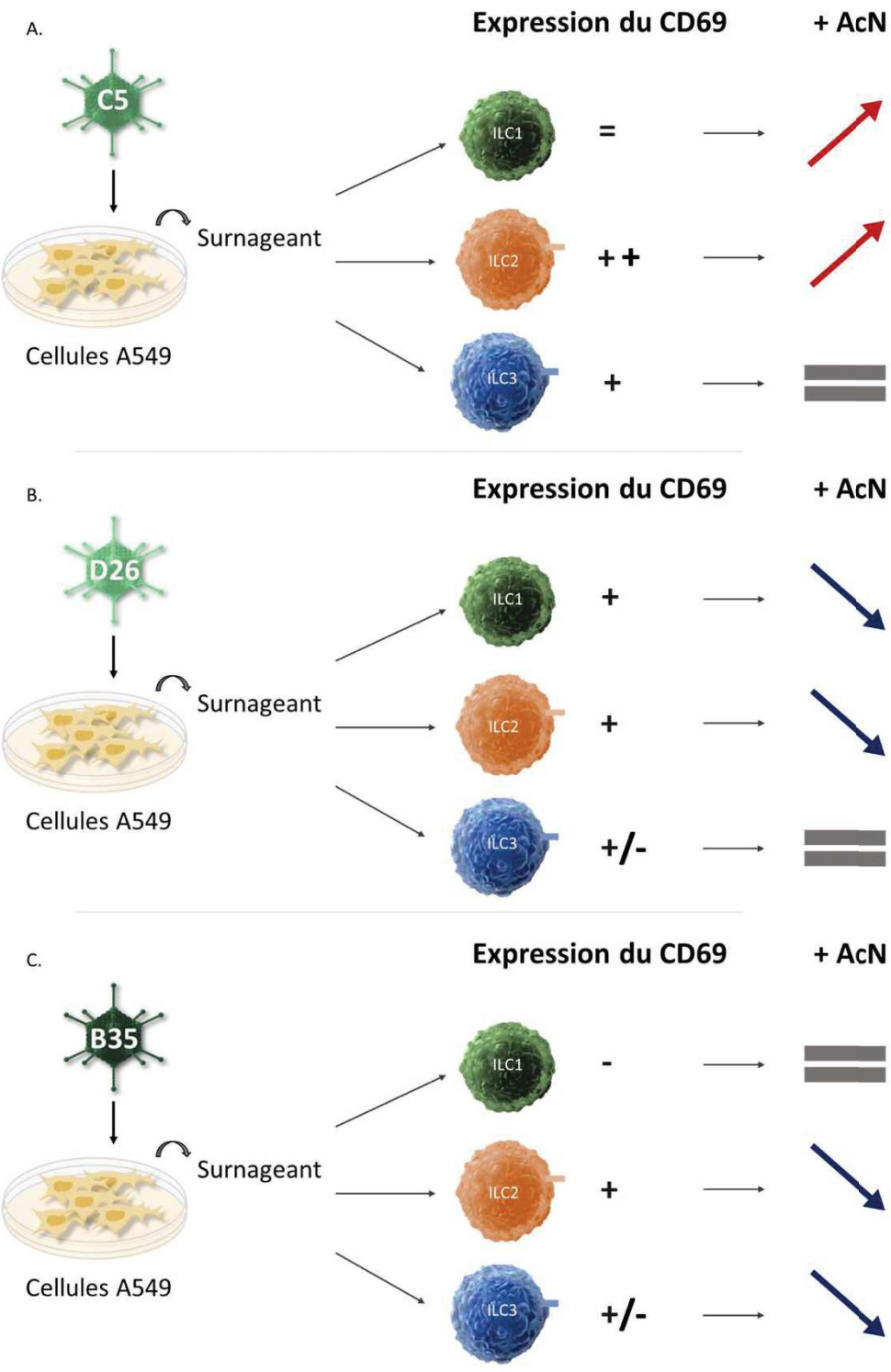


Figure 33: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les surnageants des cellules A549 infectées par les HAdVs

Synthèse de l'expression du CD69 par les ILCs après une stimulation par les surnageants des cellules A549 infectées par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

ii. L'expression du CD161

Nous nous sommes ensuite intéressés au profil d'expression du CD161 par les ILCs malgré les résultats non concluants concernant l'expression du CD161 après une infection directe par les HAdVs. Il a été montré que l'expression du CD161 par les cellules NK est modulée en réponse aux cytokines environnantes[174].

Les sérums seuls n'induisent pas de variation dans le pourcentage d'expression du CD161. Globalement, nous constatons une expression basale du CD161 plus faible par les ILCs en « milieu ILC » qu'en présence du surnageant des cellules A549 (à l'exception des ILC2) (***Figure S14***).

Nous observons qu'environ 60% des ILCs totaux expriment le CD161. Le contrôle positif LPS montre un profil d'expression du CD161 similaire ou inférieur au contrôle sans stimulation pour les ILCs totaux et les ILC1. A contrario, nous observons pour les ILC2 et les ILC3, que le LPS induit une légère augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD161 par rapport aux contrôles.

Si nous étudions les niveaux d'expression obtenus après chaque stimulation pour chaque groupe d'ILCs, nous observons globalement un pourcentage d'expression du CD161 inférieur ou égal au milieu seul à l'exception de la condition HAdV-B35-S14 et des ILC2 (***Figure S14***). Au sein des ILC2, nous observons également une augmentation significative de l'expression du CD161 pour le complexe HAdV-B35-S14 par rapport au virus seul (***Figure S14C***). Un profil similaire semble se dessiner pour les ILC1 et les ILC3, mais compte tenu du faible nombre de donneurs ces observations restent à confirmer.

Pour résumer, nous observons peu variation dans le pourcentage d'expression du CD161 intra-groupe. Comparativement à la ***Figure 26***, le pourcentage basal d'expression du CD161 par les ILC2 semble trop élevé pour observer des variations interprétables.

iii. Distribution des ILCs

Comparablement à ce que nous avons observé lors d'une stimulation directe (***Figure 27***), la stimulation indirecte des ILCs ne montre pas de variations dans la distribution des ILCs (***Figure S15***) en comparaison des contrôles. Les sérums seuls n'induisent pas de variation dans la distribution du nombre d'ILCs par rapport au milieu contrôle (***Figure S15***). Néanmoins, nous pouvons observer pour la condition HAdV-B35 une diminution du nombre d'ILC3 et une

augmentation du nombre d'ILC3 avec la condition HAdV-D26-SA en comparaison avec l'HAdV-D26 seul ***(Figure S15D)***.

Globalement, nous confirmons un pourcentage d'ILC3 plus important que les ILC1 et les ILC2 pour toutes les conditions. Cependant, la comparaison avec le profil obtenu lors d'une infection directe des ILCs par les HAdVs (***Figure 27***) indique une légère augmentation des ILC1 et une diminution des ILC2 suggérant qu'en fonction de la voie de stimulation, la distribution des ILCs peut varier. Cette hypothèse devra être confirmer par une autre approche comme l'étude des facteurs de transcription.

iv. Criblage des cytokines sécrétées après une indirecte par les cellules A549 infectées par les HAdVs

Nous nous intéressons ensuite au profil des cytokines sécrétées après une stimulation des ILCs par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs. Comme précédemment, nous utilisons deux panels de cytokines impliquées dans la réponse antivirale et dans la réponse T helper. L'objectif est de détecter les cytokines pouvant intervenir au cours d'une réponse immunitaire antivirale. Lors du criblage, le niveau de sécrétion de chaque cytokine est normalisé par rapport au profil obtenu pour la condition contrôle sans stimulation puis comparé avec le profil obtenu par les cellules A549. Le profil de cytokines obtenu par les ILCs après une stimulation des cellules A549 via le LPS, nous a permis de contrôler le potentiel sécrétoire des ILCs étudiées de façon indirecte.

A partir de nos résultats, nous avons discriminé 3 groupes de cytokines classées en fonction du niveau de sécrétion moyen mesuré pour l'ensemble des conditions et des donneurs. Les cytokines présentant une sécrétion moyenne inférieure à 500 pg/mL sont représentées en **orange**, celles sécrétées en moyenne entre 500 et 2 000 pg/mL en **rouge** et celles ayant une sécrétion supérieure à 2 000 pg/mL sont en **rouge foncé** (***Figure 34***). Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées, bien que chaque cytokine exprime un niveau de sécrétion différent.

Pour le panel 1, nous observons une production d'IL-6, d'IFN-λ_1 et d'IFN-$\lambda_{2/3}$ inférieur à 500 pg/mL. Pour l'IFN-γ, la sécrétion moyenne mesurée est comprise entre 500 et 2 000 pg/mL. Nous observons une sécrétion supérieure à 2 000 pg/mL pour L'IL-8 et l'IFN-β (***Figure 34A***). Concernant le panel 2, nous observons une production d'IL-6, d'IFN-γ, de TNF et d'IL-

21 inférieur à 500 pg/mL (***Figure 34B***). Concernant les cytokines communes aux 2 panels, nous observons un profil identique pour l'IL-6 mais des variations pour le TNF et l'IFN-γ. Pour le panel 1, la sécrétion de TNF est inférieure au contrôle, tandis que pour le panel 2, nous obtenons une sécrétion supérieure au contrôle. En comparaison du panel 1, nous quantifions un niveau de sécrétion d'IFN-γ plus faible pour le panel 2. Ces différences entre panels peuvent en partie s'expliquer par des variations expérimentales.

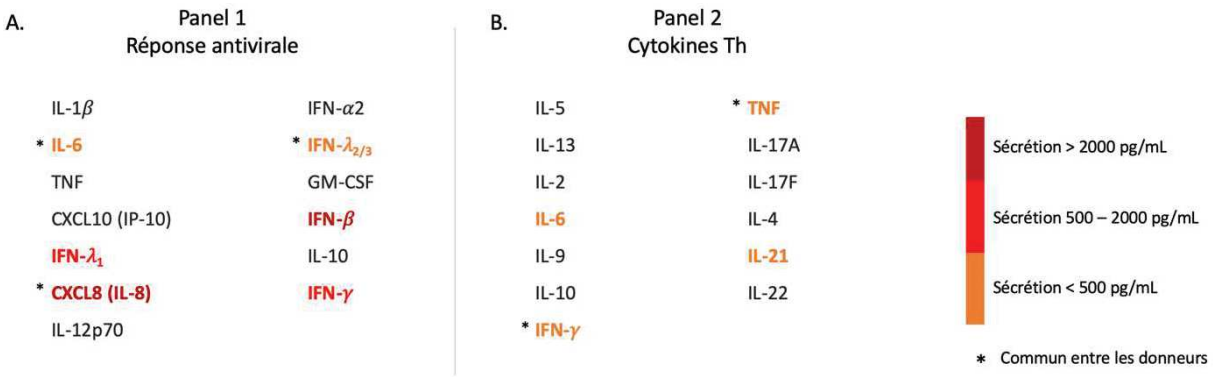


Figure 34: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs

La production de cytokines appartenant à un panel antiviral (**A**) et un panel de cytokines Th (**B**) dans le surnageant des ILCs stimulées par les cellules A549 a été évaluée par le système CBA (*cytometric bead array*) (n = 4). La production de cytokines par les cellules A549 après une infection par les HAdVs a également été évaluée afin de comparer avec les ILCs (données non montrées). Les réultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel LegendPlex™.

La synthèse des résultats sous forme de schéma est disponible dans la ***Figure 35*** et sous forme de tableau dans la ***Figure S13***.

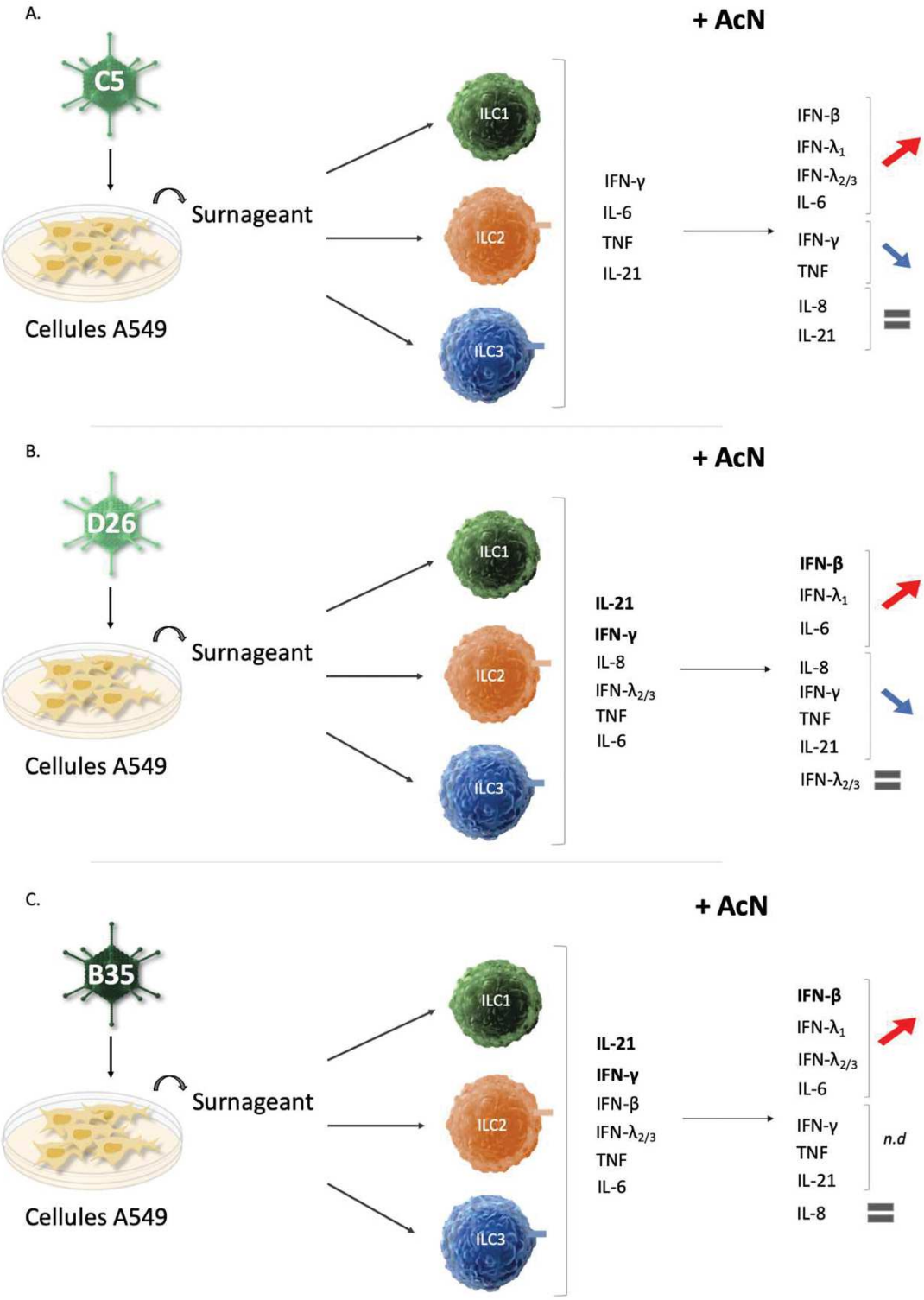


Figure 35: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les surnageants des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

Synthèse des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation par les surnageants des cellules A549 infectées par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par les cellules A549 dans un contexte d'infection par différents HAdVs

Nous avons observé à travers les différents paramètres étudiés des profils variables concernant l'expression du marqueur CD69 et des cytokines sécrétées après une stimulation indirecte des ILCs à travers les cellules A549 infectées par les HAdVs (***Figure S13***).

Pour résumer cette partie, nous avons constaté que les ILCs étaient capable d'être stimulées par un environnement de cytokines pro-inflammatoires et antivirales induit par l'infection des cellules A549 par les HAdVs (***Figure 36***).

Les 3 HAdVs peuvent infecter les cellules A549, et l'HAdV-B35 infecte le plus efficacement. La présence d'AcN spécifiques dans les sérums entraine la réduction de l'infection pour les 3 HAdVs étudiés.

A la suite d'une stimulation par le surnageant des cellules A549 préalablement infectées, les ILC2 et les ILC3 semblent être activées à travers l'expression du CD69. Concernant le profil des cytokines mise en évidence, nous observons un profil plutôt antiviral (IFNs) ainsi que la présence de molécules pro-inflammatoires pouvant corroborer avec l'activation observée. Pour aborder cette question en utilisant une autre approche, nous pourrions évaluer les transcrits d'ARN messager des cytokines d'intérêts pour chaque groupe d'ILCs après une stimulation indirecte à travers les cellules A549 infectées par les HAdVs.

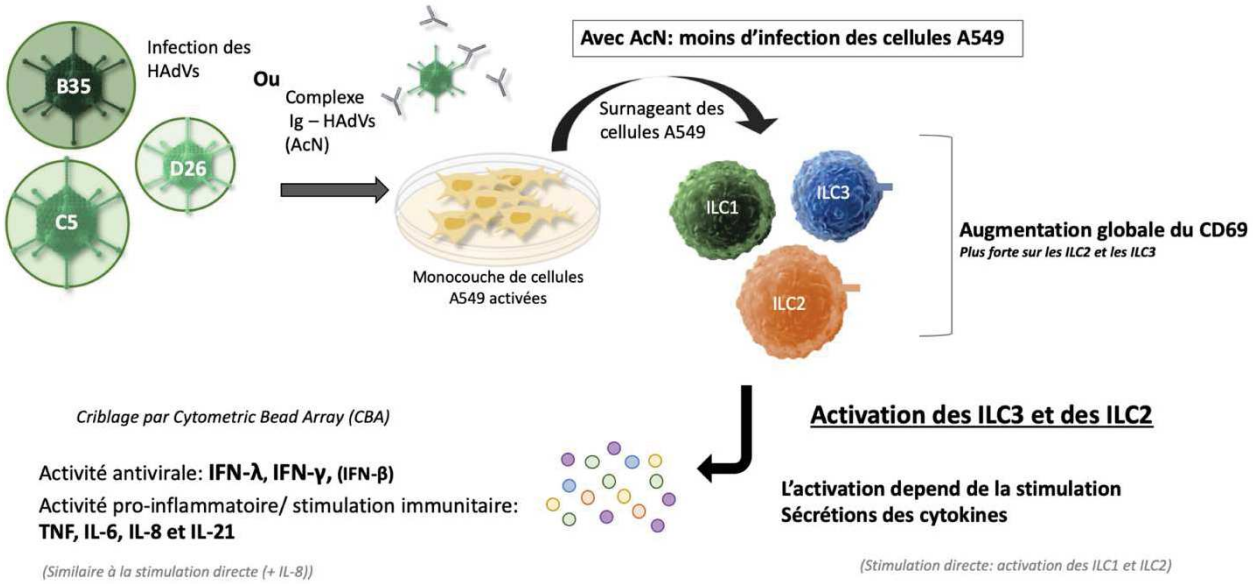


Figure 36: Synthèse de la réponse mise en place par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs

Les ILCs ont été stimulée via le surnageant des cellules A549 préalablement infectées par les HAdVs seuls ou en présence d'AcN. Après la caractérisation des cellules A549, nous avons évalué l'activation des ILCs par l'expression des marqueurs CD69 et CD161, la distribution des ILCs et la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire.

Nous avons ensuite étudié le profil d'activation des ILCs au cours d'une stimulation indirecte à travers les DC. Nous savons que les ILCs participent en coopération avec les autres cellules à la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate, notamment avec les DC[7,65,438].

4) Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation par des DC infectées par les HAdVs

a. Profils d'activation des DC à la suite d'une infection par les HAdVs

i. Infections des DC par les HAdVs

Nous avons d'abord étudié l'infection des DC par les HAdVs avec ou sans AcN ***(Figure 37)***. Nous observons que tous les HAdVs testés peuvent infecter les DC avec un pourcentage moyen d'infection de 28% pour l'HAdV-C5, 23,5% pour l'HAdV-D26 et 42,5% pour l'HAdV-B35 ***(Figure 37A)***. En présence d'AcN, nous observons une augmentation de l'infection des DC pour l'HAdV-C5 et l'HAdV-D26 ***(Figure 37B)***. Les complexes Ig - HAdVs formés avec IVIg servent de témoins d'infection. En revanche, pour l'HAdV-B35 la présence du sérum A (sans AcN contre l'HAdV-B35) induit une augmentation de l'expression de la GFP,

alors qu'en présence du complexe HAdV-B35-S14 (avec des AcN contre l'HAdV-B35) nous observons une diminution de l'expression de la GFP ***(Figure 37B)***.

Ces résultats montrent que la présence d'AcN facilite l'internalisation de l'HAdV-C5 et -D26 par les DC, contrairement à ce que nous avons observé avec les cellules A549 (*paragraphe II.3.a.i*).

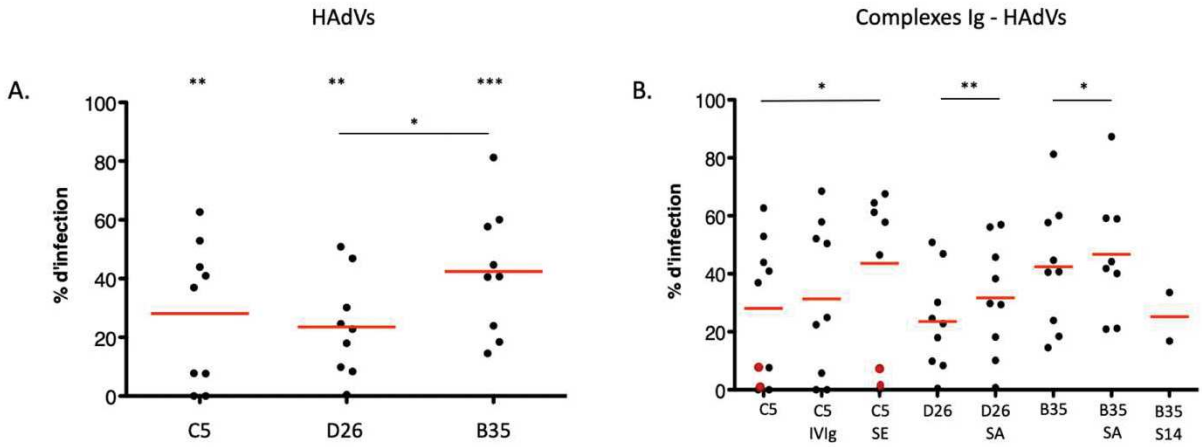


Figure 37: Capacité d'infection des DC par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'infection des DC a été évaluée 24 h post-infection en mesurant l'expression de la GFP avec chaque HAdV **(A)** sans AcN (n = 9) ou **(B)** en présence d'AcN (n ≥ 2). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées (contrôle négatif) et entre les différents HAdVs avec ou sans AcN *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress. *Les donneurs identifiés en rouge ont été exclus des analyses statistiques*.

ii. Expression du CD83 et du CD86

Nous nous intéressons ensuite au profil de maturation/d'activation des DC via l'expression du CD83 ***(Figure 38A)*** et du CD86 ***(Figure 38B)***. Le CD83 est un marqueur de maturation exprimé après une stimulation ou une infection et le CD86 est une molécule de costimulation pouvant réguler la réponse adaptative en intéragissant avec les lymphocytes T et B lors de la présentation de l'Ag.

Les DC immatures n'expriment pas de CD83. La stimulation par le LPS conduit à une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD83. Certains sérum seul induisent parfois une légère augmentation de l'expression du CD83 sans impacter sur les conditions avec HAdVs (***Figure 38A)***.

Pour le CD86, nous observons une forte augmentation du pourcentage de cellules positives après une stimulation par le LPS, en comparaison des DC immatures (***Figure 38B).*** Pour les sérums A et E seuls, nous observons une légère augmentation du pourcentage de cellules positives pour le CD86 par rapport au contrôle, respectivement de 20% et de 4%, sans pour autant impacter les conditions avec HAdVs (***Figure 38B***). L'infection par les HAdVs seuls induit également une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD86 de 34,5% pour l'HAdV-C5, 48% pour l'HAdV-D26 et 38% pour l'HAdV-B35 en moyenne. En présence d'AcN, nous observons également une augmentation du pourcentage de DC exprimant le CD86 par rapport au contrôle, respectivement de 37% (HAdV-C5-IVIg) et de 42% (HAdV-C5-SE) pour l'HAdV-C5 et de 48% pour l'HAdV-D26-SA (***Figure 38B***). Pour les complexes HAdV-B35-SA et HAdV-B35-S14, nous observons une augmentation de l'expression du CD86 par les DC par rapport au contrôle, respectivement de 30,5% et de 72,5% (***Figure 38B***).

La comparaison des HAdVs entre eux, seuls ou immun-complexés, montre un pourcentage d'expression du CD86 plus élevé avec l'HAdV-D26 en comparaison des autres HAdVs *(**Figure 38B***). Pour les conditions immun-complexées, nous observons globalement une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD86 par rapport aux HAdVs seuls. Toutefois, le nombre limité de donneur rend les comparaisons difficiles.

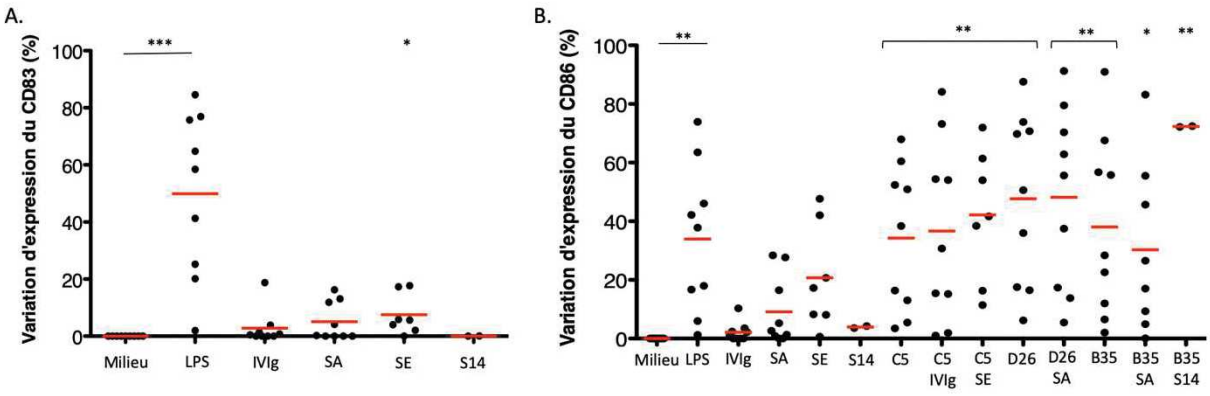


Figure 38: Expression des marqueurs de maturation CD83 et de costimulation CD86 par les DC après une stimulation par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

Expression du CD83 **(A)** et du CD86 **(B)** par les DC, 24 h post-infection avec chaque HAdV puis normalisée par rapport à l'expression observée avec la condition contrôle sans stimulation (n ≤ 2).
Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

b. Profils d'activation des ILCs à la suite d'une stimulation indirecte par les DC

Les DC sont préalablement infectées avec les différents HAdVs durant 24 h. Les ILCs sont ensuite mis en culture avec les surnageants des DC activées.

Nous avons comme précédemment évalué le pourcentage de cellules exprimant le CD69 et le CD161, la distribution des ILCs, ainsi que la sécrétion de cytokines.

i. L'expression du CD69

Les différents sérums n'induisent pas de variation de l'expression du CD69, cependant, nous constatons de fortes augmentations dans l'expression du CD69 lorsque les ILCs sont en contact avec le milieu des DC immatures (non stimulées) en comparaison du milieu de culture classique des ILCs (ILC) (***Figure 39***). Globalement, 2 à 3 fois plus d'ILCs expriment le CD69 en milieu DC en comparaison du milieu ILC pour les ILCs totaux, mais aussi pour les différents groupes d'ILCs.

Nous observons une augmentation entre 6% et 15% du pourcentage d'ILCs exprimant le CD69 après une stimulation par le LPS, pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs (***Figure 39***).

Contrairement à l'HAdV-C5, pour -D26 et -B35, nous observons une augmentation du pourcentage d'ILCs exprimant le CD69, respectivement de 6% à 16% et de 5% à 11%. Si nous comparons le profil obtenu entre chaque HAdV, nous observons que l'HAdV-D26 impacte le plus l'expression du CD69 par les ILCs par l'intermédiaire des DC (***Figure 39***). L'ensemble de nos résultats semblent également montrer une augmentation des cellules exprimant le CD69 pour les conditions l'HAdV-C5 et -B35 avec AcN par rapport aux HAdVs seuls.

En contact avec les surnageants de DC infectées par les HAdVs seuls ou sous forme de complexes Ig - HAdVs, nous observons un pourcentage de cellules exprimant le CD69 plus élevé pour les ILC3 en comparaison des autres sous-groupes et pour les 3 HAdVs testés.

Pour conclure, après une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant de DC infectées, nous observons un pourcentage d'expression du CD69 plus élevé pour les ILC3 que pour les autres groupes. Nous observons également des variations légèrement plus élevées pour

l'HAdV-C5 et -B35 en présence d'AcN que pour le virus seul. A contrario, nous observons une nouvelle fois le profil inverse pour l'HAdV-D26.

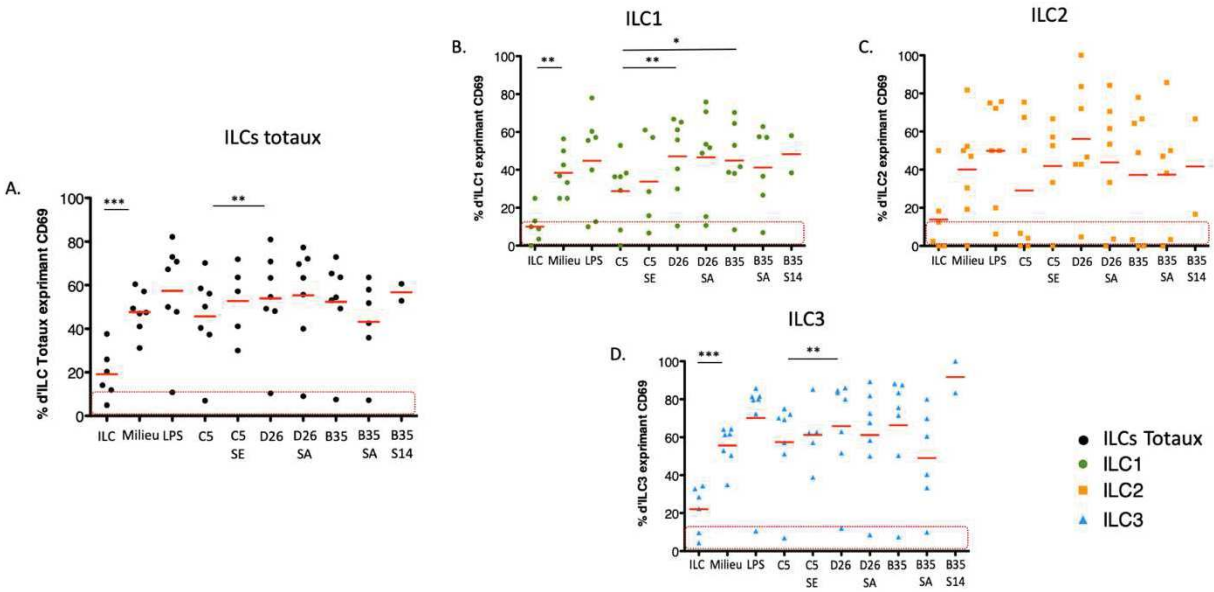


Figure 39: Expression du CD69 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant de DC stimulées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD69 par les ILCs a été mesurée 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées pour les ILCs totaux, et les différents groupes d'ILCs (n = 7). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. La condition « ILC » correspond au milieu ILC et la condition « milieu » à la présence de surnageant de DC non infectées. Pourcentages moyens des ILCs totaux **(A)**, ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant le CD69 après une stimulation indirecte. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non-stimulées (contrôle négatif) et entre les différents adénovirus *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress. Une partie des donneurs étudiés (encadré rouge) montre un profil différent et est représentatif de la diversité inter-donneur présent chez l'Homme.

Les résultats sont synthétisés schématiquement dans la ***Figure 40*** et sous forme de tableau dans la ***Figure S16***.

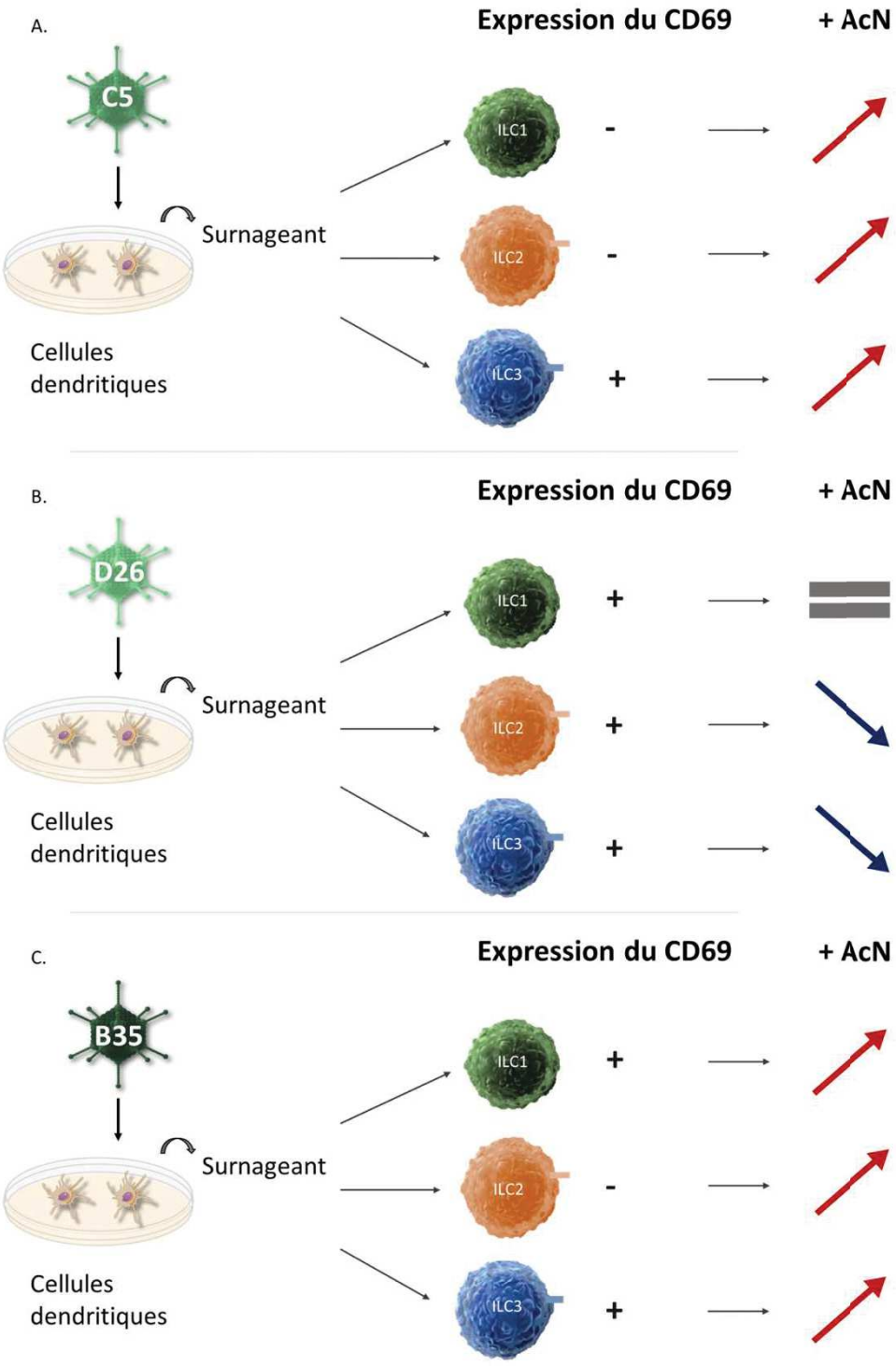


Figure 40: Représentation schématique de l'expression du CD69 par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par les DC stimulées par les HAdVs

Synthèse de l'expression du CD69 par les ILCs après une stimulation par le surnageant des DC infectées par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

ii. L'expression du CD161

Nous évaluons ensuite l'effet d'une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant des DC infectées sur l'expression du CD161. Pour chaque groupe d'ILC les sérums n'induisent pas de variation de l'expression du CD161 par rapport au contrôle. Globalement, nous constatons un pourcentage d'expression du CD161 par les ILCs plus faible en présence du surnageant des DC, à l'exception des ILC1 (***Figure S17***). L'expression basale du CD161 est de ~ 35% pour les ILCs totaux et de 29%, 57% et 48% environ pour les ILC1, les ILC2 et les ILC3 respectivement. Le LPS ne modifie pas l'expression du CD161 par les ILCs en stimulation indirecte.

Les données montrent des variations de l'expression du CD161 intra-groupe mais sans atteindre de significativité. Cependant, nous pouvons distinguer un pourcentage d'expression du CD161 globalement plus élevé pour les ILC2 puis les ILC3 en comparaison des ILC1.

iii. Distribution des ILCs

Les sérums seuls n'induisent pas de variation dans la distribution du nombre d'ILCs par rapport au milieu contrôle (***Figure S18***). Nous n'observons également pas de variations dans la distribution des ILCs stimulées par une voie indirecte par le LPS. Nous observons une augmentation du pourcentage d'ILC1 en condition « surnageant des DC non-stimulées » (16%) en comparaison de la condition « milieu ILC » (11%). Nous observons également plus d'ILC1 pour l'HAdV-D26 (20%) que pour l'HAdV-C5 (16%) (* p=0,0121) (***Figure S18***). Il semblerait que les ILC1 et les ILC3 aient une distribution plus variable que les ILC2 après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées.

Globalement, les ILC1 et les ILC3 sont significativement plus représentées que les ILC2, mais nous n'observons pas de changement majeur dans la répartition des ILCs sous l'influence des surnageants des DC.

iv. Criblage des cytokines sécrétées après une indirecte par les DC infectées par les HAdVs

Pour finir, nous avons une nouvelle fois évaluer le profil des cytokines sécrétées par les ILCs en réponse aux surnageants des DC soumis à nos conditions de stimulations, à l'aide de

nos 2 panels de criblages. L'objectif est de mettre en évidence les cytokines impliquées dans une réponse antivirale et/ou dans l'orientation de la réponse immunitaire. Le niveau de sécrétion de chaque cytokine a été normalisé par rapport au profil obtenu pour la condition contrôle sans stimulation puis comparé avec le profil obtenu par les DC.

Nous avons classé 3 groupes de cytokines basés sur le niveau de sécrétion moyen. Les cytokines présentant une sécrétion moyenne inférieure à 5 000 pg/mL sont représentées en **orange**, celles sécrétées en moyenne entre 5 000et 10 000 pg/mL en **rouge** et celles ayant une sécrétion supérieure à 10 000 pg/mL sont en **rouge foncé** (***Figure 41***). Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées.

Concernant le panel 1, nous observons une production d'IL-6, de TNF et d'IFN-λ_1 inférieur à 5000 pg/mL. Pour la chimiokine CXCL10 (IP-10), la sécrétion moyenne mesurée est comprise entre 5000 et 10 000 pg/mL. L'IL-8 est produit à une concentration supérieure à 10 000 pg/mL (***Figure 41A***). Avec le panel 2, nous observons un niveau de sécrétion pour le TNF inférieur à 5 000 pg/mL et pour l'IL-6 entre 5 000 et 10 000 pg/mL (***Figure 41B***). Concernant les cytokines communes aux 2 panels, nous observons un profil identique pour le TNF mais des variations dans les taux d'IL-6 avec un taux détecté plus faible avec le panel 1 (< 5 000 pg/mL) qu'avec le panel 2 (> 5 000 pg/mL). Ces différences entre panels peuvent s'expliquer en partie en raison de variations entre donneur mais aussi du protocole de dosage qui a été modifié par rapport au protocole original.

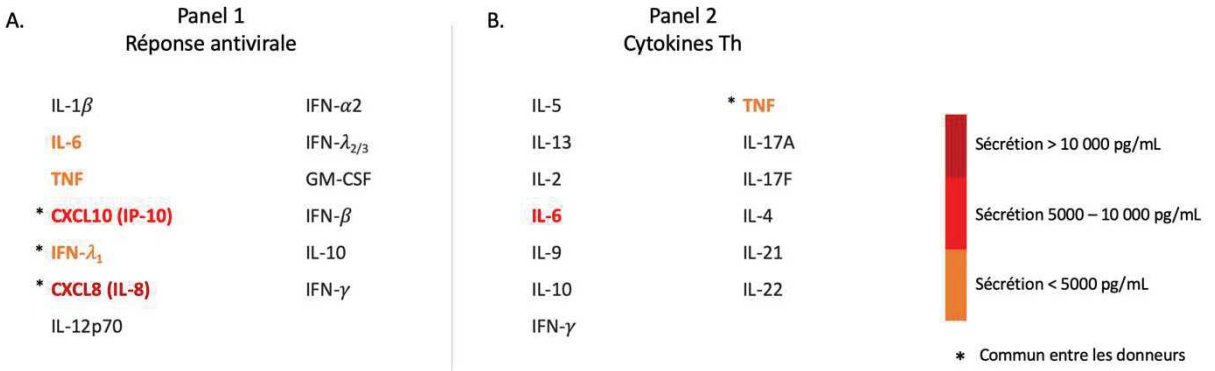


Figure 41: Criblage des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC stimulées par les HAdVs

La présence de cytokines appartenant à un panel antiviral (**A**) et un panel de cytokines Th (**B**) dans le surnageant des ILCs stimulées par les DC a été évaluée par le système CBA (*cytometric bead array*) (n = 3). Les cytokines sécrétées par les DC après une infection par les HAdVs ont été mesurées afin de les comparer avec les ILCs (données non montrées). Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel LegendPlex™.

Les résultats sont synthétisés dans les ***Figure 42*** et ***Figure S16***.

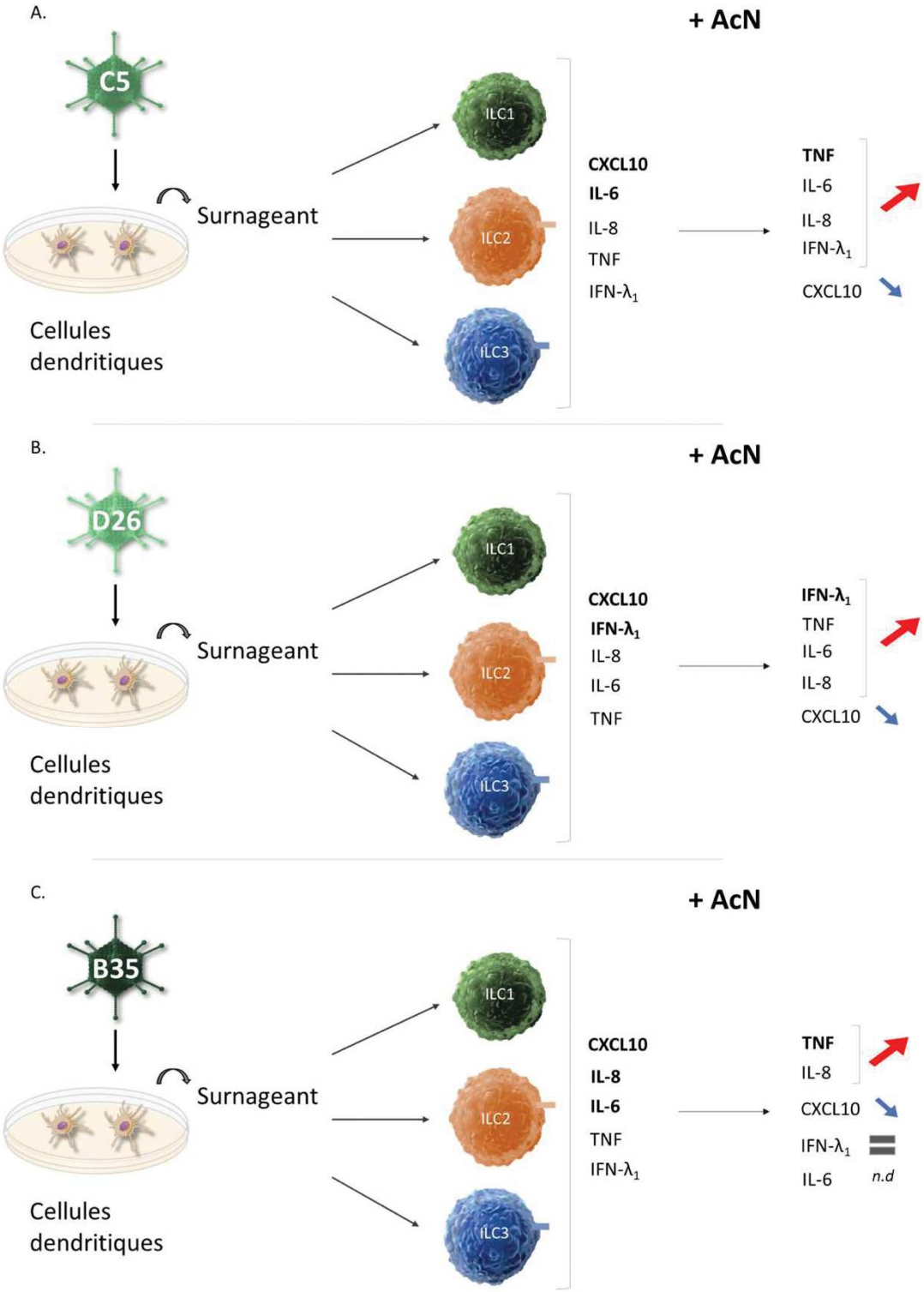


Figure 42: Représentation schématique des cytokines sécrétées par les ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs

Synthèse des cytokines sécrétées par les ILCs après une stimulation par le surnageant des DC infectées par l'HAdV-C5 **(A)**, l'HAdV-D26 **(B)** ou l'HAdV-B35 **(C)** avec ou sans AcN.

v. Récapitulatif du profil d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par les DC dans un contexte d'infection par différents HAdVs

Nous avons pu observer des variations concernant l'expression du marqueur CD69 et des cytokines sécrétées après une stimulation indirecte des ILCs à travers les DC infectées par les HAdVs (***Figure S16***).

Pour résumer cette partie, nous montrons que les ILCs semblent être, dans notre modèle, capable d'être stimulées par un environnement de cytokines pro-inflammatoires et antivirales induit par l'infection ou la stimulation des DC par les HAdVs (***Figure 43***).

Les DC sont infectées par les 3 HAdVs mais plus efficacement par l'HAdV-B35. La présence d'AcN entraine une augmentation de l'infection pour les 3 HAdVs.

A la suite d'une stimulation par le surnageant des DC, tous les ILCs semblent être activées à travers l'expression du CD69 mais avec un pourcentage légèrement plus élevé pour les ILC3 suivi des ILC1 et ILC2. La présence d'AcN lors de l'infection des DC, semble augmenter l'expression du CD69 (sauf avec l'HAdV-D26 pour les ILC1 et les ILC2). Concernant le profil des cytokines mise en évidence, nous observons un profil plutôt pro-inflammatoire et chimio-attractant pour les cellules impliquées dans une réponse antivirale. Pour évaluer et affiner ces observations par une approche complémentaire, il serait nécessaire de quantifier les transcrits d'ARN messager des cytokines d'intérêts pour chaque groupe d'ILCs.

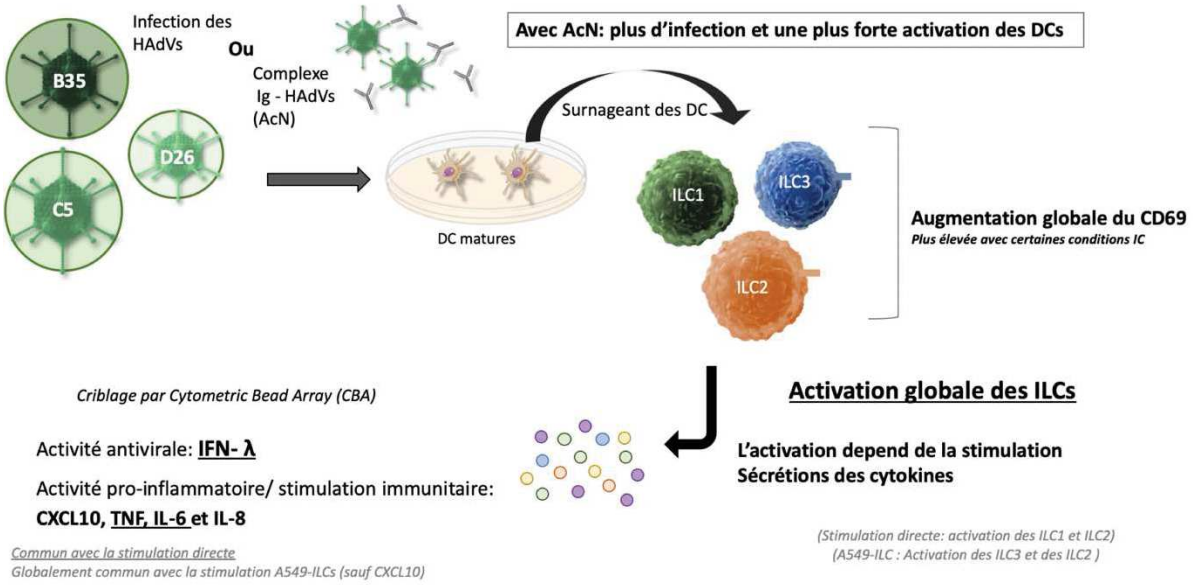


Figure 43: Synthèse récapitulative de la réponse mise en place par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC stimulées par les HAdVs

Les ILCs sont stimulées par le surnageant des DC préalablement infectées par les HAdVs seuls ou en présence d'AcN. Après la caractérisation des DC afin de s'assurer de leur activation, nous avons évalué l'activation des ILCs par l'expression des marqueurs CD69 et CD161, leurs distributions et la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire.

5) Synthèse des résultats

Nous avons montré que les ILCs sont infectées par les 3 HAdVs testés, mais que l'HAdV-B35 infecte plus efficacement les ILCs. De plus, nous avons observé que les ILC2 sont dans l'ensemble plus permissives à une infection par les HAdVs. En présence d'AcN, nous avons observé un profil similaire pour les ILC2. Les ILC3 sont en revanche les cellules les moins permissives aux infections par les HAdVs sous forme nue ou immun-complexée. Nous avons également observé 2 profils diférents en présence d'AcN avec une augmentation de l'infection pour l'HAdV-C5 et l'HAdV-D26 et une diminution de l'infection pour l'HAdV-B35. Après une activation directe des ILCs, nous observons dans l'ensemble une diminution du pourcentage d'ILCs exprimant le CD69 après une infection sous forme immun-complexée en comparaison des HAdVs seuls. En parallèle, nous avons mis en évidence la sécrétion d'un panel de cytokines à activité pro-inflammatoire (TNF, IL-6, IL-21) et antivirale (IFNs) comparable à un profil Th1 et corrélant avec le profil connu d'une activation des ILC1. L'expression du CD161 et la distribution des ILCs ne semblent en revanche pas être impacté par les infections directes des HAdVs.

La comparaison du profil d'activation directe avec la stimulation par les cellules A549 montre des profils d'activation différents concernant l'expression du CD69, du CD161 et des

cytokines sécrétées. Après une infection directe les ILC1 et les ILC2 expriment d'avantage le marqueur CD69, alors que lors d'une stimulation indirecte par les cellules A549 ce sont les ILC2 et les ILC3 qui semblent le plus fortement réagir. Le marqueur CD161 n'est en revanche pas significativement impacté, aussi bien après une infection directe par les HAdVs que lors de stimulations indirectes. Les données concernant la distribution des ILCs après une infection ou une stimulation indirecte n'indiquent également pas de variations significatives entre les groupes d'ILCs quel que soit le type de stimulation. Pour finir, nous observons un profil de cytokines similaires entre les deux voies de stimulation, à l'exception de l'IL-8 plus fortement produit dans le surnageant des ILCs activées indirectement par les cellules A549. Nous constatons également des variations d'un facteur 10 ou plus dans le taux de production de l'IFN-β, l'IFN-λ_1 et l'IL-6 entre les 2 voies d'activation.

La comparaison du profil d'activation directe avec la stimulation indirecte par le surnageant des DC indique également des variations concernant l'expression du CD69, du CD161 et des cytokines sécrétées. Au cours d'une stimulation par le surnageant des DC, nous observons une augmentation globale des ILCs exprimant le CD69 avec un niveau d'expression plus élevé pour les ILC3. L'expression du CD161 et la distribution des ILCs ne sont pas significativement impactées indirectement par l'infection ou la stimulation des DC. Concernant les cytokines sécrétées, nous observons une augmentation de plus de 25 fois de la sécrétion d'IFN-λ_1, de TNF et d'IL-6. La production de CXCL10 et d'IL-8 est retrouvée uniquement dans les conditions de stimulation indirecte.

Enfin, la comparaison des profils d'activation des ILCs stimulées indirectement par les surnageants des cellules A549 ou des DC montre des similitudes mais aussi un pourcentage d'expression du CD69 plus élevé avec les DC qu'avec les cellules A549, principalement pour les ILC2 et les ILC3. Bien que non significatives en raison de nombre limité de donneurs, nous observons de plus fortes variations dans le pourcentage d'expression du CD161 par les ILCs avec les DC qu'avec les cellules A549 et que la distribution des ILCs est confrontée à de plus grandes variations inter-donneur avec les DC en comparaison des cellules A549. Pour finir, nous observons dans l'ensemble un profil commun de cytokines sécrétées à activité antivirale, avec de l'IFN-λ et pro-inflammatoire avec le TNF, l'IL-6 et l'IL-8. Nous pouvons tout de même constater des particularités comme la présence d'IL-21 et d'IFN-γ dans le surnageant des ILCs indirectement stimulées par les cellules A549 et la présence de CXCL10 dans le surnageant des ILCs indirectement stimulées par les DC.

V. Discussion et perspectives

Les ILCs correspondent à une nouvelle population cellulaire possédant un potentiel non négligeable, dont les fonctions lors de l'induction de la réponse immunitaire sont encore mal explorées. Aujourd'hui, les mécanismes par lesquels les ILCs humaines détectent le danger et par conséquent sont activées ne sont pas encore élucidés. De précédentes études ont suggéré un rôle des ILCs lors de la mise en place de la réponse immunitaire suite à une infection par le virus influenza[2], ou encore une réponse coopérative avec les DC au cours d'une réponse vaccinale chez la souris[438]. Cependant, chez l'Homme les connaissances sur l'impact des ILCs lors de la mise en place d'une réponse antivirale sont encore vagues.

Nos études au sein du laboratoire ces 15 dernières années, nous ont permis de mieux comprendre les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et les HAdVs lors d'un contexte d'infection naturelle mais surtout de vaccination, notamment à travers les DC. Nos travaux nous ont ensuite amené à étudier le rôle des ILCs, qui sont des cellules moins conventionnelles. L'ensemble de nos études nous permet de mieux appréhender les interactions entre la réponse immunitaire de l'hôte et les HAdVs, et a pour objectif de participer à l'amélioration des vaccins dérivés des HAdVs.

Mon projet de thèse a donc pour ambition d'approfondir nos connaissances fondamentales pour améliorer les stratégies de développement et d'utilisation de vecteurs adénoviraux en thérapies géniques, en particulier en vaccination qui touche de plus larges populations. La complexité de ce projet repose sur l'utilisation des ILCs provenant de sang périphérique humain adulte, qui sont extrêmement minoritaires, mais aussi à travers l'utilisation de différents HAdVs, ainsi que de sérums ayant des profils sérologiques en AcN contre chaque HAdV très variés. Aux difficultés techniques et expérimentales associées aux ILCs s'ajoute les variations inter-donneur. La physiologie unique des ILCs et nos nombreuses interrogations scientifiques sur ces cellules rendent ce projet fascinant.

Pour ce projet, il a fallu dans un premier temps mettre en place un protocole d'isolation et de culture fiable des ILCs humaines à partir de sang périphérique. Dans un second temps, j'ai évalué la physiologie des ILCs au cours d'une infection par différents types d'HAdVs, mais aussi l'impact de l'immunité humorale préexistante de l'hôte. Enfin, j'ai pu explorer l'adaptabilité des ILCs à répondre aux facteurs environnementaux pro-inflammatoires et

antiviraux reçus notamment à travers l'infection des cellules épithéliales et des DC par les HAdVs avec ou sans immunité humorale préexistante. Le profil ou le rôle des ILCs dans un contexte d'infection naturelle ou de vaccination par les HAdVs n'avait jusqu'à présent jamais été étudié chez l'Homme, et peu d'études existent dans le modèle animal[439].

Il est important de rappeler que notre modèle d'étude, à partir des cellules humaines, présente de fortes variations entre les donneurs dues à l'hétérogénéité de la population humaine, mais également aux nombreuses difficultés expérimentales inhérentes aux ILCs. Nous n'observons donc pas une représentation globale sur l'ensemble des populations. Nos observations mettent en évidence des profils parfois différents, qui nous permettent d'obtenir des indices et d'avancer dans la compréhension des questions posées. De plus, nous utilisons des virus non réplicatifs, il est donc probable que certaines de nos observations ne reflètent pas totalement les situations naturelles d'infection par les HAdVs. Nos résultats s'intègrent davantage à un contexte de vaccination utilisant des vecteurs dérivés des HAdVs.

Enrichissement et culture des ILCs

J'ai débuté cette étude à partir d'ILCs isolées de couches leuco-plaquettaires (***Figure S1***). Au cours de ces premiers tests, j'ai développé et optimisé un protocole d'isolation et de culture adapté et reproductible des ILCs humaines. Les premiers résultats sur l'expression des TLRs ont révélé une expression du TLR4, -3 et -9 supérieure ou égale à 1 log par comparaison aux cellules seules (***Figure S9***). De plus, la viabilité des ILCs isolées à partir de couches leuco-plaquettaires n'était pas satisfaisante et aucune infection par les HAdVs n'avait été observé dans ces conditions. Par la suite, j'ai transposé les protocoles d'isolation, de culture et d'étude à des ILCs isolées à partir de sang périphérique frais, afin de déterminer si les différents traitements imposés aux couches leuco-plaquettaires pouvaient altérer nos données sur les ILCs. A partir de ce nouveau protocole, j'ai obtenu des ILCs ayant une viabilité stable en culture et également capable d'être infectées par les HAdVs. Cette différence de viabilité et de permissibilité a déjà été observé entre des lymphocytes issus de couches leuco-plaquettaires et de sang frais avec le VIH par exemple (communication personnelle). Concernant, l'expression des TLRs, nous avons constaté des variations en comparaison des premières observations à partir de couches leucocytaires. Cela pourrait s'expliquer par la qualité de l'échantillon, car nous avons régulièrement observé que les cellules immunitaires isolées de couches leuco-plaquettaires peuvent parfois afficher un profil d'activation déjà très avancé.

Les ILCs provenant de sang périphérique montrent une faible expression du TLR4 après isolation. Cependant, nous avons pu observer que l'activation des ILCs par le LPS se traduit notamment par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ce qui indique que le niveau d'expression du TLR4 est suffisant pour permettre la stimulation par le LPS ou alors que l'expression du TLR4 est augmenté suites aux premières liaisons ligand-récepteur (rétrocontrôle positif)[440]. L'expression et la stimulation des autres TLRs (TLR2, -3 et -9 en particulier) n'a pas été évalué mais ils pourraient participer à l'activation des ILCs dans notre modèle[15,19,67,68,69], ou bien induire une immunosuppression comme certaines études le montrent[441]. Les TLRs semblent donc induire une réponse ambivalente des ILCs selon l'environnement d'étude.

Outre la stimulation par le LPS, nous avons également étudié l'expression du CMH-II à travers une stimulation cellulaire par le récepteur P2X7 (récepteur purinergique). Une étude sur les ILCs murins a mis en évidence l'expression du CMH-II pour 50 - 70% des ILC2, et des ILC3, ainsi que sa contribution dans l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ par les ILCs[70]. D'une autre part, le récepteur P2X7 active la réponse immunitaire en agissant sur l'induction de l'inflammation et la sécrétion de cytokines[442,443]. Après une stimulation par de l'ATP à travers le P2X7R, nous n'avons cependant pas observé l'activation des ILCs. Nous n'avons donc pas poursuivi dans cette voie, bien que nous n'ayons pas exploré l'ensemble des possibilités comme par exemple la combinaison P2X7R-CMH-I.

Récepteurs cellulaires aux HAdVs

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'expression de certains récepteurs aux HAdVs connus pour être utilisé par l'HAdV-C5, -D26 ou -B35, tels que CAR et DC-SIGN pour -C5, CD46 et la DSG2 pour -D26 et -B35, ainsi que les intégrines α_4 (CD49d). Les ILCs expriment ni CAR, ni DC-SIGN, cependant nous avons observé que certains HAdVs (ex: l'HAdV-C5) peuvent infecter les ILCs, indiquant qu'un autre récepteur primaire est utilisé par certains HAdVs ou bien que les récepteurs secondaires comme les intégrines α_4 remplissent un rôle plus primaire au cours de l'infection des ILCs. D'autres récepteurs comme l'acide sialique ou les motifs GD1a présents sur différentes glycoprotéines pourraient être exprimés par les ILCs (tests non effectués). Afin de s'assurer de la voie d'infection utilisée par les HAdVs ainsi que les récepteurs préférentiellement utilisés pour infecter les ILCs, nous pouvons imaginer de bloquer tour à tour les différents récepteurs aux

HAdVs et évaluer le pourcentage de cellules exprimant le transgène GFP. Ce type d'expérimentation pourrait mettre en lumière une voie d'infection propre aux ILCs ou bien mettre en évidence de nouveaux récepteurs utilisés par les HAdVs au cours d'une infection.

Infection des ILCs par les HAdVs

Nous avons montré que les ILCs humaines provenant du sang périphérique pouvaient être infectées par l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35 à des niveaux différents mais aussi avec des sensibilités très différentes entre les donneurs. En effet, nous avons observé des variations allant de 0% à presque 80% d'efficacité d'infection en fonction des donneurs. Ce phénomène n'est pas totalement surprenant car au sein d'une population, la réponse immunitaire de chaque individu peut fortement varier face à une infection virale et conduire à de nombreux niveaux de sensibilité à la maladie. Nous avons également observé des variations dans l'expression de certains récepteurs aux HAdVs en fonction des donneurs. Cependant, le faible nombre de cellules isolées par donneur, ne nous a pas permis d'examiner en parallèle s'il y avait une corrélation entre le pourcentage d'expression des récepteurs aux HAdVs et le pourcentage d'infection. Une des hypothèses possibles est que les donneurs exprimant les plus faibles taux de récepteurs aux HAdVs sur les ILCs correspondent aux donneurs pour lesquels l'efficacité d'infection des ILCs par les HAdVs sont les plus faibles, et inversement.

Marqueurs d'activation

Au cours de la caractérisation des ILCs, nous avons étudié l'expression de différents marqueurs d'activation afin de sélectionner les meilleurs candidats pour évaluer l'activation des ILCs. Nous avons fini par sélectionner le CD69 et le CD161 en raison de leur niveau d'expression par les ILCs. Nos données ont toutefois révélé que le CD161 n'est pas un marqueur pertinent, notamment pour les ILC2 qui l'expriment fortement de façon basale. Le CD161 pourrait en revanche être utilisé comme marqueur d'identification par plus de 80% des ILC2 en moyenne[178]. Nous avons tout de même pu observer des variations plus cohérentes du CD161 par les ILC1 et les ILC3 lors de nos études d'infection directe par les HAdVs (***Figure 26***). Ces résultats correspondent à des profils d'activation plus interprétables et mériteraient d'être approfondi, en particulier pour déterminer le rôle du CD161 lors de l'activation des ILC1 en comparaison par exemple des données disponibles et plus complètes sur les cellules NK.

Le CD69 semble en revanche être un marqueur plus pertinent pour évaluer l'activation des ILCs. Pour aller plus loin et en raison du faible nombre de cellules ainsi que des techniques les plus récentes, l'étude des transcrits ARN, notamment du CD69 mais aussi du CD161 après une infection des ILCs par les HAdVs ou une stimulation via les cellules épithéliales ou les DC, semble le plus intéressant pour affiner nos travaux.

D'autres marqueurs n'ont pas été exploré, tels que le CD80 et le CD86 (décrit brièvement dans l'étude), mais aussi le CMH-I ou encore le CD62L. Les ILCs fraîchement isolées ou non stimulées n'expriment pas le CD80 et le CD86, mais leur expression augmente légèrement après une stimulation par les HAdVs. Nos données montrent que ces marqueurs semblent donc être impliqués lors de l'activation des ILCs à travers les DC plutôt qu'après une infection directe par les HAdVs. Nous avons également observé lors de tests préliminaires une diminution du pourcentage d'ILCs exprimant le CMH-I après une infection par les HAdVs. Pour rappel, plus de 95% des ILCs montrent une expression du CMH-I après isolation, ce qui nous laisse supposer que ce marqueur pourrait être un bon marqueur « d'infection » ou d'entrée virale[101,444,445]. Cependant, pour étudier l'activation des ILCs, le CMH-I seul ne semble pas être suffisant.

Pour finir, une étude chez l'Homme a montré que le marqueur CD62L (molécule d'adhésion cellulaire de type L-selectine) correspondrait à un marqueur de fonctionnalité des précurseurs ILCs mais aussi qu'il pourrait être utilisé comme marqueur de diagnostique clinique lors de maladies inflammatoires[446]. L'absence ou la diminution de l'expression du CD62L par les ILCs a été observé chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Il serait donc pertinent d'étudier l'expression du marqueur CD62L par les ILCs du sang périphérique après une infection par les HAdVs. Ce marqueur pourrait donc s'avérer être un bon candidat pour explorer l'activation des ILCs chez l'Homme, aussi bien sur le plan fondamental pour améliorer les connaissances sur les ILCs dans la réponse immunitaire, que sur le plan clinique pour le suivi de l'évolution des maladies inflammatoires ou de l'évaluation des traitements[447].

Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et antivirales

En parallèle de nos études sur l'expression des marqueurs d'activation des ILCs, nous avons examiné la sécrétion de cytokines par les ILCs après une infection directe ou d'une stimulation indirecte à travers les cellules épithéliales pulmonaires A549 ou les DC. Au cours des analyses, nous avons observé des variations entre les deux panels CBA utilisés, concernant les taux d'IL-6, mais aussi de TNF et d'IFN-γ. Ces différences pourraient provenir de

modifications du protocole original. Nous ne pouvons pas non plus exclure les fluctuations expérimentales ou les variations entre les donneurs car nous comparons la sécrétion moyenne des cytokines d'intérêts pour l'ensemble des donneurs en comparaison des contrôles négatifs.

Au cours d'une réponse immunitaire, les cytokines circulantes dans le plasma peuvent être détectées et utilisées comme biomarqueurs suite à une infection ou une vaccination. Cependant, si le dosage des cytokines circulantes peut participer au pronostic et au suivi thérapeutique, leurs concentrations circulantes ne présentent qu'un intérêt limité pour la compréhension globale de la physiopathologie de ces molécules. La plupart des cytokines ne sont d'ailleurs pas détectables dans la circulation à l'état physiologique. L'activité biologique des cytokines est généralement locale, voire agissent dans des micro-environnements. Il est donc difficile de définir des seuils précis à partir desquels les cytokines exercent une activité biologique. Les cellules immunitaires répondent à des gradients de concentrations de cytokines, parfois dans un contexte dynamique et un environnement extrêmement restreint. A partir de tests *in vitro*, nous sommes dans un contexte de micro-environnement donnant un aperçu des cytokines impliquées dans l'interaction entre les ILCs et d'autres acteurs cellulaires clés de la réponse immunitaire. Dans la circulation sanguine, les cytokines sont généralement présentes à une concentration inférieure à 10 pg/mL[448]. Cependant, si certaines cytokines exercent leurs effets biologiques à forte concentration, d'autres peuvent induire des effets avec des quantités bien plus faibles. Par exemple, les IFNs ont une activité biologique importante même a de très faible concentration, contrairement au TNF qui nécessite une concentration plus élevée pour exercer une activité biologique. L'environnement cytokinique peut donc moduler la réponse immunitaire à des concentrations minimales ou dans un micro-environnement. Dans un contexte physiologique, les cytokines peuvent également avoir des activités différentes selon leur cible, leur concentration et leur combinaison avec d'autres cytokines. Certaines cytokines vont être associées à un effet dose alors que d'autres vont rapidement atteindre un plateau d'activation. Dans notre étude, nous considérons qu'une différence d'expression de 2 fois ou plus en comparaison des taux mesurés pour les contrôles, correspond à des variations biologiquement significatives, indépendamment de la quantité mesurée.

Nous observons après une infection des ILCs par les HAdVs une augmentation de la sécrétion d'IFN de type III (IFN-λ) et de type I (IFN-β). Les IFNs de type I et III sont impliquées dans l'immunité antivirale directe et possèdent de fortes propriétés immunomodulatrices[449]. Les concentrations présentes dans le surnageant des ILCs sont au moins 2 fois plus élevée que les concentrations basales pouvant être retrouvées sans stimulation. Nous observons le même profil

concernant l'IFN-γ (IFN de type II) qui est impliqué dans l'induction et le développement des mécanismes antiviraux indirects en favorisant la réponse immunitaire cytotoxique. Nos résultats suggèrent donc qu'en réponse à une infection directe par les HAdVs, les ILCs humaines répondent par une forte activité des IFNs. Le TNF, l'IL-6 et l'IL-21 sont produits à des niveaux plus modérés et ont potentiellement une action synergique plutôt qu'individuelle. Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire ayant un rôle plus général dans l'induction et la stimulation des cellules immunitaires avoisinantes. L'IL-6 est une cytokine présentant une pléiotropie fonctionnelle et qui contribue à la défense de l'hôte en stimulant les réponses de la phase aigüe, l'hématopoïèse et les réactions immunitaires[450]. L'IL-6 possède des activités fondamentalement différentes en fonction de ses partenaires cytokiniques[451]. L'IL-21 est une cytokine pro-inflammatoire, induisant notamment la sécrétion d'IL-8, en maintenant la fonction des lymphocytes T $CD8^+$ et en renforçant la présentation antigénique des APC[452,453]. Nous avons également détecté la présence d'IL-1β et d'IL-8 selon les conditions, qui ont entre autres un rôle de médiateur pro-inflammatoire notamment en favorisant le recrutement de leucocytes sur le site de l'infection et en favorisant la fonction des lymphocytes ou encore des neutrophiles. Ces cytokines peuvent notamment agir sur le recrutement des ILCs au niveau tissulaire[454].

Lorsque nous stimulons les ILCs par le surnageant des cellules A549 ou des DC, nous observons un profil comparable à une infection directe des ILCs par les HAdVs mais à des taux plus élevés, d'un facteur 10 (pour les cellules A549) à un facteur 25 (pour les DC). Les ILCs produisent des quantités très supérieurs d'IL-8 et de TNF après une stimulation indirecte, ainsi que la production de CXCL10. Le CXCL10 (ou IP-10) est une molécule pléiotropique capable d'exercer de puissantes fonctions biologiques, notamment en favorisant l'activité chimiotactique des cellules $CXCR3^+$ (son récepteur), en induisant l'apoptose, en régulant la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse au cours des maladies infectieuses et inflammatoires, et le cancer[455,456,457]. Le CXCL10 est principalement associé à l'immunité de type I, induite notamment au cours des réponses antivirales[455,458,459].

D'après l'ensemble de nos données, nous obtenons un profil de cytokine Th1 et antiviral corrélant avec une stimulation des ILCs par les HAdVs. Une étude sur l'IL-21 montre son implication dans les réponses des Ly T $CD8^+$ mais aussi dans la formation de Ly T $CD4^+$ mémoires au cours des réponses à une infection virale[460]. Cette étude montre également un profil d'activation des Ly T $CD4^+$ à travers l'expression du CD69, mais cependant sans corrélation directe avec la production d'IL-21[460]. Les ILCs étant des homologues de l'immunité innée des

Ly T $CD4^+$ il serait intéressant de comparer nos résultats. L'évaluation des transcrits ARNm permettrait ainsi d'identifier la sous population d'ILCs produisant chaque cytokine et peut-être de mettre en évidence un rôle prédominant d'une sous population en particulier.

Distribution des ILCs

Le dernier critère examiné correspond à la distribution des ILCs après une infection par HAdVs ou une stimulation à travers le surnagent des cellules épithéliales A549 ou des DC. Comme décris précédemment (*paragraphe II.2.i)*, les ILC1, ILC2 et ILC3 sont identifiables à travers l'expression de facteurs de transcription, respectivement T-bet, GATA-3 et ROR-γt, mais aussi par les niveaux d'expression du CD117 et du CRTH2.

Des études chez l'Homme ont montré que les ILCs sont capables de se différencier en de multiples lignages en réponse aux signaux environnementaux locaux notamment induit par un agent pathogène[47,55,461,462]. Le même phénomène a d'abord été mis en évidence chez la souris[462,463].

Dans notre étude, nous observons le pourcentage de chaque ILC présent dans le milieu après stimulation, ce qui correspond à un « état des lieux » qui se traduit par les proportions des différents types d'ILC à un instant T. Nous ne pouvons savoir par ce biais si les cellules ont divergé d'un groupe vers un autre groupe (processus de transdifférenciation décrit dans le *paragraphe II.2.i.b*). Pour répondre précisément à cette question, il faudrait étudier l'expression des facteurs de transcriptions à travers l'expression des ARNm. La présence de transcrits ARNm des facteurs de transcriptions pour une sous population donnée permettrait de confirmer ou d'infirmer les résultats observés sur les pourcentages obtenus à partir des marqueurs CD117 et CRTH2. De plus, si nous isolons préalablement chaque sous population d'ILCs, nous pourrions évaluer si après une stimulation par les HAdVs, nous observons une transdifférenciation des ILCs.

Avec les données récoltées, nous observons globalement des variations dans les proportions d'ILC entre les infections directes et les ILCs stimulées à travers les cellules A549 ou les DC. Nous observons après une infection directe par les HAdV-B35-S14 une augmentation du nombre d'ILCs totaux qui semble avoir pour origine une augmentation du pourcentage d'ILC1 en comparaison avec les conditions HAdV-B35 et HAdV-B35-SA (***Figure 27***). Ces résultats pourraient confirmer les hypothèses suivantes: 1) les ILCs sont plus permissives à l'HAdV-B35, en effet cet adénovirus a été décrit comme infectant préférentiellement les lignées cellulaires lymphoïdes, 2) même si les ILC2 semblent être plus

infectées par les HAdVs de façon globale, une dérive des ILCs en ILC1 pourraient corroborer avec les profils d'activation observés, et 3) les ILC1 répondent de façon préférentielle aux infections par HAdVs. Pour pouvoir confirmer ces hypothèses et approfondir nos connaissances, l'étude des transcrits ARNm que ce soit pour l'expression du CD69, des marqueurs CD117 et CRTH2 ou encore de la production de cytokines semblent être le choix le plus judicieux. L'ensemble de ces données croisé avec nos données pourraient nous orienter sur la ou les populations d'ILCs capables d'être infectées et/ou recrutées pour ensuite interagir et moduler l'immunité adaptative.

Stimulation indirecte des ILCs

Au cours des stimulations indirectes des ILCs par le surnageant des cellules A549 ou des DC, nous nous attendons à des profils d'activation des ILCs opposés en présence d'AcN. Néanmoins, en l'absence d'immunité préexistante contre les HAdVs, nous nous attendons à observer une coopération cellulaire entre les cellules A549 et les ILCs mais également entre les DC et les ILCs reflétée par une activation des ILCs.

Au cours de l'infection des cellules A549 par les HAdVs sous forme de complexes Ig - HAdVs, nous observons une neutralisation de l'infection en comparaison aux HAdVs seuls (***Figure 31***). La neutralisation des HAdVs va également arrêter la cascade immunitaire induite au cours d'une infection par les HAdVs. Dans ce contexte, nous nous attendons à quantifier une diminution de l'activité cellulaire des ILCs se traduisant par une diminution globale des marqueurs de l'activation comme l'expression du CD69 ou encore la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et antivirales. Nous observons pour les ILC1 et les ILC2 notamment une diminution du pourcentage de cellules exprimant le CD69 en présence d'AcN pour l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35 corrélant avec les profils de neutralisation et d'activation des cellules A549 infectées (***Figure S12, Figure S13 et Figure 33***). Concernant la sécrétion de cytokines, nous observons des profils différents en comparaison avec les conditions avec les HAdVs seuls, nécessitant d'autres quantifications pour émettre une conclusion (***Figure S13, Figure 34 et Figure 35***).

Contrairement aux cellules A549, les DC affichent une augmentation de l'infection en présence des HAdVs sous forme complexes Ig - HAdVs (***Figure 37***) et une activation cellulaire (***Figure 38***). Concernant l'analyse de la condition HAdV-B35-S14, nous observons individuellement soit une infection égale à l'HAdV-B35 soit légèrement supérieure. Il serait nécessaire d'effectuer des tests sur un plus grand nombre de donneur. Dans ce contexte

d'augmentation de l'infection, nous nous attendons à quantifier une augmentation de l'activité cellulaire des ILCs se traduisant par une augmentation globale des marqueurs de l'activation comme l'expression du CD69 ou encore la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et antivirales. Globalement, nous observons une augmentation du pourcentages d'ILCs exprimant le CD69 pour l'HAdV-C5 et l'HAdV-B35 corrélant avec les profils d'activation des DC infectées et nos hypothèses (***Figure S16, Figure 39 et Figure 40***). Pour finir, nous observons dans l'ensemble une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et antivirales (à l'exception du CXCL10) en comparaison aux conditions avec les HAdVs seuls (***Figure S16, Figure 41 et Figure 42***).

Pour conclure, nous pouvons déduire de l'ensemble de nos données que nous observons un effet activateur modéré sur le profil des ILCs à travers l'expression du CD69 et la sécrétion de cytokines par une stimulation indirecte, que ce soit à travers les cellules épithéliales pulmonaires A549 ou les DC. L'analyse d'un nombre de donneur bien plus élevée serait nécessaire pour approfondir nos données.

Immunité préexistante

Les FcγRs contribuent à la modulation de la réponse immunitaire notamment par le phénomène ADE (*antibody-dependent enhancement*)[464,465], ou encore en influant sur la production des cytokines au cours de la réponse[464,466,467]. Les FcγRs possèdent au niveau de leur queue cytoplasmique des motifs appelés ITAM (motif activateur des récepteurs immuns basé sur la tyrosine) ou ITIM (motif inhibiteur des récepteurs immuns basé sur la tyrosine) permettant respectivement de transmettre des signaux activateurs ou inhibiteurs après liaison à un complexe immun[468,469,470]. L'expression des FcγRs a donc un rôle crucial notamment dans le contexte vaccinal en présence d'une immunité préexistante. De plus, en fonction des virus, du type cellulaire mais aussi du titre d'AcN, un faible titre d'AcN augmente l'infection tandis qu'un titre d'AcN plus élevé la neutralise.

Au cours de cette étude, nous avons pu observer lors d'une infection des DC par les HAdVs (***Figure 37***) un phénomène ADE qui se traduit par une augmentation de l'infection dépendante des anticorps à travers les récepteurs aux fragments Fc[465,471,472]. Au cours de ce phénomène, la formation de complexes Ig - HAdVs entre le virus et des anticorps non neutralisants ou à des concentrations sous neutralisantes permet d'internaliser le virus[473], d'augmenter la réplication virale et modifier la réponse immunitaire de l'hôte, notamment à travers une surproduction de TNF[471,474].

Concernant les ILCs, nous présumons l'hypothèse d'un phénomène ADE après une infection par l'HAdV-D26 en présence du sérum A pour tous les groupes d'ILCs et plus faiblement après une infection par l'HAdV-C5 en présence du sérum E pour les ILC1 et les ILC2 ***(Figure 22)***. Cependant, nous avons pu mettre en évidence seulement un faible pourcentage d'ILCs exprimait le CD16 (FcγRIII), rejoignant ce qui a été observé pour les Ly T[464,468]. D'autres FcγRs, comme le CD32 (FcγRII) ou le CD64 (FcγRI), participent aussi à la modulation de la réponse immunitaire en présence d'AcN[464,468]. Le rôle du CD32 dans l'activation des lymphocytes[475,476], ou au cours de réponse antivirale[477,478], a déjà été décrit. Le CD64 est impliqué dans l'internalisation des complexes Ig - HAdVs par les cellules présentatrices de l'antigène et module l'activation de l'immunité humorale, notamment des lymphocytes[479,480,481].

L'ensemble de ces observations nous laissent supposer que les ILCs participent aux interactions entre les vecteurs vaccinaux dérivés des HAdVs et la réponse immunitaire préexistante de l'hôte[471]. Néanmoins, les phénomènes d'ADE pour les ILCs restent encore majoritairement à explorer.

Perspectives

La première étape pour consolider nos résultats serait d'étudier les transcrits d'ARNm des différents marqueurs (CD69, CRTH2, CD117) et des cytokines (IFN-λ, IFN-β, IFN-γ, TNF, IL-6, IL-8, IL-21 et CXCL10) que nous avons examiné par cytométrie en flux, mais aussi approfondir nos données par l'analyse des facteurs de transcription (T-bet, GATA-3 et ROR-γt). Il serait également envisageable de déterminer la production de cytokines pour chaque groupe d'ILCs par des stratégies de marquage intracellulaire. Les ILCs semblent être plus sensible à une infection par l'HAdV-B35 et montrent des profils différents en présence de sérum contenant des anticorps spécifiques (S14) et non spécifiques (SA). Ces résultats semblent cohérents avec les connaissances disponibles sur l'infection par l'HAdV-B35 infectant préférentiellement les cellules de la lignée lymphoïde. De plus, des tests utilisant des virus réplicatifs pourraient être plus informatifs concernant le profil d'infection et d'activation des ILCs dans un contexte d'infection naturelle.

Nous avions pour ambition au début de ce projet de transposer les études menées avec la lignée épithéliale pulmonaire A549 à des cellules pulmonaires primaires humaines afin d'affiner nos résultats et de se rapprocher d'une situation plus physiologique. Nous avions

également le projet d'observer le profil d'activation des ILCs au cours d'une infection par HAdVs avec ou sans immunité préexistante dans un contexte de co-culture grâce à l'utilisation du système Transwell ® ***(Figure 44)***. En parallèle, nous voulions transposer nos tests à des cellules entérocytaires de type Caco-2 car pour une grande partie des HAdVs l'infection se fait par voie digestive. Cela aurait permis d'approfondir nos connaissances dans un contexte d'infection naturelle par les HAdVs.

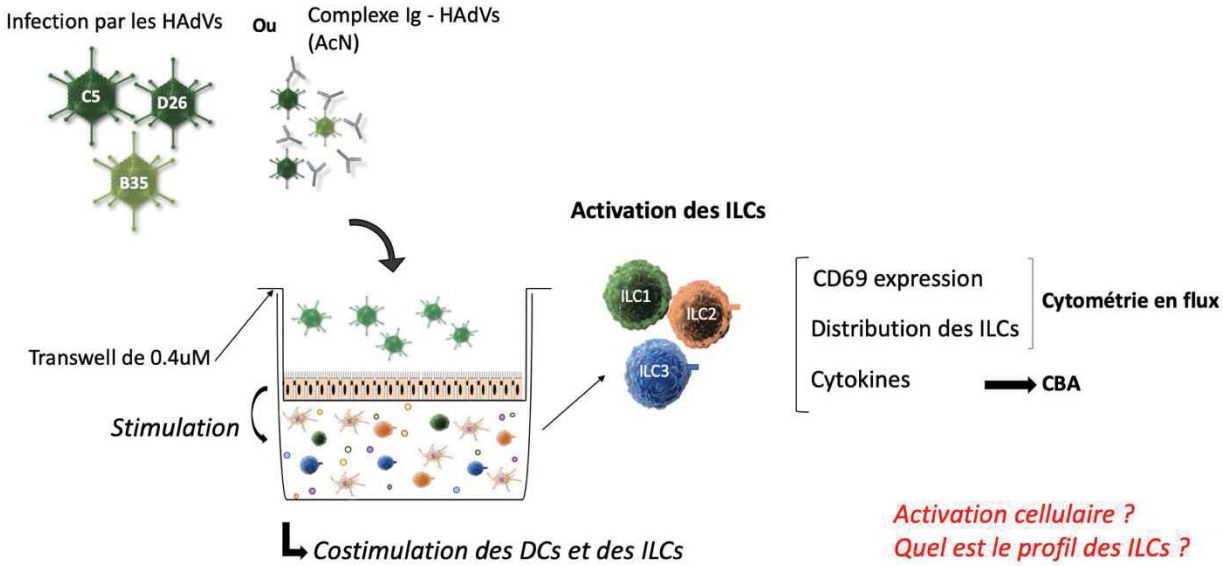


Figure 44: Représentation schématique du protocole de stimulation des ILCs en co-culture après une infection des cellules A549 par les HAdVs

Les cellules épithéliales sont directement infectées par les HAdVs dans le compartiment supérieur du système Transwell®. Les DC et les ILCs situées dans le compartiment inférieur sont stimulées dans un environnement de costimulation. Les ILCs sont ensuite étudiées pour l'expression du CD69, la distribution de chaque groupe et la sécrétion des cytokines impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire.

Nous pouvons aussi nous interroger sur les différences d'activation entre les ILCs circulantes et les ILCs tissulaires. Les ILCs sont majoritairement décrites et étudiées dans les tissus (peau, poumons, intestins)[60,454,482,483]. Pour des raisons évidentes, chez l'Homme l'étude des ILCs tissulaires est plus problématique que chez la souris, c'est pourquoi le modèle sanguin est plus accessible. Il se pourrait que les ILCs tissulaires aient une physiologie différente face aux HAdVs car dans un contexte physiologique leur réponse induit une infiltration cellulaire immunitaire massive qui conduit à la formation d'un environnement inflammatoire plus enrichi. Dans ce cas, les ILCs circulants pourraient correspondre à un « stock » d'ILCs.

Dans un contexte plus général, nous savons que les ILCs ont un rôle crucial dans l'orientation de l'immunité adaptative[484]. Les ILCs peuvent agir de manière indirecte via la

sécrétion de cytokines mais aussi directe par contact cellulaire[485]. Des études chez la souris ont mise en évidence que les ILCs étaient capable de stimuler la différenciation des Ly B à travers la sécrétion d'IL-5 et d'IL-6[39,486], mais aussi des éosinophiles, mastocytes ou encore les DC[486]. Les ILCs semblent aussi avoir un rôle plus direct dans la modulation de l'immunité adaptative par leur capacité à présenter les antigènes aux Ly T $CD4^+$ à travers le CMH-II et la liaison de molécules de costimulation[437,487,488]. Après la phase aigüe de la réponse immunitaire, les ILCs participent au maintien des Ly T $CD4^+$ mémoires mais aussi dans la régulation de la réponse effectrice en stimulant les Ly T régulateurs[117,487].

Récemment, une nouvelle sous population d'ILCs a été observé chez la souris, une population capable de synthétiser et sécréter comme les Ly T régulateurs de l'IL-10 et du TGF-β, appelée ILC_{reg}[489,490]. Cette population a été identifié comme exprimant le facteur de transcription FoxP3, caractéristique des Ly T régulateurs. Chez l'Homme, une population similaire a été mise en évidence dans l'intestin, une population Lin^- $CD127^+$ $IL\text{-}10^+$ qui reste cependant à étudier plus en profondeur[490].

Dernièrement, une étude a mis en évidence la génération d'une sous-population d'ILC2 mémoires à l'âge adulte[491]. L'ensemble de ces données montre que la fonction des ILC soulève encore de nombreuses questions quant à leur rôle au cours de la réponse immunitaire. Les nombreuses facettes de ces cellules restent encore à explorer dans notre modèle, encore confronté à de nombreux obstacles techniques, tels que les difficultés de purification et de culture, et le nombre extrêmement réduit de cellules disponibles.

Conclusion

Pour conclure, les ILCs répondent à une infection par HAdVs à travers notamment leur participation dans l'induction d'un environnement pro-inflammatoire et antiviral. Ces cellules présentent un profil d'activation différent en fonction des voies de stimulation utilisées mais aussi en présence ou non d'anticorps neutralisants. Pour étudier cette activation, le CD69 et la sécrétion de cytokines paraissent être de bons outils.

Nos résultats, bien que préliminaires, montrent que les ILCs participent à la réponse immunitaire dirigé contre les HAdVs et par conséquent interviennent également lors de la réponse de l'hôte dans un contexte de vaccination utilisant des vecteurs adénoviraux.

VI. Figures supplémentaires

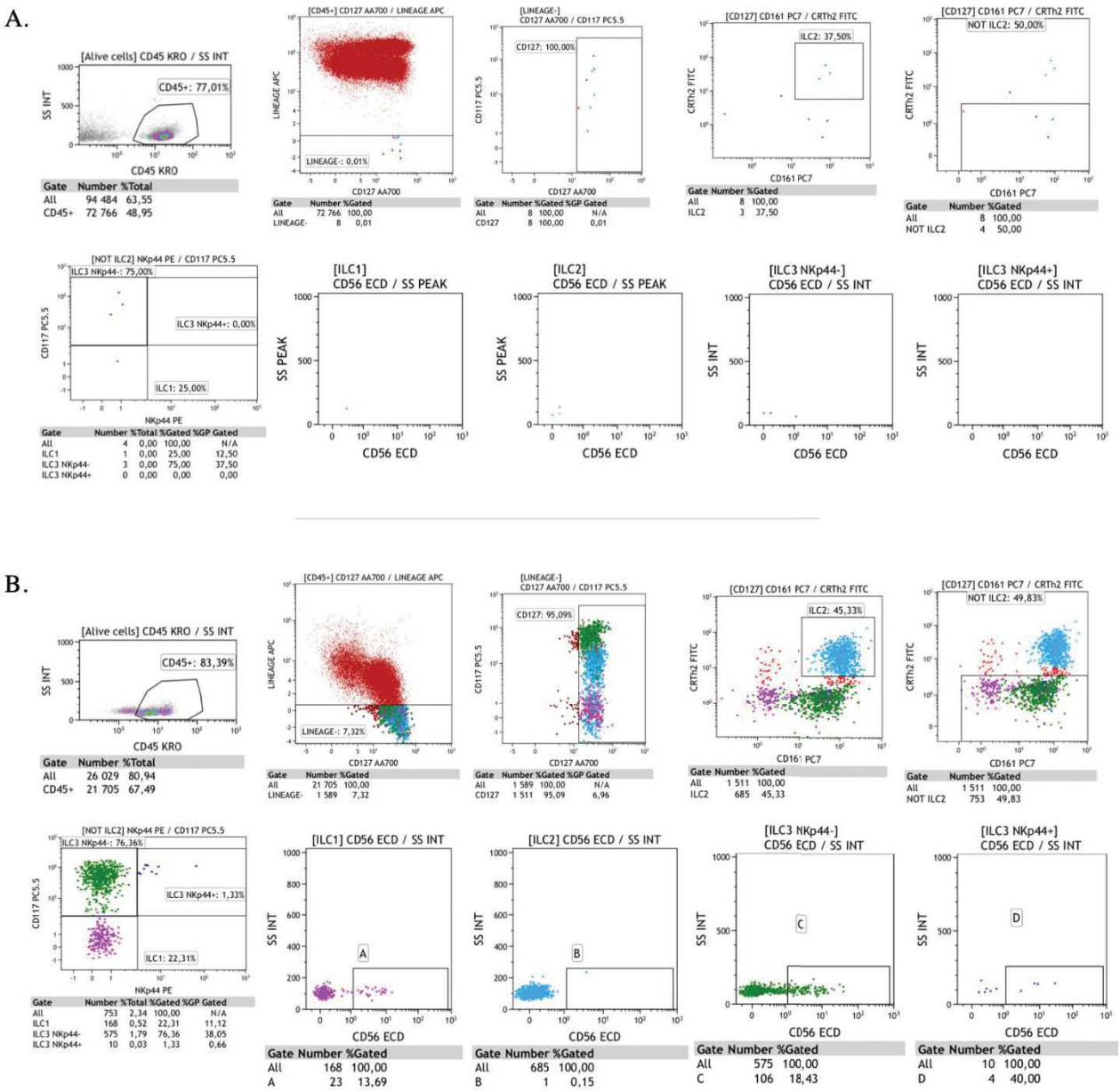


Figure S1: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de couches leuco-plaquettaires par cytométrie de flux

Comparaison de la population Lin$^-$ CD127$^+$ avant (**A**) et après (**B**) isolation des ILCs par sélection immuno-magnétique négative. Le protocole d'observation est le suivant: Cellules vivantes → Cellules CD45$^+$ → Cellules Lin$^-$ → Cellules CD127$^+$ → ILC1 - ILC2 - ILC3. Les ILC1 (CRTH2$^-$ CD117$^-$) sont identifiées en **fuchsia**, les ILC2 (CRTH2$^+$ CD117$^{+/-}$) en **bleu** et les ILC3 (CRTH2$^-$ CD117$^+$) en **vert**. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter) en collaboration avec Anne-Sophie Bedin (UMR_1058, Inserm, Montpellier).

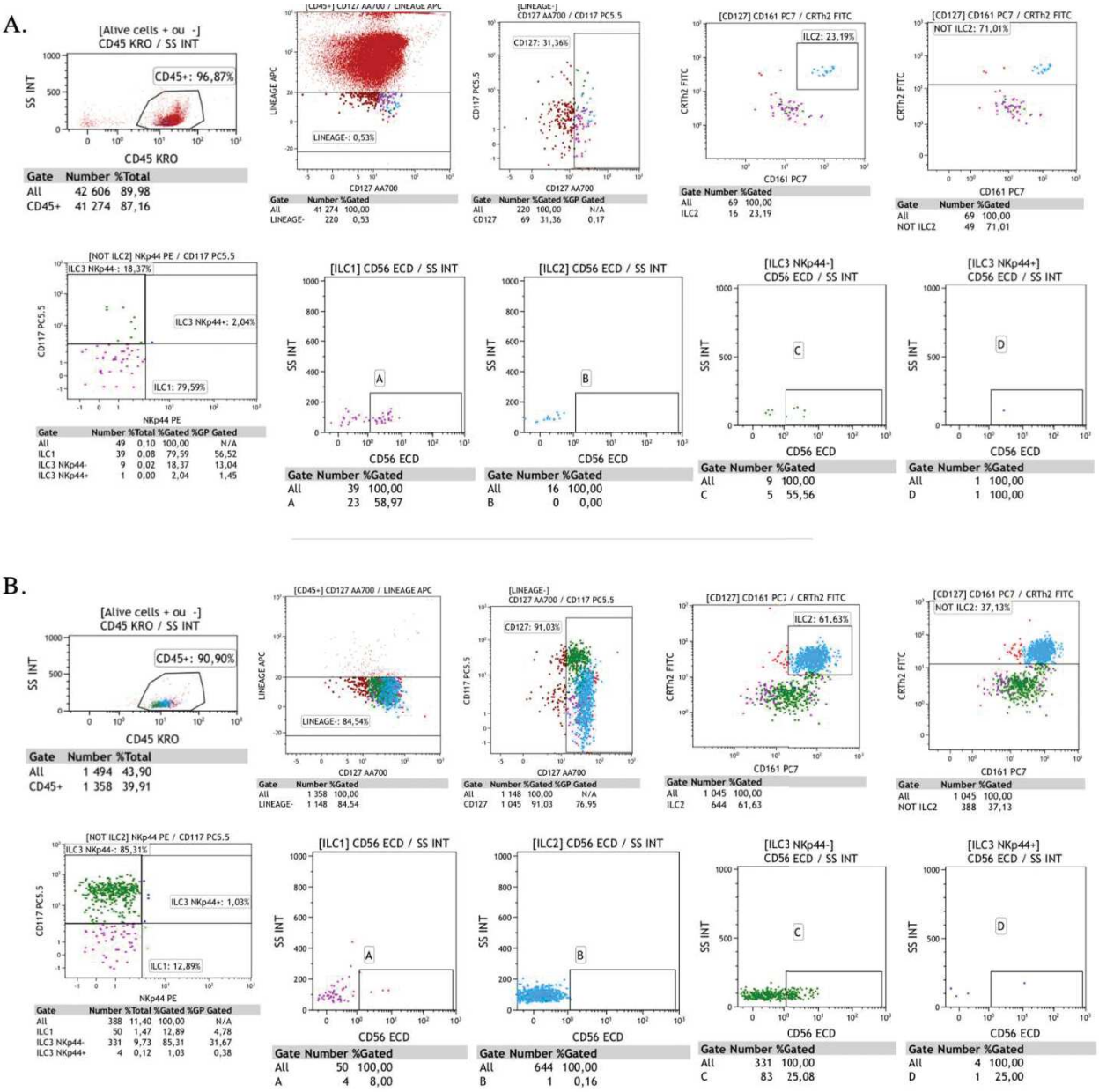
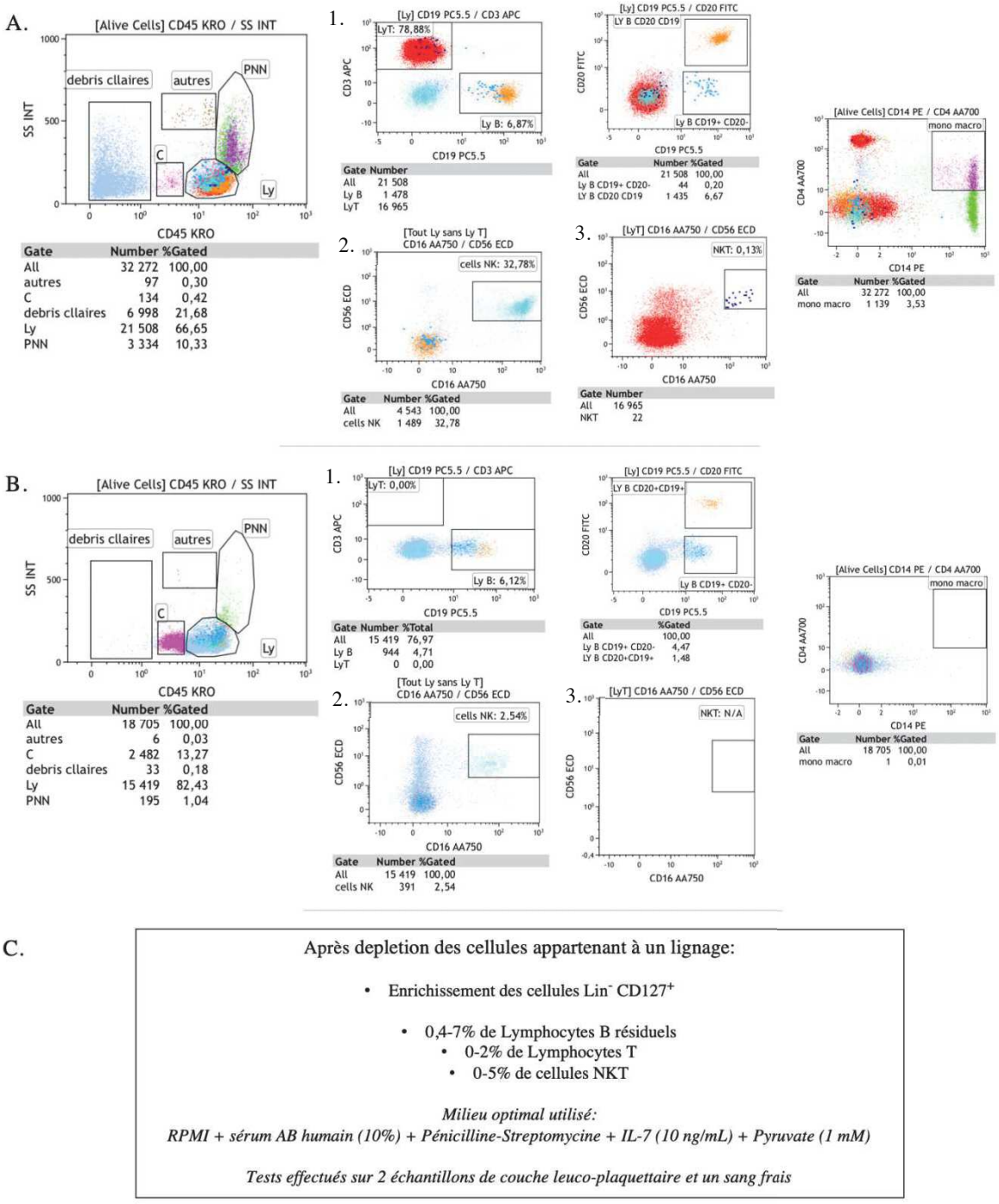


Figure S2: Validation du protocole d'enrichissement des ILCs humaines à partir de sang frais par cytométrie de flux

Comparaison de la population Lin$^-$ CD127$^+$ avant (**A**) et après (**B**) isolation des ILCs par sélection immuno-magnétique négative. Le protocole d'observation est le suivant: Cellules vivantes → Cellules CD45$^+$ → Cellules Lin$^-$ → Cellules CD127$^+$ → ILC1 - ILC2 - ILC3. Les ILC1 (CRTH2$^-$ CD117$^-$) sont identifiées en **fuchsia**, les ILC2 (CRTH2$^+$ CD117$^{+/-}$) en **bleu** et les ILC3 (CRTH2$^-$ CD117$^+$) en **vert**. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter) en collaboration avec Anne-Sophie Bedin (UMR_1058, Inserm, Montpellier).



C.

Après depletion des cellules appartenant à un lignage:

- Enrichissement des cellules Lin$^-$ CD127$^+$

- 0,4-7% de Lymphocytes B résiduels
- 0-2% de Lymphocytes T
- 0-5% de cellules NKT

Milieu optimal utilisé:
RPMI + sérum AB humain (10%) + Pénicilline-Streptomycine + IL-7 (10 ng/mL) + Pyruvate (1 mM)

Tests effectués sur 2 échantillons de couche leuco-plaquettaire et un sang frais

Figure S3: Evaluation de l'efficacité du protocole d'enrichissement des ILCs humaines par cytométrie de flux

A-B. Comparaison des populations NKT, Lymphocytes T et lymphocytes B avant (**A**) et après (**B**) le protocole d'isolation des ILCs par sélection immuno-magnétique négative. Les résultats sont présentés pour un seul donneur et sont représentatifs de 3 donneurs indépendants. Le protocole d'observation est le suivant: Cellules vivantes → Cellules CD45$^+$ → 1. Cellules CD3$^+$ (LyT) vs CD19$^+$ (LyB), 2. Ly (LyT exclus): CD16 vs CD56 (NK) puis 3. Parmi les LyT: CD16 vs CD56 (NKT). **C.** Récapitulatif des cellules NK et NKT, des LyT et des LyB présentes dans l'échantillon sanguin après enrichissement et déplétion. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter) en collaboration avec Anne-Sophie Bedin (UMR_1058, Inserm, Montpellier).

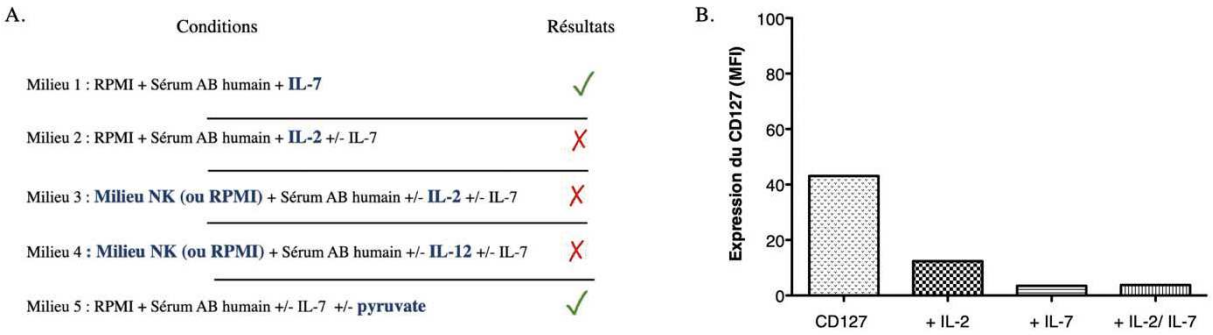
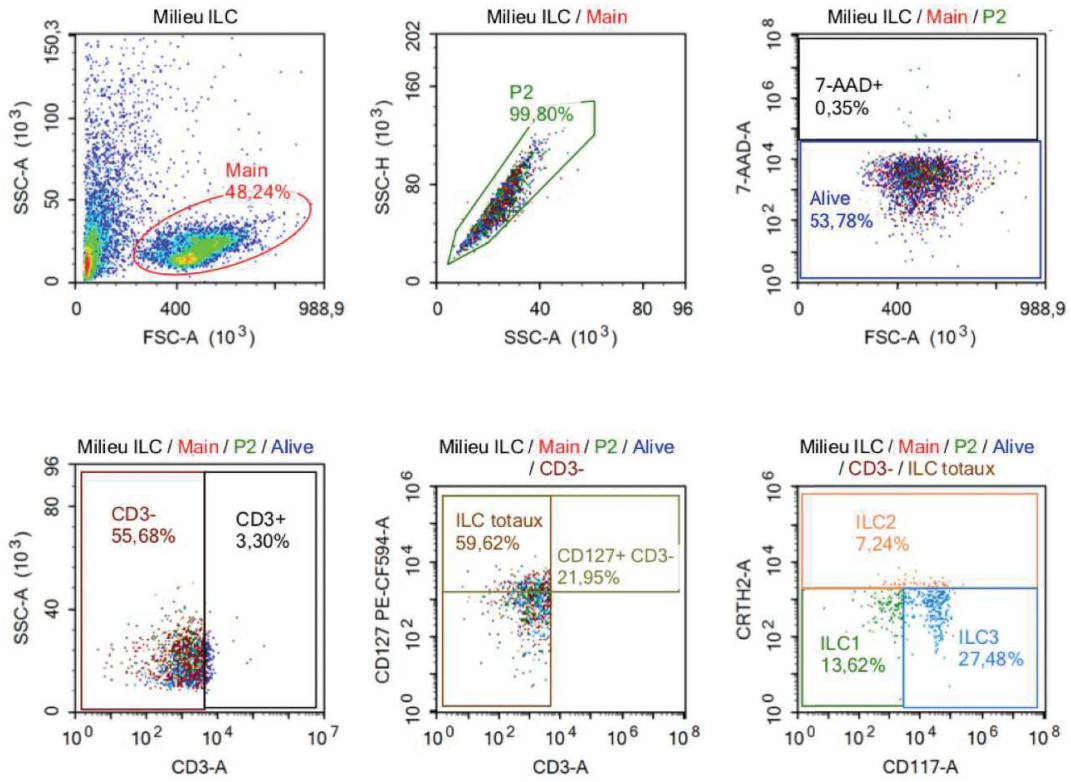


Figure S4: Milieux testés pour la culture des ILCs et l'expression du marqueur CD127

A. Liste des différents milieux testés (n = 2 pour chaque combinaison de milieu). Les différentes combinaisons de milieux sont en présence d'IL-2, d'IL-12 et/ou d'IL-7 à des concentrations de 5, 10, 20, 30 ou 90 ng/mL en milieu RPMI ou en milieu commercial spécifique aux cellules NK. **B**. L'expression du CD127 en MFI (Moyenne d'intensité de fluorescence) par les ILCs a été mesurée après 24 h en culture (n = 2). La condition CD127 correspond à un milieu complet sans cytokines, puis l'IL-2 et/ou l'IL-7 y a été ajouté. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysé avec le logiciel NovoExpress.

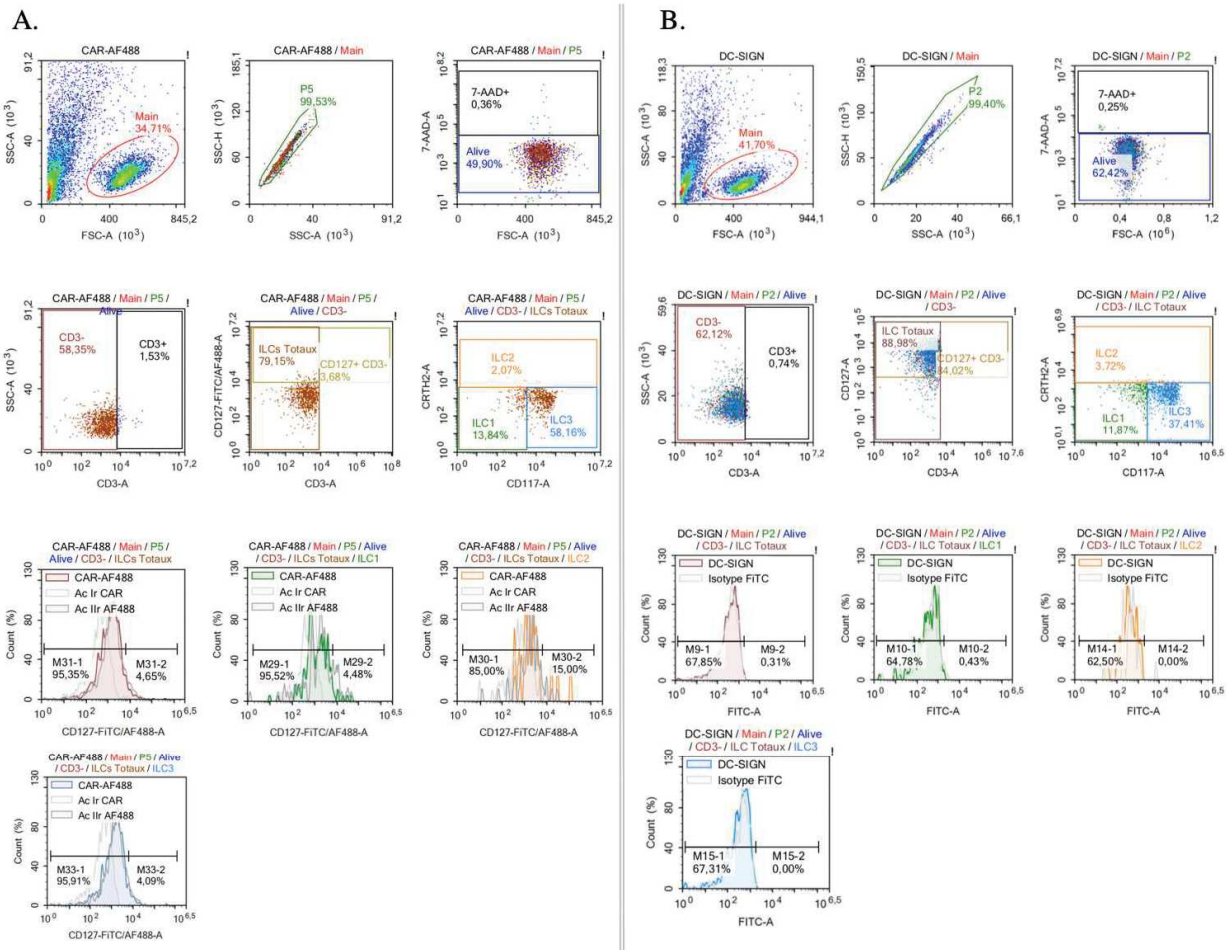


Sample Statistics

Gate	Count	% Parent	X	Y	Median X	Median Y
All	9 482					
Main	4 574	48,24 %	FSC-A	SSC-A	475 521	19 289
P2	4 565	99,80 %	SSC-A	SSC-H	19 282	55 305
Alive	2 455	53,78 %	FSC-A	7-AAD-A	474 860	2 928
CD3-	1 367	55,68 %	CD3-A	SSC-A	1 383	19 273
ILC totaux	815	59,62 %	CD3-A	CD127 PE-CF594-A	1 260	1 084
ILC1	111	13,62 %	CD117-A	CRTH2-A	1 097	648
ILC2	59	7,24 %	CD117-A	CRTH2-A	12 061	2 463
ILC3	224	27,48 %	CD117-A	CRTH2-A	30 545	695
CD127+ CD3-	300	21,95 %	CD3-A	CD127 PE-CF594-A	1 251	2 236
CD3+	81	3,30 %	CD3-A	SSC-A	5 547	21 297
7-AAD+	16	0,35 %	FSC-A	7-AAD-A	483 644	209 837

Figure S5: Observation des ILCs fraîchement enrichies à partir de sang frais par cytométrie en flux

Parmi la population lymphoïde (= *main*), les doublets sont exclus (P2), et les cellules négatives pour le marqueur de viabilité 7-AAD sont sélectionnées (Alive). Au sein de cette population, les cellules $CD3^-$ $CD127^+$ sont sélectionnées (= ILCs totaux), et l'expression des marqueurs CRTH2 et CD117 permet d'identifier chaque groupe d'ILCs. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress. Les résultats sont représentatifs du protocole d'enrichissement des ILCs utilisé.



Sample Statistics

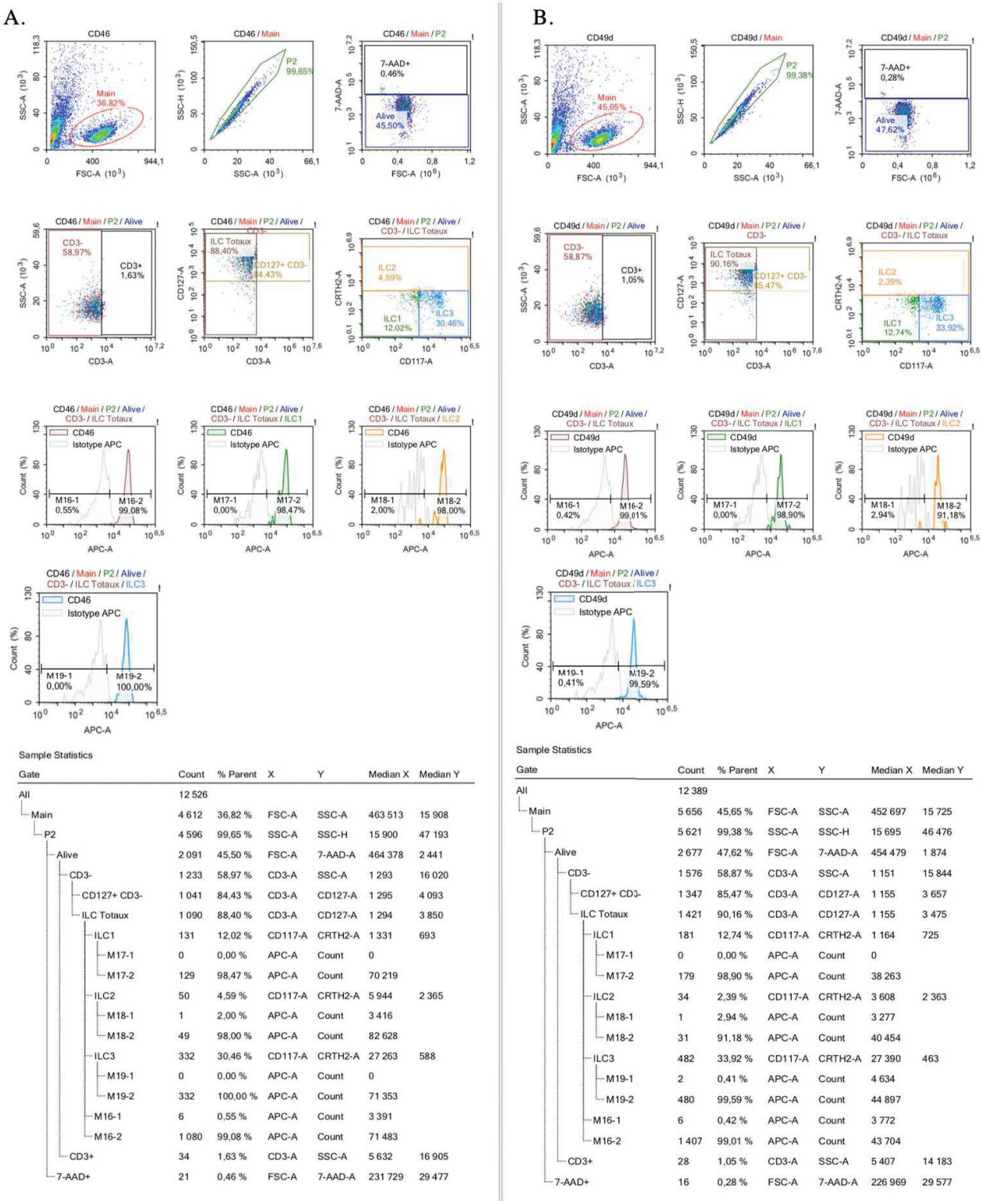
Gate	Count	% Parent	X	Y	Median X	Median Y
All	12 157					
Main	4 220	34,71 %	FSC-A	SSC-A	488 058	18 058
P5	4 200	99,53 %	SSC-A	SSC-H	18 047	54 106
Alive	2 096	49,90 %	FSC-A	7-AAD-A	489 262	2 955
CD3-	1 223	58,35 %	CD3-A	SSC-A	1 559	18 159
CD127+ CD3-	45	3,68 %	CD3-A	CD127-FiTC/AF488-A	1 941	11 166
ILCs Totaux	968	79,15 %	CD3-A	CD127-FiTC/AF488-A	1 576	1 423
ILC1	134	13,84 %	CD117-A	CRTH2-A	1 544	1 001
M29-1	128	95,52 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	1 144	
M29-2	6	4,48 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	15 404	
ILC2	20	2,07 %	CD117-A	CRTH2-A	3 369	4 567
M30-1	17	85,00 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	1 675	
M30-2	3	15,00 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	32 834	
ILC3	563	58,16 %	CD117-A	CRTH2-A	23 865	985
M33-1	540	95,91 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	1 389	
M33-2	23	4,09 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	10 496	
M31-1	923	95,35 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	1 341	
M31-2	45	4,65 %	CD127-FiTC/AF488-A	Count	11 166	
CD3+	32	1,53 %	CD3-A	SSC-A	9 004	20 327
7-AAD+	15	0,36 %	FSC-A	7-AAD-A	504 315	211 691

Sample Statistics

Gate	Count	% Parent	X	Y	Median X	Median Y
All	13 551					
Main	5 651	41,70 %	FSC-A	SSC-A	460 090	15 543
P2	5 617	99,40 %	SSC-A	SSC-H	15 521	46 118
Alive	3 506	62,42 %	FSC-A	7-AAD-A	460 466	1 927
CD3-	2 178	62,12 %	CD3-A	SSC-A	1 212	15 662
CD127+ CD3-	1 830	84,02 %	CD3-A	CD127-A	1 218	3 547
ILC Totaux	1 938	88,98 %	CD3-A	CD127-A	1 218	3 349
ILC1	230	11,87 %	CD117-A	CRTH2-A	1 188	694
M10-1	149	64,78 %	FITC-A	Count	384	
M10-2	1	0,43 %	FITC-A	Count	2 014	
ILC2	72	3,72 %	CD117-A	CRTH2-A	3 996	2 375
M14-1	45	62,50 %	FITC-A	Count	397	
M14-2	0	0,00 %	FITC-A	Count	0	
ILC3	725	37,41 %	CD117-A	CRTH2-A	26 545	552
M15-1	488	67,31 %	FITC-A	Count	412	
M15-2	0	0,00 %	FITC-A	Count	0	
M9-1	1 315	67,85 %	FITC-A	Count	413	
M9-2	6	0,31 %	FITC-A	Count	2 160	
CD3+	26	0,74 %	CD3-A	SSC-A	5 402	15 054
7-AAD+	14	0,25 %	FSC-A	7-AAD-A	224 212	27 107

Figure S6: Expression de CAR et DC-SIGN par les ILCs humaines du sang périphérique

Détails de l'expression de la protéine CAR **(A)** et DC-SIGN **(B)** par les ILCs fraîchement isolées à partir de sang frais. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 2 à 3 donneurs indépendants.



Sample Statistics

Gate	Count	% Parent	X	Y	Median X	Median Y
All	12 526					
Main	4 612	36,82 %	FSC-A	SSC-A	463 513	15 908
P2	4 596	99,65 %	SSC-A	SSC-H	15 900	47 193
Alive	2 091	45,50 %	FSC-A	7-AAD-A	464 378	2 441
CD3-	1 233	58,97 %	CD3-A	SSC-A	1 293	16 020
CD127+ CD3-	1 041	84,43 %	CD3-A	CD127-A	1 295	4 093
ILC Totaux	1 090	88,40 %	CD3-A	CD127-A	1 294	3 850
ILC1	131	12,02 %	CD117-A	CRTH2-A	1 331	693
M17-1	0	0,00 %	APC-A	Count	0	
M17-2	129	98,47 %	APC-A	Count	70 219	
ILC2	50	4,59 %	CD117-A	CRTH2-A	5 944	2 365
M18-1	1	2,00 %	APC-A	Count	3 416	
M18-2	49	98,00 %	APC-A	Count	82 628	
ILC3	332	30,46 %	CD117-A	CRTH2-A	27 263	588
M19-1	0	0,00 %	APC-A	Count	0	
M19-2	332	100,00 %	APC-A	Count	71 353	
M16-1	6	0,55 %	APC-A	Count	3 391	
M16-2	1 080	99,08 %	APC-A	Count	71 483	
CD3+	34	1,63 %	CD3-A	SSC-A	5 632	16 905
7-AAD+	21	0,46 %	FSC-A	7-AAD-A	231 729	29 477

Sample Statistics

Gate	Count	% Parent	X	Y	Median X	Median Y
All	12 389					
Main	5 656	45,65 %	FSC-A	SSC-A	452 697	15 725
P2	5 621	99,38 %	SSC-A	SSC-H	15 695	46 476
Alive	2 677	47,62 %	FSC-A	7-AAD-A	454 479	1 874
CD3-	1 576	58,87 %	CD3-A	SSC-A	1 151	15 844
CD127+ CD3-	1 347	85,47 %	CD3-A	CD127-A	1 155	3 657
ILC Totaux	1 421	90,16 %	CD3-A	CD127-A	1 155	3 475
ILC1	181	12,74 %	CD117-A	CRTH2-A	1 164	725
M17-1	0	0,00 %	APC-A	Count	0	
M17-2	179	98,90 %	APC-A	Count	38 263	
ILC2	34	2,39 %	CD117-A	CRTH2-A	3 608	2 363
M18-1	1	2,94 %	APC-A	Count	3 277	
M18-2	31	91,18 %	APC-A	Count	40 454	
ILC3	482	33,92 %	CD117-A	CRTH2-A	27 390	463
M19-1	2	0,41 %	APC-A	Count	4 634	
M19-2	480	99,59 %	APC-A	Count	44 897	
M16-1	6	0,42 %	APC-A	Count	3 772	
M16-2	1 407	99,01 %	APC-A	Count	43 704	
CD3+	28	1,05 %	CD3-A	SSC-A	5 407	14 183
7-AAD+	16	0,28 %	FSC-A	7-AAD-A	226 969	29 577

Figure S7: Expression du CD46 et du CD49d (intégrine α4) par les ILCs humaines du sang périphérique

Détails de l'expression de la protéine CD46 **(A)** et CD49d (intégrine α4) **(B)** par les ILCs fraîchement isolées à partir de sang frais. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 2 à 4 donneurs indépendants.

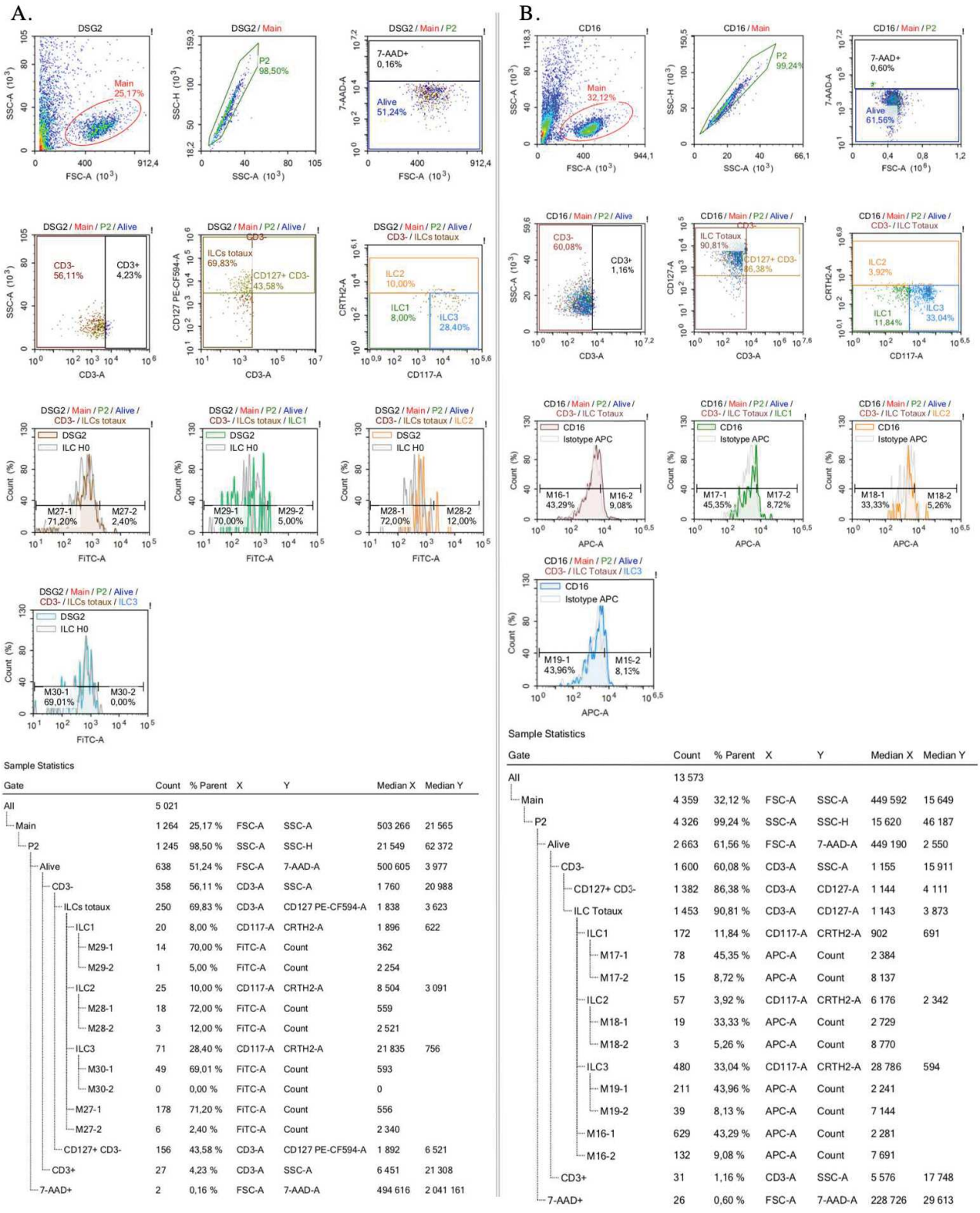


Figure S8: Expression du CD16 et de la DSG2 par les ILCs humaines du sang périphérique

Détails de l'expression de la protéine DSG2 (desmogléine 2) **(A)** et du CD16 (FcγRIII) **(B)** par les ILCs fraîchement isolées à partir de sang frais. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ®, analysés avec le logiciel NovoExpress et sont représentatifs de 4 à 5 donneurs indépendants.

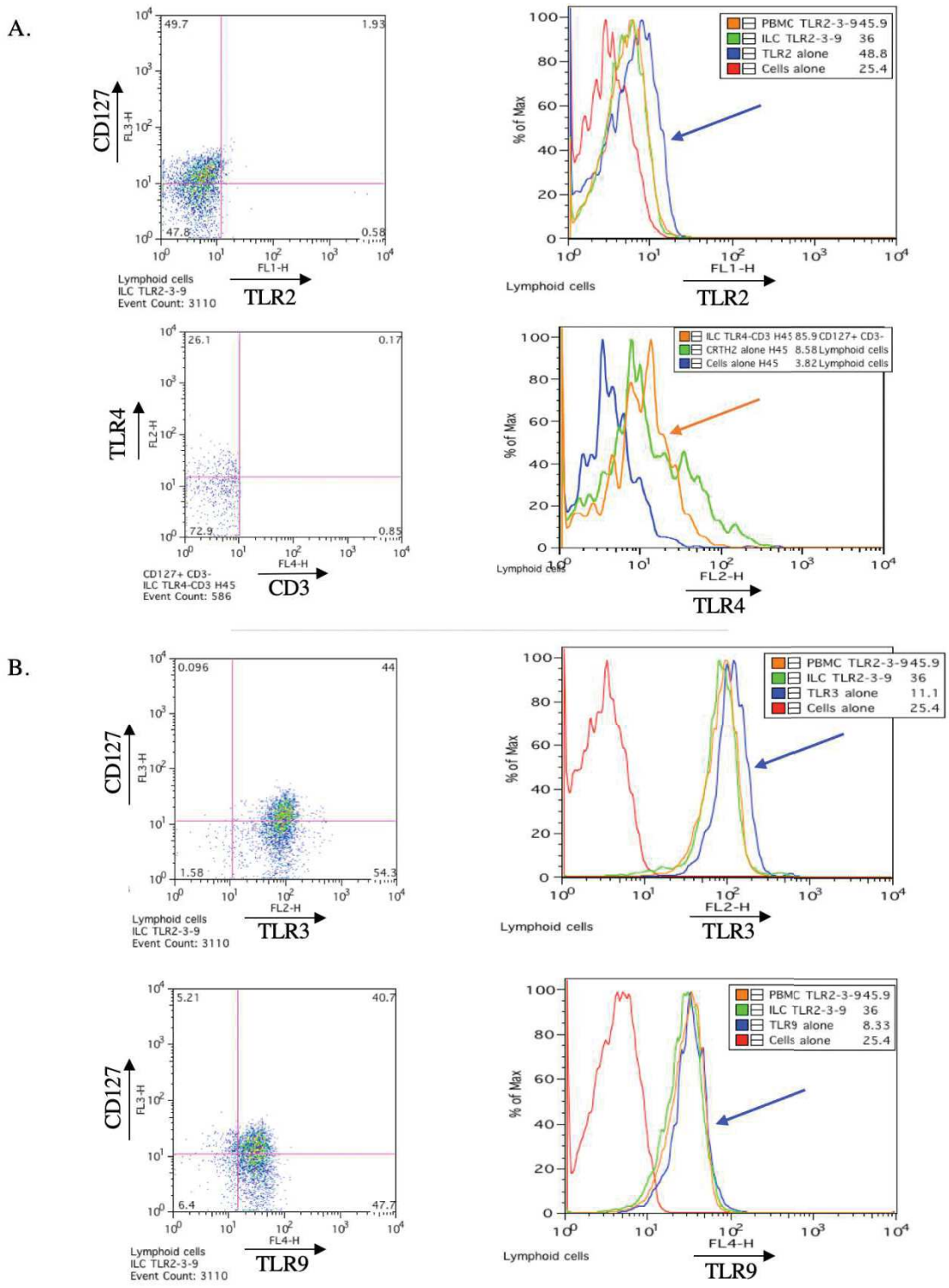


Figure S9: Expression de différents TLRs par les ILCs humaines de couches leuco-plaquettaires

A. Expression des TLR2 et TLR4 par les ILCs totaux ($CD3^-$ $CD127^+$) isolées à partir de sang frais. Pour le TLR2, la flèche bleue correspond au marquage et pour le TLR4 la flèche orange correspond au marquage. **B.** Expression des TLR3 et TLR9 par les ILCs totaux ($CD3^-$ $CD127^+$) isolées à partir de sang frais. Sur les deux histogrammes, la flèche bleue correspond au marquage. Les résultats correspondent aux premières mesures effectuées. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux FacsCalibur ®, analysés avec le logiciel FlowJo et sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

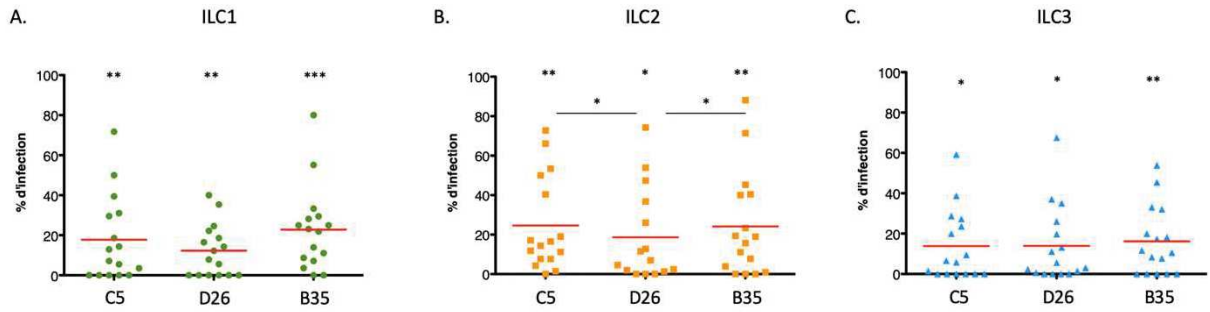


Figure S10: Efficacité d'infection des ILCs humaines par l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35

L'expression de la GFP par les ILCs a été mesurée 24 h post-infection avec chaque vecteur HAdV pour les ILC1, ILC2 et ILC3 (n = 16). Les pourcentages moyens des cellules exprimant la GFP après l'infection sont pour les ILC1: HAdV-C5: 18% / HAdV-D26: 12,5% / HAdV-B35: 23% **(A)**; pour les ILC2: HAdV-C5: 25% / HAdV-D26: 19% / HAdV-B35: 24 % **(B)**; pour les ILC3: HAdV-C5: 14% / HAdV-D26: 14% / HAdV-B35: 16% **(C)**. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non infectées et entre les différents HAdVs *(ns, $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Nous notons une différence significative entre l'HAdV-C5 et l'HAdV-D26 puis l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35 pour les ILC2 (* $p \leq 0,05$) mais une différence non significative entre les HAdVs testés pour les ILC1 et les ILC3. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

A.

GFP	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus	IC	Virus	IC	Virus	IC
ILC1	+ +	↗	+	↗	+ + +	↘
ILC2	+ + +	↗	+ +	↗	+ + +	↘
ILC3	+	↘	+	↗	+ +	↘

B.

CD69	*HAdV-C5*		*HAdV-26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
ILC1	=	=	+	↘	-	=
ILC2	+	↘	+ +	↘	=	↘
ILC3	-	↘	-	↘	=	↘

C.

Cytokines	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
IL-1β		+	+	-	+	+ +
TNF	+/-	+	+/-	+	+ +	+
IFN-λ_1	+/-	-	+/-	-	+/-	*n.d*
IFN-$\lambda_{2/3}$	+	+ +	+ +	+ +	+ + +	*n.d*
IL-8	+	+		+		*n.d*
IFN-β		+	+	-	+	*n.d*
IFN-γ	+/-	+	+	-	+	*n.d*
IL-6	+/-	+	+/-	+	+/-	+
IL-21	+/-	+		+	+	=
IL-5		+				
IL-9					+	*n.d*

Légendes

A - B : *+ = augmentation par rapport au contrôle/ - = diminution par rapport au contrôle/ « = » = égal au contrôle*
↘ = diminution par rapport au HAdV seul / ↗ = augmentation par rapport au HAdV seul

C : *Absence de variation en comparaison aux cellules seules*
n.d : non déterminé

Figure S11: Tableaux récapitulatifs d'infection et d'activation/stimulation des ILCs par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

A. Capacité d'infection des ILCs par les HAdVs. **B.** Expression du marqueur CD69 par les ILCs. **C.** Sécrétion des cytokines par les ILCs. Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées.

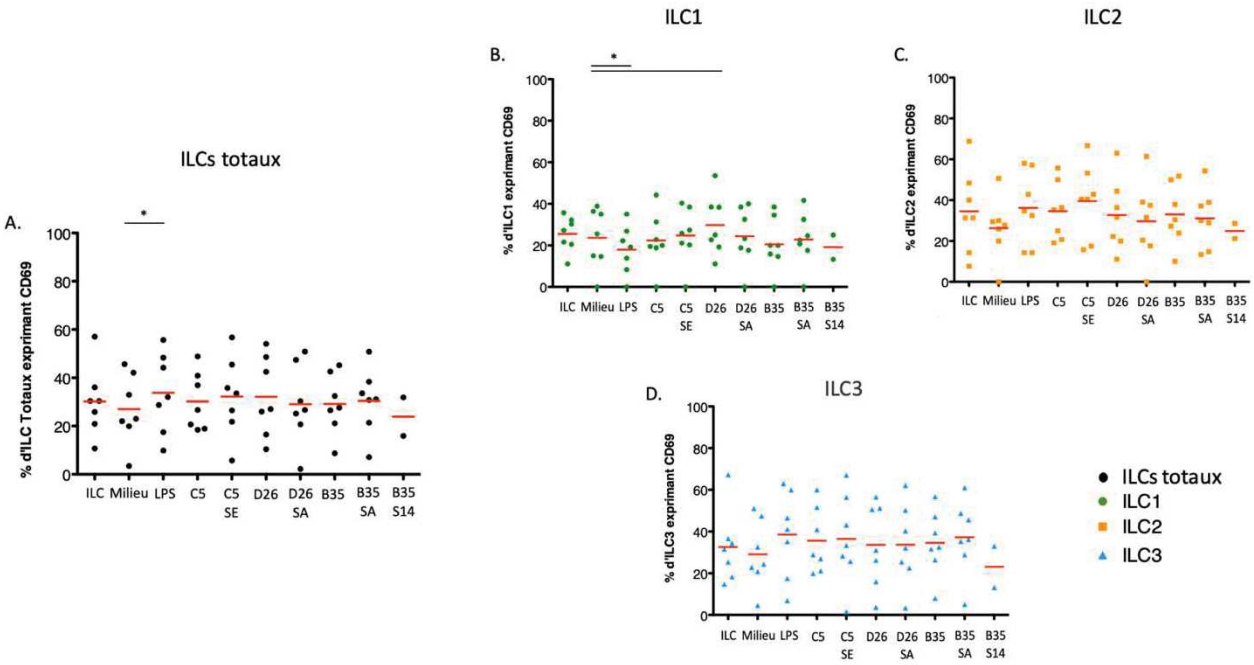


Figure S12: Expression du marqueur d'activation CD69 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD69 par les ILCs a été mesurée 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs ($n \geq 2$). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. La condition ILC correspond au milieu ILC et la condition milieu à la présence de surnageant de cellules A549 non infectées. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant le CD69 après une stimulation indirecte. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant le CD69 après une stimulation indirecte. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non stimulées (contrôle négatif) et entre les différents HAdVs *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

A.

CD69	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
ILC1	=	↗	+	↘	-	=
ILC2	+ +	↗	+	↘	+	↘
ILC3	+	=	+/-	=	+/-	↘

B.

Cytokines	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
IFN-β		+	-	+ +	+	+ + +
IL-8		=	+	-		=
IFN-γ	+	-	+ +	-	+ +	*n.d*
IFN-λ_1		+ +		+		+ +
IFN-$\lambda_{2/3}$		+	+	=	+	+
IL-6	+/-	+	+/-	+	+/-	+
TNF	+/-	-	+	-	+	*n.d*
IL-21	+	=	+ +	-	+ +	*n.d*

Légendes

A : *+ = augmentation par rapport au contrôle/ - = diminution par rapport au contrôle/ « = » = égal au contrôle*
↘ = diminution par rapport au HAdV seul / ↗ = augmentation par rapport au HAdV seul

B : *Absence de variation en comparaison aux cellules seules*
n.d : non déterminé

Figure S13: Tableaux récapitulatifs des résultats d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

A. Expression du marqueur CD69 par les ILCs après une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant des cellules A549 infectées avec ou sans AcN. **B.** Sécrétion des cytokines par les ILCs après une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant des cellules A549 infectées avec ou sans AcN. Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées.

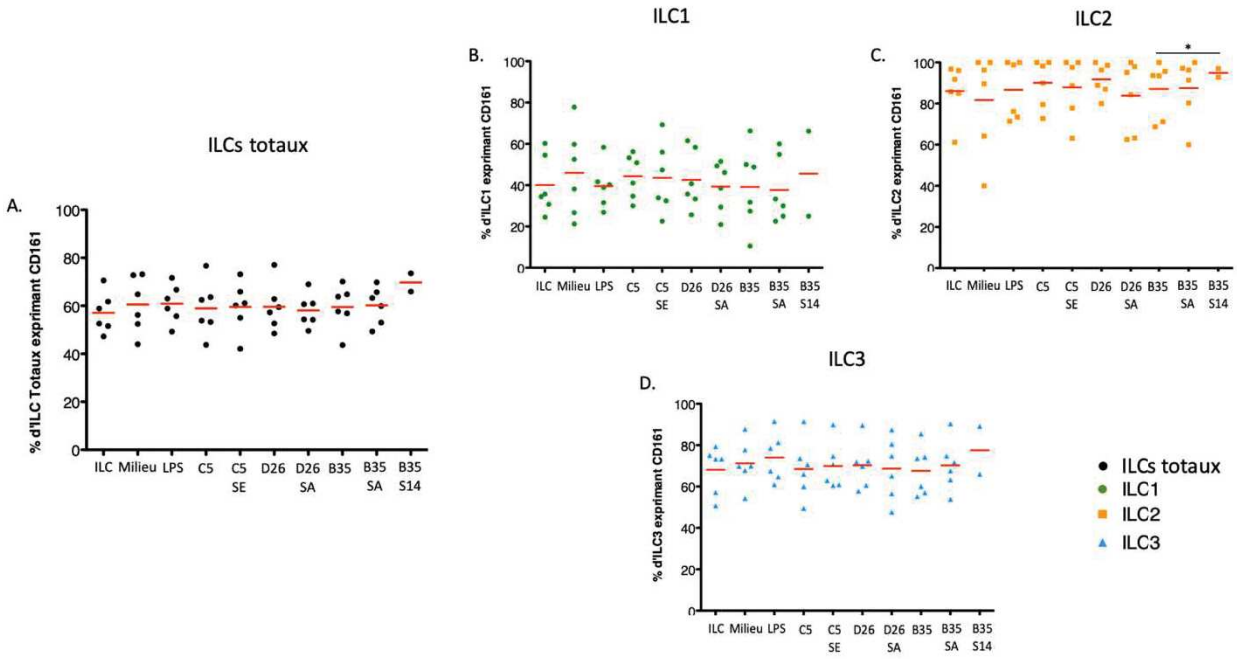


Figure S14: Expression du CD161 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD161 par les ILCs a été mesurée 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs ($n \geq 2$). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. La condition ILC correspond au milieu ILC et la condition milieu à la présence de surnageant de cellules A549 non infectées. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux exprimant le CD161 après une stimulation indirecte. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** exprimant le CD161 après une stimulation indirecte. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non stimulées (contrôle négatif) et entre les différents HAdV *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

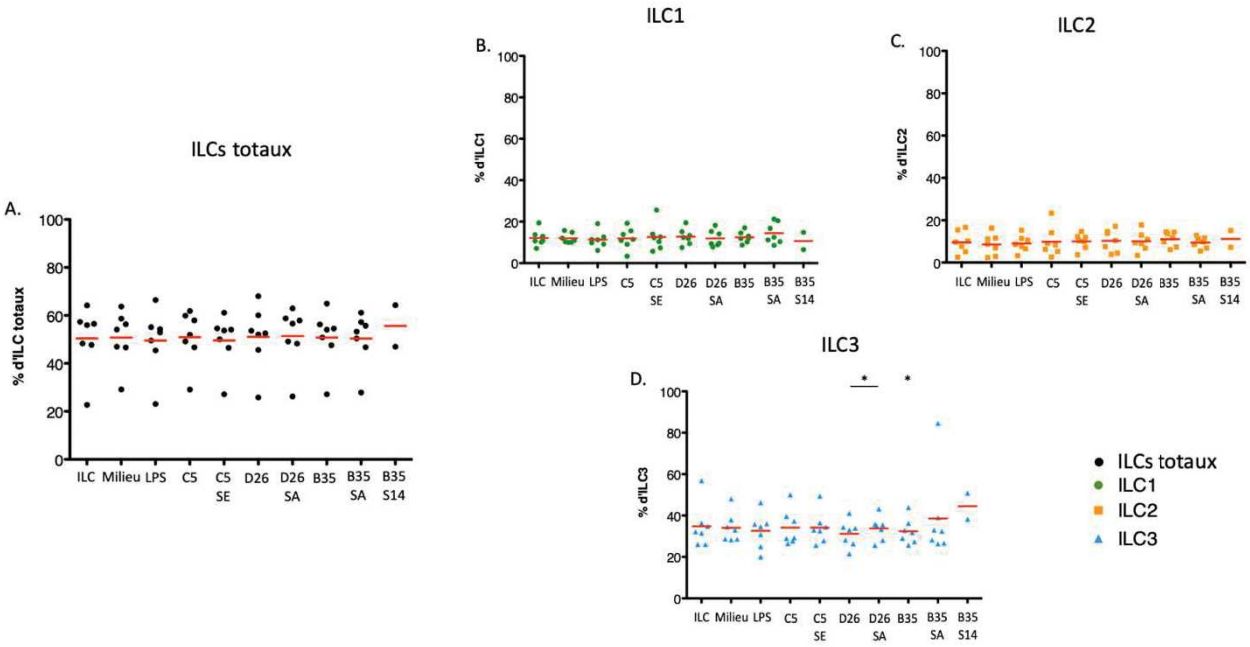


Figure S15: Distribution des ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

La distribution des ILCs a été étudié 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des cellules A549 infectées pour les ILCs totaux et les différents groupes d'ILCs ($n \geq 2$). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. La condition « ILC » correspond au milieu ILC et la condition « milieu » à la présence de surnageant de cellules A549 non infectées. **A.** Pourcentages moyens des ILCs totaux présents après une stimulation indirecte. **B-D.** Pourcentages moyens des ILC1 **(B)**, ILC2 **(C)** et ILC3 **(D)** après une stimulation indirecte. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non stimulées (contrôle négatif) et entre les différents HAdVs *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

A.

CD69	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
ILC1	-	↗	+	=	+	↗
ILC2	-	↗	+	↘	-	↗
ILC3	+	↗	+	↘	+	↗

B.

Cytokines	*HAdV-C5*		*HAdV-D26*		*HAdV-B35*	
	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*	Virus *vs milieu*	IC *vs virus*
IL-8	+	+ +	+	+ +	+ +	+
CXCL10	+ +	-	+ +	-	+ +	-
IL-6	+ +	+ +	+	+ +	+ +	*n.d*
TNF	+	+ + +	+	+ +	+	+ +
IFN-λ$_1$	+	+	+ +	+ + +	+	=

Légendes

A : *+ = augmentation par rapport au contrôle/ - = diminution par rapport au contrôle/ « = » = égal au contrôle*
↘ = diminution par rapport au HAdV seul / ↗ = augmentation par rapport au HAdV seul

B : *Absence de variation en comparaison aux cellules seules*
n.d : non déterminé

Figure S16: Tableaux récapitulatifs des résultats d'activation des ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées avec les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

Synthèse de l'expression du marqueur CD69 **(A)** et des cytokines sécrétées **(B)** après une stimulation indirecte des ILCs par le surnageant des DC infectées avec ou sans AcN. Seules les cytokines dont le niveau de sécrétion est au moins 2 fois plus élevé que celui des témoins sont présentées.

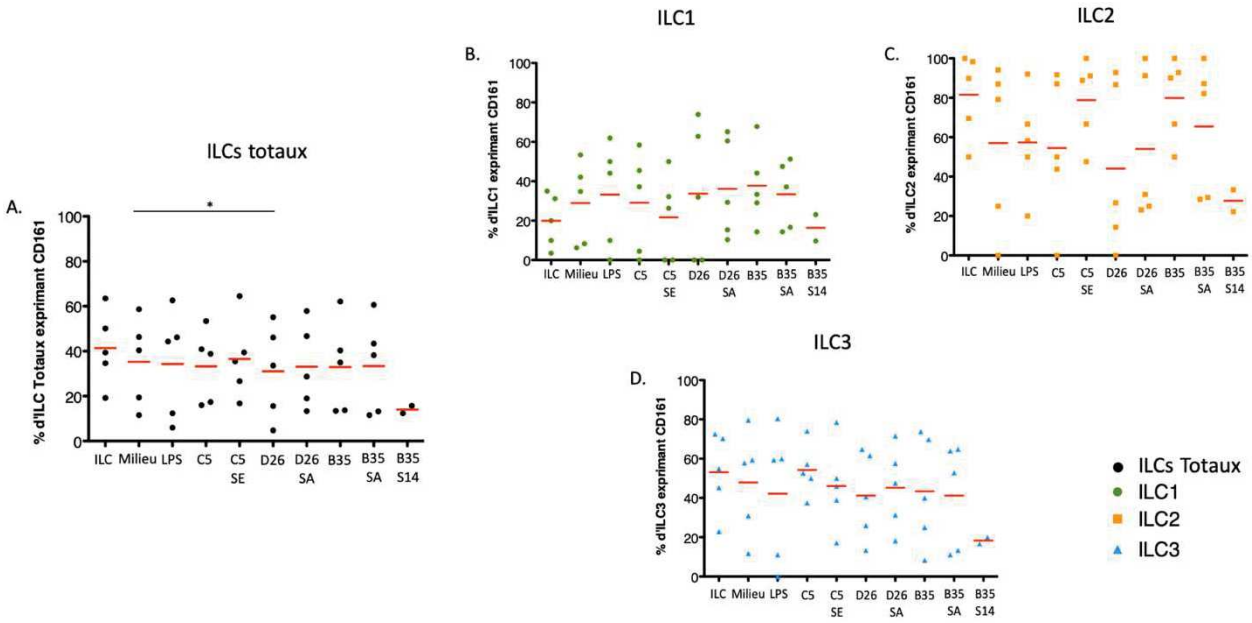


Figure S17: Expression du marqueur d'activation CD161 par les ILCs après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

L'expression du CD161 par les ILCs a été mesurée 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées pour les ILCs totaux **(A)**, les ILC1 **(B)**, les ILC2 **(C)** et les ILC3 **(D)** (n = 5). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre l'HAdV-C5, l'HAdV-D26 et l'HAdV-B35. La condition « ILC » correspond au milieu ILC et la condition « milieu » à la présence de surnageant de DC non infectées. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non stimulées (contrôle négatif) et entre les différents HAdVs *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

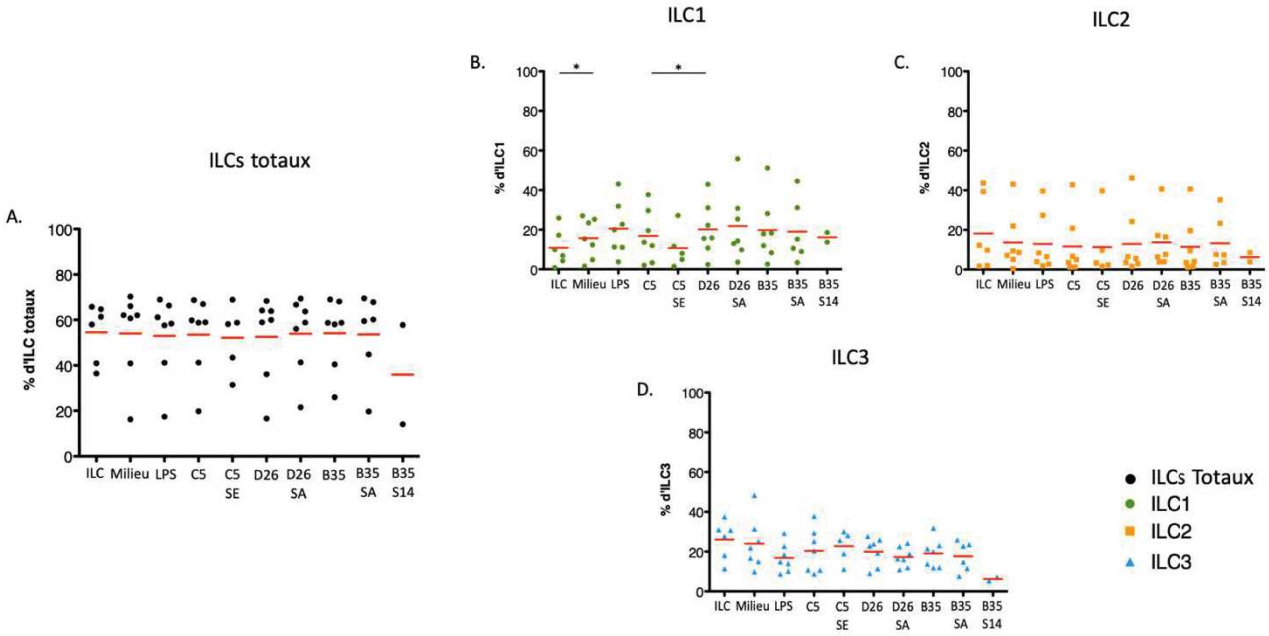


Figure S18: Distribution des ILCs humaines après une stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées par les HAdVs en présence ou non d'anticorps (AcN)

La distribution des ILCs a été étudié 24 h post-stimulation indirecte par le surnageant des DC infectées pour les ILCs totaux **(A)**, les ILC1 **(B)**, les ILC2 **(C)** et les ILC3 **(D)** (n = 7). Les sérums E, A et 14 possèdent respectivement des AcN contre HAdV-C5, HAdV-D26 et HAdV-B35. La condition « ILC » correspond au milieu ILC et la condition « milieu » à la présence de surnageant de DC non infectées. Les statistiques ont été effectuées par test de Student *t* apparié par comparaison avec les cellules non stimulées (contrôle négatif) et entre les différents HAdV *(ns $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)*. Les résultats ont été obtenus avec le cytomètre en flux Novocyte ® et analysés avec le logiciel NovoExpress.

VII. Annexes

1) Annexe 1: Infection par les HAdVs et la réponse immunitaire associée

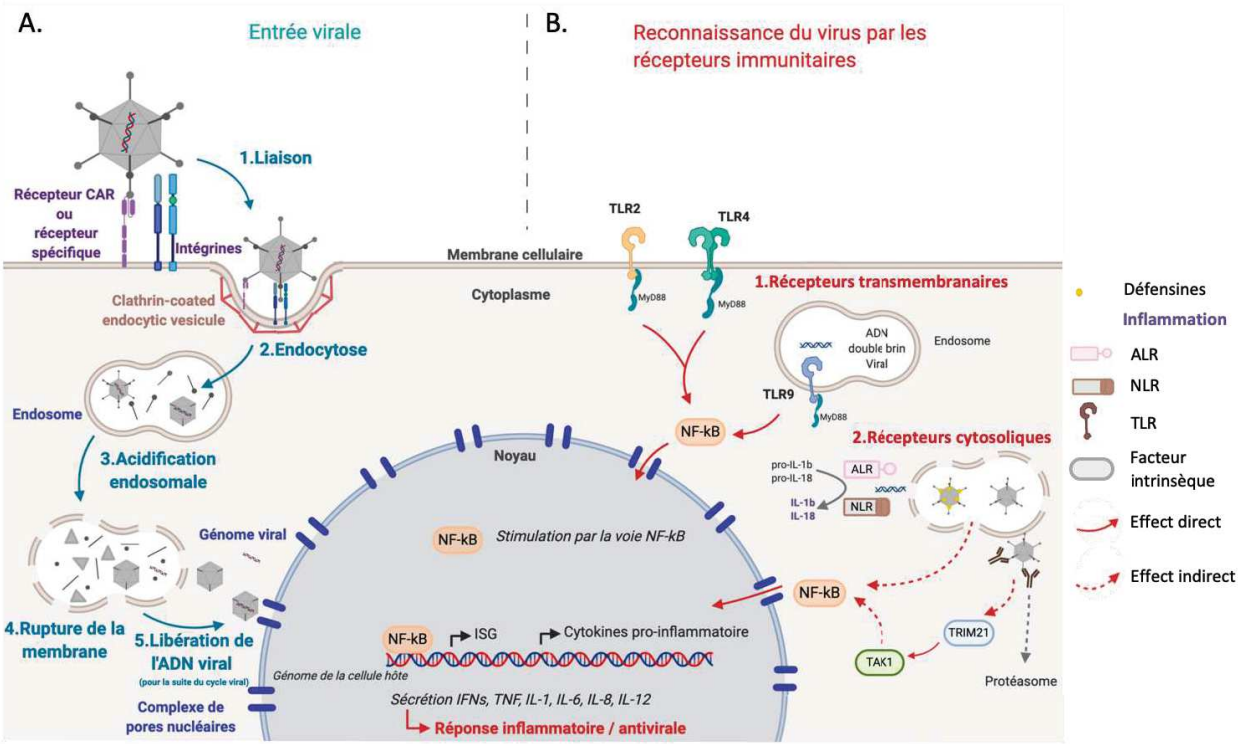
Lors d'une infection virale, la première grande étape correspond l'adsorption de la particule virale à la cellule cible[492]. Dans un premier temps, le domaine knob de la fibre va se lier à des récepteurs cellulaires, dit récepteurs primaires (exemple CAR, l'acide sialique, CD46)[30,80] reconnaissant des motifs viraux[235,247,493,494] (***étape 1. Annexe 1***). L'expression des récepteurs cellulaires étant souvent lié à certains types tissulaires, le tropisme viral est donc déterminé par cette première interaction[228,493]. Or, cette étape permet seulement l'attachement et non l'internalisation virale. Pour se faire, certains adénovirus ont besoin d'une interaction supplémentaire qui se produit entre les protéines de penton et un récepteur secondaire ou corécepteur comme les intégrines[30,236,250] notamment les intégrines α_V[81,246,247]. En effet, cette liaison via entrainer une cascade de signalisation favorisant l'internalisation du virus via des endosomes précoces par une endocytose par vésicules mantelées de clathrines[81,236,495,496] (***étape 2. Annexe 1***). Les différentes associations récepteur-corécepteur participent très largement au tropisme viral[30,190,234]. L'internalisation de la particule virale est suivie par une acidification de l'endosome[496] (***étape 3. Annexe 1***) aboutissant à la rupture de la membrane endosomale[493,497,494] (***étape 4. Annexe 1***). Ce signal marque le début de la phase de déshabillage progressive du virus[499]. Après la lyse de l'endosome, la capside virale partiellement perturbée, est transportée jusqu'aux pores nucléaires via les microtubules dans le but d'y engager le génome viral[500] (***étape 5. Annexe 1***). Les virus s'accumulent alors au niveau des pores nucléaires[501,502] où le processus de décapsidation, c'est-à-dire à la libération du génome virale dans le noyau de la cellule hôte[236,503] s'effectue dans le but de poursuivre le cycle viral dans le noyau cellulaire.

A chaque étape de l'entrée virale le système immunitaire peut reconnaître les particules virales par l'intermédiaire de différents types de récepteurs appelés PRR *(pathogen recognition receptor)* dont la famille des Toll-like receptor[19,96], AIM2-like receptor ou encore les NOD-like receptor[19]. Les adénovirus peuvent être reconnu lors de l'entrée virale au niveau de la membrane plasmique avec des récepteurs transmembranaires comme les TLR2, TLR4, TLR9, et au niveau du cytoplasme avec des récepteurs cytosoliques comme les complexes AIM2 ou NALP3[19,248]. Cette liaison récepteur-virus ou motifs viraux permet de stimuler l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la réponse antivirale, en particulier les gènes stimulés par les interférons *(ISG pour Interferon-Stimulated Genes)* via le facteur NF-kB[19]. L'ADN viral

reconnu par les récepteurs cytosoliques permet la maturation et la sécrétion d'IL-1β et IL-18 actives impliqués dans la réponse inflammatoire[504].

Au sein de l'immunité innée un autre type moléculaire est impliqué dans la défense de l'hôte lors d'une infection virale, ce sont les peptides antimicrobiens dont les défensines[14,505]. Les défensines peuvent agir à différentes étapes au cours de l'infection entre autres par agrégation sur la particule virale masquant les sites de liaison avec les récepteurs cellulaires ou encore en bloquant le déshabillage des particules virales au sein des endosomes[19,505]. Comme pour les défensines, la présence d'anticorps spécifiques à l'adénovirus peut impacter la voie de détection des particules virales[369] mais aussi la mise en place de la réponse antivirale[13,506], notamment par l'expression des ISGs[19].

Pour résumer, lors d'une réponse antivirale mise en place à la suite d'une infection par adénovirus, les acteurs impliqués peuvent être peptidiques (les peptides antimicrobiens) ou cellulaires comme les cellules épithéliales, les macrophages ou encore les cellules dendritiques[14]. La réponse antivirale se traduit également par la sécrétion de plusieurs cytokines à action antivirale et pro-inflammatoire comme: les IFNs, le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et IL-12[14].



Annexe 1: Réponse immunitaire innée induite par une infection par les HAdVs

A. Détails des étapes clés lors de l'entrée virale: 1.Liaison de la particule virale aux récepteurs cellulaires/ 2.Endocytose de la particule virale par une vésicule mantelées d'un manteau de clathrines/ 3.Acidification de l'endosome/ 4.Destruction de la membrane endosomale/ 5.Libération de l'ADN viral dans le noyau cellulaire pour poursuivre le cycle viral (non abordé dans cette figure)**.**
B. Voies de détection du virus par le système immunitaire: 1.Détection des motifs viraux via les récepteurs transmembranaires à la membrane cellulaire ou endosomale (TLRs: Toll-like receptors)/ 2. Détection des motifs viraux via les récepteurs cytosoliques (ALRs: AIM2-like receptors; NLRs: NOD-like receptors).
ISG: Interferon-stimulated genes

2) Revue 1: A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence

EXPERT REVIEW OF VACCINES
2019, VOL. 18, NO. 6, 597–613
https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1588113

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Check for updates

A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence

Franck J. D. Mennechet[a], Océane Paris[a], Aline Raissa Ouoba[a,b,c], Sofia Salazar Arenas[a], Sodiomon B. Sirima[d,e], Guy R. Takoudjou Dzomo[f], Amidou Diarra[d], Isidore T Traore[c], Dramane Kania[c], Karsten Eichholz[a], Eric A. Weaver[g], Edouard Tuaillon[b] and Eric J. Kremer[a]

[a]Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier - CNRS, Montpellier, France; [b]UMR 1058, Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM - University of Montpellier - Etablishment Français du Sang - Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France; [c]Département des sciences et de la recherche clinique, Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; [d]Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso; [e]Groupe de Recherche Action en Santé (GRAS), Ouagadougou, Burkina Faso; [f]Complexe Hospitalo Universitaire « Le Bon Samaritain », N'Djamena, Republic of Chad; [g]University of Nebraska-Lincoln, School of Biological Sciences, Lincoln, NE, USA

ABSTRACT

Introduction: Human adenovirus (HAdV)-derived vectors have been used in numerous pre-clinical and clinical trials during the last 40 years. Current research in HAdV-based vaccines focuses on improving transgene immunogenicity and safety. Because pre-existing humoral immunity against HAdV types correlate with reduced vaccine efficacy and safety, many groups are exploring the development of HAdV types vectors with lower seroprevalence. However, global seroepidemiological data are incomplete.

Areas covered: The goal of this review is to centralize 65 years of research on (primarily) HAdV epidemiology. After briefly addressing adenovirus biology, we chronical HAdV seroprevalence studies and highlight major milestones. Finally, we analyze data from about 50 studies with respect to HAdVs types that are currently used in the clinic, or are in the developmental pipeline.

Expert opinion: Vaccination is among the most efficient tools to prevent infectious disease. HAdV-based vaccines have undeniable potential, but optimization is needed and antivector immunity remains a challenge if the same vectors are to be administrated to different populations. Here, we identify gaps in our knowledge and the need for updated worldwide epidemiological data.

ARTICLE HISTORY
Received 21 November 2018
Accepted 25 February 2019

KEYWORDS
Adenovirus; vaccination; gene therapy; immunology; seroepidemiology

1. Introduction

An increasing interest in human adenoviruses (HAdVs) arises from two major factors: persistent HAdV infections are being increasingly linked to morbidity in immunocompromised adults and children undergoing hematopoietic stem cell transplantation [1]; and HAdV vectors are efficient gene transfer tools and are used for clinical gene transfer (http://www.abedia.com/wiley/vectors.php).

HAdVs were used in clinical trials long before their development as gene transfer vectors in the late 1980s [2,3]. Identified as an oncolytic agent, the 'adenoidal-pharyngeal-conjunctival virus' (now known as adenovirus) was trialed for the treatment of cervical cancer during the late 1950s [2,3]. In addition to their continued use as anti-cancer therapeutics, HAdV-based vectors are used as vaccines. Beyond development of vaccines against tumor antigens, HAdV-based vaccines are currently being tested for various infectious agents such as tuberculosis, HIV, and Ebola virus. The need for vaccination is particularly strong in some developing countries where infectious diseases account for 50% of all deaths. Of note though, geographical distributions of endemic or emerging pathogens are not limited by geopolitical borders and are increasingly associated with climate change, temporal variation, immigration, and animal habitat. Due to improvements along the way, replication-defective HAdV (and nonhuman AdV) vectors have become attractive because they are biochemically stable, readily produced in high titers (>10^{13} physical particle/ml), can induce $CD8^+$ T-cell and B-cell responses, infect multiple nondividing and dividing cell types, and they can carry relatively large expression cassettes (up to 38,000 bp). Moreover, antigen expression can be relatively stable over time and the vector genome poorly integrates into the host genome [4,5].

However, the clinical use of HAdV vectors is not risk free: it could lead to possible recombination with wild type virus, mobilization (i.e. a vector infected cell that becomes infected with a replication competent HAdV, which leads to the amplification and dispersion of the replication-defective vector), hepatic lesions, thrombocytopenia, neutropenia, systemic inflammation, and fever [6]. In addition, pre-existing B and T cell immunity to some HAdV types also creates challenges for their widespread utility [7]. Currently, HAdV species C type 5 is the best characterized vector system, but also has the disadvantage of being one of the most common HAdVs worldwide and therefore pre-existing immunity is nearly ubiquitous. A possible solution to this problem is to use vectors derived

CONTACT Franck J. D. Mennechet franck.mennechet@umontpellier.fr Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier - CNRS, Montpellier, France

Supplemental data for the article can be accessed here.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Article highlights

- A human adenovirus (HAdV) were isolated in 1953 by Rowe and colleagues from adenoid tissue.
- HAdVs are nonenveloped particles containing a double-stranded linear DNA genome and belong to the family Adenoviridae and the genus Mastadenovirus, grouped into species A–G and classified in 'types' based on serology and sequence.
- HAdVs cause mild, self-limiting infections in immunocompetent people with an array of clinical manifestations, targeting the lower respiratory, digestive and ocular tracts (depending of the type), predominantly children, and people in close contact situation.
- -HAdV-derived vectors have been explored during the last 40 years and, despite challenges along the way, have become powerful tools for *in vivo* gene transfer.
- HAdV have been used in numerous vaccine trials, including a multitude of tumor-associated antigens and infectious agents.
- The use HAdV vectors is not risk free because pre-existing immunity creates challenges for their widespread utility as vaccines.
- HAdV-C5 is the best characterized vector system, which is also the most common type that infects humans worldwide.
- Clinical use of HAdV-C5 vectors exposed some limitations, drawbacks, and side effect are associated with pre-existing humoral and cellular immunity.
- In 1999, a death in a gene therapy trial remind us the critical need for fundamental research concerning HAdV use.
- In 2008, the HVTN502 vaccine STEP trails was prematurely interrupted due to lack of efficacy and increased risk of HIV acquisition in HAdV-C5 seropositive patients.
- To circumvent pre-existing immunity, vectors derived from 'rare' human or from animal AdVs were progressively developed. However, selective seroprevalence data have been incomplete and misleading.
- By 2018, hundreds of vaccines (and cancer) trials have used, or are using, HAdV-based vectors.
- Many studies and clinical trials are based on results that were generated more than 40 years ago.
- Seroepidemiological data were mostly performed for North America, Western Europe, China and Japan. HAdV seroepidemiology data from South America, Australasia and for most countries from Africa are limited and incomplete
- HAdV-D26 seroprevalence appears relatively high in Africa and Asia and low in North America and Europe and HAdV-B35 seroprevalence is reasonably low worldwide, according to the few studies performed.
- NAbs against some NHP AdVs can be detected in humans. Cross-reactivity is likely the reason.
- Technical procedures performed for seroepidemiologocal investigations contain noteworthy variation between studies, which make sometimes comparisons difficult.
- We encourage worldwide seroepidemiological studies, development of fundamental research on basic vector biology and interactions between HAdV and preexisting host immunity, systematic HIV surveillance in the trial endpoints, standardization of technical procedure for seroepidemiology investigations and improvement of a North-South collaborations.
- Determining HAdV seroprevalence will be challenging mostly due to increasing international travel and immigrations, and because of difficult social, medical, political, and military situations in specific areas.

from adenovirus isolated from animals, or HAdV types that are rarely found in humans.

In this review, we gather and discuss 65 years of HAdV seroprevalence data. We highlight gaps in our knowledge and the need for updated worldwide epidemiological data. In as much, we include unpublished data from HAdV seroprevalence in the Republic of Chad and Burkina Faso. We list the strengths and drawbacks of the techniques that were used for neutralizing Abs (NAbs) titration. We also discuss the impact of the geographical distribution of HAdVs seroprevalence with respect to the development of HAdV-derived vaccines. Finally, we address the possibility that HAdV-derived vaccines could be, in some areas, a long-term risk.

2. Background

2.1. Structure and physiopathology

HAdVs are nonenveloped particles containing a double-stranded linear DNA genome. Structurally, HAdVs are composed of two major elements, the external capsid and the internal core, in which viral genome is enclosed [8]. To date, all AdVs have the same overall capsid architecture, an icosahedral nucleocapsid that consists primarily of three polypeptides, hexon, penton base, and fiber [9] surrounding the viral genome of approximately 34,000–36,000 base pairs. The genome is divided into early (E) and late (L) genes, expressed, respectively, before and after replication of the viral genome. A HAdV was first described in 1953 by Rowe and colleagues while trying to develop adenoid tissue derived cell cultures [10].

HAdVs are ubiquitous pathogens that generally cause mild, self-limiting infections with an array of clinical manifestations [11]. Depending to the type, HAdVs display various tropisms that correlate with clinical manifestations. HAdVs typically infect the respiratory, digestive and ocular tracts. Less frequently, HAdVs can be associated with hepatitis, cystitis, colitis, or meningoencephalitis. Approximately 5% of childhood respiratory tract infections are due to HAdVs. Transmission generally occurs when children are in childcare centers, schools, summer camps, and before 5 years old [12]. Most children have serological evidence of HAdV infection by 10 years of age and, in turn, have robust adaptive immunity. Recent studies identified HAdVs among 6 to 20% of hospitalized children presenting with lower respiratory tract infections [13,14], and from 10 to 23% of children admitted for acute gastroenteritis [15–17].

Severe or lethal HAdV infection occurs typically in persons with immunodeficiency such as transplant recipients or those living with HIV. Children aged from 6 months to 2 years who are in childcare and elderly individuals are more susceptible to severe complications related to HAdV infections. Of note, outbreaks of HAdVs have been reported globally in close communities, especially in young military recruits [18]. Peaks occur in winter and spring, but remain common throughout the year. Transmission involves the airborne route by aerosolized droplets reaching the upper airways and conjunctiva, by fecal-oral spread, close personal contact, or by touching environmental contaminated surfaces. Occasionally, contamination occurs during and solid organ transplantation [19]. The average incubation period is about 5–12 days, but the contagious period can last for weeks to months. Vaccines against HAdVs are currently not available to the general population, but after several years of hiatus, are reuse within the military in the United States [20–22].

The predominant HAdV types can change over time within a region [23] and transmission of new strains across continents appears to be frequent [24–26]. Considering the dynamics of seroprevalence, the global dispersion of HAdVs is particularly important.

2.2. Classification

HAdVs belong to the family Adenoviridae and the genus *Mastadenovirus*. The nomenclature of HAdV 'species' was introduced in 1960 by L. Rosen [27]. Now HAdVs are grouped into species A–G (Figure 1 and Box 1). Individual HAdV "type" nomenclature is currently in flux and has not reached a global consensus within the scientific community. HAdV types were historically defined by antigenic determinants detected by viral neutralization assays, hemagglutination properties, morphological, and pathogenicity criteria [28]. It is accepted that there are about 70 types [29]. Since HAdV-52 [30] new types have been primarily identified based on genomic sequencing analysis [31]. Consequently, 40 genotypes have been proposed (http://hadvwg.gmu.edu/). Sequence of three regions (penton, hexon, and fiber) or of the entire genome have been recommended to provide alternative identification [32–34] (Figures 1 and 2(b)). Currently, no globally accepted nomenclature has been recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses. To be as informative as possible in this review, we are using the format 'human adenovirus dash species, type' (e.g. HAdV-C5) whenever appropriate.

3. The unveiling of HAdVs

In 1953, Rowe and colleagues isolated a transmissible agent from adenoid tissues undergoing a cytopathic effect. The following years focused principally on understanding its natural history (Figure 2(a) highlights some key events). Initially, studies mostly focused on a group of viruses that shared specific viral characteristic and classified as "newly recognized group of common viruses of the respiratory system. In 1956, the name 'adenovirus' was proposed for this new respiratory tract virus [35–38]. Initially, diagnosis was serological and based on complement-fixing antibodies to the HAdV group antigen. Between 1954 and 1956, many outbreaks and sporadic cases of febrile illness of unknown etiology mostly with respiratory or nervous symptoms were registered. In almost all those in which evidence of HAdVs infection was found, respiratory tract symptoms were predominant and touched predominantly young children. In parallel, HAdVs were incriminated as new type of adeno-pharyngeal-conjunctival (APC) virus, responsible for epidemic keratoconjunctivitis [39]. These studies indicated that in children, HAdV-C1, C2, and to a lesser extent C5, were primarily responsible for childhood respiratory infections.

HAdV-B3 was responsible for epidemics in adult civilian populations and children from 4 to 15 years old. HAdV-C6, D8, and D10 were implicated in epidemic conjunctivitis [40,41]. Interestingly, HAdV-E4 and B7 were predominant etiologic agents responsible for acute respiratory disease (ARD) in US military recruits [36]. In addition, HAdV-B14 was the causative agent of an epidemic of ARD in army recruits in the Netherlands [42]. These observations accentuated the degree of HAdV tissue selectivity, raising the conundrum of how a pathogen with similar biological and physical characteristics could cause such diverse clinical pathology. The critical need for anti-HAdV vaccines was naturally raised. By 1957, 14 HAdV types were identified, principally by neutralization test in HeLa cultures using type-specific rabbit sera.

3.1. 1950s and 1960s: HAdVs etiology and pathogenicity

During the late 1950s and early 1960s, studies on HAdV infections and HAdV seroprevalence spread from Europe [43] and North America [44] to Japan, Taiwan, Singapore, China [45], and Russia [46]. Studies in indigenous population of the Eastern Arctic region suggested seroprevalence of 35%, for which 80% had high NAb titers [47]. These studies suggested that HAdV

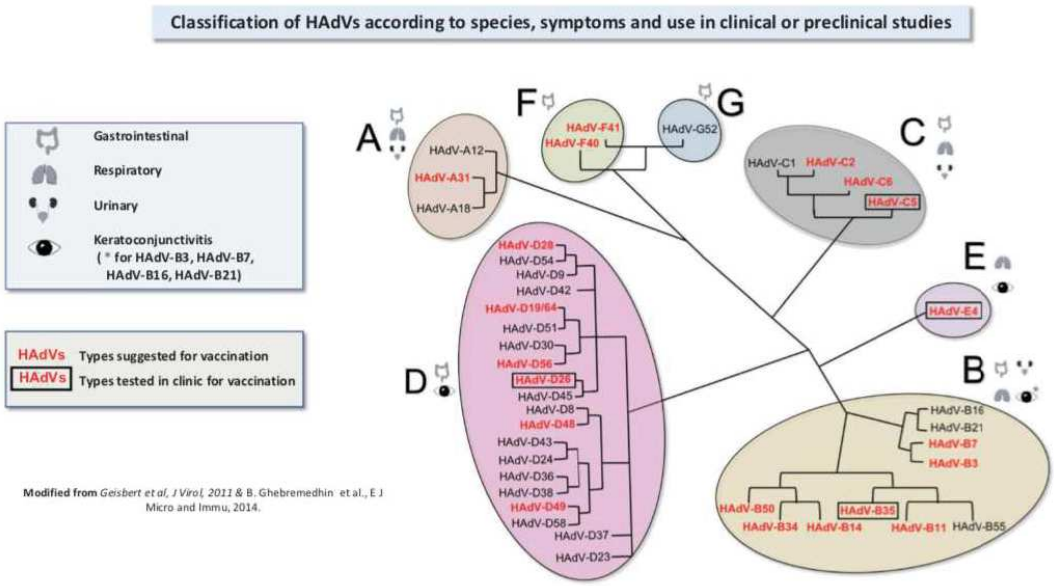


Figure 1. **Adenovirus classification** by species (A-G) and clinical symptoms. Types marked in red are vaccine vector candidates. Framed types have been tested in clinic.

Species A (including types 12, 18, 31)
Members of species A, such as HAdV-A12, have the ability to induce tumors in newborn rodents [54]. To our knowledge, HAdV-A31 is the only A proposed for vaccination strategy, principally because of its ability to escape the host's immune surveillance. Moreover, limited evolution of clinical isolates of HAdV-A31 indicated low probabilities for the emergence of new subtypes in the recent years [173].

Species B (including types 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55)
The species B HAdVs (which, as mentioned above are from gorillas) are subdivided into subspecies B1 (types B3, B7, B16, B21 and B50) and B2 (types B11, B14, B34, B35 and B55) based on DNA homology. Most subgroup B1 members cause respiratory infections, while subgroup B2 are mainly associated kidneys and the urinary tract infections [174]. In addition to low seroprevalence, members of the species B use the CD46 or desmoglein (for types B3, B7, B11 and B14) as a primary receptors. Among the species B, type 35 was intensively characterized and launch for pre/clinical trials against HIV, Ebola, malaria, tuberculosis or the respiratory syncytial virus [175,176]. Historically, HAdV-B7 vector was the first species B to be developed [177,59], later type B11 [178], B3 [164], B14 [165], B50 [95] and B34 [166,167] were proposed as alternative candidate for vaccine platforms (Figure 1).

Species C (including types 1, 2, 5, 6, 57)
The five species C (C1, C2, C5, C6 and C57) are the most common types reported in most populations. Members of this species cause a significant proportion of acute respiratory tract infections in children [179,180]. Despite widespread pre-existing immunity, HAdV-C5 vectors are currently being used as vaccine platforms in many countries, principally against HIV [181,182], malaria [183,184,185], Ebola virus [186,187,188,189,190], influenza virus [191], tuberculosis [192,193], or in pre-clinical studies that are targeting Zika virus [194,195], Clostridium botulinum [196], type O foot-and-mouth disease virus [197], Middle East respiratory syndrome coronavirus [198,199], rabies virus [200,201], or Dengue virus [202]. In mice and NHPs, HAdV-C2 delivered antigens protected against Ebola virus [203]. Because the other species C types likely have biological characteristic similar to C5, C6 is being proposed as candidate for vaccination and because of its lower seroprevalence [204,205,206].

Species D (including, but not limited to types 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56)
This is the largest of the seven species with 44 out of the 70 recognized types. Except for a few types that cause epidemic keratoconjunctivitis (Figure 1), most of the types from the species D are associated with moderate or asymptomatic diseases. The majority of HAdVs from this group have been isolated or detected in HIV-positive patients, suggesting an opportunistic pathogenicity profile [29,207]. However, knowledge about their pathogenicity is still limited and very few of these HAdVs have been exploited as candidates for vaccination. CD46 seems to be used as primary receptor and integrins and/or CAR as alternative primary receptors. However, some members of this species also use sialic acid-modified surface moieties [208,209]. HAdV-D26 is frequently being advertised as a lower seroprevalent platform and consequently is the best characterized from this group. Additionally, D26 is the only member from the species D being evaluated in large-scale human vaccination trials against HIV and Ebola virus [210,211]. Among other candidate from this group, type D24 [212], D28 [142,213], D43 [214], D48 [215,216], D49 [120,217], and most recently D56 [130] or D19 [218] (recently renamed D64 [219]) were also suggested or tested for pre-clinical vaccination studies.

Species E (type 4)
HAdV-E4 is the only member from this species and is frequently implicated in outbreaks of ARD in military training camps [220]. Phylogenetically, HAdV-E4 falls with the simian AdVs, and therefore likely jumped the species barrier several decades ago. Vectors derived from type E4 were designed to optimize systemic and mucosal antibody responses and were clinically tested as Ag delivery system against influenza virus (including the bird flu H5N1 strain) [221,222,223], but also more recently against HIV (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03408262). HAdV-E4 has been tested as vaccine vector candidate for other infectious diseases such as Hepatitis B [170] and respiratory syncytial virus [171], supporting future exploration of HAdV-E4 as vaccine vectors against alternative pathogens [59].

Species F (types 40, 41)
HAdV-F40 and F41 are associated with gastrointestinal disease exclusively [224]. HAdVs from the F groups have thus the potential to be excellent candidates for oral vaccination or gene therapy targeting gastrointestinal or mucosal tract [168,169,225]. These types were thus proposed as oral delivery vector candidate for vaccination against HIV [172] middle East respiratory syndrome coronavirus [199] or for the induction of allergen-specific intestinal mucosal tolerance [225]. In addition, levels of NAb to this groups seems relatively low in children and elderly.

Species G (type 52)
HAdV-G52 - Polysialic acid is the cellular receptor for type G52 [226].

infections were likely pandemic. At that period, seroprevalence against HAdV-C1, C2, and C5 was more frequent than HAdV-B3, C6, and B7. HAdV-E4 and B7 seroprevalence was generally low or nonexistent [48]. However, some notable exceptions where found: in the Tokyo area HAdV-E4 seroprevalence was very low, while 73% in Okayama were seropositive. Similarly, among adult women in Washington, D.C., 71% had ant-HAdV-4 seroprevalence antibody while for the other studies in the United States, the range in adults was between 12 and 29% [43,45]. In retrospect, the seroprevalence of HAdV-E4 in Washington, D.C. (and possibly Okayama) is not surprising, given that the city has high US military personnel. These pioneering investigations highlighted variability of HAdV seroprevalence around the world and also underlined the first observations of the temporal variation of HAdV type infections among a given population. In the early 1960s studies were also performed to understand HAdV-D26, which was not associated with specific illness. The study, using intentional infection of male inmates of an American correctional institution, revealed that HAdV-D26 caused an acute conjunctivitis and an asymptomatic enteric infection that could persist for weeks. Moreover, >50% of the 'volunteers' from correctional institutions from seven different American states had NAbs against HAdV-D26 [49]. By 1961, 19 different types of HAdVs had been identified, based on serology.

During the late 1960s, HAdV seroprevalence was surveyed in many parts of the world [50] including populations such as military camps or children and adults in small closed communities [51,52]. Most of these studies did not identify the HAdV type, and the studies that did, focused on HAdV-C1 to B7 (the low number types). Yet, the frequency with which HAdV infection occurred was unclear because these studies mostly concerned small numbers of hospitalized patients or local outbreaks. In 1969, Brandt and colleagues investigated 18,000 infants in a study lasting 10 years. The study concluded that HAdVs infections were predominantly in children with low socioeconomic status, and that many infections may be asymptomatic. HAdV-C2 (34%), HAdV-C1 (26%), HAdV-C5 (11%), and HAdV-B3 (10%) were isolated from approximately 10% of the children. Of note, this study provided critical information about the incidence of HAdV infection (vs. seroprevalence) according to the type, and was the first long-term investigation on a large,

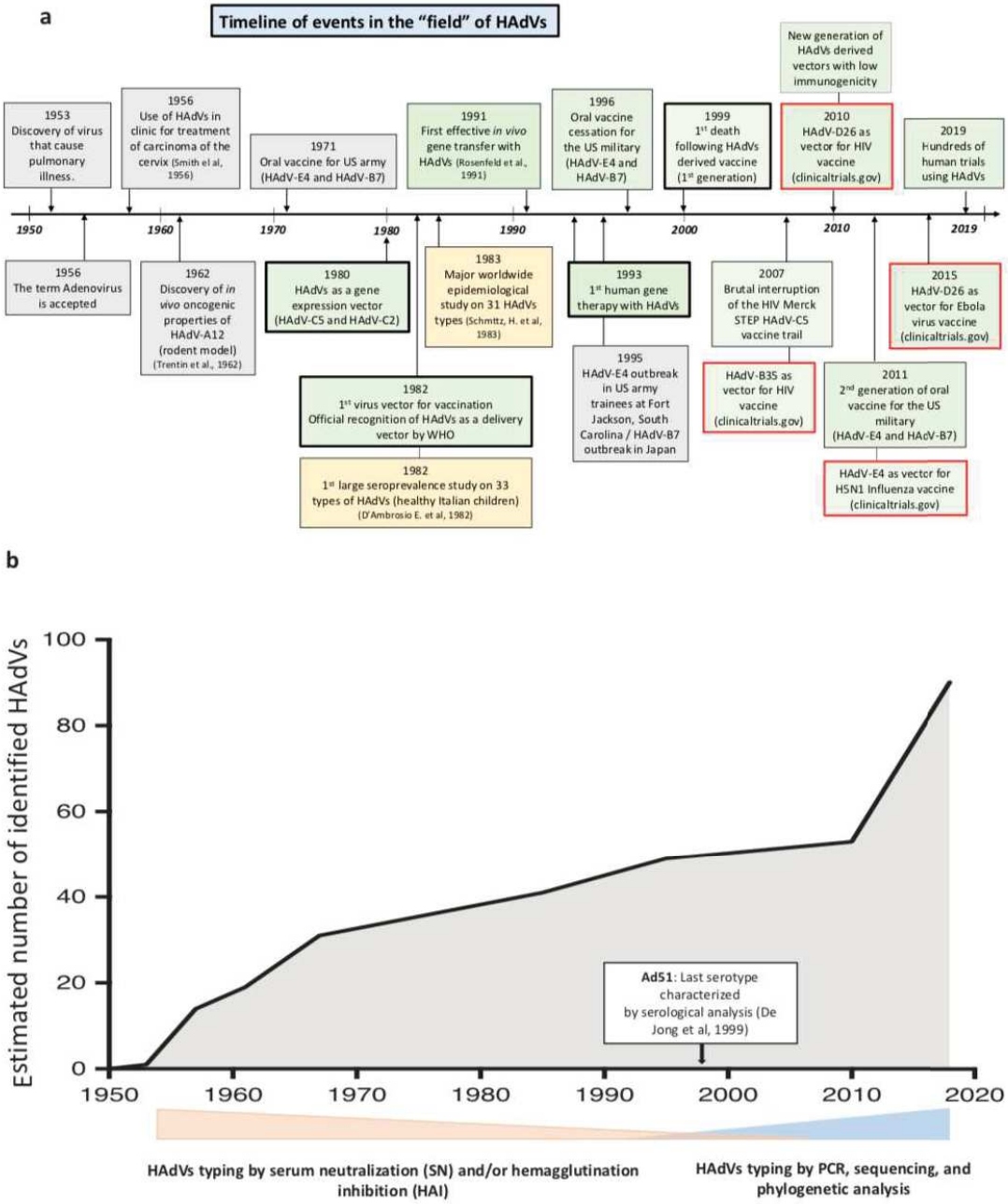


Figure 2. **(a) Key events in the adenovirus "field"**. The gray boxes indicate major findings on the etiology and pathogenicity. Green boxes indicate notable events involving adenovirus-derived vectors. The yellow boxes indicate the major epidemiological studies. The bold borders indicate important events or discoveries. The red bold borders indicate the initiation of some clinical trials involving vectors derived from "alternative or rare" adenovirus types. **(b) Chronology of adenovirus type reporting**. Adenovirus types were historically defined according to their antigenic determinants and ability to agglutinate red blood cells. Since HAdV type 52, identification has been primarily based on genomic sequencing analysis (https://hadvwg.gmu.edu/). However, no globally accepted nomenclature has been currently recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses. To date, there are ~70 recognized types and ~40 additional types based exclusively on sequence data.

random cohort [53]. By 1967, 31 HAdV types had been identified. During this period, Trentin et al. reported in 1962 that injection of HAdV-A12 of into newborn Syrian hamsters led to the induction of sarcomas at the site of administration [54] HAdVs subsequently became a model of choice for molecular biologists to study DNA replication, RNA transcription and splicing, and the molecular basis of cell transformation.

In the late 1960s, the US army initiated a program for ARD surveillance. Initially started during World War II [55], the first epidemiological studies of respiratory illnesses in soldiers at

Fort Bragg, North Carolina and Fort Dix, New Jersey, found that ARD syndrome caused large outbreaks, with a high-risk period during the initial 5 weeks of training [56,57]. Previous epidemiological surveys showed a direct correlation of HAdV-E4 and B7-related ARD rates with crowding. Infection rates approached 70% and were primarily limited to the military population. Approximately 20% of the infected individuals required hospitalization [58]. During the 1970s, HAdVs infections were largely studied in the military recruits, principally because of the unusual pathogenicity and selectivity of HAdV-E4 and B7. Consequently, in 1971 the US began routine administration of a lyophilized HAdV-E4 and B7 oral vaccine [59], which significantly reduced respiratory morbidity at training centers. The benefits of immunization were significant in term of both, ARD hospitalizations and cost-benefit [60].

3.2. The 1970s and 1980s: breaking down HAdVs biology and global epidemiology

The 1970s was the period where persistence of HAdV infection was reported, principally within adenoid vegetation of asymptomatic hosts. Persistant HAdVs were thought to promote high NAb levels that did not, counterintuitively, clear HAdVs from the host. HAdV persistence may be one of the causes responsible for its pandemic nature [61]. The late 1970s was also marked by a better understanding of the HAdV structure, cell cycle, and mechanism of DNA replication [62]. Historically, the 1980s was a crucial period for the development of molecular biology. Control of HAdV gene expression was better characterized as well as the structure of the virus components. In addition, HAdV-C2 and C5 were developed into gene transfer vectors [63].

During the 1980s the seroprevalence of other HAdV types was explored. Epidemiological data suggested that some HAdV types are common in all age groups and populations, while other types infected later in life. Furthermore, about half of the HAdV infections were asymptomatic, meaning that physicians were not detecting infections of nonpathogenic HAdVs. Thus, epidemiological studies on HAdVs generally focused on types 1 through 8, and type B21, which were those most frequently associated with the symptomatic disease.

One of the largest (n = 338 individuals) studies on HAdV seroprevalence was performed on Italian children using microneutralization tests. This study showed that ~75% of the children were positive for at least one HAdV type among the 33 tested. The highest seroprevalence was for HAdV-C2 (41,5%) and HAdV-C5 (33%), followed in decreasing order by HAdV-C1, B3, C6, D31, and D18. NAbs against other serotypes were present in less than 10% of the children or never found, including HAdV-D9, D20, D26, and D32 [64]. This study was consistent with the seroprevalence described in the United States, with a higher frequency found for types 1 through 7, but also highlighted the presence of less common and less virulent types. Moreover, this study challenged early conclusions concerning the common global distribution of HAdVs [65] and highlighted the substantial differences. In 1983, Schmitz and colleagues addressed the epidemiology of 31 HAdV types, based on approximately 25,000 reports to the WHO from 1967 to 1976. They found an absolute frequency of HAdV-C2, C1, B7, B3, C5, C6, E4, and D8 in decreasing order (with a large gap between HAdV-C5 and C6). The southern hemisphere showed a higher incidence of HAdV-E4 and species B (without HAdV-B3 and B7), and a lower incidence of HAdV-C6, whereas HAdV-D8, D13, D19, and species A were rarely found. For species B, many differences were found between countries and ages, principally concerning HAdV-B3 and B7 [66].

Initially found by electron microscopy in stools from children with diarrhea, HAdV-F40 and F41 were linked to enteric infections [67,68]. HAdV-F40 and F41 genomes were notably different from the 39 previously described types and were resistant to numerous attempts of *in vitro* culture [69]. HAdV-F40 and F41 could not be distinguished from each other by classical hemagglutination-inhibition tests, indicating a close antigenic relationship. Of note, HAdV-F40 and F41 have the shortest of all HAdV hexon hypervariable regions, which may play a role in their stability at low pH. The early 1980s was also marked by the development of restriction enzyme analysis of HAdV genomes, which became a valuable epidemiological tool in studying the geographic and temporal occurrence of different HAdV types. Analysis by DNA restriction profile allowed differentiation between HAdV-F40 and F41. Later, monoclonal antibodies were used to differentiate them by neutralization assay [70]. According to the first epidemiological studies using neutralization assays, HAdV-F40 and F41 were likely pandemic. Sera from healthy children from Hong Kong, New Zealand, Gambia, Kuwait, and the United Kingdom were 40%–50% seropositive. Surprisingly, the 16 samples from Guatemala were negative [71,72]. A study performed among children in Thailand demonstrate a relatively low prevalence for HAdV-F40 and F41 (2%), suggesting that among the spectrum of diarrheal etiologies, they may be proportionately less prevalent in a tropical climate than they are in countries with temperate climates [73].

The 1980s were a critical period for epidemiologic studies on HAdV-B7. Previous data from the United States and Europe suggested that HAdV-B7 was frequently associated with severe illness that caused fatal lower respiratory disease and outbreaks in schools, hospitals, and military facilities [74,75]. The highest seroprevalence against HAdV-B7 was detected in Taiwan during the 1960s, where about 30% of children were positive. However, in that study, HAdV-B7 was the only type for which adults (vs. children) were more likely to have NAbs [45]. In comparison to Japan and the US, HAdV-B7 infections were also more frequent and occurred at an earlier age in Taiwan. In contrast to Australia, Brazil, China, Sweden, the United States, the United Kingdom, Germany, and Belgium, HAdV-B7 was rarely isolated in Japan. The low frequency of HAdV-B7 isolation in Japan during the 1980s (before the outbreak in 1995) and its particularly high frequency in US and European military recruits was a unique characteristic [76]. By 1985, ~41 HAdVs types were identified.

Taken together, studies from the 1980s highlighted major advances in HAdVs seroprevalence: (i) global HAdV serology was associated with greater variability (ii) there was significant variations of temporal epidemiological patterns of HAdVs infection for a given region, and (iii) the existence of frequent asymptomatic HAdV infections making epidemiology unpredictable and therefore a need for permanent surveys.

3.3. The 1990s: a renaissance of Ad biology, vaccination, and gene therapy

During the late 1980s and early 1990s, HAdV seroepidemiological studies took place during difficult sanitary and health context in developing nations, where the need for the prevention of childhood pneumonia or diarrhea was imperative. In 1990, the WHO estimated that 14.6 million children <5 years old died each year in developing countries. Of note, studies from that time indicated that HAdVs were not of significant health risks (with the exception of HAdV-E4 and HAdV-B7 in military training centers).

3.4. HAdVs and immunodeficiency

The 1990s was also a dynamic period for the HAdVs scientific community because of the impact of HAdV-related diseases linked to HIV infection. By the end of 1990, between 8 and 10 million peoples were thought to be living with HIV [77], with HAdV infections more virulent and frequently in HIV-positive individuals [78]. Along with rotavirus, HAdVs were frequently incriminated in HIV-positive individuals with diarrhea [79], encephalitis [80], hepatitis [81], pneumonitis [82], and gastrointestinal infections [83]. In addition, HAdV infections were reported in pharmacologically-induced immunocompromised individuals undergoing cell or organ transplantation [84]. In 1995, ~ 49 HAdVs types were identified.

3.5. A better understanding of HAdV molecular biology: medical hopes and disappointments

During the 1990s, advances in molecular and cellular biology were used to improve our understanding of the mechanisms by which HAdVs counteract antiviral immune defenses [85]. As a result, this period saw the successful demonstrations of replication-defective HAdV vector expression of open reading frames/cDNA in animals. Quickly, HAdV vectors became a popular gene transfer tool for mammalian cells [86,87]. HAdV-C2 and C5 dominated the gene transfer field because they could be readily propagated to high titers. In 1991, the first effective *in vivo* gene transfer with HAdVs was performed [88]. In 1993, the first human gene therapy trial used a recombinant HAdV-C5 vector at the Clinical Center, NIH, on a 23-year-old cystic fibrosis patient. Other clinical studies on various disease, using HAdV-C2- or C5-based vectors followed [89–91]. 25 years on, HAdVs are still the most common vectors used in clinical trials worldwide [92].

The use of a viral vector for the delivery of antigens in vaccination was first described by in 1982 and the WHO recognized the potential value of such a delivery system [93]. Replication-defective HAdV vectors (typically deleted in the E1 region) were particularly promising because they were relatively cheap to produce, stable, and provided long-term immunity [94]. In preclinical trials HAdV-based vaccine induced strong humoral response and T-cell specific immunity [95]. Many thought that HAdV-C5-based vaccines would be extremely efficient to induce protection against human pathogens.

3.6. The limits of HAdV-C5 for clinical application

Clinical use of HAdV-C5 vectors exposed some limitation, drawbacks and side effects [96]. During preclinical testing in immunologically naïve animals, HAdV-C5 vectors induced robust responses [97]. Not surprisingly, pre-existing immunity to HAdVs, which concerned the majority of the world's population, precluded robust responses against the encoded antigens. In some populations the pre-existing immunity against HAdV-C5 was >90% by 2 years of age [98]. HAdV-specific T cells, NK cells and cytokines also contribute to the fading efficacy of HAdV-based vaccines in individuals with pre-existing immunity [99].

HAdV-based vaccination may also include other adverse effects as illustrated by STEP, an HIV Vaccine Trial Network 425 (HVTN502 STEP) [100]. HVTN is the world's largest publicly-funded international collaboration for the development of vaccines against HIV. HVTN502 STEP was an international, randomized, double blind, placebo-controlled Phase II test-of-concept clinical trial. This trial enrolled 3,000 HIV-negative volunteers from diverse populations at high risk of HIV infection, including men who have sex with men and female sex workers. HVTN502 STEP was prematurely interrupted due to lack of efficacy and also because vaccinees who had high NAb titers against HAdV-C5 had a statistically significant increased risk of HIV acquisition during the first 18 months post-vaccination [101,102]. Ten years later, the mechanisms by which these side effect occurred are still not fully understand and certainly complex. HIV acquisition occurred in uncircumcised men who have higher levels of mucosal inflammation and HIV susceptibility in general. Growing evidence suggest also that specific generation of immune complexes with HAdV-C5 and NAb can be captured by antigen-presenting cells that present conserved HAdV-C5 epitopes via the MHC II pathway and thus create an acute local proinflammatory response [103]. In individuals with high levels of HAd-C5 NAbs that inflammatory environment could lead to the proliferation of HAdV-specific CD4 T cells (IL-17^{+}), which have preferentially mucosal tropism [104] and are particularly susceptible to HIV infection (through a mechanism linked to CCR5 and $\alpha4\beta7$ expression) in comparison to other virus-specific CD4 T cells [105]. Of note, the epitopes recognized by memory T cells against HAdVs are broadly shared among human and nonhuman AdVs [106,107]. Thus, higher levels of mucosal inflammation added to recurrent stimulation and mucosal trafficking of HAd-C5 specific memory CD4 T cells during vaccination might lead to this adverse effect. These data shed light on the complex cellular events that could rise from the interactions between host pre-existing immunity and, theoretically, other HAdV derived vectors [102,108].

In addition, the late 1990s witnessed the first death of a volunteer in a gene therapy trial. An 18-year-old who had ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiency was administered 6×10^{11} viral particles/kg of an HAdV-C5 vector containing the OTC cDNA. The man died 4 days later from multiple organ failure [109]. In addition to ethical and technical issues (mostly concerning the controversial aspects of eligibility criteria for participation and explanation of the risks and benefits of the clinical experiment), these events remind us the critical need for further fundamental research concerning administration of HAdVs and their complex interactions with the host's pre-existing immunity.

3.7. Alternatives to HAdV-C5 vectors

To circumvent pre-existing immunity, vectors derived from 'rare' human or from animal AdVs were progressively developed. Canine type 2 (CADV-2 or better known as CAV-2) was the first nonhuman adenovirus vector [110]. The HAdV types were selected according to their supposedly low seroprevalence [111,112]. The NHP AdVs were selected primarily for production characteristics as all could be propagated and produced in GMP-certified human cell lines. The human and nonhuman AdVs are generally stable, and easily produced, but in some cases their biology still needs to be better characterized.

In principal, the rare HAdVs and NHP AdVs should be unaffected by pre-existing anti-HAdV humoral immunity. However, seroprevalence against chimpanzee, simian and rare HAdV types exists in human populations [113]. For example, some rare HAdV types were chosen for their low seroprevalence in North America and Europe (e.g. HAdV-D26) – only to be significantly more prevalent in some African countries. One study demonstrated that the original host of species B HAdVs are gorillas, and that HAdV-B's jumped the species barrier a handful of times starting ~100,000 years ago and have now affected human health for most of our species lifetime [114]. Even though many people are not exposed to NHP AdVs, they may have pre-existing immunity that cross-reacts against NHP-AdVs. Take for example a study using a chimpanzee AdV (ChAd-3) as an Ebola vaccine vector. Twenty volunteers from the Washington, D.C. metropolitan area were enrolled in a clinical trial. More than 40% of those volunteers had significant levels of anti-ChAd-3 antibodies and no evidence of the source of exposure was described [115]. The other conclusion from this interesting study is that species D HAdVs are the quintessential HAdVs. HAdV-E4 is another clear example of a NHP AdV that jumped the species barrier. Other studies showed that NHP types carry the potential for cross-species transmission between monkeys and humans [116]. Moreover, if selection of alternative HAdV types has been largely driven by the absence of NAbs in North Americans, very little attention has been given to cross-reactive AdV T cells [107,7]. It is clear that global AdV seroepidemiology is incomplete, especially concerning African countries that are often primary targets for vaccination campaigns.

4. HAdV-based vaccines: results from the last 20 years

This section focuses on HAdVs that have been chosen for vaccine development, mainly because of their theoretical low seroprevalence compared to HAdV-C5. Potential HAdV candidates will be first presented by species. Based on HAdV seroprevalence in the clinical setting, only half of the known HAdV types cause morbidity. Hence, HAdVs infection can be clinically silent and thus only seroepidemiology investigations can evaluate the incidence within a given population. Technically, HAdV seroprevalence is characterized as one in which exhibits limited cross-reaction with others. The definition is nevertheless difficult to apply because some cross-reactivity can occur, especially among HAdVs from the same species. This is particularly problematic concerning the recently identified species D HAdVs that have been generated by recombination [117].

4.1. Preclinical and clinical trails

By 2018, hundreds of vaccine (and cancer) trials have used, or are using, HAdV-based vectors (https://clinicaltrials.gov/ct2/home and Box 1). Today, many HAdV-based vectors are modified versions of HAdV-C5 [94,118], but its use is becoming more restricted to limited cohort of cancer patient and/or single gene transfer. In regard to vaccination strategies that may very well involve millions of random people anywhere on earth, the clinical use of HAdV-C5 may be limited.

4.2. Seroprevalence of principals HAdV vaccine candidates

Many studies from the last 20 years, that contain data from healthy individuals (if not, pathology will be outlined) in a specific area, are discussed (**Supplementary Tables 1–4**). We recently assayed sera collected in Burkina Faso and the Republic of Chad (West and Central Africa, respectively). Data are included here (organized by species and continents). A caveat due to technical conditions and thresholds at which samples are considered positive are indicated, as well as number of samples, location and year(s) of the studies (when available). Only HAdV types that are suggested or tested for preclinical or clinical studies are included in the **Supplementary Tables 1–4**, and only HAdV types that are tested in clinic are displayed in Figure 3.

4.3. Moving forward

Gathering data from about 50 studies, it is first notable that the majority has been performed using cohorts from North America, Europe, Africa, or China. Cohorts in South America, the Middle East, Asia (except China and Japan) and Oceania, are poorly represented **(Supplementary Tables 1–4** and Figure 3). In Africa, Europe, and Asia, only a handful of countries where investigated for HAdV seroprevalence. In Africa, except for a handful of exceptions, most of the data have been generated from scattered sub-Saharan populations. In Europe, studies where performed primarily in Western Europe, and in Asia, 80% of the investigations took place in China. Data gathered here outlines that members of species C, D, and B were principally investigated.

Among the species C, HAdV-C5 seroprevalence is the most widely reported, either as principal target of the studies or for comparison with other human or nonhuman AdVs. HAdV-C5 is clearly pandemic, but the proportion of seropositive people in North America is globally lower compared to Europe, Asia, and Africa (100% of seroprevalence detected in some sub-Saharan countries) [119]. HAdV-C2 global seroprevalence is relatively high (36–92%) and ≥ HAdV-C5 [120,121]. HAdV-C6 was presented as a low prevalence type by one study in the United States (8.5% adult and 2% children [122] and reach 12% in of healthy adult in China [123]), while others studies show a seroprevalence rate fluctuating between 78% in Thailand and Cameroon; 73% in South Africa and 71% in Malawi [124].

For the types belonging to species D, HAdV-D26 and to a lesser extent D48 and D28, infections are globally more frequent in Africa. HAdV-D26 NAbs were detected in 88% of the

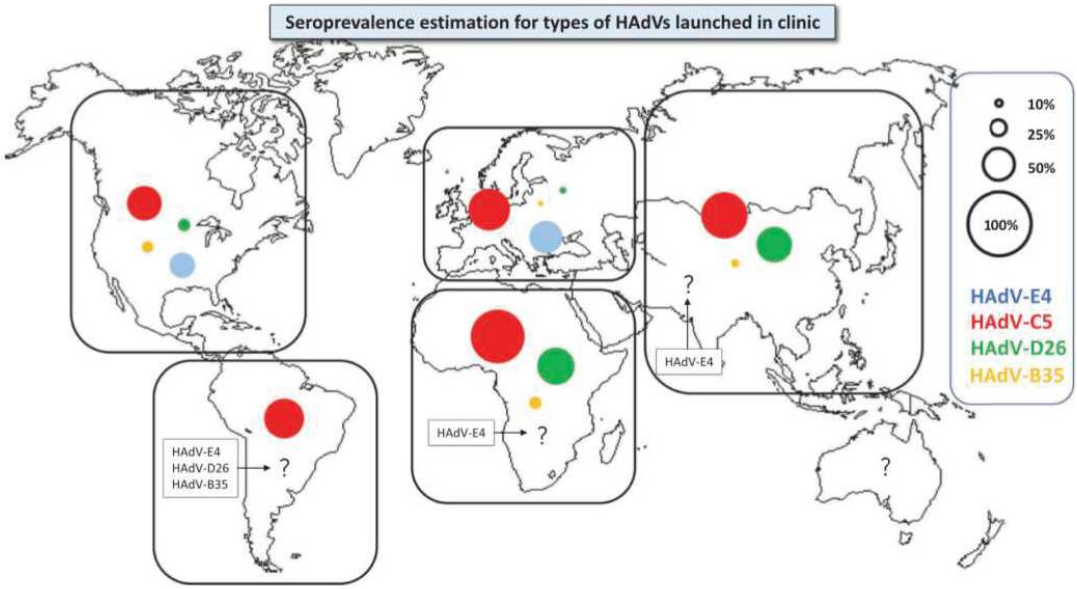


Figure 3. **Seroprevalence for adenovirus types used in clinic.** Calculated according to the results of about 30 studies from the last 20 years, this figure estimates by continent the serology of HAd-E4, C5, D26, and B35.

serum tested from Cameroun [124], and ~70% in the Republic of Chad and for some areas of Burkina Faso (unpublished data). By contrast, seroprevalence was always ≤12% in the United States and Europe among all the studies listed in this review. In China and Thailand, seroprevalence for HAdV-D26 is 35–60% [124–126]. Studies that targeted HAdV-D48 or HAdV-D28 are consistent with a lower seroprevalence compared to HAdV-D26, including for Africa.

For species B types, global seroprevalence for HAdV-B7, HAdV-B11, and HAdV-B35 are relatively low. Similarly to others species, seroprevalence appears to be slightly higher in Africa, reaching 20% for B35 [126–128], and around 30% for B11 [129] [98,127]. However, the results fluctuate between countries. In Europe and North America, the prevalence for B35 and B11 NAbs were <10%, with the exception of Haiti (22% and 30%, respectively [127]) and one study performed on United States healthy adults older than 50 years (22% for B35 [130]). In Asia, results are similar to Europe and North America, with the exception of Thailand, where B35 seroprevalence reached around 17% for a healthy group of adults associated with high HIV risks. [126].

Studies from Japan suggested a higher rate of B11 seroprevalence (18–30%) compared to Europe and North America. Moreover, HAdV-B11 seroprevalence rate in Japan was globally higher than B35 [129,131]. Of note, only limited studies were performed in Asia for these types. On the other hand, the seroprevalence for HAdV-B7 was largely explored during last 20 years in Japan. Indeed, HAdV-B7 was rarely isolated in Japan before 1995 when a nationwide outbreak suddenly occurred [132,133]. Despite the epidemic, HAdV-B7 seroprevalence remained relatively low in Japan (2–13%) [133–135] compared to China (13–85%) [123,136], the United States (27–78%) [122,137], and Belgium (38%) [131].

For species, A, E, and F, the seroprevalence for the type HAdV-E4 was evaluated in healthy adults in the United States and Europe (17–46%) [123,132]. Not surprisingly, seroprevalence in United States army recruits was notable (71%) [137]. The arguments used for HAdV-E4-based vaccines were its biological properties and respiratory tropism. HAdV-F41 showed high seroprevalence worldwide according to the handful of studies performed on US, European, and Asian samples, reaching a maximum of 95% for healthy children from south China [138]. It is also clear that reporting HAdVs seroprevalence in populations from vast and diversified countries (in terms of climates, populations and densities) such as the United States, China, or Brazil can poorly reflect the likely diversity. For example, Kahl and colleagues showed substantial HAdV-C5 seroprevalence variations within healthy adult populations across the United States, fluctuating from 35% for Northeast region to 71% for Upper Midwest region [139]. More recently, Wang et al. found significant variation between healthy adults from coastal regions vs. inland regions in China [140].

Given the overlapping epidemiology of HAdVs, it is clear that understanding host immunity remains a challenge, especially because HAdV vectors could be used for different populations [141]. Most HAdV epidemiology studies also found that seroconversion against the vast majority of HAdV types is an age-dependent process. Clearly, some types are pandemic (C5, C2, F40, and F41) independently of the sanitary condition of the country. Other types such as HAdV-B35, B11, D26, D48, D56, and D58, are globally less frequent, but their seroprevalence fluctuates considerably. In addition, and compared to Europe or North America, the average seroprevalence of these types is higher in Africa and for some regions of Asia. Of note, many of the studies listed here also investigated the proportion of sera that exhibited low, medium or high NAb titers,

indicating that these 'rare' types have generally low NAb titers. Consequently, as vectors, they might be less problematic when used as population-based vaccines. Nevertheless, at least 10% of the samples from the Republic of Chad (N'Djamena) and Burkina Faso (Ouagadougou) had anti-HAdV-D26 NAb titers above 1000 (unpublished data).

Understanding how alternative AdV vectors are affected by pre-existing humoral immunity constitutes a challenge. Yet, pre-existing immunity is not the only criterion that will influence HAdV vector efficacy. As indicated above, HAdVs species and types have different receptors, tropism, transduction, longevity, and immunogenicity profiles. For instance, mice do not have ubiquitous or homologous expression of CD46 (or desmoglein 2) and combined with the fact that these HAdVs do not replicate in mice, substantially limits preclinical studies of HAdV derived from species D and B in small animals. Thus, identification of functionally relevant immune responses is an essential element that needs to be determined to design potent vaccines. Of note, HAdV vectors based on B35 or D26 have lower immunogenicity compared to HAdV-C5 [98]. Moreover, in contrast to injection, oral administration can elicit mucosal immune responses and greatly circumvent the pre-existing antivector immunity [142]. These issues shed light on the complexities between the species and types, and strongly indicates that more research is required to identify the mechanisms that play a key role in the induction of protective immunity induced by HAdV derived vaccines.

5. Technical procedure for type-specific seroprevalence assays

Supplementary Tables 1–4 contain noteworthy variation between values from studies performed on similar populations. These variations can be due to differences in the numbers of samples, technical conditions, and thresholds at which samples are considered positive. These technical disparities can make comparisons among different studies particularly difficult. Historically, the first methods used to determine antibody titers in human sera were complement-fixation [143] and hemagglutination-inhibition tests [56]. We now know that species C HAdVs agglutinated erythrocytes from some animals and not others because of the differential expression of the CAR on their membrane [144].

Today, the use of neutralization assay using transgene expression are more sensitive, and less demanding in terms of amounts of virus, cells, and sera [145]. Transgenes cloned into the vectors for these assay are either GFP (green fluorescent protein) [146], luciferase [126], β-galactosidase [147], or secreted alkaline phosphatase (SEAP) [148]. The type of cell line used is critical, especially for studies that compared HAdV types because of the variability in infection efficacy. Cells lines used in the studies listed here are mainly the A549 (human adenocarcinomic alveolar epithelial cell), HEK 293 (human embryonic kidney cells), Hep2 (HeLa derivative/human cervix carcinoma cells), 911 (human embryonic retinoblasts cells), or PER C6 (human embryonic retinal cells) cell line, because they are permissive to infection by a large range of HAdV types. In addition to the ability of the virus to infect the cell line, the $TCID_{50}$ (the number of physical viral particles needed to infect 50% of the cells) between of HAdV types needs to be similar to be able to compare respective NAb titers. Studies presented here also displayed a different threshold for which the sera are considered positive. Most studies used serum titer >16 or dilution >1:4 to define a threshold, but substantial variations can be found ranging from 8 to 100 for sera titer and 1:2–1:32 for sera dilution. In addition, NAb titers were determined either by the dilution at which 50% (EC_{50}) or 90% (EC_{90}) of cell viability or transgene expression was observed. These variations make comparison between studies nebulous. A low threshold might lead to excessive false positive samples. In addition, distortions in the neutralization curves of samples at high serum concentrations are often observed, possibly resulting from nonspecific interactions. By contrast, a high threshold might fail on low titers samples and include them as negative, especially for HAdV types that generally displayed weak NAb titers. Standardizing the parameters will reduce the variability in sera titer values and make easier and more accurate comparison between studies.

6. Conclusion

The use of HAdVs with low seroprevalence as antigen delivery platforms was one of the main strategies to circumvent pre-existing HAdV humoral immunity. Arguments in favor of these vectors often underlined their potential abilities to overcome HAdV-C5-specific NAb [131,149], and enhance immune responses in populations with a high prevalence of HAdV-C5 immunity. But at least one question remains: in a situation where seroprevalence against rare types is high, what are the risks of using a vaccine derived from this type? The results from HIV STEP trial should not be underestimated. HAdV-C5 vector administration increased HIV acquisition in participants with high pre-existing HAd5 immunity. Will this situation also hold true for other HAdV vectors expressing different antigens? HIV acquisition will not be an endpoint that most vaccine trial organizers will include/promote. Furthermore, quantifying the human and economic costs of increased HIV infections versus reduced vaccine target is not straightforward. We therefore recommend systematic monitoring of HIV acquisition when any kind of HAdV vector is used in the clinic [102,150]. Others strategies have been established to overcome HAdVs pre-existing immunity such as the development of nonprimate-AdV vectors. Most of these vectors are derived from canine, bovine, porcine, ovine, and fowl and are currently in preclinical stages of development. NHP-AdV vectors from monkey origins are the most advanced and have reach clinical trials against Ebola, Malaria, HIV, tuberculosis, HCV and influenza principally [115,151–154]. Animals-derived vectors share some appropriate characteristics of the well characterized HAdV-C5, but with seemingly negligible seroprevalence among human population [7,107,155]. However, while NAb titers against a ChAdVs in healthy volunteers were 2% in the United States [119], substantial NAbs titers were detected in the sub-Saharan Africa [156], Brazil [157], and China [125].

We believe that developing seroepidemiological research on rare HAdVs need be amplified to generate an accurate global mapping of HAdV seroprevalence and consequently improve the safety and the efficacy of these vectors. Too many studies are based on results that were generated more

than 40 years ago. But, determining HAdV seroprevalence will be challenging. International travel and increasing immigration foster pathogen spreading from previously isolated areas. Sample collection can be problematic due to social, medical, political, and military situations in a specific area. Shipping biological samples from Africa to outside of the continent can be particularly costly, administratively demanding, and time consuming. For this reason, we encourage development of local serological studies to update the database. Thus, it is imperative to develop, standardize, and adapt technical procedures to countries with limited technical resources to perform accurate, robust, and reproducible data at minimum cost. This is all the more important because low income countries are usually the ones that need most to improve vaccination coverage and to be most susceptible to support vast vaccination campaigns. In addition, HAdVs are constantly undergoing recombination [117]. Increasing urbanization and globalization of poor sanitary developing countries, coupled with insufficient resources for control, are combinatorial factors that are greatly increasing probabilities of generating new types and consequently periodic outbreaks of HAdV infections [158].

We also encourage fundamental research on interaction between the pre-existing immunity, AdV and antigen-presenting cells. A better understanding of cellular and molecular interactions between host immunity and AdVs would inevitably improve the next generations of vaccine platforms, possibly allowing one to safely target specific population or individuals according to their unique serology profile. This challenging task will require a concerted effort between countries, research facilities, medical staff, and political authorities.

7. Expert opinion

After access to potable water, vaccination is the most efficient tools to prevent disease. AdV-based vaccines have undeniable potential. Nevertheless, optimizing is needed, especially against complex diseases such as HIV or malaria. Anti-vector immunity remains a challenge if the same vectors are to be administrated to different populations because most of us likely been infected with at least five different HAdV. The ideal scenario would take in consideration the HAdV sero-epidemiology of targeted areas for vaccination campaigns, associated to a systematic survey of HIV acquisition following clinical trials.

Fundamental research addressing virus-host interactions are essential. Relationship between pre-existing humoral and cellular immunity [159–161]. Studies on interactions of the host with pre-existing T cells, anti-microbial peptides, and natural occurring immunoglobulins need also to be developed and clarified, especially concerning the 'rare' HAd types. The variability of the host immune response, in particular during preclinical trials in animals, has to be taken in consideration. It is also possible that the limitations imposed by vector-host interactions could be overcome if postpurification modifications of the capsid are included [162]. Other approaches include genetically fusing epitopes to capsid proteins and/or single-round replicating vaccines that increase the transgene-directed immune response and allow a lower inoculation dose. Restricted replication in targeted cells or tissues may increase safety and potentially immune focus on the transgene.

8. Five-year view

Remarkable efforts have been made to improve HAdV-derived vector efficacy, safety, and to sidestep pre-existing immunity. Vaccine candidates against malaria, Ebola, or HIV may reach the market in the near future (Box 1). In the context of our review, one key issue is whether the HIV surveillance will be incorporated into vaccine trial endpoints in regions where infection rates are high. In these regions, will governments and NGOs recommend the used of AdV-based vaccines? Hopefully, seroprevalence will be characterized before performing vaccination campaigns. Another key issue is the paucity of data on seroprevalence for areas where future 'rare' Ad-based vaccines could be used. This task could be challenging due to cultural, social, and governmental issues. There are potential strategies to complement to serology-based assays: with the advent of next generation sequencing, pathogens will be more easily detected in blood samples. This will clarify the issues of AdV prevalence [163].

Finally, success will depend on better understanding the biology of each AdV type. Undoubtedly, fundamental research in term of cell attachment, and intracellular trafficking will enhance AdV vectors efficacy and safety for gene transfer and vaccination.

Acknowledgment

We particularly thanks Chloé Houques, Lumen Ishimwe and Aboudou Djobo for their technical help during sercepidemiological studies.

Funding

This paper was supported by funding from the Centre Muraz (Burkina Faso); The Ebovac 2 project (Grant 115861 - EBOVAC2), Campus France, La fondation Pierre Fabre and the University of Montpellier.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Reviewer disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

ORCID

Eric J. Kremer http://orcid.org/0000-0001-6114-7530

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Ghebremedhin B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2014;4:26–33.
2. Smith RR, Huebner RJ, Rowe WP, et al. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. Cancer. 1956;9:1211–1218.

3. Georgiades J, Zielinski T, Cicholska A, et al. Research on the oncolytic effect of APC viruses in cancer of the cervix uteri; preliminary report. Biul Inst Med Morsk Gdansk. 1959;10:49–57.
4. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy., adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. Curr Gene Ther. 2013;13 (13):421,421–433.
5. Hillgenberg M, Tonnies H, Strauss M. Chromosomal integration pattern of a helper-dependent minimal adenovirus vector with a selectable marker inserted into a 27.4-Kilobase genomic stuffer. J Virol. 2001;75:9896–9908.
6. Harmon AW, Byrnes AP. Adenovirus vector toxicity. In: Brunetti-Pierri N, editor. Safety and efficacy of gene-based therapeutics for inherited disorders. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2017. p. 37–60.
7. Fausther-Bovendo H, Kobinger GP. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important?. Hum Vaccin Immunother. 2014;10:2875–2884.
8. Berk AJ. Adenoviridae. In: Knipe DM and Howley PM, editors. Fields virology. 6th Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. Vol. 2, p. 1704–1731.
9. Van Oostrum J, Burnett RM. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. J Virol. 1985;56:439–448.
10. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, et al. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Society for Experimental Biology and Medicine. 1953;84:570–573.
11. Khanal S, Ghimire P, Dhamoon A. The repertoire of adenovirus in human disease: the innocuous to the deadly. Biomedicines. 2018;6:30.
12. Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB, et al. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982–96. Epidemiol Infect. 2000;125:333–345.
13. Cebey-López M, Herberg J, Pardo-Seco J, et al. viral co-infections in pediatric patients hospitalized with lower tract acute respiratory infections. PLoS ONE. 2015;10:e0136526.
14. Esposito S, Zampiero A, Bianchini S, et al. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. PLoS ONE. 2016;11:e0152375.
15. Liu C, Xiao Y, Zhang J, et al. Adenovirus infection in children with acute lower respiratory tract infections in Beijing, China, 2007 to 2012. BMC Infect Dis. 2015;15.
16. Fischer TK, Rungoe C, Jensen CS, et al. The burden of rotavirus disease in Denmark 2009–2010. Pediatr Infect Dis J. 2011;30:e126–e129.
17. Fletcher S, Sibbritt D, Stark D, et al. Descriptive epidemiology of infectious gastrointestinal illnesses in Sydney, Australia, 2007–2010. West Pac Surveillance Response J. 2015;6:7–16.
18. Lion T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. Clin Microbiol Rev. 2014;27:441–462.
19. Veltrop-Duits LA, van Vreeswijk T, Heemskerk B, et al. High titers of pre-existing adenovirus serotype-specific neutralizing antibodies in the host predict viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in children. Clinl Infect Dis. 2011;52:1405–1413.
20. Radin JM, Hawksworth AW, Blair PJ, et al. Dramatic decline of respiratory illness among us military recruits after the renewed use of adenovirus vaccines. Clinl Infect Dis. 2014;59:962–968.
21. Kuschner RA, Russell KL, Abuja M, et al. A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. Vaccine. 2013;31:2963–2971.
22. Choudhry A, Mathena J, Albano JD, et al. Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits. Vaccine. 2016;34:4558–4564.
23. Lin K-H, Lin Y-C, Chen H-L, et al. A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4. J Med Virol. 2004;73:274–279.
24. Lynch J, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2011;32:494–511.
25. Zhang L, Zhao N, Sha J, et al. Virology and epidemiology analyses of global adenovirus-associated conjunctivitis outbreaks, 1953–2013. Epidemiol Infect. 2016;144:1661–1672.
26. Abbas KZ, Lombos E, Duvvuri VR, et al. Temporal changes in respiratory adenovirus serotypes circulating in the greater Toronto area, Ontario, during December 2008 to April 2010. Virol J. 2013;10:15.
27. Rosen L. A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. Am J Hyg. 1960;71:120–128.
28. Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. J Virol. 2005;79:12635–12642.
29. Gerd Liebert U, Bergs S, Ganzenmueller T, et al. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient. J Gen Virol. 2015;96:2734–2742.
30. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. J Virol. 2007;81:5978–5984.
31. Huang G-H, Xu W-B. Recent advance in new types of human adenovirus. Bing Du Xue Bao. 2013;29:342–348.
32. Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, et al. evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. PLoS One. 2009;4:e5635. Markotter W, editor.
33. Robinson CM, Singh G, Lee JY, et al. Molecular evolution of human adenoviruses. Scientific Reports; 2013. p. 3.
34. Han G, Niu H, Zhao S, et al. Identification and typing of respiratory adenoviruses in Guangzhou, Southern China using a rapid and simple method. Virol Sin. 2013;28:103–108.
35. Blacklock J. Discussion on adenovirus infections. Proceedings of the Royal Society of Medicine. Birmingham Children's Hospital, Birmingham, UK. 1957. Vol. 50. p. 753–760.
36. Ginsberg HS. Newer aspects of adenovirus infections. Am J Public Health Nations Health. 1959;49:1480–1485.
37. Smith A. The adenoviruses. J Am Med Assoc. 1957;163:40.
38. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, et al. "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. Science. 1956;124:119–120.
39. Jawetz E, Kimura S, Nicholas AN, et al. New Type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. Science. 1955;122:1190–1191.
40. Ormsby H, Fowle A, Doane F. Canadian cases of adenovirus infection 1951–1956. Am J Ophthalmol. 1957;43:17–20.
41. Huebner R, Rowe W. Adenoviruses as etiologic agents in conjunctivitis and keratoconjunctivitis. Am J Ophthalmol. 1957;43:20–25.
42. Veen JV D, Kok G. Isolation and typing of adenoviruses recovered from military recruits with acute respiratory disease in The Netherlands. Am J Epidemiol. 1957;65:119–129.
43. Potter CW, Shedden WIH. The distribution of adenovirus antibodies in normal children. Epidemiol Infect. 1963;61:155–160.
44. Joncas J, Moisan A, Pavilanis V. Incidence of Adenovirus Infection. Can Med Assoc J. 1962;87:52–58.
45. Tai F-H, Grayston JT. Adenovirus neutralizing antibodies in persons on Taiwan. Exp Biol Med. 1962;109:881–884.
46. Ritova VV, Zhdanov VM, Schastnv EI. Serological evidence of respiratory virus infections in Moscow children, 1948 to 1956. Pediatrics. 1966;38:402–404.
47. Hildes JA, Wilt JC, Stanfield FJ. Antibodies to adenovirus and to psittacosis in eastern arctic eskimos. Canadian J Public Health/ Revue Canadienne de Santé Publique. 1958;49:230–231.
48. Sterner G, Svartz-Malmberg G. Adenovirus neutralizing antibodies in swedish children. Acta Paediatrica. 1962;51:617–620.
49. Kasel JA, Evans HE, Spickard A, et al. Conjunctivitis and enteric infection with adenovirus types 26 and 27: responses to primary, secondary and reciprocal cross-challenges. Transactions of the Association of American Physicians. 1962;75:179–189.
50. Devi KI. Adenovirus infections in Delhi: isolation from tonsils and a serological survey. Indian J Med Res. 1968;56:20–26.
51. Afshar A, Abdi H, Hatami-Monazah H. The occurrence of adenovirus precipitating antibodies in human sera in Iran. Archives of Razi Institute. 1969;21:107–110.
52. Evans AS, Jeffrey C, Niederman JC. The risk of acute respiratory infections in two groups of young adults in colombia, south

america: a prospective seroepidemiologic study. Am J Epidemiol. 1971;93:463–471.
53. Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, et al. Infections in 18, 000 infants and children in a controlled study of respiratory tract diseasel. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. Am J Epidemiol. 1969;90:484–500.
• **This study is one of the first to show that HAd types 1, 2, 3, 5, 6, and 7 are associated with ~7% pediatric respiratory disease cases in the United States.**
54. Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G. The Quest for Human Cancer Viruses: A new approach to an old problem reveals cancer induction in hamsters by human adenovirus. Science. 1962;137:835–841.
55. Commission on Acute Respiratory Diseases. Acute respiratory disease among new recruits. Am J Public Health Nations Health. 1946;36:439–450.
56. Hilleman MR. Epidemiology of adenovirus respiratory infections in military recruit populations. Ann N Y Acad Sci. 1957;67: 262–272.
57. Dingle JH, Langmuir AD. Epidemiology of acute respiratory disease in military recruits. Amer Rev Respir Dis. 1968;97(6).
58. Sanchez JL, Cooper MJ, Myers CA, et al. Respiratory infections in the U.S. military: recent experience and control. Clin Microbiol Rev. 2015;28:743–800.
59. Weaver EA. Vaccines within vaccines. Hum Vaccin Immunother. 2014;10:544–556.
60. Collis PB, Dudding BA, Winter PE, et al. Adenovirus vaccines in military recruit populations: a cost-benefit analysis. J Infect Dis. 1973;128:745–752.
61. Šnejdarová V, Vonka V, Kutinová L, et al. The nature of adenovirus persistence in human adenoid vegetations. Arch Virol. 1975;48:347–357.
62. Winnacker E-L. Adenovirus DNA: structure and function of a novel replicon. Cell. 1978;14:761–773.
63. Berkner KL. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. BioTechniques. 1988;6:616–629.
64. D'Ambrosio E, Del Grosso N, Chicca A, et al. Neutralizing antibodies against 33 human adenoviruses in normal children in Rome. J Hyg (Lond). 1982;89:155–161.
• **This study investigated seroprevalence of multiple HAds types in a large cohort and highlights similarity and differences between HAdV within and between countries.**
65. Taylor PE. Adenoviruses: diagnosis of infections. In: Kurstak E, Kurstak C, editors. Comparative diagnosis of viral diseases. Vol. 1. New York: Academic Press; 1977. p. 85.
66. Schmttz H, Wigand R, Heinrich W. Worlwide epidemiology of human adenovirus infections. Am J Epidemiol. 1983;117:455–466.
67. Richmond S, Caul EO, Dunn SM, et al. An outbreak of gastroenteritis in young children caused by adenoviruses. Lancet. 1979;313:1178–1180.
68. Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, et al. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. Dev Biol Stand. 1983;53:311–318.
69. Kidd AH, Madeley CR. In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. J Clin Pathol. 1981;34:213–216.
70. Avoort H VD, Ag W, Zomerdijk T, et al. Characterization of fastidious adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralizing monoclonal antibodies. Virus Res. 1989;12:139–157.
71. Kidd AH. Genome variants of adenovirus 41 (subgroup G) from children with diarrhoea in South Africa. J Med Virol. 1984;14:49–59.
72. Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, et al. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. J Clin Microbiol. 1984;20:365–372.
73. Herrmann JE, Blacklow NR, Perron-Henry DM, et al. Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in gastroenteritis. J Clin Microbiol. 1988;26:1783–1786.
74. Oker-Blom N, Wager O, Strandstrom H, et al. Adenoviruses associated with pharyngoconjunctival fever; isolation of adenovirus type 7 & serological studies suggesting its etiological role in an epidemic in Helsinki. Ann Med Exp Biol Fenn. 1957;35:342–351.
75. Wadell G, Jong JCD, Wolontis S. Molecular epidemiology of adenoviruses: alternating appearance of two different genome types of adenovirus 7 during epidemic outbreaks in Europe from 1958 to 1980. Infect Immun. 1981;34:368–372.
76. Wadell G, Cooney MK, Da Costa Linhares A, et al. Molecular epidemiology of adenoviruses: global distribution of adenovirus 7 genome types. J Clin Microbiol. 1985;21:403–408.
77. Chin J. Global estimates of AIDS cases and HIV infections: 1990. Aids. 1990;4:S277.
78. Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, et al. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. N Engl J Med. 1993;329:14–20.
79. Janoff EN, Orenstein JM, Manischewitz JF, et al. Adenovirus colitis in the acquired immunodeficiency syndrome. Gastroenterology. 1991;100:976–979.
80. Anders KH, Park C-S, Cornford ME, et al. Adenovirus encephalitis and widespread ependymitis in a child with AIDS. PNE. 1990;16:316–320.
81. Krilov LR, Rubin LG, Frogel M, et al. Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in patients with human immunodeficiency virus infection and other immunodeficiency states. Rev Infect Dis. 1990;12:303–307.
82. Chastel C, Plantin P, Chomel JJ, et al. Respiratory tract infection caused by adenovirus 37 in an HIV-1 infected patient. Presse Med. 1990;19:1372.
83. Khoo SH, Bailey AS, de Jong JC, et al. Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. J Infect Dis. 1995;172: 629–637.
84. Varki NM, Bhuta S, Drake T, et al. Adenovirus hepatitis in two successive liver transplants in a child. Arch Pathol Lab Med. 1990;114:106–109.
85. Gooding LR, Wold WS. Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. Crit Rev Immunol. 1990;10:53–71.
86. Graham FL. Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines. Trends Biotechnol. 1990;8:85–87.
87. Imler J-L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. Vaccine. 1995;13:1143–1151.
88. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant aol-Antitrypsin gene to the lung epithefium in vivo. Reports Science. 1991;252:431–434.
89. Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, et al. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. Cell. 1993;75:207–216.
90. Brody SL, Crystal RG. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. Ann N Y Acad Sci. 1994;716:90–103.
91. Zuckerman JB, Robinson CB, Ks M, et al. A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. Hum Gene Ther. 1999;10:2973–2985.
92. Crystal RG. Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. Hum Gene Ther. 2014;25:3–11.
93. WHO meeting, 1989 Jun 19-22. Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines Report No.: Vaccine; 1990. Geneva. Vol. 8. p. 425–436.
94. Zhang C, Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. Hum Vaccin Immunother. 2016;12:2064–2074.
95. Modermott MR, Graham FL, Hanke T, et al. Protection of mice against lethal challenge with herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing hsv glycoprotein B. Virology. 1989;169:244–247.
96. Jönsson F, Kreppel F. Barriers to systemic application of virus-based vectors in gene therapy: lessons from adenovirus type 5. Virus Genes. 2017;53:692–699.
97. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. Curr Opin Biotechnol. 1999;10:440–447.
98. Abbink P, Lemckert AAC, Ewald BA, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant

adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol. 2007;81:4654–4663.

•• **This study reported HAdV seroprevalence of six "rare" types (11, 35, 50, 26, 49, and 49) from cohorts in sub-Saharan countries, and therefore identifying potential candidates for vaccine strategies in Africa.**

99. Perreau M, Mennechet F, Serratrice N, et al. Contrasting effects of human, canine, and hybrid adenovirus vectors on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells: implications for clinical efficacy. J Virol. 2007;81:3272–3284.
100. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. Lancet. 2008;372:1881–1893.
101. Fauci AS, Marovich MA, Dieffenbach CW, et al. Immune activation with HIV vaccines: implications of the adenovirus vector experience. Science. 2014;344:49–51.

•• **This study published after the interruption of the HVTN502 STEP HIV trails, showed that vaccinees who had high NAb titers against HAdV-C5 had a statistically significant increased risk of HIV acquisition during the first 18 months postvaccination.**

102. Mennechet FJ, Tran TTP, Eichholz K, et al. Ebola virus vaccine: benefit and risks of adenovirus-based vectors. Expert Rev Vaccines. 2015;14:1471–1478.
103. Eichholz K, Bru T, Tran TTP, et al. Immune-complexed adenovirus induce AIM2-mediated pyroptosis in human dendritic cells. PLOS Pathogens. 2016;12:e1005871. Benedict CA, editor
104. Benlahrech A, Harris J, Meiser A, et al. Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:19940–19945.
105. Hu H, Eller MA, Zafar S, et al. Preferential infection of human Ad5-specific CD4 T cells by HIV in Ad5 naturally exposed and recombinant Ad5-HIV vaccinated individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:13439–13444.
106. Frahm N, DeCamp AC, Friedrich DP, et al. Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. J Clin Invest. 2012;122:359–367.
107. Perreau M, Kreemer EJ. Frequency, proliferation, and activation of human memory T cells induced by a nonhuman adenovirus. J Virol. 2005;79:14595–14605.

• **This study showed that even nonhuman adenoviruses share epitopes that can be recognized by a human memory T-cell response.**

108. Tran TTP, Eichholz K, Amelio P, et al. Humoral immune response to adenovirus induce tolerogenic bystander dendritic cells that promote generation of regulatory T cells. PLoS Pathog. 2018 Aug;14(8):e1007127.
109. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab. 2003;80:148–158.
110. Klonjkowski B, Gilardi-Hebenstreit P, Hadchouel J, et al. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. Hum Gene Ther. 1997;8:2103–2115.
111. Michael NL. Rare serotype adenoviral vectors for HIV vaccine development. J Clin Invest. 2012;122:25–27.
112. Vitelli A, Folgori A, Scarselli E, et al. Chimpanzee adenoviral vectors as vaccines – challenges to move the technology into the fast lane. Expert Rev Vaccines. 2017;16:1241–1252.
113. Abbink P, Kirilova M, Boyd M, et al. Rapid cloning of novel rhesus adenoviral vaccine vectors. J Virol. 2018;92(6):e01924-17.
114. Hoppe E, Pauly M, Gillespie TR, et al. Multiple Cross-Species Transmission Events of Human Adenoviruses (HAdV) during Hominine Evolution. Mol Biol Evol. 2015;32:2072–2084.
115. Ledgerwood JE, DeZure AD, Stanley DA, et al. Chimpanzee adenovirus vector ebola vaccine. N Engl J Med. 2017;376:928–938.
116. Chiu CY, Yagi S, Lu X, et al. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. mBio. 2013;4(2):e00084-13.
117. Lee JY, Lee JS, Materne EC, et al. Bacterial RecA protein promotes adenoviral recombination during in vitro infection. mSphere. 2018;3. Greber UF, editor.
118. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. J Gene Med. 2007;9:833–842.
119. Lemckert AAC. Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity. J Gen Virol. 2006;87:2891–2899.
120. Li Q, Liu Q, Huang W, et al. Neutralizing antibodies against adenovirus type 2 in normal and HIV-1-infected subjects: Implications for use of Ad2 vectors in vaccines. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2017;13(6):1433–1440.
121. Yu B, Zhou Y, Wu H, et al. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenovirus type 5 in healthy adults in China. J Med Virol. 2012;84:1408–1414.
122. Piedra PA, Poveda GA, Ramsey B, et al. Incidence and prevalence of neutralizing antibodies to the common adenoviruses in children with cystic fibrosis: implication for gene therapy with adenovirus vectors. Pediatrics. 1998;101:1013–1019.
123. Jian L, Zhao Q, Zhang S, et al. The prevalence of neutralising antibodies to chimpanzee adenovirus type 6 and type 7 in healthy adult volunteers, patients with chronic hepatitis B and patients with primary hepatocellular carcinoma in China. Arch Virol. 2014;159:465–470.
124. Mast TC, Kierstead L, Gupta SB, et al. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. Vaccine. 2010;28:950–957.
125. Zhang S, Huang W, Zhou X, et al. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy Chinese adults. J Med Virol. 2013;85:1077–1084.
126. Barouch DH, Kik SV, Weverling GJ, et al. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. Vaccine. 2011;29:5203–5209.

•• **A recent study on HAd-C5, D26, B35, and D48 seroprevalence involving more than 4,000 people and showing major variations across the planet.**

127. Sumida SM, Truitt DM, Lemckert AAC, et al. neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. J Immunol. 2005;174:7179–7185.
128. Kostense S, Koudstaal W, Sprangers M, et al. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. Aids. 2004;18:1213–1216.
129. Holterman L, Vogels R, van der Vlugt R, et al. Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. J Virol. 2004;78:13207–13215.
130. Duffy MR, Alonso-Padilla J, John L, et al. Generation and characterization of a novel candidate gene therapy and vaccination vector based on human species D adenovirus type 56. J Gen Virol. 2018;99:135–147.
131. Vogels R, Zuijdgeest D, van Rijnsoever R, et al. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. J Virol. 2003;77:8263–8271.

• **This work shows, in contrast to others types, that HAd-B35 seroprevalence is very low among healthy individuals in Belgium, and demonstrates that transduction with HAd-B35 is not hampered by pre-existing HAd-C5 immunity.**

132. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, et al. Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. Jjmsb. 1998;51:43–51.
133. Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, et al. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. J Clin Microbiol. 2002;40:140–145.
134. Miwa C. [Serosurvey for adenovirus type 3 and adenovirus type 7 infection in resident in Gifu Prefecture, 1996]. Kansenshogaku Zasshi. 1997;71:1261–1262.

135. Kajiwara J, Hamasaki M, Ishibashi T, et al. [Analysis of genome types of adenovirus type 7 isolated in Fukuoka Prefecture in 1996]. Kansenshogaku Zasshi. 1997;71:895–898.
136. Su X, Tian X, Jiang Z, et al. Human adenovirus serotype 3 vector packaged by a rare serotype 14 hexon. PLoS One. 2016;11: e0156984. Ulasov I, editor
137. Lyons A, Longfield J, Kuschner R, et al. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. Vaccine. 2008;26:2890–2898.
138. Yang W-X, Zou X-H, Jiang S-Y, et al. Prevalence of serum neutralizing antibodies to adenovirus type 5 (Ad5) and 41 (Ad41) in children is associated with age and sanitary conditions. Vaccine. 2016;34:5579–5586.
139. Kahl CA, Bonnell J, Hiriyanna S, et al. Potent immune responses and in vitro pro-inflammatory cytokine suppression by a novel adenovirus vaccine vector based on rare human serotype 28. Vaccine. 2010;28:5691–5702.
140. Wang X, Xing M, Zhang C, et al. Neutralizing antibody responses to enterovirus and adenovirus in healthy adults in China. Emerg Microbes Infect. 2014;3:e30–e30.
    - **In addition to showing that HAd-C5 is highly epidemic among healthy adults in China, this study also highlights major variation in HAdVs seroprevalence within a country.**
141. Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, et al. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. Curr Opin Immunol. 2016;41:47–54.
142. Croyle MA, Patel A, Tran KN, et al. Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. PLoS One. 2008;3: e3548. Doolan DL, editor
143. Katz S, Jordan WS Jr., Badger GF, et al. Studies of complement-fixing and neutralizing antibodies against certain adenoviruses. J Immunol. 1957;78:118–121.
144. Seiradake E, Henaff D, Wodrich H, et al. The cell adhesion molecule "CAR" and sialic acid on human erythrocytes influence adenovirus in vivo biodistribution. PLoS Pathog. 2009;5:e1000277.
145. Sprangers MC, Lakhai W, Koudstaal W, et al. Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. J Clin Microbiol. 2003;41:5046–5052.
146. Xiang Z, Li Y, Cun A, et al. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, Sub-Saharan Africa. Emerg Infect Dis. 2006;12:1596–1599.
147. Kuriyama S, Tominaga K, Kikukawa M, et al. Inhibitory effects of human sera on adenovirus-mediated gene transfer into rat liver. Anticancer Res. 1998;18:2345–2351.
148. Aste-Amézaga M, Bett AJ, Wang F, et al. Quantitative adenovirus neutralization assays based on the secreted alkaline phosphatase reporter gene: application in epidemiologic studies and in the design of adenovector vaccines. Hum Gene Ther. 2004;15:293–304.
149. Barouch DH, Pau MG, Custers JHHV, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 Immunity. J Immunol. 2004;172:6290–6297.
150. Kremer EJ. Van de Perre P. Ebola vaccines based on adenovirus vectors and risk of HIV. BMJ. 2015;350:h1307–h1307.
151. Kennedy SB, Bolay F, Kieh M, et al. Phase 2 placebo-controlled trial of two vaccines to prevent Ebola in Liberia. N Engl J Med. 2017;377:1438–1447.
152. Venkatraman N, Anagnostou N, Bliss C, et al. Safety and immunogenicity of heterologous prime-boost immunization with viral-vectored malaria vaccines adjuvanted with Matrix-M™. Vaccine. 2017;35:6208–6217.
153. Afolabi MO, Tiono AB, Adetifa UJ, et al. Safety and Immunogenicity of ChAd63 and MVA ME-TRAP in West African Children and Infants. Mol Ther. 2016;24:1470–1477.
154. Hayton E-J, Rose A, Ibrahimsa U, et al. Safety and tolerability of conserved region vaccines vectored by plasmid DNA, simian adenovirus and modified vaccinia virus ankara administered to human immunodeficiency virus type 1-uninfected adults in a randomized, single-blind phase I trial. PLoS One. 2014 Jul;9(7):e101591.
155. Morris SJ, Sebastian S, Spencer AJ, et al. Simian adenoviruses as vaccine vectors. Future Virol. 2016;11:649–659.
156. Dudareva M, Andrews L, Gilbert SC, et al. Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan Children, in the context of vaccine vector efficacy. Vaccine. 2009;27:3501–3504.
157. Ersching J, Hernandez MIM, Cezarotto FS, et al. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. Virology. 2010;407:1–6.
158. Cook J, Radke J. Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses. F1000 Research. 2017;6(F1000 Faculty Rev):90. Last updated: 30 Jan 2017.
159. Anchim A, Raddi N, Zig L, et al. Humoral responses elicited by adenovirus displaying epitopes are induced independently of the infection process and shaped by the toll-like receptor/myd88 pathway. Front Immunol. 2018 Feb;9:Article 124.
160. Eichholz K, Mennechet FJD, Kremer EJ. Human coagulation factor X-adenovirus type 5 complexes poorly stimulate an innate immune response in human mononuclear phagocytes. J Virol. 2014;89:2884–2891.
161. Perreau M, Welles HC, Pellaton C, et al. The number of toll-like receptor 9-agonist motifs in the adenovirus genome correlates with induction of dendritic cell maturation by adenovirus immune complexes. J Virol. 2012;86:6279–6285.
162. Hagedorn C, Kreppel F. Capsid engineering of adenovirus vectors: overcoming early vector–host interactions for therapy. Hum Gene Ther. 2017;28:820–832.
163. Ladner JT, Grubaugh ND, Pybus OG, et al. Precision epidemiology for infectious disease control. Nat Med. 2019;25:206–211.
164. Zhang Q, Su X, Seto D, et al. Construction and characterization of a replication-competent human adenovirus type 3-based vector as a live-vaccine candidate and a viral delivery vector. Vaccine. 2009;27:1145–1153.
165. Binn LN, Sanchez JL, Gaydos JC. Emergence of adenovirus type 14 in US military recruits - a new challenge. J Infect Dis. 2007;196:1436–1437.
166. Colloca S, Folgori A, Ammendola V, et al. Generation and screening of a large collection of novel simian Adenovirus allows the identification of vaccine vectors inducing potent cellular immunity in humans: a range of novel simian adenoviral vectors, which are capable of priming high levels of T cell responses in man, has been defined. Sci Transl Med. 2012;4(115):115ra2.
167. Emini E, Shiver J, Bett A, et al. Adenovirus serotype 34 vectors, nucleic acids and virus produced thereby. GooglePatents. 2004; EP1611237A1.
168. Lu ZZ, Zou XH, Dong LX, et al. Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. J Gene Med. 2009;11:128–138.
169. Lu ZZ, Zou XH, Lastinger K, et al. Enhanced growth of recombinant human adenovirus type 41 (HAdV-41) carrying ADP gene. Virus Res. 2013;176:61–68.
170. Lubeck MD, Davis AR, Chengalvala M, et al. Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6763–6767.
171. Hsu KH, Lubeck MD, Davis AR, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5, and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. J Infect Dis. 1992;166:769–775.
172. Lemiale F, Haddada H, Nabel GJ, et al. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. Vaccine. 2007;25:2074–2084.
173. Hofmayer S, Madisch I, Darr S, et al. Unique sequence features of the Human Adenovirus 31 complete genomic sequence are conserved in clinical isolates. BMC Genomics. 2009;10:557.
174. Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H, et al. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. Curr Gene Ther. 2007;7:229–238.
175. Omosa-Manyonyi G, Mpendo J, Ruzagira E, et al. A Phase I Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of the Safety and

Immunogenicity of an Adjuvanted HIV-1 Gag-Pol-Nef Fusion Protein and Adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef Vaccine in Healthy HIV-Uninfected African Adults. PLoS One. 2015; 10(5):e0125954.
176. Ouédraogo A, Tiono AB, Kargougou D, et al. A phase 1b randomized, controlled, double-blinded dosage-escalation trial to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an adenovirus type 35 based circumsporozoite malaria vaccine in Burkinabe healthy adults 18 to 45 years of age. PLoS One. 2013;8 (11):e78679.
177. Abrahamsen K, Kong HL, Mastrangeli A, et al. Construction of an adenovirus type 7a E1A- vector. J. Virol. 1997;71:8946–8951.
178. Lemckert AA, Sumida SM, Holterman L, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. J Virol. 2005;79:9694–9701.
179. Garnett CT, Erdman D, Xu W, et al. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. J Virol. 2002;76:10608–10616.
180. Wurzel DF, Mackay IM, Marchant JM, et al. Adenovirus species C is associated with chronic suppurative lung diseases in children. Clin Infect Dis.2014;59:34–40.
181. Lhomme E, Richert L, Moodie Z, et al. Early CD4+ T Cell Responses Are Associated with Subsequent CD8+ T Cell Responses to an rAd5-Based Prophylactic Prime-Boost HIV Vaccine Strategy. PLoS One. 2016;11(4):e0152952.
182. Kaulfuß M, Wensing I, Windmann S, et al. Induction of complex immune responses and strong protection against retrovirus challenge by adenovirus-based immunization depends on the order of vaccine delivery. Retrovirology. 2017;14:8.
183. Fonseca JA, Cabrera-Mora M, Kashentseva EA, et al. A Plasmodium Promiscuous T Cell Epitope Delivered within the HAdV-C5 Hexon Protein Enhances the Protective Efficacy of a Protein Based Malaria Vaccine. PLoS One. 2016;11:e0154819.
184. Li X, Huang J, Zhang M, et al. Human CD8+ T cells mediate protective immunity induced by a human malaria vaccine in human immune system mice. Vaccine. 2016;34:4501–4506.
185. McGuire KA, Miura K, Wiethoff CM, et al. New adenovirus-based vaccine vectors targeting Pfs25 elicit antibodies that inhibit Plasmodium falciparum transmission. Malar J. 2017;16:254.
186. Li JX, Hou LH, Meng FY, et al. Immunity duration of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine and a homologous prime-boost immunisation in healthy adults in China: final report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. Lancet Glob Health. 2017;5:e324–e334.
187. Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. Hum Vaccin Immunother.2017;13:613–620.
188. Wang L, Liu J, Kong Y, et al. Immunogenicity of Recombinant Adenovirus Type 5 Vector-Based Ebola Vaccine Expressing Glycoprotein from the 2014 Epidemic Strain in Mice. Hum Gene Ther.2018;29:87–95.
189. Wu L, Zhang Z, Gao H, et al. Open-label phase I clinical trial of Ad5-EBOV in Africans in China. Hum Vaccin Immunother.2017;13:2078–2085.
190. Zhu FC, Wurie AH, Hou LH, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in Sierra Leone: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet. 2017;389:621–628.
191. Van Kampen KR, Shi Z, Gao P, et al. Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. Vaccine. 2015;23:1029–1036.
192. Shen CF, Jacob D, Zhu T, et al. Optimization and scale-up of cell culture and purification processes for production of an adenovirus-vectored tuberculosis vaccine candidate. Vaccine. 2016;34:3381–3387.
193. Smaill F, Jeyanathan M, Smieja M, et al. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. Sci Transl Med. 2013;5:205ra134.
194. Guo Q, Chan JF, Poon VK, et al. Immunization With a Novel Human Type 5 Adenovirus-Vectored Vaccine Expressing the Premembrane and Envelope Proteins of Zika Virus Provides Consistent and Sterilizing Protection in Multiple Immunocompetent and Immunocompromised Animal Models. J. Infect. Dis. 2018;218:365–377.
195. Kim E, Erdos G, Huang S, et al. Preventative Vaccines for Zika Virus Outbreak: Preliminary Evaluation. EBioMedicine. 2016;13:315–320.
196. Chen S, Xu Q, Zeng M. Oral vaccination with an adenovirus-vectored vaccine protects against botulism. Vaccine.2013;31:1009–1011.
197. Xie Y, Gao P, Li Z, et al. A Recombinant Adenovirus Expressing P12A and 3C Protein of the Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Stimulates Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice. Biomed Res Int. 2016;2016:7849203.
198. Jung SY, Kang KW, Lee EY, et al. Heterologous prime-boost vaccination with adenoviral vector and protein nanoparticles induces both Th1 and Th2 responses against Middle East respiratory syndrome coronavirus. Vaccine. 2018;36:3468–3476.
199. Guo X, Deng Y, Chen H, et al. Systemic and mucosal immunity in mice elicited by a single immunization with human adenovirus type 5 or 41 vector-based vaccines carrying the spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. Immunology. 2015;145:476–484.
200. Vos A, Neubert A, Pommerening E, et al. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabies by different routes of administration. J Gen Virol. 2001;82:2191–2197.
201. Xiang ZQ, Greenberg L, Ertl HC, et al. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. Virology. 2014;450-451:243–249.
202. Raviprakash K, Wang D, Ewing D, et al. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. J Virol. 2008;82:6927–6934.
203. Feng Y, Li C, Hu P, et al. An adenovirus serotype 2-vectored ebolavirus vaccine generates robust antibody and cell-mediated immune responses in mice and rhesus macaques. Emerg Microbes Infect. 2018;7:101.
204. Capone S, Meola A, Ercole BB, et al. A novel adenovirus Type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques. J Virol. 2006;80:1688–1699.
205. Crosby CM, Barry MA. IIIa deleted adenovirus as a single-cycle genome replicating vector. Virology. 2014;462-463:158–165.
206. Crosby CM, Matchett WE, Anguiano-Zarate SS, et al. Replicating Single-Cycle Adenovirus Vectors Generate Amplified Influenza Vaccine Responses. J Virol. 2017;91(2):e00720–16.
207. Pauly M, Hoppe E, Mugisha L, et al. High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. Virol J. 2014;11:25.
208. Andersson EK, Mei YF, Wadell G. Adenovirus interactions with CD46 on transgenic mouse erythrocytes. Virology. 2010;402:20–25.
209. Nilsson EC, Storm RJ, Bauer J, et al. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. Nat Med. 2011;17:105–109.
210. Milligan ID, Gibani MM, Sewell R, et al. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26– and Modified Vaccinia Ankara–Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2016;315:1610–1623.
211. Barouch DH, Liu J, Peter L, et al. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine in healthy adults (IPCAVD 001). J Infect Dis. 2013;207:248–256.
212. Colloca S, Barnes E, Folgori A, et al. Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. Sci Transl Med. 2012;4:115ra2.
213. Johnson MJ, Björkström NK, Petrovas C, et al. Type I interferon-dependent activation of NK cells by rAd28 or rAd35, but not rAd5, leads to loss of vector-insert expression. Vaccine. 2014;32:717–724.

214. Belousova N, Mikheeva G, Xiong C, et al. Native and engineered tropism of vectors derived from a rare species D adenovirus serotype 43. Oncotarget. 2016;7:53414–53429.
215. Farrow AL, Peng BJ, Gu L, et al. A Novel Vaccine Approach for Chagas Disease Using Rare Adenovirus Serotype 48 Vectors. Viruses. 2016;8:78.
216. Weaver EA, Barry MA. Low seroprevalent species D adenovirus vectors as influenza vaccines. PLoS One. 2013;8:e73313.
217. Thorner AR, Lemckert AA, Goudsmit J, et al. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. J Virol. 2006;80:12009–12016.
218. Lapuente D, Ruzsics Z, Thirion C, et al. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. Vaccine. 2018;36:2712–2720.
219. Zhou X, Robinson CM, Rajaiya J, et al. Analysis of human adenovirus type 19 associated with epidemic keratoconjunctivitis and its reclassification as adenovirus type 64. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53:2804–2811.
220. Gray GC, Callahan JD, Hawksworth AW, et al. Respiratory diseases among U.S. military personnel: countering emerging threats. Emerg Infect Dis. 1999;5:379–385.
221. Khurana S, Coyle EM, Manischewitz J, et al. Oral priming with replicating adenovirus serotype 4 followed by subunit H5N1 vaccine boost promotes antibody affinity maturation and expands H5N1 cross-clade neutralization. PLoS One. 2015;10:e0115476.
222. Gurwith M, Lock M, Taylor EM, et al. Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. Lancet Infect Dis. 2013;13:238–250.
223. Alexander J, Ward S, Mendy J, et al. Pre-clinical evaluation of a replication-competent recombinant adenovirus serotype 4 vaccine expressing influenza H5 hemagglutinin. PLoS One. 2012;7:e31177.
224. Christensen ML. Human viral gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 1989;2:51–89.
225. Yamasaki, S., et al. A single intraduodenal administration of human adenovirus 40 vaccine effectively prevents anaphylactic shock. Clin Vaccine Immunol. 2013;20:1508–1516.
226. Lenman, A, Liaci AM, Liu Y, et al. Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 May 1;115(8):E4264–E4273.

3) Article 1: Seroprevalence of Neutralizing Antibodies against Adenoviruses type -C5, -D26 and -B35 in Healthy and HIV-Infected Adults and Children from Burkina Faso and the Republic of Chad: impact on the use of HAdV-derived vaccines (soumis)

Seroprevalence of Neutralizing Antibodies against Adenoviruses type -C5, -D26 and -B35 in Healthy and HIV-Infected Adults and Children from Burkina Faso and the Republic of Chad: impact on the use of HAdV-derived vaccines

*Aline Raissa Ouoba[1,4,6] & *Océane Paris[1], Chatté Adawaye[2], Adoum Abderrazzack[3], Guy Takoudjou Dzomo[5], Sodiomon B. Sirima[7], Dramane Kania[6], Amidou Diarra[7], Zenaba Abdraman Kallo[3], Isidore T Traore[6], Edouard Tuaillon[4], Philippe van de Perre[4], Eric J. Kremer[1, $] & $Franck J. D. Mennechet[1,4, $]

*Equal contribution

$Co-senior authors

Correspondence to: franck.mennechet@umontpellier.fr

[1]Institute of Molecular Genetics of Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France

[2]Institut National Supérieur des Sciences et Techniques d'Abéché, Abéché, Republic of Chad

[3]Toumaï University, Sectoral AIDS Control Program (PSLS), N'Djamena, Republic of Chad

[4]Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, INSERM, French Blood Establishment (EFS), University Hospital Center (CHU) of Montpellier, Montpellier, France

[5]University Hospital Complex "Le Bon Samaritain", N'Djamena, Republic of Chad

[6]Department of Science and Clinical Research, Muraz Center, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

[7]National Malaria Research and Training Center (CNRFP), Ouagadougou, Burkina Faso, Health Action Research Group (GRAS), Ouagadougou, Burkina Faso

Abstract (176 words)

Vaccines derived from human adenoviruses (HAdV) are currently being used and trialled against numerous infectious diseases, including severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). However, pre-existing humoral immunity can lower vaccines efficacy and safety. One strategy to circumvent this obstacle is to use HAdV types with low seroprevalence. Because HAdV sero-epidemiological data in many regions are lacking, we evaluate HAdV-C5, HAdV-D26 and HAdV-B35 seroprevalence from healthy and HIV-infected adults and children from Burkina Faso and the Republic of Chad. Compared to France, seroprevalence for HAdV-C5 and -D26, particularly in the Republic of Chad for the HIV-infected population was elevated (> 85%) By contrast, HAd-B35 seroprevalence was low for all populations tested. To estimate the impact of HAdVs pre-existing humoral immunity on the host immune response, we developed assays using monocyte-derived dendritic cells (MoDC) and demonstrated that Ig-complexed HAdV-D26 induce MoDC activation. Our study fills gaps in the epidemiological data needed to optimize HAdV-derived vaccines in sub-Saharan regions.

Background

The development and use of vaccines save millions of lives every year and limit major financial and public health system losses[1,2]. Vaccines are have been used against infectious diseases for a hundred years, and more recently as prophylaxis and therapeutics for cancers and autoimmune diseases[3]. COVID-19 vaccines took advantages from the foundation laid over the previous 30 years[4,5]. As of May 11th 2021, of the landscape of COVID-19 vaccines, ~18% are viral vector-derived, non-replicating (14/99) or replicating (3/99)[6]. Among them, 5 are HAdV-baseds, including CanSino Biologics[7], Sputnik V (Gamaleya Research Institute/ Health ministry Russian federation)[8], and the Johnson & Johnson Ad26.COV2.S[9]. HAdVs were among the first viral vector developed for gene transfer. Among the hundred or so HAdVs types identified since 1953[10], HAdV type 5 (HAdV-C5) is the best characterized and remains to this day the most widely HAdV used in gene transfer applications[11].

A drawback in the use of HAdV-derived vaccines is pre-existing immunity that can reduce vaccine efficacy and potential cause immunotoxicity[12–14]. Current data suggest that both innate and adaptive immune responses impact the duration of transgene expression from HAdVs[15–17]. Natural infection or the administration of AdVs vectors in pre-immune subjects results in an activation of innate immune responses associated with the production of pro-inflammatory cytokines/chemokines, following by an adaptive immunity, including specific T cells and production of neutralizing antibodies (NAb)[13,18,19]. While HAdV-induced T cells are responsible for the elimination of target cells expressing viral and transgenic products[20], anti-HAdV Abs mediate the interaction of HAdV with dendritic cells (DC) or macrophages through Fc receptors (FcRs)[21,22]. Hence, pre-existing immunity impede, the effectiveness of HAdV-mediated gene transfer[15,23,24]. Initial lessons learned from HAdV-C5-based vaccines have therefore shown a correlation between efficacy and pre-existing humoral immunity. A better understanding of the interaction between host pre-existing immunity, vaccines and phagocytes and ultimately how to circumvent it, has consequently been a major objective in the development of Ad-derived vaccines.

A number of strategies have been developed to bypass humoral immunity, including genetic and chemical modifications of the capsid, generation of chimeric vectors, and the use of alternative human or non-human AdV-derived vectors[12]. In principle, AdV types with low seroprevalence should be less affected by pre-existing humoral immunity. Among non-human vectors, Ads isolated from the non-human primates are currently use as vaccine for a wide range of infectious agents and cancers[25,26]. Alternative human candidates to HAdV-C5 for vaccination are numerous, but only HAdV-D26, B35 and E4[27] are currently tested in large-scale clinical trials. These types were chosen mostly because of their low seroprevalence in Europe and North America[28]. HAd-D26-based vaccines have been extensively tested in multiple clinical programs[29], including Respiratory Syncytial Virus[30], HIV[31,32], Zika virus[33], Ebola virus[34], Middle East Respiratory Syndrome[35], malaria[29], human papillomavirus[36] and SARS-CoV-2[9]. Depending on the trial, HAdV-D26-derived vaccines is used in prime-boost heterologous strategies with the modified vaccinia Ankara (MVA) or other HAdV types of such as HAdV-B35 or HAdV-C5. For COVID-19 vaccine, Jonson & Johnson is using the HAdV-D26 platform (Ad26.COV2.S) in a single dose[9], and Sputnik is a heterologous vaccine using HAdV-D26 with -C5 in a prime boost regimen[8]. HAdV-B35 on other hand is not among candidates of COVID-19 vaccines, but has long been part of the vaccination landscape for many infectious diseases, in particularly HIV[37–39], Ebola virus[28,40], malaria [41,42] and tuberculosis[43], which are particularly devastating in sub-Saharan Africa.

While the seroprevalence of HAdV-C5 is fairly well characterized, data on HAdV-D26 and HAdV-B35 are less extensive[44]. For HAdV-D26, accumulating evidence showed that seroprevalences in Europe and North America rarely exceeds 10%[44–46]. The few studies conducted on the seroprevalence of HAdV-D26 in Africa have shown seroprevalence between 10 and 90% with low or intermediate NAb titers compared to HAdV-C5[47–49]. For HAdV-B35, seroprevalence is generally low worldwide, with rates slightly higher in some sub-Saharan regions[44,45,50]. However, global mapping of the seroprevalence of HAdV-D26 and HAdV-B35 remains incomplete. These gaps make HAdV-derived COVID-19 vaccines less predictable in populations that are globally more affected by infectious diseases.

In this study, we quantified the seroprevalence against HAdV-C5, -D26 and -B35 in cohorts from Burkina Faso and the Republic of Chad. In contrast to Europe & North

America, our study indicates that HAdV-D26 seroprevalence is high, particularly for the cohort living with HIV in the Republic of Chad. On the other hand, HAdV-B35 seroprevalence was low in all populations tested, regardless of geographic origin. In addition, our work also suggests that immunoglobulin-complexed HAdV-D26 stimulate the hyper-maturation of human phagocytes.

Methods

Sample locations and management

This cross-sectional study was carried out on 424 plasma samples from Burkina Faso (241), the Republic of Chad (93) & France (50) **(Table 01)**. Participants included 158 males and 252 females (+ 18 unknown) aged 7 month - 82 years (mean: 28.6). Participant involved 325 adults and 99 children (under 18 years) and were HIV- (358) or HIV+ (86 - adults only). Participants were divided into five age groups (0-9; 10-17, 18-25, 26-44, ≥45). Sample were collected from adult or children, HIV negative or positive donors. For the HIV-negative cohorts, samples were provided in Burkina Faso by the National Malaria Research and Training Center (CNRFP) in Ouagadougou (60, collected in 2012) and the Muraz Center of Bobo-Dioulasso (201, collected in 2017). Collection and use of plasma samples for this study was approved by institutional review boards of the CNRFP (N° XXXXX) and the Muraz Center (N°2017-361/MS/SG/CM/DG), which have provided material transfer agreements. For the Republic of Chad, samples were collected at the "Bon Samaritain" hospital (47, from December 2018 to November 2019) and the study was approved by the bioethics committee of the Republic of Chad (N° XXXXX). In France, samples (collected from July 2016 to September 2019) were provided the French Blood Establishment (EFS, France) and the study was approved by the Occitanie & Midi-Pyrenees EFS scientific board (EFS-OCPM) (Convention EFS-OCPM: N°21PLER2019-0002). Concerning HIV-positive donors, samples from Burkina Faso (20) were randomly selected from the ANRS 12174 Promise-PEP trial database, in accordance with a sub-study request established and approved by the concerned countries/teams. For the Republic of Chad, HIV-positive samples were collected (46, from August 2019 to December 2019) at the Sectoral AIDS Control Program Center (PSLS) in the city of N'Djamena. All Samples collected for this study include the signed and written informed consent of all participants. The study was performed in accordance with good clinical practice guidelines. Plasma samples were heat inactivated at 56°C for 30 min and stored at -80°C prior the measurement of HAdVs NAb titers at the Institute of Molecular Genetics of Montpellier (IGMM), National Centre for Scientific Research (CNRS), France. Repeated freeze thawing was avoided by using samples aliquots.

Adenovirus derived vectors, cells and culture conditions

For neutralization assays, human embryonic retinoblast (HER)-derived cells (911 cells) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Auckland, New Zealand) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France), GlutaMAX™ (Gibco) and antibiotics (Penicillin/Streptomycin at 100 µg/mL) at 37°C and 5% CO_2. Cells were split at 1/3 every 3 days[51].

For *ex vivo* MoDC stimulation assay, blood was obtained from healthy adult donors at the regional French blood establishment (EFS, Montpellier, France) as previously described[52].

Briefly, peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll-Histopaque® gradient (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Monocytes were purified by immunomagnetic positive selection on the basis of CD14+ expression (MACS system, Miltenyl Biotec). Purified CD14+ monocytes were cultured during 6 days at $2x10^6$ cell/ml in RPMI complemented with 10% FCS, 50 ng/ml of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and of 20 ng/ml of interleukin-4 (IL-4) (PeproTech, Neuilly sur Seine, France) (Mo-DC medium). Culture supernatant was renewed every 2 days. Mo-DC stimulations were performed after 6 days of differentiation in Mo-DC medium.

All GFP-expressing HAdV were produced and amplified in human embryonic kidney (HEK) 293 or 911 cells and purified by double banding on CsCl density gradients as previously described[51]. Vector purity typically reaches > 99%. HAdV concentrations (physical particles (pp)/ml) were determined as previously described[53]. GFP-expressing HAdV-D26 was kindly provided by Dr. Eric A Weaver (Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, USA)[54] and GFP-expressing HAdV-B35 by Andre Lieber (Department of Medicine & Pathology, Division of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, USA).

Adenovirus neutralization assays

For neutralizing antibody (NAb) titration tests, 911 cells were seeded at 10^5 cells/well in 24-well plate and left to attach for 1 h. Plasmas were diluted from 1:40 to 1:2160 and pre-incubated during 30 mins at 20°C with GFP-expressing-HAdV at a final concentration of 15, 100 or 500 pp/cell for HAdV-C5, B35 and D26 respectively. Since the seroprevalence of HAdV-B35 is very low worldwide, a pre-screening at 1:10, 1:100 and 1:1000 sample dilutions was performed to select positive samples. Samples alone, HAdV and medium were use as controls. Twofold dilutions of the HAdV of interest was systematically included in duplicate for each experiment to control the infectivity capacity of the vectors, going to 7.5 pp/cell to 250 pp/cell for HAd-C5, 400 pp/cell to 12.5 pp/cell for HAd-D26 and 1000 pp/cell to 31.2 pp/cell for HAd-B35. HAdV standards, controls and samples to test were cultured with 911 cells for 20 h at 37°C and 5% of CO_2. The next day, HER911 cells were trypsinized, washed (1200 RPM, 5 mins, 20°C), collected, centrifuged and resuspended into PBS + 10% FCS, + 2mM EDTA before testing for GFP expression by flow cytometry (FACScalibur®- BD Bioscience or NovoCyte ACEA®-Agilent). The NAb titers was quantified by identifying the sample dilutions that neutralize 50% of GFP+ cells. Data analyses were performed using the FlowJo software (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France).

Immune complexes formation and DC stimulation

Mo-DCs were plated at $6x10^5$/well in 400 µl final volume in 12 well plates. HAdV vectors (10^4pp)/cell) were incubated with plasma samples (10% concentration) in 50 µl final volume during 30 mins at room temperature. Vectors ± plasma, plasma alone, LPS (500

ng/ml), or Intravenous Immune Globulin (IVIG®) (Baxter SAS, Guyancourt, France) was added to the Mo-DC. IVIG® is a pool of IgG purified from 3.000 to 20,000 of North American donors and was used as a control to form immune complexes (IC). Because IVIG® has low NAb titer against HAdV-D26 and B35 **(data not shown)**, specific plasma samples were also used for the formation of IC, accordingly to their serological profiles: (C5+, D26- and B35-), (C5-, D26+ and B35-) and (C5-, D26- and B35+). Supernatants were collected after 14 h of culture and tested for TNF secretion by ELISA (OptEIA human TNF ELISA Kit) (BD Biosciences). The quantity of TNF secretion was estimated after subtracting the background noise of the HAdVs alone control conditions. Data showing the secretion of TNF by the Mo-DC were performed independently on several donors (n=3 to 6). For more accurate comparisons between HAdVs, experiments were performed simultaneously on Mo-DCs generated from the same blood donors, using 1000 pp/cell for all 3 HAdVs. The reading was taken at 450 nm using a Tecan Infinite® 200 PRO spectrophotometer.

Statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Prism 5 software. Statistical significances were determined using non-parametric Mann Whitney U test when two groups are compared and Kruskal Wallis Anova statistical test for multiples inter-group comparisons. The non-parametric Spearman test correlation test was used to evaluate the association between NAb titers and TNF levels (r_s (rho): Spearman rank correlation). Correlations test were performed with the online statistical tools for high-throughput data analysis (STHDA)[55]. p-values less than 0.05 are noted with a star.

Results

NAb titers for HAdV-C5, HAdV-D26, and HAdV-B35.

We first evaluated the prevalence NAb from healthy donors from Burkina Faso, the Republic of Chad, and France (**Figure 1).** Consistent with previous reports, the majority (58-82%) of adults in all regions have NAbs for HAd-C5, with median titers of 643; 521 and 591 for Burkina Faso, the Republic of Chad and France, respectively. For HAd-D26, a significant number (64-85%) of individuals from Burkina Faso and the Republic of Chad have specific NAb, while we found no sample with more than very low NAb titers in the French cohort (median titers were 407; 333 and 30 for Burkina Faso, the Republic of Chad and France, respectively). In contrast, no sample showed a significant amount of NAb for HAdV-B35 for all cohorts tested.

To generate a more nuanced evaluation, individual NAb titers were divided into 3 categories: < 99 (negative to very low titers); 100-999 (medium titers) and ≥ 1000 (high titers). For HAdV-C5, 55.2% of the samples from Burkina Faso had titers ≥ 100, and among them, 30% had very high titers **(Figures 2A & 2B)**. For the Republic of Chad, 63% of the samples had titers ≥100 and 22% were above 1000. In France, 66% of the population had NAb titers ≥ 100 and about 18% had very high NAb titers. For HAd-D26, around 48% of the samples had NAb titers ≥ 100 in Burkina Faso and the Republic of Chad, compared to only 4% for France. In addition, around 13% of the samples had very high NAb titers for HAd-D26, but for the sub-Saharan cohorts only. The seroprevalence rates were as follows when considering seropositivity NAb threshold ≥ 100: HAdV-C5 - 55% (143/261) and HAd-D26 - 48% (126/261) for Burkina Faso; HAdV-C5 - 63% (29/46) and HAdV-D26 - 48% (22/46) for the Republic of Chad, in comparison to HAdV-C5 - 66% (33/50) and HAdV-D26 4% (2/50) for the French cohort **(Figure 2B)**.

If the positivity threshold were reduced to 20, the seroprevalence rate stood as follows HAdV-C5 - 68% (178/261) and HAd-D26 - 69% (180/261) for Burkina Faso; HAd-C5 - 80% (37/46) and HAdV-D26 - 85% (39/46) for the Republic of Chad and HAdV-C5 - 70% (5/50) and HAdV-D26 10% (5/50) for France. For HAdV-B35 we found no positive samples with a positivity threshold ≥ 100, and a seroprevalence rate below 6% for all samples tested when the positivity threshold ≥ 20 **(data not shown)**. The **Figure 2C** shows the distribution of NAb titers among positive samples (NAb titers ≥ 20) of healthy adults and

children from Burkina Faso. The distribution was stratified into four categories as follows: low (20-99), medium (100-499), high (500-999) and very high (>1000) NAb titers. We observe that the majority of the samples exhibited high (9%) or very high (44%) NAb titers for HAd-C5 (54% total), while most of the people had moderate (41%) and low (30%) NAb titers for HAd-D26 (71% total). However, the percentage of positive samples with NAb titers to HAd-D26 ≥ 500 was close to 30%, and those with NAb titers ≥ 1000 reached almost 20%.

Correlation between NAb titers for HAd-C5 and HAd-D26, gender or age groups among healthy adults and children from Burkina Faso.

To better understand the natural history of HAdVs infections among sub-Saharan populations, we explored possible relationships between the seroprevalence of the different HAdVs and several biological characteristics of the study cohorts. A correlation study was conducted to establish whether HAdV-C5 NAb-positive plasma were associated with HAdV-D26 seropositivity or vice versa (titers ≥100). We found no correlations between single or double-positive groups for HAdV-C5 and HAdV-D26 NAbs titers **(Figure S1A)**. We next examined whether there was a correlation between virus seroprevalence and gender **(Figure S1B & C).** NAb titers were divided into negative or very low (0-99), low (100-499), medium (500-999) and high (≥1000). No differences in medians NAb seroprevalences or in the titers distribution reached statistical differences between genders. The comparison of NAb seroprevalence between different age groups also does not indicate differences regarding the rate of seropositivity **(Figure S2A)** or the average NAb titers of positive samples (NAb titre ≥20) **(Figure S2B)**.

Impact of NAb seroprevalence on DC activation.

To evaluate the impact of pre-existing humoral immunity directed against HAdV on the activation of the immune response, we challenged MoDC with serum containing NAb and the respective HAdV. We previously showed that plasma containing NAb for HAdV-C5 will lead to the formation of IC with the virus (IC-HAdV) and activate MoDC. The mechanism leading to MoDC activation was associated to the DNA pattern recognition receptor AIM2 (absent in melanoma 2) after efficient internalizion and aggregation of IC-HAdV[56,57].

MoDC activation/maturation was here evaluated by quantifying TNF secretion. We divide plasma samples into cohorts according to their serological profiles: single positive (HAdV-C5+/HAdV-D26-) and (HAdV-C5-/HAdV-D26+), double positive (HAdV-C5+/HAdV-D26+) and double negative (HAdV-C5-/HAdV-D26-). We ensured that plasmas had both comparable sampling and average NAb titles. Plasmas were pre-incubated with HAdV-C5 or HAdV-D26 at identical viral load then added to MoDCs. The single-positive group (HAdV-C5+/HAdV-D26-) induced significantly higher production of TNF with HAdV-C5 compared to HAdV-D26, whereas the opposite was observed with the group (HAdV-C5-/HAdV-D26+) (**Figure 3A)**. The double-positive group (HAdV-C5+/HAdV-D26+) induced significantly higher TNF production for both vectors in comparison to the double-negative cohort (HAdV-C5-/HAdV-D26-). In addition, TNF production rates for a given virus were comparable regardless of the serological profile of the other virus.

We then performed linear regression analyses to examine the association between NAb titers and the level of TNF production in the presence of HAdVs **(Figure 3B)**. By including samples negative for one or both viruses, we observed a moderate and comparable correlation between the NAb titer and the TNF production for both virus (r_2: 0.62 for HAdV-C5 and 0.58 for HAdV-D26). We then estimated the average production of TNF by DC, pre-incubated with each serum individually, and independently of their serological profile. For a more pertinent comparison between HAdVs, samples were incubated with DCs generated with the same donor. This approach gives an overall estimate of the general population's immune response against the different HAdVs. Combined plasma from the adult and pediatric population in Burkina Faso activated Mo-DC more strongly when preincubated with HAdV-C5 compared to HAdV-D26 or HAdV-B35 (**Figure 3C)**. The average TNF secretion level was with highest with HAdV-C5, following by HAdV-D26 and HAdV-B35, respectively. In addition, MoDC activation was significantly higher for HAdV-D26 compared with HAdV-B35. By contrast, DC activation with sera from France (n = 15) was modest with HAdV-D26 and HAdV-B35 compared to HAdV-C5 **(data not shown)**.

HAdVs seroprevalence and DC activation according to clinical HIV status

To determine whether the HIV status affected the seroprevalence of HAdVs in sub-Saharan countries we first evaluated the mean NAb titers of HIV+ populations versus healthy populations. For samples collected in Burkina Faso, the mean HAdV-C5 NAb titers

was significantly higher only for HIV+ plasma. However, for the Republic of Chad, mean NAb titers were considerably higher for the three HAdV tested, with approximately twice the level for the HIV+ cohort, exceeding those from Burkina Faso. **Figure 4B** shows that the rate (NAb titer ≥ 100) for people living with HIV in the Republic Chad reached 91% (42/46) for HAdV-C5, 89% (41/46) for HAdV-D26 and 24% (11/46) for HAdV-B35, compared to 63% (29/46), 48% (22/46) and 0%, respectively **(Figure 2B)**. With a threshold of ≥20, the seroprevalence for HAdV-B35 was 39.3% (18/46) for the HIV-positive population versus 6% (7/46) for the cohort **(data not shown)**. In addition, we found an elevated proportion of the HIV-positive samples containing high NAb titers (≥ 1000) for both HAdV-C5 52% (25/46) and HAdV-D26 39% (18/46) compared to the HIV- cohort **(Figure 2A)**.

We then estimated the correlation between NAb titers and TNF production by MoDC for samples collected from people living with HIV and the general population in the Republic of Chad **(Figure 4C)**. In concordance with what we observed for Burkina Faso, we found a positive but moderate correlation between NAb titers and the TNF production with low p-value. Correlations were always slightly better for HAdV-C5 compared to HAdV-D26, regardless of HIV status. Finally, **Figure 4D** we compared the ability of various cohorts to activate DC according to their HIV serology. No significant differences were observed between cohorts based on the HIV serological profile, whatever the HAdV tested. However, we observed that plasmas incubated with HAdV-C5 or HAdV-D26 activated MoDCs to a higher average extent compared to HAdV-B35, regardless of the HIV status of the samples. No significant difference was found between HAdV-C5 and HAdV-D26. For HAdV-B35, only the HIV-negative cohort reached a significant variation with HAdV-D26. Finally, TNF production showed ~3-fold higher secretion rates with samples from the Republic of Chad compared to Burkina Faso, regardless of HIV serology profile and for all three HAdVs tested. **(Figure 3C)**.

Discussion

Forty years of basic and clinical research, improved theoretical knowledge, advances in genetic modification techniques, and significant funding have facilitated the design of vaccines [58,59]. As a result, several vaccines derived from HAdVs are naturally competing in the race for SARS-CoV-2 vaccination[60–62]. However, we emphasize in this work that the choice of HAdV-derived vaccines, whether for COVID-19 or for the control of any pathogens, must be made judiciously (Eric J. Kremer Mol ther 2020 error citation).

We are just beginning to understand the biological mechanisms that govern the interaction between pre-existing immunity and the effectiveness of HAdVs. In addition to fading the efficacy of the vaccine, the events of the STEP/Phambili trials from the HIV Vaccine Trials Network (HVTN) illustrates the need to take a number of precautions[63–65]. In brief, more than a decade ago, two clinical trials using a HAdV-C5-based HIV-1 vaccine were prematurely stopped due to ineffectiveness but also because they increased risk of HIV acquisition. This adverse event occurred predominantly in uncircumcised men exhibiting high NAb titers against HAdV-C5[66,67]. The biological and clinical explanations for such a situation are complex, but a relative consensus has emerged. Pre-existing adaptive humoral immunity to HAdV-C5 may induce a strong T cell response, which limit the efficacy of the vaccine and create a favorable environment for HIV infection by activating CD4+ effector memory lymphocytes with mucosal tropism[68] with susceptibility to HIV infection[21,69–73]. CD8 cross-reactivity induced by HAdV-C5-based HIV vaccines may also be contribute to this the process by influencing early viral evolution in newly infected recipients[74].

In this study, we observed HAdV-C5 seroprevalence at comparable rates reported in other sub-Saharan regions, especially in the Republic of Chad[44,47–49]. For HAdV-D26, limited information is available, in particularly for Africa. Our results are consistent with other studies showing a low seroprevalence of HAdV-D26 in France. Investigations performed on rural populations from Côte d'Ivoire, the Democratic Republic of Congo, the Central African Republic, and Uganda showed high prevalence and high genetic diversity among the HAdV-Ds species. This study also indicated that these populations frequently shed HAdV-Ds[75]. Authors also suggested that the fecal-oral nature of transmission, hygiene measures, nutrition and local infectious burden might play a role in HAdV-Ds susceptibility and shedding. The majority of seroprevalence studies on HAdV-D26 or -B35 were conducted by industrial laboratory to monitor the clinical applicability, immunogenicity and safety of these alternative HAdV in a context of vaccination strategies. Consistent with some of this work, we observed a higher seroprevalence for HAdV-D26 in sub-Saharan zones compared to developed countries. Also, in comparison to HAdV-C5, HAdV-D26 NAb titers were consistently lower[47–49,76]. One study, however, found very high NAb seroprevalence for HAdV-D26 in cohorts from Cameroun, similar or higher than HAdV-C5[46]. This work also highlights the discrepancy between studies regarding the

extent of seroprevalence for HAdV-D26 in African areas. Taken together, these studies showed that HAdV-D26 seroprevalence in sub-Saharan zone ranges from 45 - 88%. However, authors also generally showed that the proportion of people with a high NAb titer (≥1000) for HAdV-D26 was low (3.4% overall with a maximum of 6.3% in South Africa)[48,49,77]. Within our cohorts, we found relatively high proportion of samples with HAdV-D26 NAb titers above those anticipated to affect the performance of a HAdV-based vaccines **(Figure 2C)** with substantial number of samples had NAd > 4000 **(not shown)**. The percentage of samples having NAb titers ≥ 1000 was the highest (39%) for the HIV-positive cohort from the Republic of Chad. In addition, for neutralization assays, we infect 911 cells with varying loads of GFP-HAdV depending on the type used, which implies that more antibodies are needed to neutralize HAdV-D26 compared to HAdV-C5, leading to a possible underestimation of HAdV-D26 NAb titers.

HAd-B35 seroprevalence was low for all cohorts tested **(Figures 1A & 2A)**. Consistent with other studies, seroprevalence for all HAdVs were independent of the donor's gender[78,79]. For the pediatric population, findings on are sometimes contradictory, indicating either lower seroprevalence compared to adults[76], or in contract that infections occurred relatively early in life leading to waned seroprevalence with age[48,30,81] In this study, we found that the rate of NAb positivity increased with age, but the mean NAb titer among positive samples was equivalent between age groups **(Figures S2A & S2B)**.

HIV infections are generally high in sub-Saharan countries. In addition, HAdV infections are common in people with immunodeficiency[83] and can cause significant morbidity in sub-Saharan areas, especially for HAdV-Ds, principally isolated from immunocompromised individuals[82]. Asymptomatic HAdV carriage is also frequent in HIV-infected patients who are not on antiretroviral therapy. In South Africa, and Nigeria, HAdVs-associated pneumonia is an under-recognized cause of severe pneumonia in the pediatric population[85,86]. However, most studies conducted on HAdV-C5 and HIV status showed a comparable seroprevalence between HIV-infected and non-infected cohort, which remains constant over the course of the progression to AIDS[87–89]. For HAdV-D26 or HAdV-B35, the correlation between HIV status and NAb seroprevalence was rarely described. Older research showed that HAdV-B35 was preferentially isolated from immunocompromised patients with AIDS[90], but did not indicate significant seroprevalence variations in cohorts from United States or African zones, for both HAdV-D26 and HAdV-B35[49,87]. In China, however, HAdV-D26 seroprevalence was higher in the population at high risk for HIV infection than in the general risk cohort[79]. In our study, HAdV-C5 seroprevalence was significantly higher for the HIV-positive cohort compared to the general population in Burkina Faso. This observation was made for all HAdVs tested in the Republic of Chad **(Figure 4A)**. Despite numerous reports reflecting the importance of HAdV in AIDS patients, the opportunistic role of this virus is poorly documented and, in light of these data, may be underestimated in sub-Saharan Africa[91].

To better understand the consequences of a HAdV seroprevalence, we used an *ex vivo* model based on MoDC activation[21]. With this system, we show a coherent MoDC activation profile according to the cohorts HAdVs serological profiles **(Figure 3A)**. However, we noticed that some samples can occasionally respond strongly even though they display negative serology. This observation was confirmed by the moderate correlation observed between NAb titers of the samples and the level of MoDC activation **(Figure 3B)**. We hypothesize that non-NAb can form ICs and activate MoDC. It is established that HAdV-C5 humoral response is directed against multiple capsid components[92–95]. It was also suggested that NAbs induced by natural HAdV-C5 infection are largely directed to the fiber, whereas exposure to in a context of vaccination causes the production of NAbs mainly against non-fiber capsid components[96]. As NAbs induced by HAdVs natural infection commonly show poor cross-reactivity, we speculate that non-NAbs cross-reactivity against other types of HAdVs could be involved in MoDC activation, especially with Abs directed against the highly conserved hexon proteins.

Several extracellular proteins in plasma interact with HAdV and can increase uptake and activation of DC [97] (Chéneau C et al., Front Immuno, 2021). By quantifying TNF production by MoDCs we estimate the overall immune response for a given population. We hypothesize that the amount of TNF secreted reflects the activation of the host immune response and could therefore be indicative of vaccine efficacy. Inflammatory response induced by HAdV-D26 and HAdV-B35 are globally lower in comparison to HAdV-C5, which correlate with the average seroprevalence observed for these populations **(Figure 3C)**. However, the differences were less evident for samples collected in the Republic of Chad **(Figure 4D)**. For example, our analyses show similar TNF production for all three HAdVs for the cohort living with HIV. The amount of TNF secreted by MoDCs was also higher on average compared to Burkina Faso samples. These results are of concern because they do not fully reflect the HIV status of these populations. We presume the possibility of numerous cross-reactions, or the involvement of other factors linked to lifestyle, environment and infectious load, but also to genetic variations, which may modulate the expression of immunity genes[98] and consequently influence immune response to HAdVs-derived vaccines[99–101].

Will HAdV-D26 or HAdV-B35 based vaccines prime individuals for infection by HIV? In particular in sub-Saharan zones at the forefront of vaccination where HAdVs seroprevalence are poorly characterized. According to the vaccine manufacturers, there is no clinical evidence to date that pre-existing immunity influences or blunts the immunogenicity or toxicity of HAdV-D26- or HAdV-B35-derived vaccines, whether natural or vector-induced[29,102]. In addition, these vectors seem to bypass host pre-immunity to HAdV-C5[28]. These clinical observations evaluating the repeated administration of alternative HAdV-derived vaccines are of course encouraging, especially since some of these studies were conducted in African populations[103,104]. Authors of these studies

suggested that the major difference with HAdV-C5 could be explained by biological variations between HAdVs types, such as the receptors used[29,105].

Individuals with high HAdV-D26 seroprevalence are common in some sub-Saharan areas, with rates comparable to those of HAdV-C5. We found that plasmas + HAdV from members of these cohorts can activate DCs, especially with HAdV-C5 and HAdV-D26. We share the concerns about the use of HAdV vaccines in high HIV endemic populations[67]. The risk/benefit assessment of HAdV-derived vaccines must take into account HIV transmission. We recommend surveillance of HIV infections in populations with high HIV prevalence, and the use of other vaccine platforms if available.

Acknowledgments

We thank Mehdi Taleb, Sofia Salazar Arenas, Chloé Houques, Lucas August, Lumen Ishimwe, Aboudou Djobo, Marina Lavigne, Hiep Tran Coraline Cheneau, TT Phuong Tran, Karsten Eichholz, Karine Bollere et Jean Pierre Molès for reagents and technical help. We thank Thierry Gostan and Myriam Boyer for their help on statistical analyses and flow cytometry, respectively. We are grateful to Eric A Weaver and Andre Lieber for the kind donation of HAd-D26 and HAdV-B35 respectively.

Funding Statement

This study was supported by the University of Montpellier, the Pierre Fabre Foundation (grant n° 191755), the French national center of scientific research (CNRS), the National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University Hospital Complex "Le Bon Samaritain", the Muraz Center, the National Research Agency (ANR), The French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and Campus France.

1. Ehreth, J. The global value of vaccination. *Vaccine* **21**, 596–600 (2003).

2. Hui, C. *et al.* Interventions to Improve Vaccination Uptake and Cost Effectiveness of Vaccination Strategies in Newly Arrived Migrants in the EU/EEA: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* **15**, (2018).

3. Manfredo Vieira, S. *et al.* Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science* **359**, 1156–1161 (2018).

4. Zhao, J. *et al.* COVID-19: Coronavirus Vaccine Development Updates. *Front Immunol* **11**, 602256 (2020).

5. Karpiński, T. M., Ożarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Wolski, H. & Wlodkowic, D. The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines. *Theranostics* **11**, 1690–1702 (2021).

6. WHO. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (2021).

7. Zhu, F.-C. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet* **395**, 1845–1854 (2020).

8. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* **396**, 887–897 (2020).

9. Sadoff, J. *et al.* Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2034201.

10. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. & Ward, T. G. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **84**, 570–573 (1953).

11. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. & Abedi, M. R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* **20**, e3015 (2018).

12. Jönsson, F. & Kreppel, F. Barriers to systemic application of virus-based vectors in gene therapy: lessons from adenovirus type 5. *Virus Genes* **53**, 692–699 (2017).

13. Greber, U. F. & Flatt, J. W. Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annual Review of Virology* **6**, 177–197 (2019).

505 14. Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C. & Herzog, R. W. Immune Responses to
506 Viral Gene Therapy Vectors. *Mol Ther* **28**, 709–722 (2020).

507 15. Gregory, S. M., Nazir, S. A. & Metcalf, J. P. Implications of the innate immune
508 response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol* **6**, 357–374 (2011).

509 16. Schagen, F. H. E., Ossevoort, M., Toes, R. E. M. & Hoeben, R. C. Immune
510 responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of
511 strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**, 51–70 (2004).

512 17. Ahi, Y. S., Bangari, D. S. & Mittal, S. K. Adenoviral vector immunity: its
513 implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther* **11**, 307–320 (2011).

514 18. Segura, M. M., Alba, R., Bosch, A. & Chillón, M. Advances in helper-dependent
515 adenoviral vector research. *Curr Gene Ther* **8**, 222–235 (2008).

516 19. Fausther-Bovendo, H. & Kobinger, G. P. Pre-existing immunity against Ad
517 vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? *Hum Vaccin*
518 *Immunother* **10**, 2875–2884 (2014).

519 20. Tang, J. *et al.* Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid
520 proteins. *Virology* **350**, 312–322 (2006).

521 21. Eichholz, K. *et al.* Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated
522 Pyroptosis in Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog* **12**, e1005871 (2016).

523 22. Zaiss, A. K. *et al.* Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and
524 amplify the innate immune response. *J Immunol* **182**, 7058–7068 (2009).

525 23. Mennechet, F. J. D., Eichholz, K., Tran, T. T. P. & Kremer, E. J. [Anti-adenovirus
526 humoral immunity: impact on dendritic cell activation]. *Med Sci (Paris)* **33**, 582–585
527 (2017).

528 24. Baker, A. H. & Herzog, R. W. Did Dendritic Cell Activation, Induced by
529 Adenovirus-Antibody Complexes, Play a Role in the Death of Jesse Gelsinger? *Mol*
530 *Ther* **28**, 704–706 (2020).

531 25. Vitelli, A. *et al.* Chimpanzee adenoviral vectors as vaccines - challenges to
532 move the technology into the fast lane. *Expert Rev Vaccines* **16**, 1241–1252 (2017).

533 26. Ewer, K. J. *et al.* T cell and antibody responses induced by a single dose of
534 ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med* **27**, 270–
535 278 (2021).

536 27. Matsuda, K. *et al.* A replication-competent adenovirus-vectored influenza
537 vaccine induces durable systemic and mucosal immunity. *J Clin Invest* **131**, (2021).

538 28. Geisbert, T. W. *et al.* Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35
539 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against
540 ebolavirus challenge. *J Virol* **85**, 4222–4233 (2011).

541 29. Custers, J. *et al.* Vaccines based on replication incompetent Ad26 viral vectors:
542 Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment.
543 *Vaccine* (2020) doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.018.

544 30. Sadoff, J. *et al.* Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in Healthy
545 Adults by a Single Immunization of Ad26.RSV.preF in a Human Challenge Study. *J*
546 *Infect Dis* (2021) doi:10.1093/infdis/jiab003.

547 31. Baden, L. R. *et al.* Safety and immunogenicity of two heterologous HIV vaccine
548 regimens in healthy, HIV-uninfected adults (TRAVERSE): a randomised, parallel-
549 group, placebo-controlled, double-blind, phase 1/2a study. *Lancet HIV* **7**, e688–e698
550 (2020).

551 32. Stephenson, K. E. *et al.* First-in-human randomized controlled trial of an oral,
552 replicating adenovirus 26 vector vaccine for HIV-1. *PLoS One* **13**, e0205139 (2018).

553 33. Cox, F. *et al.* Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env
554 antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and
555 nonhuman primates against ZIKV challenge. *PLoS One* **13**, e0202820 (2018).

556 34. Pollard, A. J. *et al.* Safety and immunogenicity of a two-dose heterologous
557 Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccine regimen in adults in Europe
558 (EBOVAC2): a randomised, observer-blind, participant-blind, placebo-controlled,
559 phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* **21**, 493–506 (2021).

560 35. Dolzhikova, I. V. *et al.* Preclinical Studies of Immunogenity, Protectivity, and
561 Safety of the Combined Vector Vaccine for Prevention of the Middle East Respiratory
562 Syndrome. *Acta Naturae* **12**, 114–123 (2020).

563 36. Çuburu, N. *et al.* Adenovirus vector-based prime-boost vaccination via
564 heterologous routes induces cervicovaginal CD8(+) T cell responses against HPV16
565 oncoproteins. *Int J Cancer* **142**, 1467–1479 (2018).

566 37. Kopycinski, J. *et al.* Broad HIV epitope specificity and viral inhibition induced
567 by multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected
568 adults. *PLoS One* **9**, e90378 (2014).

569 38. Omosa-Manyonyi, G. *et al.* A Phase I Double Blind, Placebo-Controlled,
570 Randomized Study of the Safety and Immunogenicity of an Adjuvanted HIV-1 Gag-
571 Pol-Nef Fusion Protein and Adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef Vaccine in Healthy HIV-
572 Uninfected African Adults. *PLoS One* **10**, e0125954 (2015).

573 39. Fuchs, J. D. *et al.* Safety and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus
574 Serotype 35-Vectored HIV-1 Vaccine in Adenovirus Serotype 5 Seronegative and
575 Seropositive Individuals. *J AIDS Clin Res* **6**, (2015).

576 40. Callendret, B. *et al.* A prophylactic multivalent vaccine against different
577 filovirus species is immunogenic and provides protection from lethal infections with
578 Ebolavirus and Marburgvirus species in non-human primates. *PLoS One* **13**,
579 e0192312 (2018).

580 41. Ockenhouse, C. F. *et al.* Ad35.CS.01-RTS,S/AS01 Heterologous Prime Boost
581 Vaccine Efficacy against Sporozoite Challenge in Healthy Malaria-Naïve Adults. *PLoS*
582 *One* **10**, e0131571 (2015).

583 42. Kazmin, D. *et al.* Systems analysis of protective immune responses to RTS,S
584 malaria vaccination in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2425–2430 (2017).

585 43. Churchyard, G. J. *et al.* The safety and immunogenicity of an adenovirus type
586 35-vectored TB vaccine in HIV-infected, BCG-vaccinated adults with CD4(+) T cell
587 counts >350 cells/mm(3). *Vaccine* **33**, 1890–1896 (2015).

588 44. Mennechet, F. J. D. *et al.* A review of 65 years of human adenovirus
589 seroprevalence. *Expert Rev Vaccines* **18**, 597–613 (2019).

590 45. Vogels, R. *et al.* Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for
591 gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of
592 preexisting adenovirus immunity. *J Virol* **77**, 8263–8271 (2003).

593 46. Chen, H. *et al.* Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three
594 species of adenoviridae. *J Virol* **84**, 10522–10532 (2010).

595 47. Abbink, P. *et al.* Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare
596 serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* **81**,
597 4654–4663 (2007).

598 48. Mast, T. C. *et al.* International epidemiology of human pre-existing adenovirus
599 (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high
600 Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* **28**, 950–957
601 (2010).

602 49. Barouch, D. H. *et al.* International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5,
603 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* **29**, 5203–5209 (2011).

604 50. Nwanegbo, E. *et al.* Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral
605 serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the
606 United States. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**, 351–357 (2004).

607 51. Kremer, E. J., Boutin, S., Chillon, M. & Danos, O. Canine adenovirus vectors: an
608 alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol* **74**, 505–512 (2000).

609 52. Perreau, M. & Kremer, E. J. Frequency, proliferation, and activation of human
610 memory T cells induced by a nonhuman adenovirus. *J Virol* **79**, 14595–14605 (2005).

611 53. Mittereder, N. *et al.* Evaluation of the efficacy and safety of in vitro,
612 adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane
613 conductance regulator cDNA. *Hum Gene Ther* **5**, 717–729 (1994).

614 54. Weaver, E. A. & Barry, M. A. Low seroprevalent species D adenovirus vectors
615 as influenza vaccines. *PLoS One* **8**, e73313–e73313 (2013).

616 55. Alboukadel Kassambara. STHDA Statistical tools for high-throughput data
617 analysis. http://www.sthda.com/english/.

618 56. Perreau, M., Pantaleo, G. & Kremer, E. J. Activation of a dendritic cell-T cell axis
619 by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV
620 in T cells. *J Exp Med* **205**, 2717–2725 (2008).

621 57. Eichholz, K. *et al.* Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated
622 Pyroptosis in Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog* **12**, e1005871–e1005871 (2016).

623 58. Ramezanpour, B., Haan, I., Osterhaus, A. & Claassen, E. Vector-based
624 genetically modified vaccines: Exploiting Jenner's legacy. *Vaccine* **34**, 6436–6448
625 (2016).

626 59. Zhang, C. & Zhou, D. Adenoviral vector-based strategies against infectious
627 disease and cancer. *Hum Vaccin Immunother* **12**, 2064–2074 (2016).

628 60. Twomey, J. D. *et al.* COVID-19 update: The race to therapeutic development.
629 *Drug Resistance Updates* **53**, 100733 (2020).

630 61. Singh, R. *et al.* COVID-19: Current knowledge in clinical features,
631 immunological responses, and vaccine development. *FASEB J* **35**, e21409 (2021).

632 62. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **586**, 516–527
633 (2020).

634 63. Sekaly, R.-P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching
635 point for future vaccine development? *J Exp Med* **205**, 7–12 (2008).

636 64. Fauci, A. S., Marovich, M. A., Dieffenbach, C. W., Hunter, E. & Buchbinder, S. P.
637 Immunology. Immune activation with HIV vaccines. *Science* **344**, 49–51 (2014).

638 65. Pollara, J., Easterhoff, D. & Fouda, G. G. Lessons learned from human HIV
639 vaccine trials. *Curr Opin HIV AIDS* **12**, 216–221 (2017).

66. Duerr, A. *et al.* Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J Infect Dis* **206**, 258–266 (2012).

67. Buchbinder, S. P., McElrath, M. J., Dieffenbach, C. & Corey, L. Use of adenovirus type-5 vectored vaccines: a cautionary tale. *Lancet* **396**, e68–e69 (2020).

68. Benlahrech, A. *et al.* Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19940–19945 (2009).

69. Hu, H. *et al.* Preferential infection of human Ad5-specific CD4 T cells by HIV in Ad5 naturally exposed and recombinant Ad5-HIV vaccinated individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13439–13444 (2014).

70. Lemos, M. P. *et al.* The inner foreskin of healthy males at risk of HIV infection harbors epithelial CD4+ CCR5+ cells and has features of an inflamed epidermal barrier. *PLoS One* **9**, e108954 (2014).

71. Mennechet, F. J. D., Tran, T. T. P., Eichholz, K., van de Perre, P. & Kremer, E. J. Ebola virus vaccine: benefit and risks of adenovirus-based vectors. *Expert Rev Vaccines* **14**, 1471–1478 (2015).

72. Maxmen, A. Adenovirus antibodies assist HIV. *J Exp Med* **205**, 2688–2688 (2008).

73. Auclair, S. *et al.* Distinct susceptibility of HIV vaccine vector-induced CD4 T cells to HIV infection. *PLoS Pathog* **14**, e1006888–e1006888 (2018).

74. Boppana, S., Fiore-Gartland, A., Bansal, A. & Goepfert, P. Cross-Reactive CD8 T-Cell Responses Elicited by Adenovirus Type 5-Based HIV-1 Vaccines Contributed to Early Viral Evolution in Vaccine Recipients Who Became Infected. *J Virol* **94**, (2020).

75. Pauly, M. *et al.* High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. *Virol J* **11**, 25–25 (2014).

76. Thorner, A. R. *et al.* Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol* **44**, 3781–3783 (2006).

77. Ersching, J. *et al.* Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology* **407**, 1–6 (2010).

673 78. Zheng, X. *et al.* Seroprevalence of neutralizing antibodies against adenovirus
674 type 14 and 55 in healthy adults in Southern China. *Emerg Microbes Infect* **6**, e43–e43
675 (2017).

676 79. Zhang, S. *et al.* Seroprevalence of neutralizing antibodies to human
677 adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy
678 Chinese adults. *J Med Virol* **85**, 1077–1084 (2013).

679 80. Ghasemi, Y. *et al.* Serotype determination of adenoviruses in children with
680 respiratory infection. *Indian J Pediatr* **81**, 639–643 (2014).

681 81. Yang, W.-X. *et al.* Prevalence of serum neutralizing antibodies to adenovirus
682 type 5 (Ad5) and 41 (Ad41) in children is associated with age and sanitary
683 conditions. *Vaccine* **34**, 5579–5586 (2016).

684 82. Lion, T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised
685 patients. *Clin Microbiol Rev* **27**, 441–462 (2014).

686 83. Al-Herz, W. & Moussa, M. A. A. Survival and predictors of death among primary
687 immunodeficient patients: a registry-based study. *J Clin Immunol* **32**, 467–473
688 (2012).

689 84. Hierholzer, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol*
690 *Rev* **5**, 262–274 (1992).

691 85. Kolawole, O. M., Oladosu, T. O., Abdulkarim, A. A. & Okoh, A. I. Prevalence of
692 adenovirus respiratory tract and hiv co-infections in patients attending the
693 University of Ilorin, teaching hospital, Ilorin, Nigeria. *BMC Research Notes* **7**, 870
694 (2014).

695 86. Zampoli, M. & Mukuddem-Sablay, Z. Adenovirus-associated pneumonia in
696 South African children: Presentation, clinical course and outcome. *SAMJ: South*
697 *African Medical Journal* **107**, 123–126 (2017).

698 87. Kostense, S. *et al.* Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk
699 groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS* **18**, 1213–1216 (2004).

700 88. Sun, C. *et al.* Epidemiology of adenovirus type 5 neutralizing antibodies in
701 healthy people and AIDS patients in Guangzhou, southern China. *Vaccine* **29**, 3837–
702 3841 (2011).

703 89. Privatt, S. R., Bullard, B. L., Weaver, E. A., Wood, C. & West, J. T. Longitudinal
704 quantification of adenovirus neutralizing responses in Zambian mother-infant pairs:
705 Impact of HIV-1 infection and its treatment. *Vaccine* **37**, 5177–5184 (2019).

90. De Jong, PieterJ., Spigland, I., Valderrama, G. & Horwitz, MarshallS. ADENOVIRUS ISOLATES FROM URINE OF PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. *The Lancet* **321**, 1293–1296 (1983).

91. González-Muñoz G. Adenoviruses: Opportunist pathogens in HIV infection? 139–146 (2005).

92. Yu, B. *et al.* Characteristics of neutralizing antibodies to adenovirus capsid proteins in human and animal sera. *Virology* **437**, 118–123 (2013).

93. Sumida, S. M. *et al.* Neutralizing Antibodies to Adenovirus Serotype 5 Vaccine Vectors Are Directed Primarily against the Adenovirus Hexon Protein. *The Journal of Immunology* **174**, 7179–7185 (2005).

94. Hong, S. S., Habib, N. A., Franqueville, L., Jensen, S. & Boulanger, P. A. Identification of Adenovirus (Ad) Penton Base Neutralizing Epitopes by Use of Sera from Patients Who Had Received Conditionally Replicative Ad (Addl1520) for Treatment of Liver Tumors. *Journal of Virology* **77**, 10366–10375 (2003).

95. Bradley, R. R., Lynch, D. M., Iampietro, M. J., Borducchi, E. N. & Barouch, D. H. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J Virol* **86**, 625–629 (2012).

96. Cheng, C. *et al.* Differential specificity and immunogenicity of adenovirus type 5 neutralizing antibodies elicited by natural infection or immunization. *J Virol* **84**, 630–638 (2010).

97. Chéneau, C. & Kremer, E. J. Adenovirus-Extracellular Protein Interactions and Their Impact on Innate Immune Responses by Human Mononuclear Phagocytes. *Viruses* **12**, (2020).

98. Quach, H. *et al.* Genetic Adaptation and Neandertal Admixture Shaped the Immune System of Human Populations. *Cell* **167**, 643-656.e17 (2016).

99. Brinkworth, J. F. & Barreiro, L. B. The contribution of natural selection to present-day susceptibility to chronic inflammatory and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **31**, 66–78 (2014).

100. Çalışkan, M., Baker, S. W., Gilad, Y. & Ober, C. Host Genetic Variation Influences Gene Expression Response to Rhinovirus Infection. *PLOS Genetics* **11**, e1005111 (2015).

101. Zimmermann, P. & Curtis, N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clinical Microbiology Reviews* **32**, (2019).

739 102. Baden, L. R. *et al.* Assessment of the Safety and Immunogenicity of 2 Novel
740 Vaccine Platforms for HIV-1 Prevention: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* **164**,
741 313–322 (2016).

742 103. Anywaine, Z. *et al.* Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous
743 Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month
744 Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. *J Infect Dis*
745 **220**, 46–56 (2019).

746 104. Mutua, G. *et al.* Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccine
747 Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a
748 Phase 1 Randomized Clinical Trial in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis* **220**, 57–67 (2019).

749 105. Baker, A. T., Mundy, R. M., Davies, J. A., Rizkallah, P. J. & Parker, A. L. Human
750 adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor.
751 *Sci Adv* **5**, eaax3567–eaax3567 (2019).

752

Table 1

Regional Sample	Overall	Burkina Faso Bobo-dioulasso /Ouagadougou	Republic of Chad N'Djamena	France Montpellier
Number of Sample (%)	424 (100)	281 (66,3)	93 (21,9)	50 (11,8)
Sex, n (%, %)				
Male	154 (36,3)	107 (30,1)	35 (37,6)	12 (36)
Female	252 (59,5)	174 (69,9)	58 (62,4)	20 (26)
unknown	18 (4,2)	0	0	18 (38)
Age range,	7 month - 82 years	10 month - 82 years	7 month - 59 years	20 - 55 years
Mean Age	28,6 years	27,9 years	30,2 years	29,5 years
Age, year; n (%)				
(0-9)	48	37 (13,2)	11 (11,8)	0
(10-17)	51	49 (17,4)	2 (2,2)	0
(18-25)	100	62 (22,1)	21 (22,6)	17 (34)
(26-44)	131	78 (27,7)	43 (46,2)	10 (20)
(≥45)	75	55 (19,6)	15 (16,1)	5 (10)
Unknown	19	0	1 (1,1)	18 (36)
HIV status, n (%)				
Negative	358 (84,4)	261 (92,8)	47 (50,5)	50 (100)
Positive	66 (15,6)	20 (7,2)	46 (49,5)	0 (0)

Table 01: Demographics of study participants, sex, HIV status, age groups and geographic sites of samples locations

Figure 1

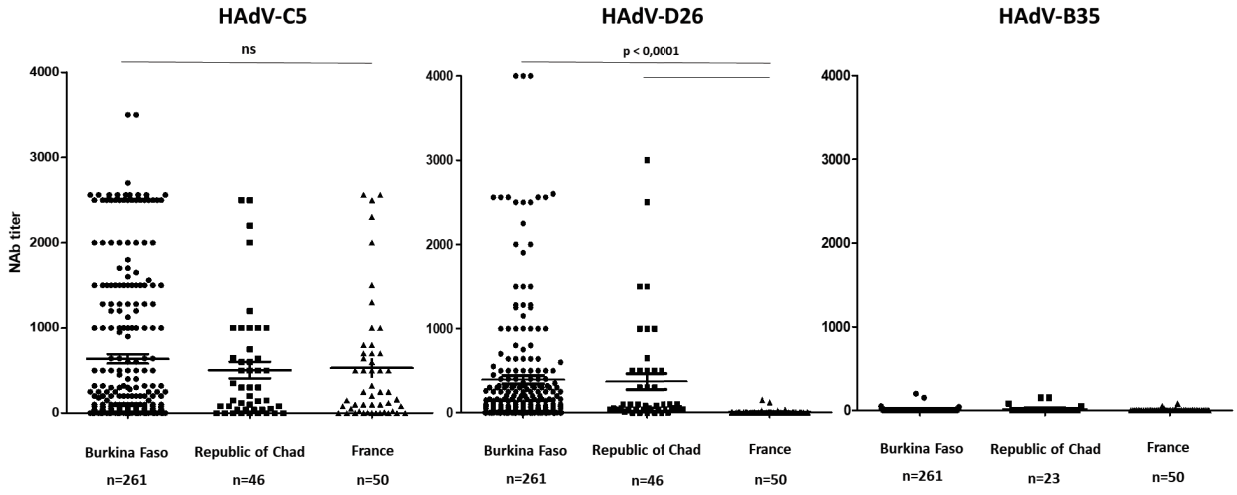


Figure 1: HAdV-C5, HAdV-D26, and HAdV-B35 NAb (bars: mean ± SEM) from healthy donors from Burkina Faso and the Republic of Chad in comparison to France. Comparisons were performed by Kruskal Wallis non-parametric Anova statistical test. Statistically significant differences (p-values) are shown above the figure. **ns**: non significant.

Figure 2

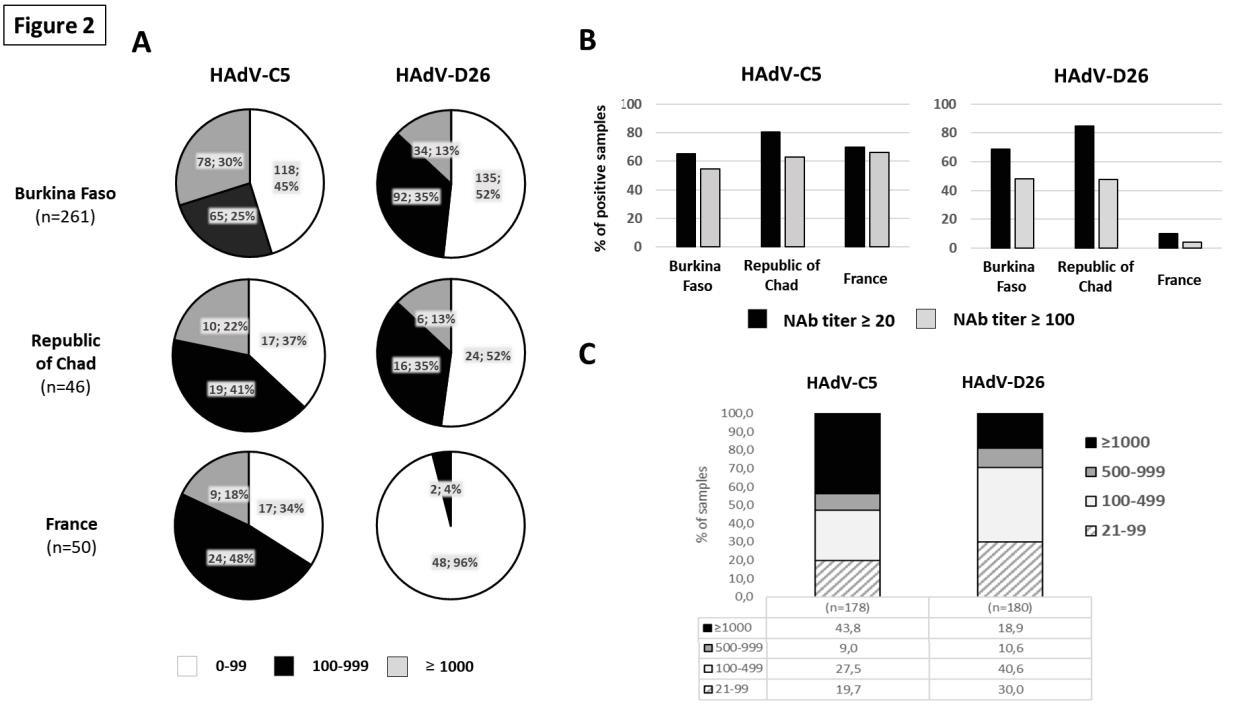


Figure 2: Distribution of HAdV-C5 and HAdV-D26 NAb titers in healthy donors from Burkina Faso, the Republic of Chad and France. **(A)** NAb titers were arbitrarily divided into the following categories: <100; 100-999 and ≥1000. **(B)** Percentage of positive samples according to the chosen positivity threshold. NAb titer ≥ 20 (black bars) or ≥ 100 (grey bars). **(C)** Distribution (percentage) of NAb titers for positive samples in Burkina Faso (positivity threshold ≥ 20). NAb titer was divided into 4 groups: low (20-99), medium (100-499), high (500-999) and very high (>1000).

Figure S1

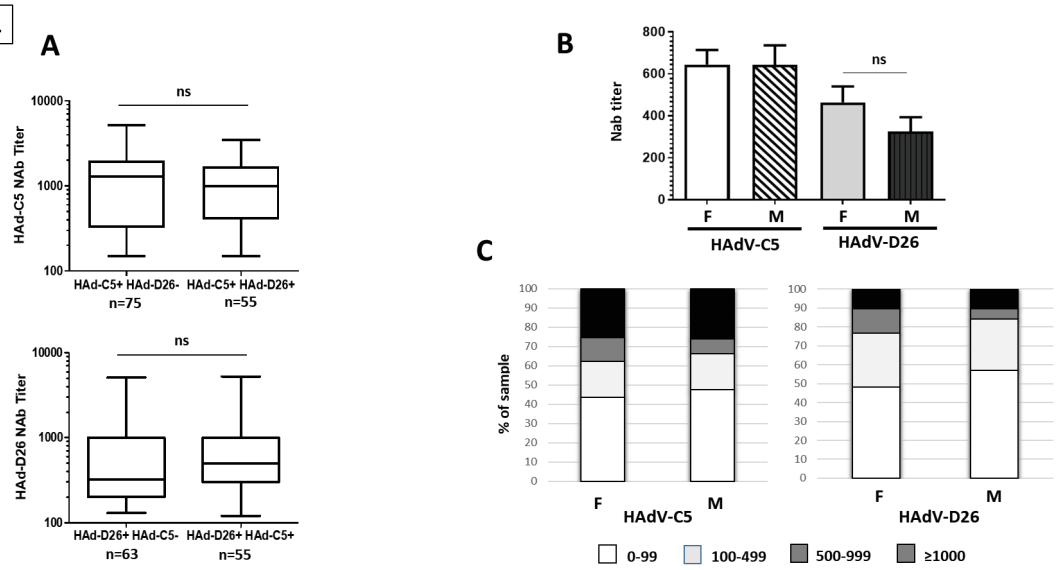


Figure S1: Overall HAdV-C5 and HAdV-D26 NAb titers among healthy donors from Burkina Faso according to **(A)** single- or double-positive groups (box-plots shows the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum titer levels) and **(B)** gender groups (mean with SEM). **(C)** Distribution of NAb titers among males (n=107) and females (n=154) groups. NAb titer was divided into 4 groups: negative (0-99), low (100-499), medium (500-999) and high (≥1000). Comparison was performed using the non-parametric Mann Whitney statistical test. **ns**: non significant.

Figure S2

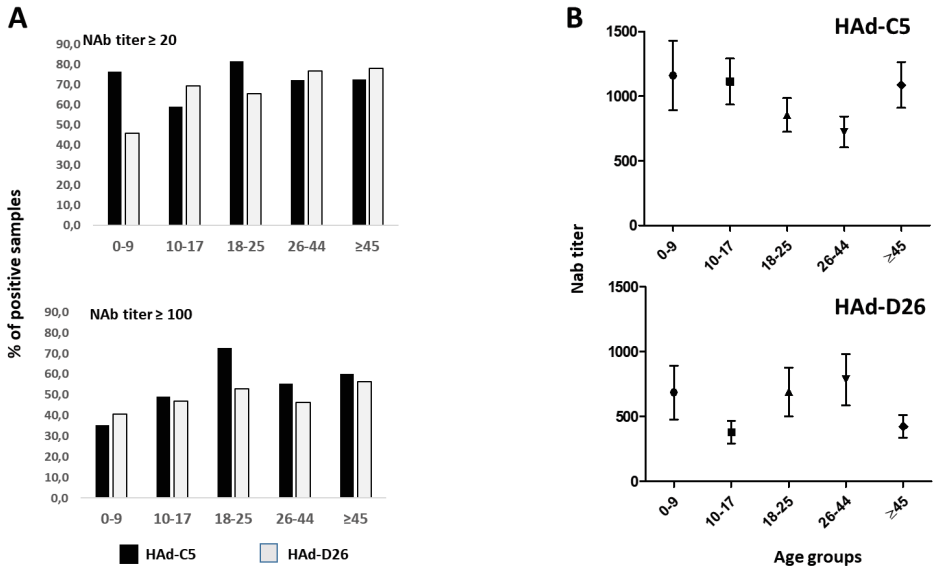
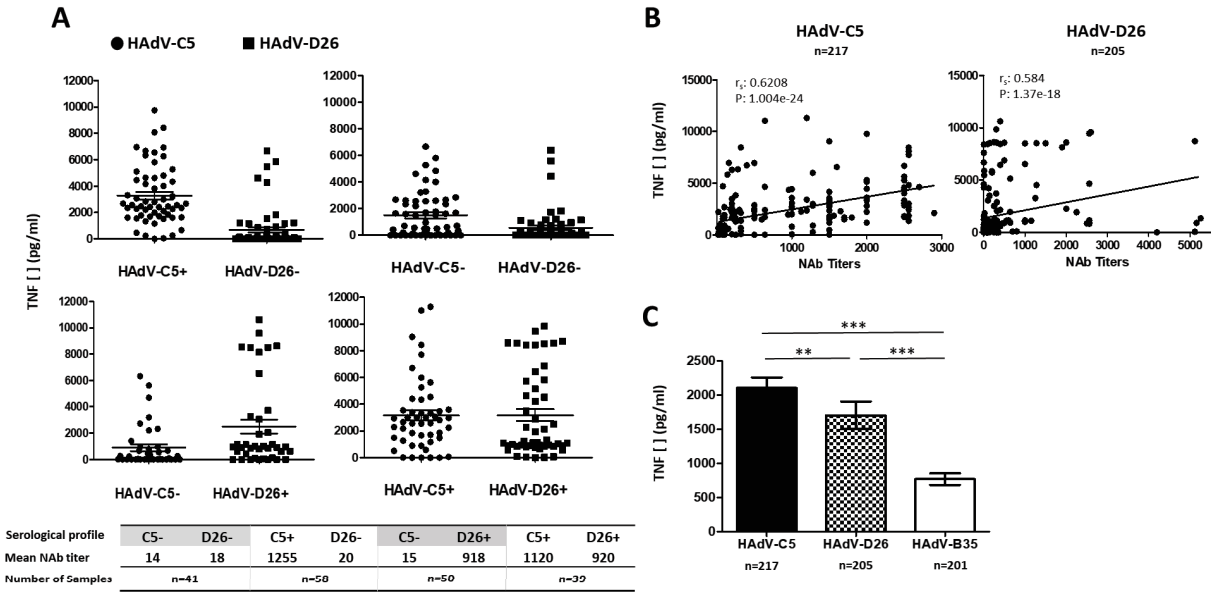


Figure S2: NAb seroprevalence against HAdV-C5 and HAdV-D26 among different age groups of healthy donors from Burkina Faso. **(A)** Percentage of positive samples among different age groups. Samples are positive when NAb titer ≥ 20 (Upper panel) or ≥ 100 (Lower Panel) for HAdV-C5 (bVlack bar) and HAdV-D26 (grey bar). **(B)** Mean NAb seroprevalence (mean ± range) among different age groups of healthy positive donors (NAb titer ≥ 20) from Burkina Faso. Comparisons were performed by Kruskal Wallis non-parametric ANOVA statistical test.

Figure 3



Serological profile	C5-	D26-	C5+	D26-	C5-	D26+	C5+	D26+
Mean NAb titer	14	18	1255	20	15	918	1120	920
Number of Samples	n=41		n=58		n=50		n=32	

Figure 3: *in vitro* Mo-DC activation by various serum cohorts from healthy donors from Burkina Faso, in presence of HAdV-C5, HAdV-D26 or HAdV-B35. **(A)** Individual and average (mean ± SEM) TNF secretion by DCs incubated with sera according of their NAb serology profiles (positivity: titers ≥ 100) in the presence of HAdV-C5 (●) or HAdV-D26 (■). **(B)** Correlation between NAb titers and TNF secretion. **(C)** Mean (with SEM) TNF secretion in presence of sera pre-incubated with HAdV-C5, HAdV-D26 or HAdV-B35. Comparisons were performed by Kruskal Wallis non-parametric ANOVA statistical test. Correlation were performed with the non-parametric Spearman test. r_s (rho) = Spearman rank correlation. In all cases, p-values of less than 0.05 were considered significant. *p < 0.05; ** p < 0.01; and *** p < 0.001.

Figure 4

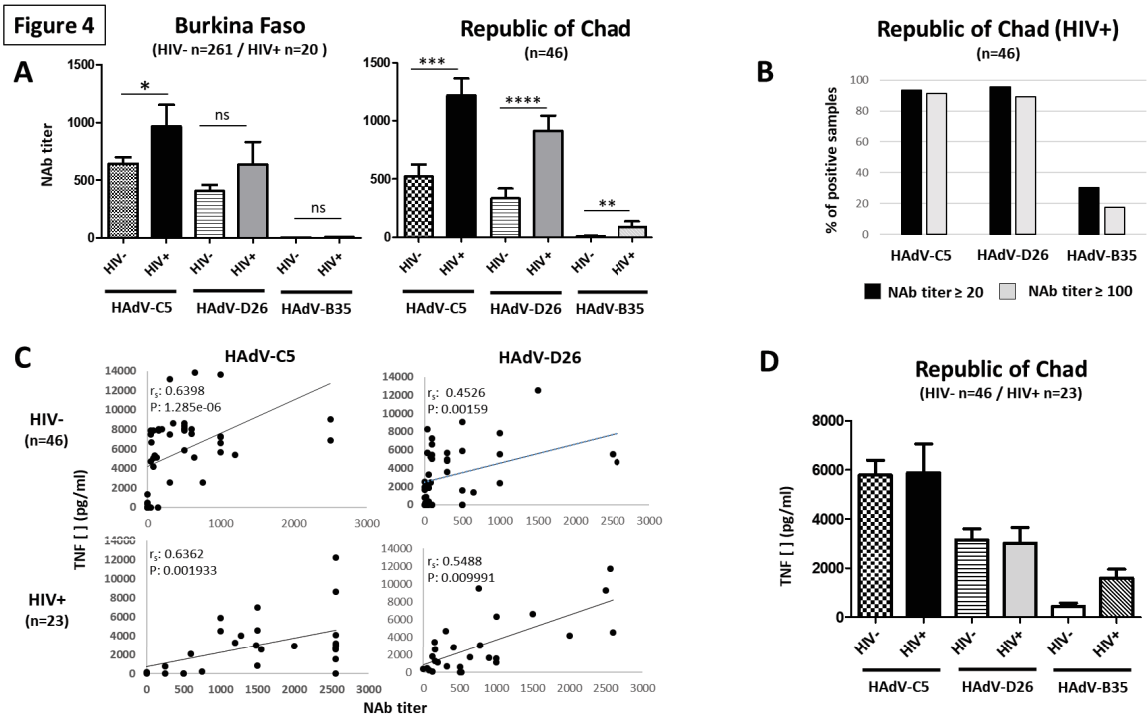


Figure 4. Overall HAdV-C5, HAdV-D26 and HAdV-35 NAb titers and TNF secretion by DC stimulated by plasma from healthy or HIV infected donors from Burkina Faso or the Republic Chad. **(A)** Mean (with SEM) NAb titers among HIV+ and HIV- populations. **(B)** Percentage of positive samples among HIV infected population in the Republic of Chad. Positivity ≥ 20 (black bars) or ≥ 100 (grey bars). **(C)** Correlation between NAb titers and TNF secretion and **(D)** mean (with SEM) TNF secretion among healthy or HIV infected cohorts from the Republic of Chad. Statistical analysis were made using Mann Whitney or Kruskal Wallis ANOVA non-parametric tests for comparisons between two or multiples groups, respectively. Correlation were made with the non-parametric Spearman test. r_s (rho) = Spearman rank correlation. In all cases, p-values of less than 0.05 were considered significant. **ns**: not significant, *p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 and **** p < 0.0001,

4) Article 2: Lactoferrin retargets human adenoviruses to TLR4 to induce an abortive NLRP3-associated pyroptotic response in human phagocytes

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 20 May 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.685218

Lactoferrin Retargets Human Adenoviruses to TLR4 to Induce an Abortive NLRP3-Associated Pyroptotic Response in Human Phagocytes

Coraline Chéneau[1‡], Karsten Eichholz[1†‡], Tuan Hiep Tran[1†‡], Thi Thu Phuong Tran[1†], Océane Paris[1], Corinne Henriquet[2], Jeffrey J. Bajramovic[3], Martine Pugniere[2] and Eric J. Kremer[1]*

[1] Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, Montpellier, France, [2] Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, Université Montpellier, Institut Régional du Cancer, Montpellier, France, [3] Alternatives Unit, Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, Netherlands

Despite decades of clinical and preclinical investigations, we still poorly grasp our innate immune response to human adenoviruses (HAdVs) and their vectors. In this study, we explored the impact of lactoferrin on three HAdV types that are being used as vectors for vaccines. Lactoferrin is a secreted globular glycoprotein that influences direct and indirect innate immune response against a range of pathogens following a breach in tissue homeostasis. The mechanism by which lactoferrin complexes increases HAdV uptake and induce maturation of human phagocytes is unknown. We show that lactoferrin redirects HAdV types from species B, C, and D to Toll-like receptor 4 (TLR4) cell surface complexes. TLR4-mediated internalization of the HAdV-lactoferrin complex induced an NLRP3-associated response that consisted of cytokine release and transient disruption of plasma membrane integrity, without causing cell death. These data impact our understanding of HAdV immunogenicity and may provide ways to increase the efficacy of HAdV-based vectors/vaccines.

Keywords: Lactoferrin, adenovirus, dendritic cell (DC), TLR4 (Toll-like receptor 4), IL-1β

OPEN ACCESS

Edited by:
Justin Pollara,
Duke University, United States

Reviewed by:
Ria Goswami,
Duke University, United States
Sunil Kannanganat Sidharthan,
Baylor College of Medicine, United States

****Correspondence:***
Eric J. Kremer
eric.kremer@igmm.cnrs.fr

†Present address:
Karsten Eichholz, Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, United States
Tuan Hiep Tran, Faculty of Pharmacy, PHENIKAA University, Hanoi, Vietnam, PHENIKAA Research and Technology Institute (PRATI), A&A Green Phoenix Group JSC, Hanoi Vietnam
Thi Thu Phuong Tran, Department of Life Sciences, University of Science and Technology of Hanoi Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

‡These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Viral Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *24 March 2021*
Accepted: *05 May 2021*
Published: *20 May 2021*

INTRODUCTION

The gaps in our understanding of our innate immune response to human adenovirus (HAdV)-based vaccines are significant. For example, following vaccine injection, how do the rapid recruitment of myeloid cells, release of danger-associated molecular patterns (DAMPs), and presence of host defense proteins/peptides (HDPs), influence the response to vector-encoded transgenes? How do these variables impact HAdV uptake and efficacy?

Here we addressed the impact of an HDP on three HAdV-based vaccine vectors. HDPs, also known as antimicrobial peptides (AMPs), are evolutionarily conserved effector molecules of the innate immune system. HDPs can act directly *via* antibiotic-like properties against a broad array of infectious agents (1, 2), or indirectly by promoting the activation and maturation of antigen-presenting cells. Many HDPs are

produced by neutrophils and epithelial cells of the skin, oral mucosa, and gastrointestinal tract. HDPs make up ~20% of the cytoplasmic content of neutrophils, which are among the first leukocytes to infiltrate pathogen-infected and vaccine-injected tissues (3). The rapid release of HDPs acts as part of the first line responders to the disruption of tissue homeostasis (4). Functionally, HDPs can neutralize endotoxin and recruit and modulate the activities of immune cells. The alarmins (e.g. lactoferrin, α-defensin, and cathelicidin LL-37) are a subset of HDPs that also modulate innate and adaptive immune responses by directly engaging several pathways including pattern recognition receptor (PRR) signalling in antigen-presenting cells (APCs) (1, 2). Lactoferrin, an 80 kDa multifunctional member of the transferrin family that sequesters iron, is produced primarily by neutrophils, and its physiological concentration can reach >1 mg/ml in some environments. Functionally, lactoferrin can induce dendritic cell (DC) maturation and, in the context of infections, drive Th1 responses (5–7).

In addition to their ability to directly influence innate and adaptive immune responses to bacteria, fungi, and enveloped viruses, some alarmins influence HAdV uptake (8–10). HAdVs are 150 mDa, ~90 nm diameter, nonenveloped proteinaceous particles containing a linear double-stranded DNA genome of ~36,000 (± 9,000) bp. HAdVs are classified into 7 species (A-G) and numerous types (> 100) based on serology and phylogeny. In most cases, HAdVs cause self-limiting respiratory, ocular, or gastro-intestinal tract infections in all populations regardless of health standards. Over the last 40 years the vectorization and immunogenicity of HAdVs have been of increasing interest in the context of vaccines, gene transfer, and morbidity associated with HAdV reactivation in immune-compromised individuals. The three HAdV types used in this study were chosen based on their state of development as vaccines (11–18). HAdV-C5, -D26 and -B35 are from different HAdV species, and are associated with different efficacy when used as vaccines. The *raison d'être* for the use of HAdV-D26 and -B35 is that their "low" seroprevalence (at least in European and North American cohorts) may circumvent some concerns associated with pre-existing HAdV humoral immunity (19). It is worth noting that HAdV-B35 seroprevalence is typically rare – whether this is due to the lack of infection or lack of production of type-specific antibodies is currently unknown. Attention to adenovirus immunogenicity has been further increased due to their use as vaccines during the COVID-19 pandemic (20).

In epithelial cells, alarmins influence HAdV uptake *via* multiple mechanisms. Lactoferrin acts as a bridging factor during species C HAdV (types 1, 2, 5 and 6) uptake in epithelial-like cells, independent of coxsackievirus adenovirus receptor (CAR), the primary cell surface attachment molecule for species C HAdVs (21). Adams et al. reported that lactoferrin enhances HAdV type 5 (HAdV-C5) uptake by human DCs (9) and increased maturation. However, a mechanistic understanding of how increased uptake occurs, how DC maturation is induced, and which PRRs are engaged is lacking.

In this study, we characterize the mechanism by which lactoferrin increases HAdV uptake and induces an innate response in human phagocytes. We show that lactoferrin binds HAdV-C5, -D26, and -B35 with affinities in the micromolar range and re-targets them to Toll-like receptor 4 (TLR4) complexes. TLR4-engagement induces NLRP3 inflammasome formation, release of the pro-inflammatory cytokine interleukin 1 beta (IL-1β) - but not cell death. This novel innate response is a variation of the alternative NLRP3 pathway (22). In addition to a better understanding of the immunogenicity of HAdV-based vaccines, our data resolve a discordance between the TLR4-associated response to HAdV in mice vs. that of human phagocytes (23, 24).

MATERIALS AND METHODS

Cells and Culture Conditions

Blood samples were obtained from >100 anonymous donors at the regional blood bank (EFS, Montpellier, France). An internal review board approved the use of human blood samples. DCs were generated from freshly isolated or frozen $CD14^+$ monocytes using CD14 MicroBeads human (MiltenyiBiotec) in the presence of 50 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and of 20 ng/ml interleukin-4 (IL-4) (PeproTech). DCs stimulation was performed 6 days post-isolation of monocytes. Monocyte-derived Langerhans cells (LCs) were generated using 200 ng/ml GM-CSF and 10 ng/ml TGF-β. 911 and 293 E4-pIX cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and minimum essential medium (MEMα) with Earle's salts, L-glutamine supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

Adenoviruses

The HAdV vectors used in this study are replication-defective (deleted in the E1 region). The HAdV-C5 vector contained a GFP expression cassette (25). The HAdV-D26 vector contained a GFP-luciferase fusion expression cassette (13). The HAdV-B35 vector contained a YFP expression cassette (26). The vectors were propagated in 911 or 293 E4-pIX cells and purified by two CsCl density gradients (25).

DC Stimulation With HAdV-Lactoferrin Complexes

DCs (4×10^5 in 400 µl of complete medium) were incubated with HAdV-C5, HAdV-D26 or HAdV-B35 (0.1 to 2×10^4 physical particles (pp)/cell). We generated HAdV-lactoferrin complexes by incubating the virus with 40 µg lactoferrin (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. This corresponds to 100 µg/ml (1.25 µM) lactoferrin in 400 µl. These concentrations were chosen to reproduce those found in an inflammatory environment of infected tissues. When specified, cells were complexed with IVIG (human IgG pooled from between 5,000 and 50,000 donors/batch) (Baxter SAS) or with lactoferricin (fragment of 49 aa). Cells were incubated with HAdV-lactoferrin for 4 h, then washed and incubated again for 24 h. The TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) and NLRP3 inflammasome inducer nigericin (InvivoGen) were used

at 100 ng/ml and 10 µM, respectively, to induce NLRP3 inflammasome formation. The inhibitors were used at the following concentrations, TLR4 inhibitors TAK-242 (Merck Millipore) at 1 µg/ml, oxPAPC (InvivoGen) at 30 µg/ml, TRIF inhibitory peptide (InvivoGen) at 25 µM, Syk inhibitor R406 (InvivoGen) at 5 µM, KCl (Sigma-Aldrich) at 40 mM, ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich) at 2 mM, cathepsin B inhibitor MDL 28170 (Tocris Bioscience) at 0.1 mM, NLRP3 inhibitor MCC-950/CP-456773 (Sigma-Aldrich) at 10 µM, Bay11-7082 (Sigma-Aldrich) at 10 µM, caspase-1 inhibitor WEHD (Santa Cruz) and YVAD (InvivoGen) at 20 µM, VX765 (InvivoGen) at 10 µM, caspase-8 inhibitor Z-IEDT at 20 µM, RIPK1 inhibitor GSK963 (Sigma-Aldrich) at 3 µM, RIPK3 inhibitors GSK872 (Merck Millipore) at 3 µM and necrosulfonamide (R&D systems) at 1 µM. TLR4/MD-2, TLR4 (R&D Systems), MD-2 (PeproTech) recombinant protein and anti-CD14 antibody (Beckman) were used at 20 µg/ml. Inhibitors were added on cells and recombinant proteins or antibody were added on HAdV-lactoferrin complex 1 h before stimulation.

Surface Plasmon Resonance Analyses

SPR analyses were carried out on a BIAcore 3000 apparatus in HBS-EP buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% (v/v) polysorbate 20, pH 7.4). HAdV-C5, HAdV-D26 and HAdV-B35 diluted in acetate buffer at pH 4 were immobilized on three different flow cells of a CM5 sensor chip by amine coupling according to the manufacturer instructions. Immobilization levels were between 3,500 and 4,000 RU. Flow cell 1, without immobilized HAdV, was used as a control. Lactoferrin was injected at 100 nM on the four flow cells simultaneously. For KD determination different concentrations of lactoferrin (6.25 - 200 nM) were injected at 30 µl/min during 180 s of association and 600 s of dissociation with running buffer. Regeneration was performed with pulses of gly-HCl pH 1.7. The kinetic constants were evaluated from the sensorgrams after double-blank subtraction with BIAevaluation software 3.2 (GE Healthcare) using a bivalent fitting model for lactoferrin. All experiments were repeated at least twice for each virus on a freshly coated flow cell.

Flow Cytometry

Cellular GFP or YFP expression from the HAdV-C5, -B35, -D26 vectors was assayed by flow cytometry. Fluorescence intensity was assessed at 24 h. TLR4 surface expression level was assessed with an anti-TLR4 antibody (Miltenyi Biotech) after 4 or 24 h. DC maturation at 24 h post-incubation was assessed by measuring CD86 surface expression level with an anti-CD86 antibody (clone 2331, BD Biosciences) or by measuring dextran (4.4 kDa) uptake (dextran TRITC, Sigma). Dextran was used at 1 mg/ml for 30 min at 37°C (or 4°C for negative control). Cells were washed and fixed with 4% PFA and fluorescence was directly analysed by flow cytometry. Cell membrane integrity was assessed by collecting cells by centrifugation 800 x g, the cell pellets were re-suspended in PBS, 2% FBS, 1 mM EDTA, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Becton-Dickinson Pharmigen) and analysed on a FACS Canto II (Becton-Dickinson Pharmigen) or NovoCyte (ACEA Biosciences) flow cytometer.

Inflammasome formation was monitored as previously described (27) with minor modifications. DCs (1.5 x 10^5 in 150 µl of complete medium) were seeded in a conical bottom 96 well plate and incubated with HDP-HAdV complexes containing 20,000 HAdV pp/cell. LPS/nigericin and immune complexed HAdV-C5 (IC-HAdV) were used as positive controls to identify inflammasome positive cells. IC-HAdV-C5 were prepared with IVIG (human IgG pooled from between 1,000 and 50,000 donors/batch) (Baxter SAS) as previously described (28). Cells were fixed by adding 50 µl 4% PFA, PBS for 10 min on ice and centrifuged at 650 x g for 5 min. Supernatants were discarded and cells were permeabilized with 150 µl PBS/3% FCS/0.1% saponin for 20 min and collected by centrifugation. Supernatant was removed, and cells were re-suspended in 100 µl 1:500 rabbit anti-ASC (N-15)-R (Santa Cruz, sc-22514-R) PBS/3%FCS/0.1% saponin and incubated overnight at 4°C. Following overnight incubation, cells were pelleted at 650 x g for 5 min, washed once with 150 µl PBS/3% FCS:0.1% saponin, pelleted again and incubated for 45 min in 100 µl 1:500 Alexa-488 1:500 donkey anti-rabbit PBS:3% FCS:0.1% saponin for 45 min at room temperature. Cells were collected again by centrifugation and re-suspended in 150 µl PBS/3% FCS/0.1% saponin. The BD FACS-Canto II was used for acquisition. Samples were gated on DC and any doublets were excluded using forward light scattering (FSC)-area versus FSC width. Inflammasome positive cells were identified in the green channel as FL1-width low, and FL1-height high.

Cytokine Secretion

Supernatants were collected 4 or 24 h post-challenge and the levels of TNF and mature IL-1β were quantified by ELISA using OptEIA human TNF ELISA Set (BD Biosciences) and human IL-1β/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D systems) following the manufacturer's instructions. In addition, 22 cytokines were detected by Luminex on Bio-plex Magpix using Bio-plex human chemokine, cytokine kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions.

LDH Release

LDH release was quantified using an LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo scientific) following the manufacturer's instructions. Briefly, 5 x 10^5 cells were cultures in 96-well plates, infected for 4 h, and 100 µl of supernatant were collected to assess LDH activity. Fresh reaction mixture (100 µl) was then added to each well, incubated at room temperature for 30 min, the reaction was stopped, and the absorbance was determined at 490 nm using a microplate reader (NanoQuant, Tecan).

Quantification of mRNAs

The levels of human *TNF*, *NLRP3*, *CASP1* and *IL1B* mRNAs were analysed using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Total RNAs were isolated from DCs using a High Pure RNA isolation kit (Roche). Reverse transcription was performed with a Superscript III first-strand synthesis system

(Invitrogen, Life Technologies) using 300 ng of total RNA and random hexamers. The cDNA samples were diluted 1:10 in water and analysed in triplicate using a LightCycler 480 detection system (Roche, Meylan, France). PCR conditions were 95°C for 5 min and 45 cycles of 95°C for 15 s, 65°C or 70°C for 15 s, and 72°C for 15 s, targeting the *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA as an internal standard. Primer sequences were as follows for *NLRP3* [5'-CCTCTC TGATGAGGCCCAAG-3' (NLRP3 forward) and 5'-GCAGCAAACTGGAAAGGAAG-3' (NLRP3 reverse)] at 65°C, *IL1B* (5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCC-3' (IL1B forward) and 5'-AAGATGAAGGGAAAGAAGGTGC-3' (IL1B reverse) at 65°C, *GAPDH* (5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3' (GAPDH forward) and 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3' (GAPDH reverse) at 70°C. Relative gene expression levels of each respective gene were calculated using the threshold cycle (2-ΔΔCT) method and normalized to *GAPDH* (28).

RESULTS

Lactoferrin Binds to HAdV-C5, -D26 and -B35 and Increases Uptake by DCs

At physiological pH, HAdV-C5, -D26 and -B35 have patches of negative charges in the hexon hypervariable regions that should potentiate cationic alarmin binding. We therefore quantified the affinity of human lactoferrin to each capsid by surface plasmon resonance (SPR). The HAdVs were immobilized on a CM5 sensor chip and then escalating doses of lactoferrin were injected over the sensor surfaces. We found that lactoferrin binds the three HAdVs with affinities (KD) that varied from 0.8 to 54 μM (**Figures 1A, B**) with a two-state association-dissociation reaction (**Figures S1A, B**).

In human myeloid and epithelial cells, HAdV-C5, -D26, and -B35 can use a range of receptors (29): HAdV-C5 predominantly uses CAR on epithelial cells and DC-SIGN (CD209) on DCs (30, 31); HAdV-D26 uses sialic acid-bearing glycans (32) and engage CD46 through a nonconventional interaction involving hexon (33); and HAdV-B35 predominantly uses CD46 (34). Of note, monocytes and DCs do not express detectable levels of CAR, all human cells have sialic acid-bearing glycans, and all nucleated human cells express CD46. We therefore tested the impact of lactoferrin on HAdV uptake using transgene expression from replication-defective vectors. Transgene expression was used as a surrogate assay for receptor engagement, internalization, cytoplasmic transport, docking at the nuclear pore, delivery of the genome to the nucleus, and transcription of the expression cassette. Because each HAdV type infects DCs with different efficacies, we chose a virus particle/cell ratio that generated approximately 30% of the cells expressing the transgene (see Material & Methods). Consistent with earlier reports (30), we found that lactoferrin increased ($p \leq 0.0001$) HAdV-C5 uptake by human DCs (**Figures 1C, D**). HAdV-D26- and -B35-lactoferrin complexes were also taken up more efficiently ($p \leq 0.0001$) than each HAdV alone (**Figures 1C, D**). Preincubating HAdVs with lactoferrin, adding lactoferrin to the cell medium before HAdV, or adding lactoferrin to the cell medium after the HAdVs, increased transgene expression (**Figure S1C**).

We previously showed that IVIG (pooled IgGs from >10,000 North American donors), which is rich in HAdV-C5 neutralizing antibodies, does not prevent infection of DCs by HAdV-C5 and, in some donors, induced greater uptake of HAdV-C5 (28, 35). To benchmark the effects induced by lactoferrin, we compared the HAdVs complexed with IVIG or lactoferrin. Globally, lactoferrin had a greater enhancing effect compared to IVIG (**Figure 1D**). As one of our long-term goals is to understand the innate response in a host with pre-existing HAdV immunity, we also combined lactoferrin and IVIG with each HAdV type. Our data demonstrate that IVIG abrogated of lactoferrin-enhanced uptake by HAdV-C5 and -D26 (**Figure 1D**). For the HAdV-B35-lactoferrin complex, the addition of IVIG induced a small decrease, which is consistent with the low seroprevalence of HAdV-B35 in North Americans (19). In addition to lactoferrin-enhanced uptake by DCs, we found that lactoferrin generally enhanced HAdV uptake by monocytes and monocyte-derived Langerhans cells ($p < 0.03$) (except HAdV-B35 in monocytes) (**Figures S1D, E**). These data demonstrate that, at physiological concentrations, lactoferrin binds to three HAdV types from different species and increased their uptake by phagocytes.

HAdV-Lactoferrin Complexes Induce Cytokine Secretion

By influencing virus uptake, alarmins could induce DC maturation and an inflammatory response which would affect downstream adaptive responses. Conversely, virus-alarmins interactions could reduce the ability of an APC to present antigens, and therefore dampen an adaptive response. To determine whether HAdV-lactoferrin complexes influence DC maturation, we performed a pilot cytokine profile screen using a multiplex array. Because each component of the complexes influences DCs, it was necessary to provide individual blanked baselines to understand the impact of the complex. Compared to mock-treated DCs, HAdV-D26 and -B35 induced a greater cytokine response than HAdV-C5 (**Figure 2A**, the group of four columns on the left). Compared to lactoferrin-treated DCs, HAdV-lactoferrin complexes increased the release primarily in IL-1α and IL-1β (**Figure 2A**, the second group of four columns). When comparing the HAdV vs. the HAdV-lactoferrin complexes, the addition of lactoferrin induced a general increase in several cytokines (**Figure 2A**, the three pairs of columns on the right). The more pronounced effect of lactoferrin on HAdV-C5, may be due in part to the lower effect of HAdV-C5 alone on DCs (for raw data see **Figure S2A**) and/or the greater affinity lactoferrin for the HAdV-C5 capsid (**Figure 1**).

We then quantified the release of mature IL-1β in the supernatant. The addition of lactoferrin-HAdV complex induced greater IL-1β release than each virus alone, which further increased from 4 ($p \leq 0.025$) to 24 h ($p \leq 0.02$) post-stimulation (**Figure 2B**). Monocytes, which generate relatively low levels of IL-1β, also released more when challenged with

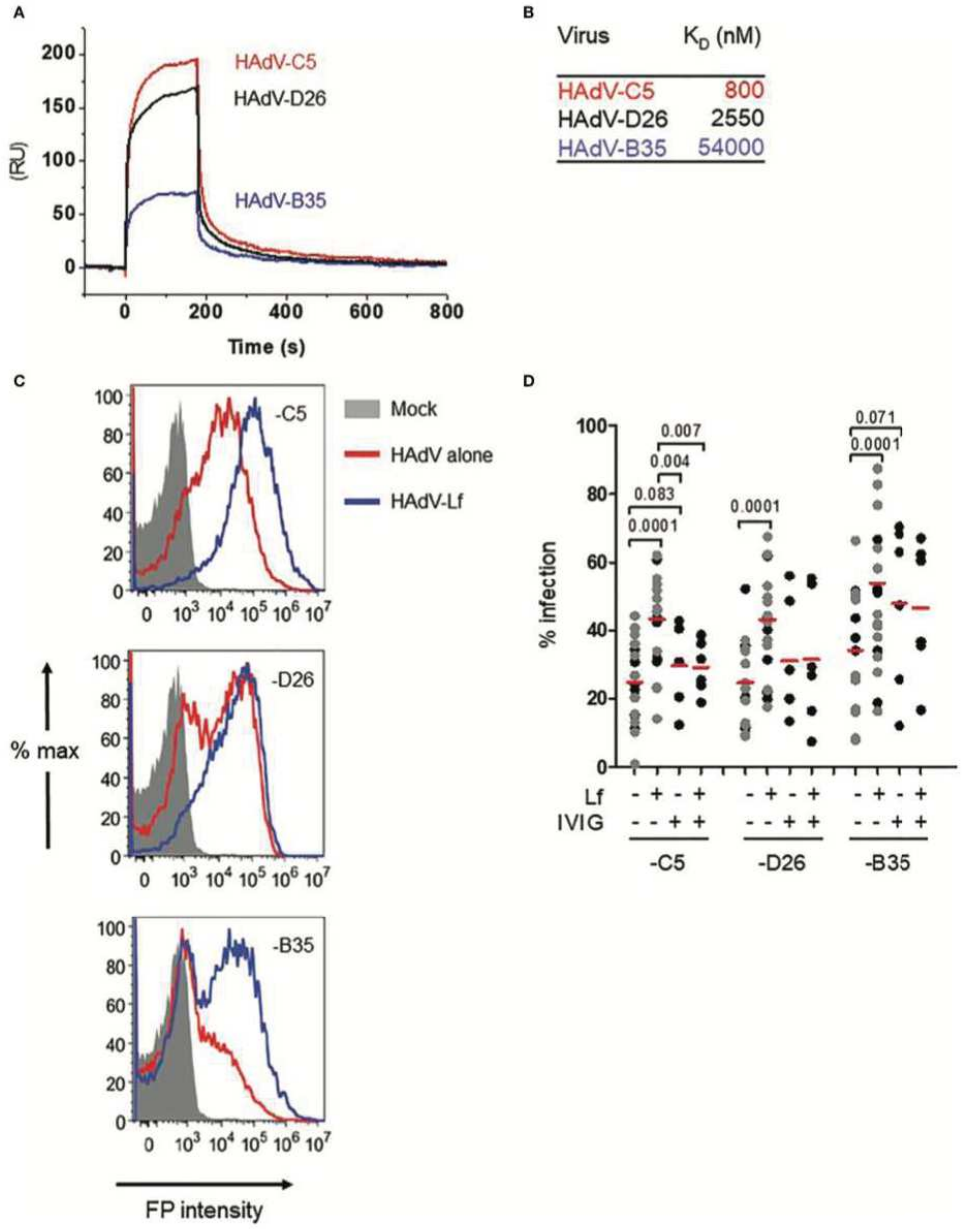


FIGURE 1 | Lactoferrin binds to HAdVs and enhances uptake by DCs. **(A)** Representative sensorgrams of lactoferrin binding to HAdV capsids as assessed by surface plasmon resonance: HAdV-C5 (red), HAdV-D26 (black), and HAdV-B35 (blue) were covalently coupled to the CM5 sensor chip and lactoferrin was injected for binding comparison. For KD determination a range of 6.25 - 200 nM of lactoferrin was injected and the KD was calculated using a bivalent fitting model (RU = resonance units); **(B)** Relative affinity (KD) of lactoferrin for HAdV-C5, -D26 and -B35 capsids; **(C)** Representative flow cytometry profiles of DCs incubated with the HAdVs. DCs were mock-treated (grey) or incubated with HAdV-C5 (5,000 physical particles (pp)/cell), -D26 (20,000 pp/cell) or -B35 (1,000 pp/cell) (red) or with lactoferrin (blue). The samples were collected 24 h later, prepared for flow cytometry and 25,000 events were acquired/sample. FP = fluorescent protein (GFP or YFP); **(D)** Cumulative data from DCs using HAdVs complexed with lactoferrin, IVIG or both. Statistical analyses by two-tailed paired t-test for comparison of HAdV *vs.* HAdV + lactoferrin (n = 21). A subset of these samples (n ≥ 5, in black) was used for analyses between HAdV + lactoferrin vs. HAdV+ lactoferrin +IVIG.

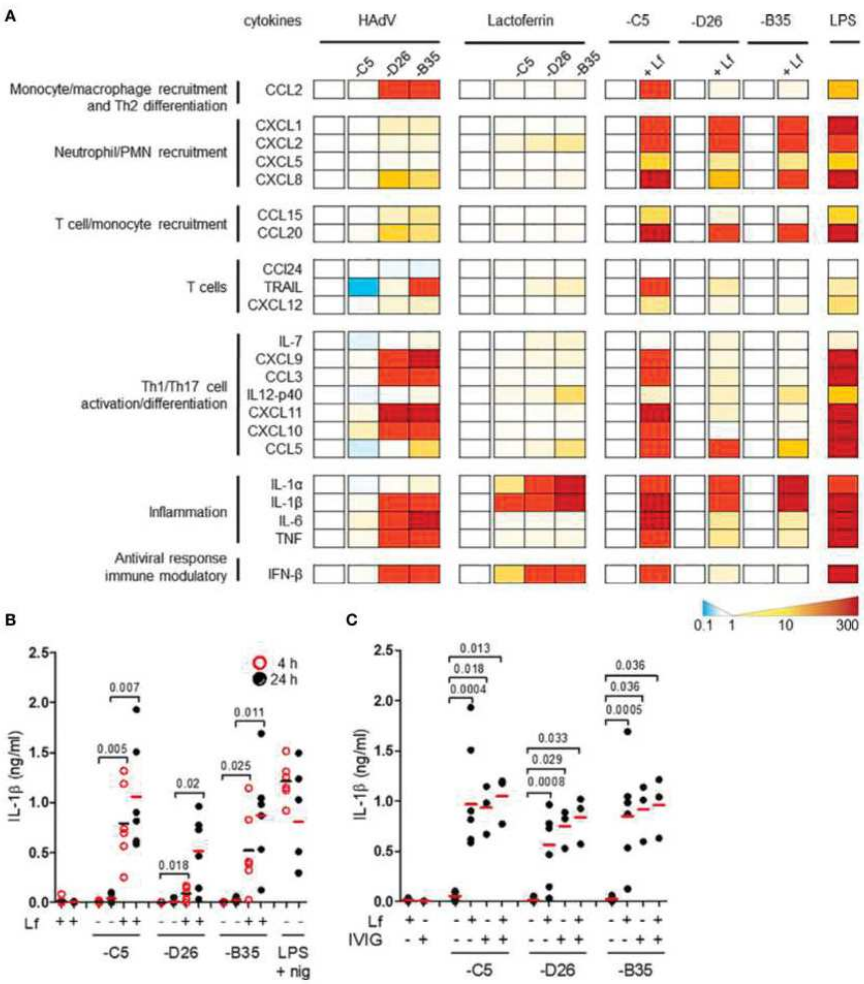


FIGURE 2 | HAdV-lactoferrin complexes induce IL-1α and IL-1β. **(A)** DCs were incubated with HAdV-C5, -D26, or -B35 ± lactoferrin for 4 h and cytokine secretion in supernatants was assessed by Luminex. To the left of each set of columns is the baseline reference set at zero. For the 4 columns on the left (HAdV), the baseline is mock-infected cells; for the middle columns (Lactoferrin) the baseline reference is lactoferrin-treated cells; for the "paired" columns on the right (-C5, -D26, and -B35) the reference is HAdV-infected cells compared to HAdV-lactoferrin infected cells. Raw data can be found in **Figures S2A, B**. LPS was used as a control; **(B)** IL-1β release by DCs in the presence of HAdV-C5, -D26, and -B35 ± lactoferrin was assessed by ELISA at 4 (red circles) and 24 h (black dots) post-incubation (n = 6, statistical analyses by two-tailed paired t-test). As a control, cells were treated with LPS and nigericin; **(C)** DCs were incubated with HAdV complexed with lactoferrin, IVIG or lactoferrin + IVIG, for 4 h. IL-1β release was analysed 24 h post-incubation (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

HAdV-D26-lactoferrin ($p < 0.023$) and HAdV-B35-lactoferrin ($p < 0.042$) compared with the HAdV alone, respectively (**Figure S2B**).

To benchmark the impact of lactoferrin, we compared it to the effect induced by IVIG. We found that IVIG and lactoferrin were similar in their ability to induce IL-1β release, and that when combined a trend toward an additive effect was apparent, suggesting a link to increased particle uptake (**Figure 2C**). Using a phenotypic (CD86 surface level) and functional (changes in phagocytic capacity) assays, we found that lactoferrin increased DC maturation (**Figures S2C, D**). Together, these data demonstrate that lactoferrin, a pleiotropic HDP, affects the innate immune response to HAdV-C5, -D26, and -B35.

TLR4 is Involved in HAdV-Lactoferrin Induced DC Maturation

We then hypothesized that lactoferrin-enhanced HAdV uptake was due to alternative receptor engagement because lactoferrin alone can increase DC maturation by interacting with TLR4 (5, 36–38). In some myeloid cells, TLR4 forms a complex with MD-

2 for ligand binding (39), and with CD14 for internalization (40). MD-2 acts as a co-receptor for recognition of exogenous and endogenous ligands (39, 41, 42). In addition, Doronin et al. proposed that HAdV-C5 interacts with murine TLR4 *via* a murine coagulation FX-bridge (23). Yet, human FX did not act as a bridge for HAdV-C5 *via* TLR4 on human DCs (24). To determine whether HAdV-lactoferrin complexes engage TLR4 on the cell surface, we incubated the HAdV-C5, -D26 and -B35 lactoferrin complexes with recombinant TLR4, MD-2, or TLR4/MD-2 dimers, or blocked CD14 on the cell surface with an anti-CD14 antibody. When using these protein-based assays, we found a reduction ($p \leq 0.045$) in the uptake of HAd-C5, -D26 and -B35 in the presence of the TL4/MD-2 dimer (**Figure 3A**). Recombinant TLR4 alone had no notable impact, the anti-CD14

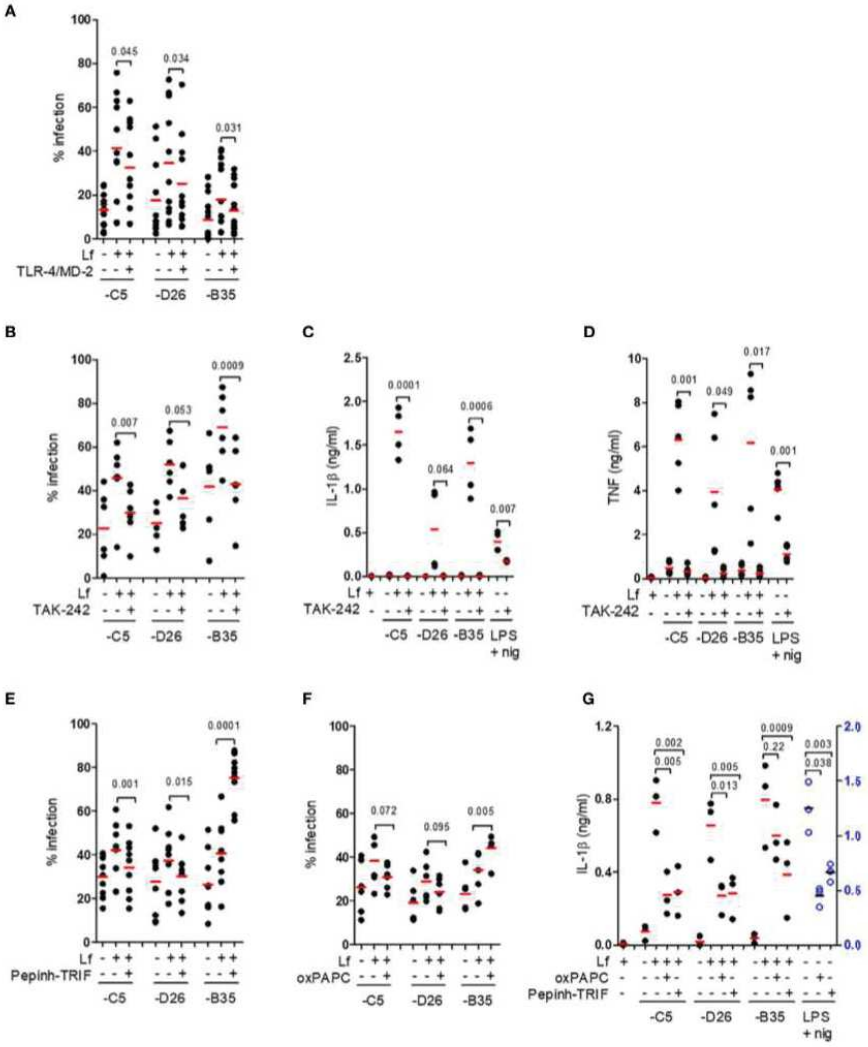


FIGURE 3 | TLR4 engagement and signalling involved in HAdV-lactoferrin DC uptake and maturation. **(A)** HAdV-lactoferrin complexes were incubated with recombinant TLR4/MD-2 for 30 min. and then added to DCs. Uptake was quantified 24 h post-incubation by flow cytometry (n =11, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(B)** DCs were pre-treated for 1 h with TAK-242, HAdV-lactoferrin complex uptake was analysed 24 h post-incubation by flow cytometry (n = 6, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(C)** IL-1β release following pre-treatment with TAK-242 (n ≥ 3 statistical analyses by t-test); **(D)** TNF levels 24 h post-incubation ± TAK-242 (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(E)** Percent infection following inhibition with Pepinh-TRIF in ≥ 6, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(F)** Percent infection following inhibition with oxPAPC (n ≥ 6, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(G)** IL-1β release from DCs incubated with HAdV-lactoferrin ± oxPAPC and Pepinh-TRIF (n = 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

antibody suggested a mild trend toward ($p \sim 0.1$) inhibition of uptake, whereas recombinant MD-2 inhibited ($p \leq 0.045$) only HAdV-D26 (**Figure S3A**).

To address the possible involvement of the cytoplasmic TLR4 tail, we used a cell-permeable cyclohexene-carboxylate (TAK-242), to disrupt interactions with the adaptor molecules TIRAP and TRAM (43–45). We found that TAK-242 reduced ($p \leq 0.007$) lactoferrin-enhanced uptake of HAdV-C5 and -B35, while its impact on -D26 was less prominent ($p \leq 0.053$) (**Figure 3B**). The impact of TAK-242 on IL-1β release (**Figure 3C**) mirrored the uptake assay: we found a reduction ($p \leq 0.021$) following incubation with HAdV-C5 and -B35 lactoferrin challenge, but less prominent (at least statistically) for -D26 ($p > 0.05$). Importantly though, in each case pre-incubation with TAK-242 reduced IL-1β levels to near background. As expected, TAK-242 also reduced ($p \leq 0.05$) TNF secretion (**Figure 3D**). Of note, the disruption of TLR4-TIRAP/TRAM interactions by TAK-242 did not impact lactoferrin-enhanced uptake by monocytes or Langerhans cells (**Figures S3B, C**), suggesting differences in TLR4 function between these cell types. We then addressed the role of the TLR4 complex using Pepinh-TRIF to prevent cytoplasmic TLR4 - TRIF interactions. We found that Pepinh-TRIF decreased ($p < 0.015$) uptake of HAdV-C5- and -D26-lactoferrin and, surprisingly, increased ($p < 0.001$) lactoferrin-HAdV-B35 uptake (**Figure 3E**).

To address the involvement of the extracellular TLR4 domain, we used oxPAPC to prevent TLR4 - MD2 interactions. While oxPAPC did not affect uptake of HAdV-C5- or HAdV-D26-lactoferrin complexes, oxPAPC increased ($p < 0.005$) HAdV-B35-lactoferrin uptake (**Figure 3F**). The impact of oxPAPC and Pepinh-TRIF on IL-1β release was more consistent and led to notable decrease ($p \leq 0.013$), except for oxPAPC on HAdV-B35 ($p > 0.2$) (**Figure 3G**). Of note, lactoferrin, TAK-242, and Pepinh-TRIF did not change TLR4 surface levels at most concentrations (**Figure S3D–F**), whereas oxPAPC increased TLR4 levels at the concentrations used in this study (**Figure S3G**).

In addition, lactoferrin is post-translationally cleaved to generate lactoferricin, a biologically active N-terminal fragment of 49 aa. Lactoferricin also binds to negatively charged hexon hypervariable regions (HVRs) of HAdV-C5, -A31 and -B35 (46). To determine whether lactoferricin could mimic the effects of lactoferrin, we incubated the former with the HAdV vectors. We found no notable increase in HAdV uptake or IL-1β release (**Figures S3H, I**), suggesting that the C-terminus of lactoferrin influences HAdV-TLR4 interactions. Together, these data demonstrate that interfering with TLR4 engagement/signalling reduces HAdV-lactoferrin-mediated transgene expression and DC maturation in the case of HAdV-C5 and -D26.

HAdV-Lactoferrin Complexes Induce NLRP3 Inflammasome Formation

The inflammasome is a multiprotein cytosolic platform consisting of a PRR that induces nucleation of ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) and recruitment of pro-caspase 1. Pro-caspase-1 auto-activation can be followed by removal of the N-terminus of gasdermin D (GSDMD), which initiates the loss of plasma membrane integrity *via* pore formation (47). Classic NLRP3 inflammasome formation (canonical and non-canonical) is preceded by transcriptional priming event (signal 1) needed to produce inflammasome components and cytokines (48). In human mononuclear phagocytes, TLR4 engagement by LPS can also induce an alternative NLRP3 inflammasome activation that does not need transcriptional priming (22). To determine whether HAdV-lactoferrin engagement of TLR4 induced transcription of inflammasome components, we used RT-qPCR to examine selective mRNAs. We found that in most cases HAdV-lactoferrin complexes increased *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, and *TNF* mRNAs compared to the HAdVs alone (**Figures 4A–D**).

During inflammasome formation, ASC changes from being distributed throughout the cytoplasm to an aggregate of ~1 μm diameter upon nucleation by NLRP3. ASC nucleation can be directly visualized by changes in the fluorescence pulse width

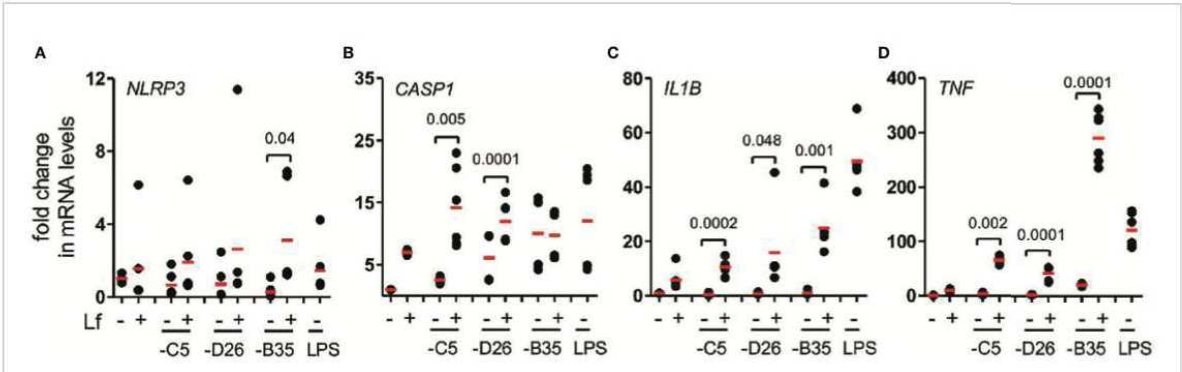


FIGURE 4 | HAdV-lactoferrin complexes induce IL-1β *via* an NLRP3 inflammasome mRNA levels of inflammasome components were analysed using qRT-PCR 4 h post-incubation. Total RNA was isolated from DCs and cDNA samples were analysed in triplicate. The GAPDH mRNA was used as an internal standard. **(A)** *NLRP3*; **(B)** *CASP1*, **(C)** (*IL1B* and **(D)** *TNF*; (n ≥ 3, statistical analyses were by two-tailed paired t-test).

ratio. While this flow cytometry-based assay does not allow quantification of all the cells that had, or will contain, an inflammasome, it does provide a semi-quantitative snapshot of inflammasome formation at a given time. In our hands, IVIG does not contain detectable levels of HAdV-D26 or -B35 neutralizing antibodies, while the titres of HAdV-C5 neutralizing antibodies are high and promote inflammasome formation in DCs. Therefore IgG-complexed HAdV-C5 was used as a benchmark. We found that ~1% of mock-treated DCs contained an inflammasome. LPS/nigericin and HAdV-C5-IVIG induced 5.2 and 3.4% inflammasome-positive cells, respectively [~40% of the DCs will undergo pyroptosis in 8 h when incubated with this concentration of HAdV-C5-IVIG (28)]. We found a ~25% increase in the number of inflammasome-positive DCs 3 h post-challenge with HAdV-C5-lactoferrin complexes (**Figure 5A**), consistent with increased IL-1β release following challenge with HAdV-C5-lactoferrin and suggestive of inflammasome formation.

IL-1β release is associated with both classic and alternative activation of NLRP3 inflammasomes. To try to identify the HAdV-lactoferrin-associated trigger(s), DCs were treated with KCl (to prevent K^+ efflux), NAC (a reactive oxygen species scavenger), or MDL (a cathepsin B inhibitor) (47). In our hands, the addition of extracellular K^+, NAC or MDL did not ($p > 0.07$) modify the release of IL-1β or lactoferrin-enhanced uptake (**Figures S4A, B**). When DCs were pre-incubated with R406 (which blocks MyD88-Syk interactions and interrupts the signalling between TLR4 engagement and NLRP3 inflammasome regulation), or Bay11-7082 [an NLRP3 inhibitor (49)], IL-1β release was reduced ($p \leq 0.036$) in response to HAdV-lactoferrin complexes (**Figure 5B**). While Bay11-7082 had no impact on lactoferrin-enhanced uptake, R406 reduced uptake of all HAdVs (**Figure 5C**), suggesting that MyD88-Syk signalling was necessary to enhance HAdV uptake.

We then inhibited the caspases that are involved in pyroptosis using Z-YVAD-FMK (caspase-1, -4 and -5), VX765 (caspase-1 and -4) or Z-IETD (capsase-8). Globally, all the inhibitors reduced IL-1β release to some extent (**Figures 5D, E**). In contrast to VX765 and Z-IETD, Z-YVAD-FMK also reduced ($p \leq 0.018$) lactoferrin-associated TNF secretion (**Figure 5F** and **Figure S4C**). The caspase inhibitors had no consistent effect on lactoferrin-enhanced uptake of the HAdVs (**Figure S4D**). In addition to the direct effects of TLR4 engagement and signalling, it was possible that TNF secretion induced an autocrine response and inflammasome activation *via* a RIPK1-RIPK3-caspase-8 pathway (50). Inhibition of the TNFR signalling using GSK963, necrosulfonamide, and GSK872 had no significant effect on uptake of the HAdVs (**Figure S4E**). By contrast, IL-1β release was reduced ($p \leq 0.026$) by necrosulfonamide during lactoferrin-enhanced uptake of HAdV-C5 and -B35 (**Figure 5G**). For combined analyses broken down by HAdV type see **Figure S4F–H**. Together, these data demonstrate that HAdV-lactoferrin complexes induced NLRP3 inflammasome formation and IL-1β release *via* the activation of the TLR4 pathway. Additionally, an autocrine effect of TNF receptor may influence IL-1β release.

IL-1β Release Without the Loss of Membrane Integrity

In contrast to classic NLRP3 inflammasome activation, the alternative pathway does not induce complete loss of cell membrane integrity (as based on L-lactate dehydrogenase (LDH) release) (22). This is thought to be due to ESCRT III pathway repairing pores in the plasma membrane induced by limited levels of GSDMD cleavage (51). To determine if HAdV-lactoferrin complexes induce pore formation and the release of large intracellular proteins, we quantified extracellular levels of LDH activity at 4 h postinfection and found no increase ($p > 0.5$) in any conditions (**Figure 6A**). To determine whether HAdV-lactoferrin complexes were able to have a long-term impact on DC membrane integrity, we added a fluorescent marker of viability (7-AAD) to the DCs and quantified fluorescent intensity by flow cytometry. At 24 h post-challenge, the percentage of 7-AAD^+ cells induced by HAdV-lactoferrin complexes was greater ($p \leq 0.024$) than lactoferrin- or HAdV-challenged cells (**Figure 6B**). Moreover, when lactoferrin was added to HAdV–IVIG complexes, we found a trend toward a further increase in the percentage of 7-AAD^+ DCs (**Figure 6C**). We concluded that while membrane integrity may be perturbed and allow uptake of small molecules, within the time frame of our assays cytosolic proteins are not released into the medium and therefore pyroptosis is not efficiently engaged or aborted.

DISCUSSION

Deconstructionist approaches using binary systems to understand HAdV receptor engagement, trafficking, and immunogenicity provide a foundation to understand virus-cell interactions. Using cell lines, which allow reproducibility but generate inherently biased results, also limits the clinical relevance that one would generate by using primary cells from a random cohort. Combinatorial assays using human blood components, in particular phagocytes, can generate insight into clinically relevant HAdV issues such as the induction of an innate immune response. Here, we show how an alarmin influences the response of human DCs to three HAdV types. We examined pathways from receptor engagement, signalling, transcription, inflammasome formation/activation and cytokine release.

Throughout our study HAdV-C5 and -D26 tended to have similar profiles in most assays, whereas -B35 was notably different. These differences may be attributed to the relative affinity of lactoferrin to the capsid (C5 > D26 > B35), or interaction with their respective panoply of receptors. In addition, work in T cells that shows CD46 primes the NLRP3 inflammasome and therefore a possible binary engagement through TLR4 and CD46 could impact the response to HAdV-B35-lactoferrin complexes (52). The breadth of the lactoferrin-enhanced uptake of the three HAdVs suggest that the interactions are charge based because of the significant differences in the HVR sequences, which make up much of the

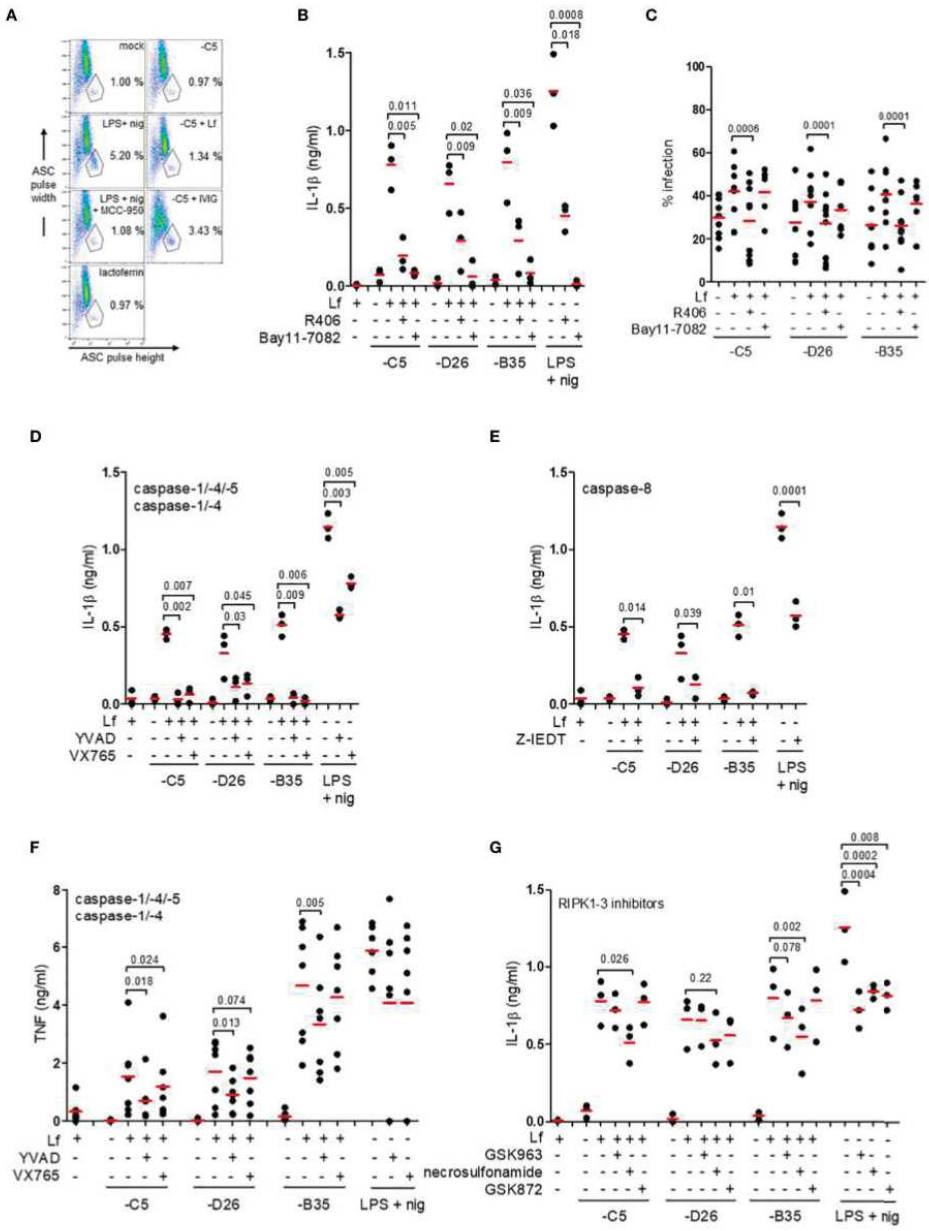


FIGURE 5 | IL-1β release *via* an NLRP3 inflammasome and caspase-1. **(A)** Flow cytometry-based assay for ASC aggregation (pyroptosome formation): inflammasome formation was induced by incubating DCs with HAdV-C5-lactoferrin complexes for 3 h. LPS + nigericin and HAdV-C5-IVIG complexes were used as positive controls to identify inflammasome-positive cells. MCC-950 was used to inhibit NLRP3 inflammasomes. Lactoferrin was used as a negative control. Cells were stained with anti-ASC antibodies. Inflammasome-positive cells were identified as ASC-width low and ASC-height high; **(B)** IL-1β release in response to HAdV-lactoferrin complexes: DCs were pre-treated with R406 and Bay11-7082. LPS/nigericin was used as a positive control (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test). **(C)** The percentage of infection of DCs by HAdV-lactoferrin complexes after pre-incubation of DCs with R406 and Bay11-7082. **(D)** Impact of caspase-1, -4, and -5 inhibition on IL-1β release. **(E)** Impact of caspase-8 inhibition on IL-1β release. **(F)** TNF release in response to HAdV-lactoferrin complexes in DCs pre-treated with YVAD or VX765. **(G)** IL-1β release in response to HAdV-lactoferrin complexes in DCs pre-treated with RIPK1-RIPK3 pathway inhibitors GSK963, necrosulfonamide or GSK872. N ≥ 3 in all assays. Statistical analyses by two-tailed paired t-test.

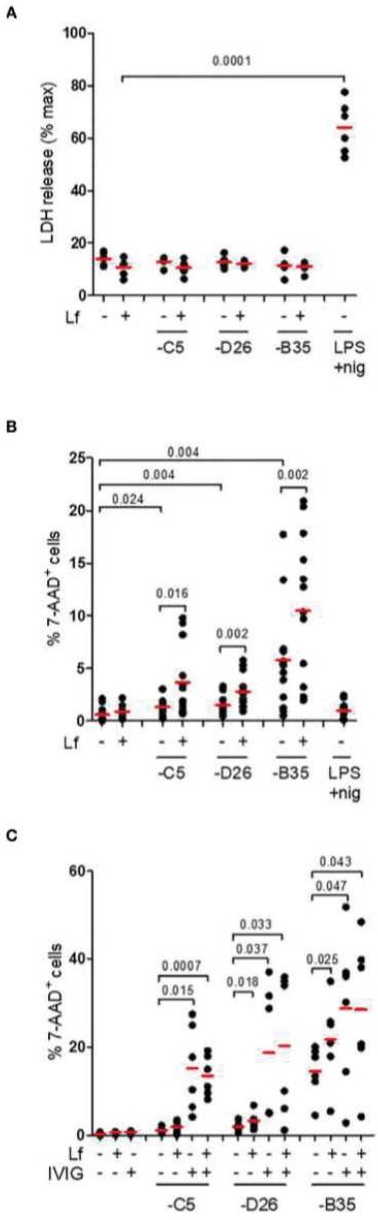


FIGURE 6 | IL-1β release without loss of membrane integrity. **(A)** DCs were challenged with HAdV-lactoferrin complexes, HAdV alone, or LPS/nigericin. Loss of cytosolic content was quantified by LDH activity in the supernatant at 4 h post-incubation (n = 6); **(B)** Plasma membrane integrity, analysed 24 h post-incubation using 7-AAD uptake, was quantified using flow cytometry (n = 13); **(C)** DCs were incubated with HAdV complexed with lactoferrin, IVIG or lactoferrin + IVIG. Plasma membrane integrity was analysed by 7-AAD uptake by flow cytometry at 24 h post-incubation (n ≥ 3). Statistical analyses by two-tailed paired t-test.

surface area of HAdVs. Previous studies demonstrated that some HDPs attenuate HAdV infection of epithelial-like cells (8, 26, 53–56). By contrast, our results are similar to Adams et al. (9) and demonstrate that lactoferrin enhances HAdV uptake by human monocytes, DCs, and Langerhans cells. By delving deeper into these initial observations, our study sheds light onto the mechanisms by which an HDP connects HAdV infection of mucosal tissues, or during vaccination, to drive innate and adaptive immune responses.

Mechanistically, it appears that lactoferrin reduces uptake of targeted cells and increases uptake into phagocytes, which provokes a pro-inflammatory and antiviral cytokine response. In combination with vaccination studies, our study provides insight into how lactoferrin modifies adaptive immune responses against HAdV vectors and/or the transgene. What do our results mean for HAdV-based vaccines? We posit that lactoferrin acts like a natural adjuvant and likely increases an anti-viral response. Should lactoferrin be included as an "adjuvant" in HAdV-based vaccines? Or, is there an excess of lactoferrin rapidly produced following vector injection? Could HAdV-lactoferrin formulation significantly reduce the dose needed for an optimal response to vaccines? Or conversely, does the lactoferrin-mediated uptake by phagocytes limit the efficacy of HAdV-based vaccines by precluding infection of targeted cells and long-term, steady expression of the transgene (which theoretically is ideal for broad and long-term responses)? Following the rare and severe thromboses and thrombocytopenia linked with HAdV-D26 and the chimpanzee AdV (ChAdOx1) based vaccines, the need to understand the human innate immune response is even greater.

Classical NLRP3 inflammasome activation involves a two-step process (57): PRR-derived signal to upregulate transcription of inflammasome components and NLRP3 posttranslational modification. Following engagement of TLR4, its TIR domain recruits MyD88 and TIRAP, which bridge TLRs to IRAK and MAPK family members that activate NF-κB, AP-1, and IRF. These latter pathways initiate transcription of genes coding for inflammasome components and proinflammatory cytokines (58, 59). The TIR domain also recruits TRAM and TRIF to activate the kinases TBK1 and IKKε to promote type I IFN expression (43). Together, these pathways prime an adaptive antiviral response. NLRP3 then detects perturbations of cellular integrity associated with K^+ efflux (signal 2). Consequently, Nek7–NLRP3 interaction leads to pyroptosome assembly and caspase-1-induced maturation of pro-IL-1β and pro-GSDMD. The alternative pathway consists of NLRP3-ASC-pro-caspase-1 signalling and IL-1β release without the loss of cytoplasmic content. Yet, the alternative pathway delineated in this study is not an indisputable fit and likely reflects the variability between LPS and HAdVs. TLR4-mediated endocytosis, which is well characterized for LPS, depends on the homodimerization of TLR4. LPS, the quintessential TLR4 ligand, is extracted from gram negative bacteria by CD14, which then transfer it to MD-2, which interacts directly with TLR4. TLR4 dimerization is induced by the lipid A region of LPS. Given the icosahedral shape and the size (~90 nm) of the HAdV-lactoferrin complex, one would expect that lactoferrin binds to multiple sites on the

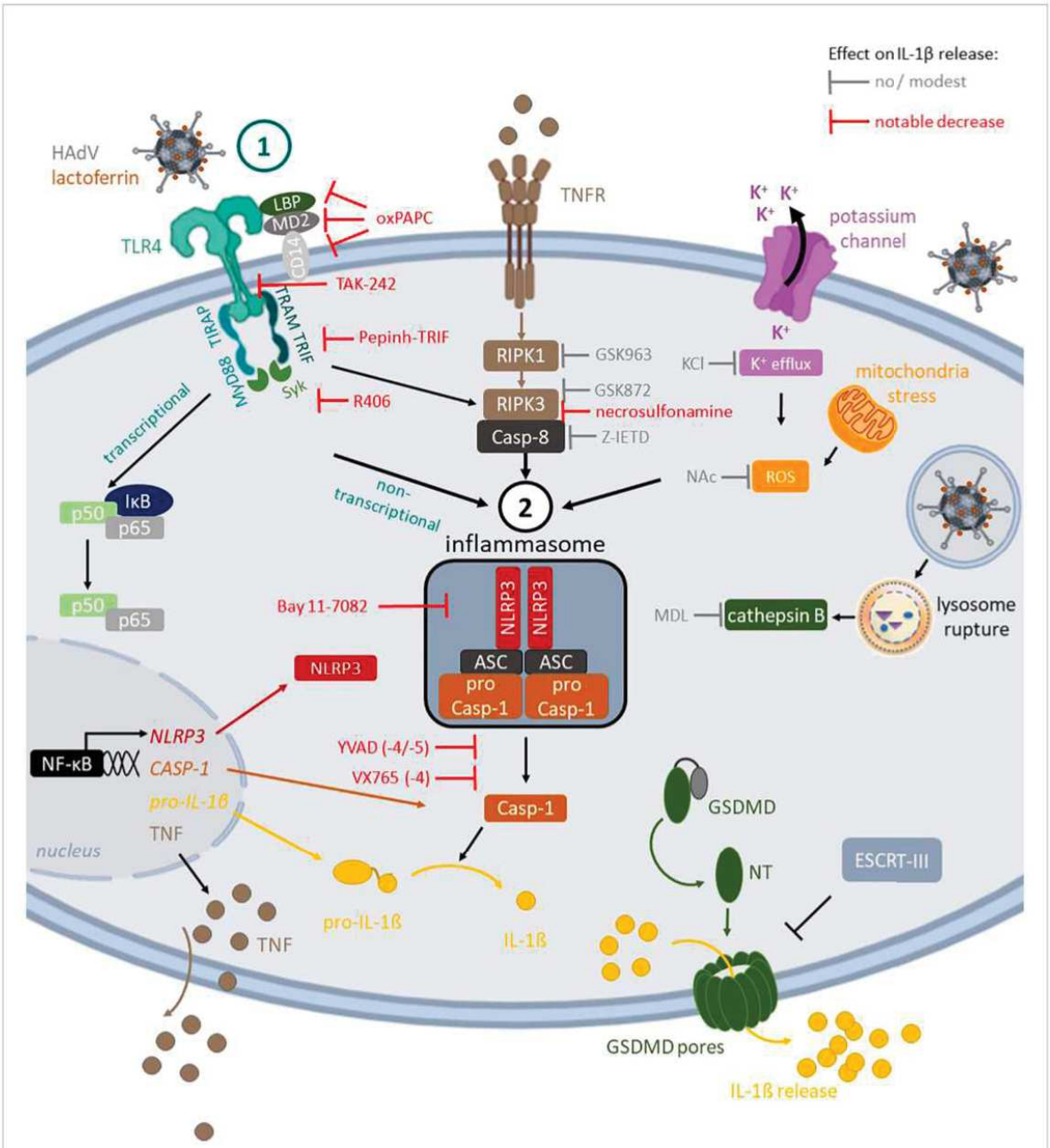


FIGURE 7 | TLR4-mediated HAdV-lactoferrin uptake in DCs and IL-1β release Lactoferrin binds to HAdV capsid and retargets the capsid toward TLR4 complex on the cells surface. Following TLR4 engagement, its TIR domain recruits MyD88 and TIRAP, which bridge TLRs to IRAK and MAPK family members that activate NF-kB, AP-1, and IRF. This priming event initiates transcription of genes coding for inflammasome components (e.g., NLRP3 and IL-1β). Under prototypic conditions, DCs detect a second perturbation (signal 2) that induced ROS release (mitochondrial stress) or K^+ efflux (perturbations of cellular integrity), and/or cathepsin B release from lysosome rupture. These pathways do not appear to be activated by HAdV-lactoferrin complexes. In addition to TLR4 pathways, the RIPK1-RIPK3 pathway is activated through an autocrine-TNF release. During inflammasome formation, pro-caspase-1 auto-activation induces cleavage of pro-IL-1β and likely GSDMD, which will initiate, but not complete, the loss of plasma membrane integrity *via* pore formation, allowing IL-1β release. Twenty-four hours post-challenge, DC membrane integrity is intact, consistent with the involvement of ESCRT-III complex and repairing GSDMD pores.

capsid and induces TLR4 dimerization directly, or possibly *via* assemblage of multiple dimers. Dimerization is then associated with CD14-dependent migration (60) to cholesterol-rich regions of the plasma membrane and endocytosis *via* a TLR4 ectodomain-dependent mechanism. While this picture appears partially consistent with the uptake of HAdV particles, CD14 levels on monocyte-derived DCs are low or absent, suggesting that migration to lipid rafts is *via* a different pathway.

Most TLR4 agonists do not have complex intracellular processing. This is not the case for HAdVs. The endosomolytic activity of protein VI, an internal capsid protein, prevents the complete degradation of IgG-complexed HAdVs in DCs by enabling the escape of the partially degraded HAdV capsid from endocytic vesicles/lysosomes into the cytoplasm (61, 62). However, this then causes the HAdV double-stranded DNA genome to become accessible to AIM2 (absent in melanoma 2) and in turn to initiate inflammasome formation. The makeup and processing of TLR4-associated vs. Fc receptor-associated endocytic vesicles is, to the best of our knowledge, unknown. From the data presented here, it appears that TLR4-associated endocytic vesicles engage the inception of an NLRP3 inflammasome. Of note, we did not detect an involvement of the cGAS pathway (the inhibitor RU.512 had no effect on HAdV-mediated transgene expression or IL-1β release, data not shown) suggesting that in our assays TLR4-mediated endocytosis was not associated with significant degradation of the HAdV capsid. These data are also consistent with increased transgene expression from the replication-defective vectors. Caspase 1 cleavage of GSDMD abolishes its intra-molecular auto-inhibition and induces pore-like structures of ~15 nm in diameter in the plasma membrane to breakdown the ion gradients. Alternative inflammasome activation can be triggered by a unique signal. LPS sensing induces a TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-CASP8 signalling axis, resulting in activation of NLRP3 by cleavage of an unknown caspase-8 substrate independent of K^+ efflux. The alternative NLRP3 complex likely has a modified stoichiometry. Although caspase 1 becomes mature and cleaves pro-IL-1β, pyroptosis is not induced and IL-1β release by an unconventional mechanism that functions independently of GSDMD. Why HAdV-lactoferrin-challenged cells do not release a significant amount of cytoplasmic content may be due to the spatial and temporal signals cells are receiving during the activation phase. In classic NLRP3 inflammasome activation, signal 1 is received well before signal 2 (NLRP3 engagement). In our assays, HAdV-lactoferrin induced signals are received immediately before the NLRP3 induction. Not surprisingly, inhibition of the NF-κB pathway decreased IL-1β levels. The poor coordination of transcriptional priming and de-ubiquitination of NLRP3 (63) may preclude pyroptosis, and favour an immune response with a longer duration and trafficking of DCs to lymph node to induce an adaptive immune responses. Inflammasome activation is thought to be crucial for the induction of cellular and humoral immune responses in the context of vaccinations. The involvement of the HAdV-lactoferrin NLRP3 axis may help drive the T-cell response toward a Th1 phenotype. Importantly, controlling an excessive inflammatory response is necessary. In addition to the expression of IL-1β, we also found notable levels of IL-1α. It is also possible that the effects of IL-1α supersede or preclude pyroptosis because IL-1α promotes the expression of genes involved in cell survival (64).

Finally, our results may also resolve one of many conundrums associated with the differences between murine and human responses to HAdVs. If murine HDPs also interact HAdVs and induce a TLR4-associated pro-inflammatory response in the mouse liver (23), then this complex partially resolves the mouse-man paradox. Whether HAdV-coagulation factor-HDP complexes are produced following intravenous injection in mice has not been addressed.

In conclusion, using combinatorial assays and primary human blood cells we detailed the multifaceted interactions between three HAdVs, a DAMP (lactoferrin), and PRRs (TLR4 & NLRP3) at the interface of innate and adaptive immunity in humans (**Figure 7**). These data directly address how the multiple layers of the innate and adaptive immune responses coordinate reactions to pathogens and HAdV-based vaccines.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design & conception: KE and EK. Project direction: EK. Performed experiments; CC, KE, THT, TPT, OP, CH, and JB. Analysed data: all authors. Wrote the manuscript: CC, KE, THT, and EK. Secured funding: EK. Data and materials availability: all materials can be obtained through an MTA. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work benefited from support by the LabEx EpiGenMed, an "Investissements d'avenir" program, Université de Montpellier (EK), Ph.D. fellowship from the Vietnamese Minister of Education (TPT), Ph.D. fellowship from the French Minister of Education (OP), the Innovative Medicine Initiative EboVac2 (#115861) (EK), TransVac2 (EC Horizon 2020 #730964) (EK), and the Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (EK). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, "Investments for the future"). We thank Katryn Stacey (CHU Montpellier) for help with the inflammasome detection by flow cytometry. We thank EKL members for constructive comments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.685218/full#supplementary-material

Supplementary Figure 1 | Analyses of lactoferrin binding to HAdV-C5, -D26 and -B35 by SPR **(A)** HAdV-C5, -D26, and -B35 were covalently coupled to a CM5 sensor chip and escalating doses of lactoferrin (6.25 - 200 nM) for KD determination. Depicted are overlaid sensorgrams (RU = resonance units); **(B)** The association and dissociation rates of lactoferrin for HAdV-C5, -D26 and -B35 capsids **(C)** Representative flow cytometry profiles of cells incubated with HAdVs ± lactoferrin. DCs were mock-treated (grey), incubated with HAdV -C5, -D26 and -B35 alone (red), with lactoferrin complexed with HAdV (blue), with HAdV for 30 min and then lactoferrin (green) or with lactoferrin for 30 min and then HAdV (purple). Fluorescence was analysed 24 h post-incubation; **(D)** monocytes and **(E)** LCs were incubated with HAdVs ± lactoferrin and fluorescence was analysed 24 h post-incubation (n = 5, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

Supplementary Figure 2 | HAdV-lactoferrin induced cytokine secretion **(A)** Raw data of Luminex assay of DCs ± HAdVs ± lactoferrin, plus controls. Data indicated total protein level. **(B)** Freshly isolate human $CD14^+$ monocytes were incubated with HAdV-C5-, -D26, or -B35 ± lactoferrin. The supernatants (24 postintubation) were used to quantify IL-1β release (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(C, D)** DCs were incubated with HAdV-lactoferrin complexes for 24 h. Phenotypic maturation was assessed by CD86 surface levels expression and functionally **(D)** by fluorescent dextran uptake. Cells were incubated at 4°C or 37°C for 30 min with 1 mg/ml TRITC-labelled dextran, washed with PBS, fixed with 4% PFA and analysed by flow cytometry (lower fluorescence = lower phagocytosis = greater maturation) (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

Supplementary Figure 3 | TLR4 inhibitors reduce infection of HAdV-lactoferrin complexes **(A)** HAdV-lactoferrin complexes were incubated with recombinant TLR4, TLR4/MD-2, MD-2 proteins for 30 min, or DCs were pre-incubated with anti-CD14 antibody for 30 min. Then, HAdV-lactoferrin-recombinant protein complexes were added to DCs or HAdV-lactoferrin were added to treated DCs. Infection was analysed 24 h post-incubation by flow cytometry (n = 5, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(B, C)** Monocytes and LCs were treated for 1 h pre-infection with 1 µg/ml of TAK-242. HAdV-lactoferrin complex infection was analysed 24 h post-incubation by flow cytometry (n ≥ 5, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(D-G)** TLR4 surface levels were analysed at 24 h after DC treatment with decreasing concentrations of lactoferrin (0.9 - 7 µg/ml), TAK-242 (25 - 200 µg/ml), Pepinh-TRIF (6.25 - 50 µg/ml) or oxPAPC (7.5 - 60 µg/ml). The essays were performed in triplicate with cells from a single donor and the levels represents the average. The R^2 score correspond to the coefficient of determination for linear regression. **(H, I)** The HAdVs were complexed with lactoferricin (a gift from H. Jenssen, Roskilde Universitet) and DC infection and IL-1β release were analysed at 24 h post-incubation, respectively (n = 4, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

Supplementary Figure 4 | Effect of pharmacological inhibition on HAdV infection **(A)** IL-1β release following inhibition of pyroptosis initiators (n ≥ 5, statistical analyses by two-tailed paired t-test) **(B)** The percentage of infection of DCs pre-treated with inhibitors of pyroptosis initiators (n = 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(C)** TNF secretion by DC pre-treated with caspase 8 inhibitors; DCs were treat with Z-IETD for 1 h. Cells were incubated with HAdV-lactoferrin complexes for 24 h and the supernatant was collected for TNF quantification (n ≥ 5, statistical analyses by two-tailed paired t-test); **(D)** The percentage of infection of DCs pre-treated with caspase 1, 4, 5, 8 inhibitors (n ≥ 6, statistical analyses by two-tailed paired t-test), **(E)** The percentage of infection of DCs pre-treated with RIPK1 inhibitor GSK963 and RIPK3 inhibitors necrosulfonamide and GSK872 (n ≥, 6 statistical analyses by two-tailed paired t-test). **(F–H)** Analyses of impact of inhibitors of TLR4 engagement and signalling; inflammasome formation and the RIPK1-3 pathway broken down according to the HAdV species/type. (n ≥ 3, statistical analyses by two-tailed paired t-test).

REFERENCES

1. Lai Y, Gallo RL. Amped Up Immunity: How Antimicrobial Peptides Have Multiple Roles in Immune Defense. *Trends Immunol* (2009) 30:131–41. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003
2. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. *Trends Biotechnol* (2011) 29:464–72. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001
3. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine Adjuvants Alum and MF59 Induce Rapid Recruitment of Neutrophils and Monocytes That Participate in Antigen Transport to Draining Lymph Nodes. *Vaccine* (2011) 29:1812–23. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.090
4. da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, Lima LA, Sampaio KBO, Dohms SSM, et al. The Next Generation of Antimicrobial Peptides (Amps) as Molecular Therapeutic Tools for the Treatment of Diseases With Social and Economic Impacts. *Drug Discovery Today* (2017) 22:234–48. doi: 10.1016/j.drudis.2016.10.017
5. Spadaro M, Montone M, Arigoni M, Cantarella D, Forni G, Pericle F, et al. Calogero R aRecombinant Human Lactoferrin Induces Human and Mouse Dendritic Cell Maturation Via Toll-like Receptors 2 and 4. *FASEB J* (2014) 28:416–29. doi: 10.1096/fj.13-229591
6. Spadaro M, Caorsi C, Ceruti P, Varadhachary A, Forni G, Pericle F, et al. Lactoferrin, a Major Defense Protein of Innate Immunity, is a Novel Maturation Factor for Human Dendritic Cells. *FASEB J* (2008) 22:2747–57. doi: 10.1096/fj.07-098038
7. de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. Lactoferrin Acts as an Alarmin to Promote the Recruitment and Activation of APCs and Antigen-Specific Immune Responses. *J Immunol* (2008) 180:6868–76. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.6868
8. Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL. Insight Into the Mechanisms of Adenovirus Capsid Disassembly From Studies of Defensin Neutralization. *PloS Pathog* (2010) 6:e1000959. doi: 10.1371/journal.ppat.1000959
9. Adams WC, Bond E, Havenga MJEE, Holterman L, Goudsmit J, Hedestam GBKK, et al. Adenovirus Serotype 5 Infects Human Dendritic Cells Via a Coxsackievirus-Adenovirus Receptor-Independent Receptor Pathway Mediated by Lactoferrin and DC-SIGN. *J Gen Virol* (2009) 90:1600–10. doi: 10.1099/vir.0.008342-0
10. Uchio E, Inoue H, Kadonosono K. Anti-Adenoviral Effects of Human Cationic Antimicrobial protein-18/LL-37, an Antimicrobial Peptide, by Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Korean J Ophthalmol* (2013) 27:199–203. doi: 10.3341/kjo.2013.27.3.199
11. Ertl HC. Viral Vectors as Vaccine Carriers. *Curr Opin Virol* (2016) 21:1–8. doi: 10.1016/j.coviro.2016.06.001
12. Mast TC, Kierstead L, Gupta SB, Nikas AA, Kallas EG, Novitsky V, et al. International Epidemiology of Human Pre-Existing Adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 Neutralizing Antibodies: Correlates of High Ad5 Titers and Implications for Potential HIV Vaccine Trials. *Vaccine* (2010) 28:950–7. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.145
13. Weaver EA, Barry MA. Low Seroprevalent Species D Adenovirus Vectors as Influenza Vaccines. *PloS One* (2013) 8:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0073313
14. DiPaolo N, Ni S, Gaggar A, Strauss R, Tuve S, Yi Li Z, et al. Evaluation of Adenovirus Vectors Containing Serotype 35 Fibers for Vaccination. *Mol Ther* (2006) 13:756–65. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.12.008
15. Stone D, di Paolo NC, Lieber A. Development of Group B Adenoviruses as Gene Transfer Vectors. *Biotechnol Genet Eng Rev* (2006) 22:101–23. doi: 10.1080/02648725.2006.10648067
16. Wang H, Liu Z, Li C, Gil S, Papayannopoulou T, Doering CB, et al. High-Level Protein Production in Erythroid Cells Derived From In Vivo Transduced Hematopoietic Stem Cells. *Blood Adv* (2019) 3:2883–94. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000706
17. Li C, Lieber A. Adenovirus Vectors in Hematopoietic Stem Cell Genome Editing. *FEBS Lett* (2019) 593:3623–48. doi: 10.1002/1873-3468.13668
18. Wang H, Georgakopoulou A, Psatha N, Li C, Capsali C, Samal HB, et al. In Vivo Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Ameliorates Murine Thalassemia Intermedia. *J Clin Invest* (2019) 129:598–615. doi: 10.1172/JCI122836

19. Mennechet FJD, Paris O, Ouoba AR, Salazar Arenas S, Sirima SB, Takoudjou Dzomo GR, et al. A Review of 65 Years of Human Adenovirus Seroprevalence. *Expert Rev Vaccines* (2019) 18:597–613. doi: 10.1080/14760584.2019.1588113
20. Kremer EJ. Pros and Cons of Adenovirus-Based Sars-CoV-2 Vaccines. *Mol Ther* (2020) 28:2303–4. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.10.002
21. Johansson C, Jonsson M, Marttila M, Persson D, Fan XL, Skog J, et al. Adenoviruses Use Lactoferrin as a Bridge for CAR-independent Binding to and Infection of Epithelial Cells. *J Virol* (2007) 81:954–63. doi: 10.1128/JVI.01995-06
22. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* (2016) 44:833–46. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.012
23. Doronin K, Flatt JW, Di Paolo NC, Khare R, Kalyuzhniy O, Acchione M, et al. Coagulation Factor X Activates Innate Immunity to Human Species C Adenovirus. *Sci (80-)* (2012) 338:795–8. doi: 10.1126/science.1226625
24. Eichholz K, Mennechet FJD, Kremer EJ. Coagulation Factor X-adenovirus Type 5 Complexes Poorly Stimulate an Innate Immune Response in Human Mononuclear Phagocytes. *J Virol* (2015) 89:2884–91. doi: 10.1128/JVI.03576-14
25. Kremer EJ, Boutin S, Chillon M, Danos O. Canine Adenovirus Vectors: An Alternative for Adenovirus-Mediated Gene Transfer. *J Virol* (2000) 74:505–12. doi: 10.1128/JVI.74.1.505-512.2000
26. Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human Alpha-Defensins. *Cell Host Microbe* (2008) 3:11–9. doi: 10.1016/j.chom.2007.12.001
27. Sester DP, Thygesen SJ, Sagulenko V, Vajjhala PR, Cridland JA, Vitak N, et al. A Novel Flow Cytometric Method to Assess a Novel Flow Cytometric Method to Assess Inflammasome Formation. *J Immunol* (2015) 194:455–62. doi: 10.4049/jimmunol.1401110
28. Eichholz K, Bru T, Tran TTP, Fernandes P, Welles H, Mennechet FJD, et al. Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells. *PloS Pathog* (2016) 12:1–29. doi: 10.1371/journal.ppat.1005871
29. Arnberg N. Adenovirus Receptors: Implications for Tropism, Treatment and Targeting. *Rev Med Virol* (2009) 19:165–78. doi: 10.1002/rmv.612
30. Günther PS, Mikeler E, Hamprecht K, Schneider-Schaulies J, Jahn G, Dennehy KM. Cd209/Dc-SIGN Mediates Efficient Infection of Monocyte-Derived Dendritic Cells by Clinical Adenovirus 2C Isolates in the Presence of Bovine Lactoferrin. *J Gen Virol* (2011) 92:1754–9. doi: 10.1099/vir.0.030965-0
31. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Sci (80-)* (1997) 275:1320–3. doi: 10.1126/science.275.5304.1320
32. Baker AT, Mundy RM, Davies JA, Rizkallah PJ, Parker AL. Human Adenovirus Type 26 Uses Sialic Acid-Bearing Glycans as a Primary Cell Entry Receptor. *Sci Adv* (2019) 5:2–11. doi: 10.1126/sciadv.aax3567
33. Persson BD, John L, Rafie K, Strebl M, Frängsmyr L, Ballmann MZ, et al. Human Species D Adenovirus Hexon Capsid Protein Mediates Cell Entry Through a Direct Interaction With CD46. *Proc Natl Acad Sci* (2021) 118:e2020732118. doi: 10.1073/pnas.2020732118
34. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a Cellular Receptor for Group B Adenoviruses. *Nat Med* (2003) 9:1408–12. doi: 10.1038/nm952
35. Tran TTP, Eichholz K, Amelio P, Moyer C, Nemerow GR, Perreau M, et al. Humoral Immune Response to Adenovirus Induce Tolerogenic Bystander Dendritic Cells That Promote Generation of Regulatory T Cells. *PloS Pathog* (2018) 14:1–31. doi: 10.1371/journal.ppat.1007127
36. Ando K, Hasegawa K, Shindo KI, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, et al. Human Lactoferrin Activates NF-κb Through the Toll-like Receptor 4 Pathway While it Interferes With the Lipopolysaccharide-Stimulated TLR4 Signaling. *FEBS J* (2010) 277:2051–66. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07620.x
37. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, et al. Cathelicidin Family of Antibacterial Peptides CAP18 and CAP11 Inhibit the Expression of TNF- by Blocking the Binding of LPS to CD14+ Cells. *J Immunol* (2001) 167:3329–38. doi: 10.4049/jimmunol.167.6.3329
38. Scott MG, Vreugdenhil ACE, Buurman WA, Hancock REW, Gold MR. Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *J Immunol* (2000) 164:549–53. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.549
39. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. Md-2, a Molecule That Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J Exp Med* (1999) 189:1777–82. doi: 10.1084/jem.189.11.1777
40. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 Controls the LPS-induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell* (2011) 147:868–80. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.051
41. Rallabhandi P, Phillips RL, Marina S. Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein-Induced Toll-Like Receptor 4 (Tlr4) Signaling is Inhibited by the TLR4 Antagonists Rhodobacter Sphaeroides Lipopolysaccharide and Eritoran (E5564) and Requires Direct Interaction With MD-2. *MBio* (2012) 3:e00218–12. doi: 10.1128/mBio.00218-12.Editor
42. Deguchi A, Tomita T, Omori T, Komatsu A, Ohto U, Takahashi S, et al. Serum Amyloid A3 Binds MD-2 to Activate p38 and NF-κb Pathways in a MyD88-dependent Manner. *J Immunol* (2013) 191:1856–64. doi: 10.4049/jimmunol.1201996
43. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is Specifically Involved in the Toll-like Receptor 4–Mediated MyD88-independent Signaling Pathway. *Nat Immunol* (2003) 4:1144–50. doi: 10.1038/ni986
44. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, et al. Lps-Tlr4 Signaling to IRF-3/7 and NF-κb Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* (2003) 198:1043–55. doi: 10.1084/jem.20031023
45. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM Couples Endocytosis of Toll-like Receptor 4 to the Induction of Interferon-β. *Nat Immunol* (2008) 9:361–8. doi: 10.1038/ni1569
46. Persson BD, Lenman A, Frängsmyr L, Schmid M, Ahlm C, Plückthun A, et al. Lactoferrin-Hexon Interactions Mediate CAR-Independent Adenovirus Infection of Human Respiratory Cells. *J Virol* (2020) 94:1–13. doi: 10.1128/JVI.00542-20
47. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* (2016) 41:1012–21. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002
48. Gaidt MM, Hornung V. Alternative Inflammasome Activation Enables IL-1β Release From Living Cells. *Curr Opin Immunol* (2017) 44:7–13. doi: 10.1016/j.coi.2016.10.007
49. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, et al. Quong A a., Latz EAnti-inflammatory Compounds Parthenolide and Bay 11-7082 are Direct Inhibitors of the Inflammasome. *J Biol Chem* (2010) 285:9792–802. doi: 10.1074/jbc.M109.082305
50. Najjar M, Saleh D, Zelic M, Nogusa S, Shah S, Tai A, et al. RIPK1 and RIPK3 Kinases Promote Cell-Death-Independent Inflammation by Toll-like Receptor 4. *Immunity* (2016) 45:46–59. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.007
51. Rühl S, Shkarina K, Demarco B, Heilig R, Santos JC, Broz P. ESCRT-Dependent Membrane Repair Negatively Regulates Pyroptosis Downstream of GSDMD Activation. *Sci (80-)* (2018) 362:956–60. doi: 10.1126/science.aar7607
52. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, et al. T Helper 1 Immunity Requires Complement-Driven NLRP3 Inflammasome Activity in CD4+ T Cells. *Sci (80-)* (2016) 352:aad1210–aad1210. doi: 10.1126/science.aad1210
53. Bastian A, Schafer H. Human Alpha-Defensin 1 (HNP-1) Inhibits Adenoviral Infection In Vitro. *Regul Pept* (2001) 101:157–61. doi: 10.1016/S0167-0115(01)00282-8
54. Pietrantoni A, Maria A, Biase D, Tinari A. Marchetti M, Valenti P, et al. Bovine Lactoferrin Inhibits Adenovirus Infection by Interacting With Viral Structural Polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother* (2003) 47:2688–91. doi: 10.1128/AAC.47.8.2688
55. Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Valenti P, Seganti L, et al. Antiadenovirus Activity of Milk Proteins: Lactoferrin Prevents Viral Infection. *Antiviral Res* (2002) 53:153–8. doi: 10.1016/S0166-3542(01)00197-8
56. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human Cathelicidin (LL-37), a Multifunctional Peptide, is Expressed by Ocular Surface Epithelia and has Potent Antibacterial and Antiviral Activity. *Curr Eye Res* (2005) 30:385–94. doi: 10.1080/02713680590934111
57. Man SM, Kanneganti T-DD. Regulation of Inflammasome Activation. *Immunol Rev* (2015) 265:6–21. doi: 10.1111/imr.12296
58. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The Adaptor Molecule TIRAP Provides Signalling Specificity for Toll-like Receptors. *Nature* (2002) 420:329–33. doi: 10.1038/nature01180
59. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential Role for TIRAP in Activation of the Signalling Cascade Shared by TLR2 and TLR4. *Nature* (2002) 420:324–9. doi: 10.1038/nature01182

60. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of Innate Immune Recognition of Bacteria Concentrate in Lipid Rafts and Facilitate Lipopolysaccharide-Induced Cell Activation. *J Cell Sci* (2002) 115:2603–11. doi: 10.1242/jcs.115.12.2603
61. Wiethoff CM, Nemerow GR. Adenovirus Membrane Penetration: Tickling the Tail of a Sleeping Dragon. *Virology* (2015) 479–480:591–9. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.006
62. Moyer CL, Nemerow GR. Disulfide-Bond Formation by a Single Cysteine Mutation in Adenovirus Protein VI Impairs Capsid Release and Membrane Lysis. *Virology* (2012) 428:41–7. doi: 10.1016/j.virol.2012.03.024
63. Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol Cell* (2013) 49:331–8. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.009
64. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JWM, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:49–77. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112306

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

Citation: *Chéneau C, Eichholz K, Tran TH, Tran TTP, Paris O, Henriquet C, Bajramovic JJ, Pugniere M and Kremer EJ (2021) Lactoferrin Retargets Human Adenoviruses to TLR4 to Induce an Abortive NLRP3-Associated Pyroptotic Response in Human Phagocytes.*
Front. Immunol. 12:685218. doi: 10.3389/fimmu.2021.685218

Copyright © 2021 Chéneau, Eichholz, Tran, Tran, Paris, Henriquet, Bajramovic, Pugniere and Kremer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

VIII. Références bibliographiques

1. Monticelli, L. A. *et al*. Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. *Nat. Immunol.* **12**, 1045–1054 (2011).
2. Gorski, S. A., Hahn, Y. S. & Braciale, T. J. Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS Pathog.* **9**, e1003615 (2013).
3. Shim, D. H. *et al*. Pandemic influenza virus, pH1N1, induces asthmatic symptoms via activation of innate lymphoid cells. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* **26**, 780–788 (2015).
4. Klose, C. S. N. & Artis, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 765–774 (2016).
5. McKenzie, A. N. J., Spits, H. & Eberl, G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity* **41**, 366–374 (2014).
6. Bonne-Année, S. & Nutman, T. B. Human innate lymphoid cells (ILCs) in filarial infections. *Parasite Immunol.* **40**, (2018).
7. Mortha, A. & Burrows, K. Cytokine Networks between Innate Lymphoid Cells and Myeloid Cells. *Front. Immunol.* **9**, 191 (2018).
8. Briseño, C. G., Murphy, T. L. & Murphy, K. M. Complementary diversification of dendritic cells and innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 69–78 (2014).
9. Halim, T. Y. F. *et al*. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat. Immunol.* **17**, 57–64 (2016).
10. Mennechet, F. J. D. *et al*. A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Rev. Vaccines* **18**, 597–613 (2019).
11. Eichholz, K. *et al*. Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* **12**, e1005871 (2016).
12. Perreau, M., Pantaleo, G. & Kremer, E. J. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 2717–2725 (2008).
13. Tran, T. T. P. *et al*. Humoral immune response to adenovirus induce tolerogenic bystander dendritic cells that promote generation of regulatory T cells. *PLOS Pathog.* **14**, e1007127 (2018).
14. Nazir, S. A. & Metcalf, J. P. Innate Immune Response to Adenovirus. *J. Investig. Med.* **53**, 292–304 (2005).
15. Thaci, B., Ulasov, I. V., Wainwright, D. A. & Lesniak, M. S. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. *Oncotarget* **2**, 113–121 (2011).
16. Pandey, A. *et al*. Impact of preexisting adenovirus vector immunity on immunogenicity and protection conferred with an adenovirus-based H5N1 influenza vaccine. *PloS One* **7**, e33428 (2012).
17. Capasso, C., Garofalo, M., Hirvinen, M. & Cerullo, V. The Evolution of Adenoviral Vectors through Genetic and Chemical Surface Modifications. *Viruses* **6**, 832–855 (2014).

18. Liu, Q. & Muruve, D. A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther*. **10**, 935–940 (2003).

19. Hendrickx, R. *et al*. Innate immunity to adenovirus. *Hum*. *Gene Ther*. **25**, 265–284 (2014).

20. Ito, T., Wang, Y.-H. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin*. *Immunopathol*. **26**, 221–229 (2005).

21. Flomenberg, P., Piaskowski, V., Truitt, R. L. & Casper, J. T. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J*. *Infect*. *Dis*. **171**, 1090–1096 (1995).

22. Crenshaw, B. J., Jones, L. B., Bell, C. R., Kumar, S. & Matthews, Q. L. Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy. *Biomedicines* **7**, (2019).

23. Mennechet, F. J. D., Eichholz, K., Tran, T. T. P. & Kremer, E. J. Immunité humorale anti-adénovirus: Impact sur l'activation des cellules dendritiques. *médecine/sciences* **33**, 582–585 (2017).

24. Boruchov, A. M. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J*. *Clin*. *Invest*. **115**, 2914–2923 (2005).

25. Mercier, S., Rouard, H., Delfau-Larue, M. H. & Eloit, M. Specific antibodies modulate the interactions of adenovirus type 5 with dendritic cells. *Virology* **322**, 308–317 (2004).

26. Perreau, M. & Kremer, E. J. Frequency, proliferation, and activation of human memory T cells induced by a nonhuman adenovirus. *J*. *Virol*. **79**, 14595–14605 (2005).

27. Mennechet, F. J. D., Tran, T. T. P., Eichholz, K., van de Perre, P. & Kremer, E. J. Ebola virus vaccine: benefit and risks of adenovirus-based vectors. *Expert Rev*. *Vaccines* **14**, 1471–1478 (2015).

28. Gray, G. E. *et al*. Recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up of the phase 2b HVTN 503/Phambili study. *Lancet Infect*. *Dis*. **14**, 388–396 (2014).

29. Roberts, D. M. *et al*. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* **441**, 239–243 (2006).

30. Sharma, A., Li, X., Bangari, D. S. & Mittal, S. K. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res*. **143**, 184–194 (2009).

31. Farrow, A. L., Peng, B. J., Gu, L., Krendelchtchikov, A. & Matthews, Q. L. A Novel Vaccine Approach for Chagas Disease Using Rare Adenovirus Serotype 48 Vectors. *Viruses* **8**, 78 (2016).

32. Geisbert, T. W. *et al*. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J*. *Virol*. **85**, 4222–4233 (2011).

33. Abbink, P. *et al*. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J*. *Virol*. **81**, 4654–4663 (2007).

34. Capone, S. *et al*. A novel adenovirus type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques. *J*. *Virol*. **80**, 1688–1699 (2006).

35. Kumar, R. K., Foster, P. S. & Rosenberg, H. F. Respiratory viral infection, epithelial cytokines, and innate lymphoid cells in asthma exacerbations. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 391–396 (2014).

36. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).

37. Hazenberg, M. D. & Spits, H. Human innate lymphoid cells. *Blood* **124**, 700–709 (2014).

38. Neill, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367–1370 (2010).

39. Moro, K. *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* **463**, 540–544 (2010).

40. Price, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11489–11494 (2010).

41. Mjösberg, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat. Immunol.* **12**, 1055–1062 (2011).

42. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–149 (2013).

43. Klose, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340–356 (2014).

44. Juelke, K. & Romagnani, C. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 75–85 (2016).

45. Vacca, P., Chiossone, L., Mingari, M. C. & Moretta, L. Heterogeneity of NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Human and Murine Decidua. *Front. Immunol.* **10**, 170 (2019).

46. Nagasawa, M., Germar, K., Blom, B. & Spits, H. Human CD5+ Innate Lymphoid Cells Are Functionally Immature and Their Development from CD34+ Progenitor Cells Is Regulated by Id2. *Front. Immunol.* **8**, 1047 (2017).

47. Simoni, Y. & Newell, E. W. Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets. *Immunology* **153**, 297–303 (2018).

48. Serafini, N., Xu, W. & Di Santo, J. P. Innate lymphoid cells: of precursors and products…. *Curr. Biol. CB* **24**, R573–R576 (2014).

49. Valdez, Y. *et al.* Efficient Enrichment of Functional ILC Subsets from Human PBMC by Immunomagnetic Selection. *J. Immunol.* **200**, 51.13-51.13 (2018).

50. Swieboda, D. *et al.* OMIP-062: A 14-Color, 16-Antibody Panel for Immunophenotyping Human Innate Lymphoid, Myeloid and T Cells in Small Volumes of Whole Blood and Pediatric Airway Samples. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **95**, 1231–1235 (2019).

51. Bianca Bennstein, S., Riccarda Manser, A., Weinhold, S., Scherenschlich, N. & Uhrberg, M. OMIP-055: Characterization of Human Innate Lymphoid Cells from Neonatal and Peripheral Blood. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **95**, 427–430 (2019).

52. Vély, F. *et al.* Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat. Immunol.* **17**, 1291–1299 (2016).

53. Peters, C. P., Mjösberg, J. M., Bernink, J. H. & Spits, H. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunol. Lett.* **172**, 124–131 (2016).

54. Kim, C. H., Hashimoto-Hill, S. & Kim, M. Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol*. **37**, 68–79 (2016).

55. Golebski, K. *et al*. IL-1β, IL-23, and TGF-β drive plasticity of human ILC2s towards IL-17-producing ILCs in nasal inflammation. *Nat. Commun*. **10**, 2162 (2019).

56. Sciumè, G., Shih, H.-Y., Mikami, Y. & O'Shea, J. J. Epigenomic Views of Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol*. **8**, 1579 (2017).

57. Mjösberg, J. & Spits, H. Human innate lymphoid cells. *J. Allergy Clin. Immunol*. **138**, 1265–1276 (2016).

58. Szabo, S. J. *et al*. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).

59. Mjösberg, J. *et al*. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* **37**, 649–659 (2012).

60. Li, B. W. S. & Hendriks, R. W. Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation. *Immunology* **140**, 281–287 (2013).

61. Forkel, M. & Mjösberg, J. Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Allergy Asthma Rep*. **16**, 73 (2016).

62. Branzk, N., Gronke, K. & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells, mediators of tissue homeostasis, adaptation and disease tolerance. *Immunol. Rev*. **286**, 86–101 (2018).

63. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301 (2015).

64. Marafini, I. *et al*. TNF-α Producing Innate Lymphoid Cells (ILCs) Are Increased in Active Celiac Disease and Contribute to Promote Intestinal Atrophy in Mice. *PloS One* **10**, e0126291 (2015).

65. Lopez-Lastra, S. *et al*. A functional DC cross talk promotes human ILC homeostasis in humanized mice. *Blood Adv*. **1**, 601–614 (2017).

66. Sivori, S. *et al*. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **101**, 10116–10121 (2004).

67. Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Direct TLR2 Signaling Is Critical for NK Cell Activation and Function in Response to Vaccinia Viral Infection. *PLoS Pathog*. **6**, e1000811 (2010).

68. Crellin, N. K. *et al*. Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTi-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity* **33**, 752–764 (2010).

69. Maggi, L. *et al*. Human circulating group 2 innate lymphoid cells can express CD154 and promote IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol*. **139**, 964-976.e4 (2017).

70. Oliphant, C. J. *et al*. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* **41**, 283–295 (2014).

71. Robinette, M. L. & Colonna, M. Innate lymphoid cells and the MHC. *HLA* **87**, 5–11 (2016).

72. Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* **37**, 601–610 (2012).

73. Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M. & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol. Lett*. **179**, 9–18 (2016).

74. Bal, S. M., Golebski, K. & Spits, H. Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 552–565 (2020).

75. Bernink, J. H. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* **14**, 221–229 (2013).

76. Bernink, J. H. *et al.* Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* **43**, 146–160 (2015).

77. Belz, G. T. ILC2s masquerade as ILC1s to drive chronic disease. *Nat. Immunol.* **17**, 611–612 (2016).

78. Kölliker, A. *Manual of human histology v. 1, 1853-54*. vol. 1 (Sydenham society, 1853).

79. Thompson, A. B. *et al.* Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur. Respir. J.* **8**, 127–149 (1995).

80. Nemerow, G. R., Stewart, P. L. & Reddy, V. S. Structure of human adenovirus. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 115–121 (2012).

81. Nemerow, G. R. & Stewart, P. L. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **63**, 725–734 (1999).

82. Loustalot, F., Kremer, E. J. & Salinas, S. The Intracellular Domain of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Differentially Influences Adenovirus Entry. *J. Virol.* **89**, 9417–9426 (2015).

83. Kolegraff, K., Nava, P., Laur, O., Parkos, C. A. & Nusrat, A. Characterization of full-length and proteolytic cleavage fragments of desmoglein-2 in native human colon and colonic epithelial cell lines. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 306–314 (2011).

84. Puchelle, E., De Bentzmann, S. & Zahm, J. M. Defense properties of airway surface liquid. *Respir. Med. Lond. Saunders* 194–204 (2003).

85. Lamblin, G. *et al.* Human respiratory mucins. *Eur. Respir. J.* **5**, 247–256 (1992).

86. Porchet, N, Dufosse, J, Degand, P & Aubert, JP. Les mucines humaines : pourquoi une telle hétérogénéité peptidique ? *Med Sci Paris* **7**, 1024–1030 (1991).

87. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**, 571–577 (2002).

88. Fahy, J. V. & Dickey, B. F. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2233–2247 (2010).

89. Bals, R. & Hiemstra, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* **23**, 327–333 (2004).

90. Mostov, K. E. Transepithelial Transport of Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 63–84 (1994).

91. Bals, R., Weiner, D. J. & Wilson, J. M. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**, 303–307 (1999).

92. Jeong, E. & Lee, J. Y. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Innate Immune Receptors. *Yonsei Med. J.* **52**, 379–392 (2011).

93. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* 1–20 (2008) doi:10.1007/978-3-540-72167-3_1.

94. Carty, M. & Bowie, A. G. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 397–406 (2010).

95. Medzhitov, R. TLR-mediated innate immune recognition. *Semin. Immunol.* **19**, 1–2 (2007).

96. Lester, S. N. & Li, K. Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *J. Mol. Biol.* **426**, 1246–1264 (2014).

97. Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nuñez, G. Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol. Rev.* **227**, 106–128 (2009).

98. Lupfer, C. & Kanneganti, T.-D. The Expanding Role of NLRs in Antiviral Immunity. *Immunol. Rev.* **255**, 13–24 (2013).

99. Coutermarsh-Ott, S., Eden, K. & Allen, I. C. Beyond the inflammasome: regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure. *J. Gen. Virol.* **97**, 825–838 (2016).

100. Kim, Y., Shin, J.-S. & Nahm, M. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med. J.* **57**, 5 (2016).

101. Koutsakos, M. *et al.* Downregulation of MHC Class I Expression by Influenza A and B Viruses. *Front. Immunol.* **10**, (2019).

102. Scalzo, A. A. Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends Microbiol.* **10**, 470–474 (2002).

103. Biassoni, R. *et al.* Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* **181**, 203–214 (2001).

104. Toth, K. *et al.* Adenovirus immunoregulatory E3 proteins prolong transplants of human cells in immunocompetent mice. *Virus Res.* **108**, 149–159 (2005).

105. Sester, M. *et al.* Conserved Amino Acids within the Adenovirus 2 E3/19K Protein Differentially Affect Downregulation of MHC Class I and MICA/B Proteins. *J. Immunol.* **184**, 255–267 (2010).

106. Ruuskanen, O., Mertsola, J. & Meurman, O. Adenovirus infection in families. *Arch. Dis. Child.* **63**, 1250–1253 (1988).

107. Brouard, J. *et al.* [Adenoviral respiratory diseases in healthy children: a study of 116 hospital cases]. *Antibiot. Paris Fr. 1999* **6**, 97–102 (2004).

108. Greber, U. F. & Flatt, J. W. Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annu. Rev. Virol.* **6**, 177–197 (2019).

109. Johansson, C. *et al.* Adenoviruses use lactoferrin as a bridge for CAR-independent binding to and infection of epithelial cells. *J. Virol.* **81**, 954–963 (2007).

110. Kälin, S. *et al.* Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *J. Virol.* **84**, 5336–5350 (2010).

111. Nestić, D. *et al.* αvβ3 Integrin Is Required for Efficient Infection of Epithelial Cells with Human Adenovirus Type 26. *J. Virol.* **93**, (2018).

112. Yang, T.-I. *et al.* Adenovirus replication and host innate response in primary human airway epithelial cells. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **52**, 207–214 (2019).

113. Schwarz, Y. A., Amin, R. S., Stark, J. M., Trapnell, B. C. & Wilmott, R. W. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits interleukin-8 expression in A549 respiratory epithelial cells infected in vitro with a replication-deficient recombinant adenovirus vector. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 388–394 (1999).

114. Yoon, J.-S., Kim, H.-H., Lee, Y. & Lee, J.-S. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells. *Pediatr. Pulmonol.* **42**, 277–282 (2007).

115. Gregory, S. M., Nazir, S. A. & Metcalf, J. P. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol.* **6**, 357–374 (2011).

116. Lam, E. *et al.* Effective Apical Infection of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cells and Induction of Proinflammatory Chemokines by the Highly Pneumotropic Human Adenovirus Type 14p1. *PLoS ONE* **10**, (2015).

117. Britanova, L. & Diefenbach, A. Interplay of innate lymphoid cells and the microbiota. *Immunol. Rev.* **279**, 36–51 (2017).

118. Hernández-Santos, N. *et al.* Lung Epithelial Cells Coordinate Innate Lymphocytes and Immunity against Pulmonary Fungal Infection. *Cell Host Microbe* **23**, 511-522.e5 (2018).

119. Stehle, C., Hernández, D. C. & Romagnani, C. Innate lymphoid cells in lung infection and immunity. *Immunol. Rev.* **286**, 102–119 (2018).

120. Van Maele, L. *et al.* Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During Streptococcus pneumoniae Infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 493–503 (2014).

121. Kumar, R. K., Foster, P. S. & Rosenberg, H. F. Respiratory viral infection, epithelial cytokines, and innate lymphoid cells in asthma exacerbations. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 391–396 (2014).

122. Barnes, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 16–27 (2016).

123. van der Ploeg, E. K., Carreras Mascaro, A., Huylebroeck, D., Hendriks, R. W. & Stadhouders, R. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Human Respiratory Disorders. *J. Innate Immun.* **12**, 47–62 (2020).

124. Borger, J. G., Lau, M. & Hibbs, M. L. The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. *Front. Immunol.* **10**, (2019).

125. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* **43**, 29–40 (2015).

126. Puttur, F. *et al.* Pulmonary environmental cues drive group 2 innate lymphoid cell dynamics in mice and humans. *Sci. Immunol.* **4**, (2019).

127. Snelgrove, R. J. Pulmonary innate lymphoid cells regulate repair and remodeling after acute lung injury. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**, 281–284 (2012).

128. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).

129. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* **139**, 380–397 (1974).

130. Steinman, R. M., Adams, J. C. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J. Exp. Med.* **141**, 804–820 (1975).

131. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).

132. Rossi, M. & Young, J. W. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **175**, 1373–1381 (2005).

133. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20 (2018).

134. MacDonald, K. P. A. *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512–4520 (2002).

135. Robinson, S. P. *et al.* Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2769–2778 (1999).

136. Vermaelen, K. & Pauwels, R. Pulmonary Dendritic Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 530–551 (2005).

137. Hart, D. N. & McKenzie, J. L. Interstitial dendritic cells. *Int. Rev. Immunol.* **6**, 127–138 (1990).

138. Katz, S. I., Tamaki, K. & Sachs, D. H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324–326 (1979).

139. Jp, A. *et al.* Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 141–148 (2003).

140. León, B., López-Bravo, M. & Ardavín, C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**, 313–318 (2005).

141. Barchet, W., Cella, M. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.* **17**, 253–261 (2005).

142. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., Sobenin, I. A. & Bobryshev, Y. V. Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front. Physiol.* **5**, (2014).

143. Murphy, T. L. *et al.* Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 93–119 (2016).

144. Stoll, S. *et al.* Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3231–3239 (1998).

145. Nizzoli, G. *et al.* Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* **122**, 932–942 (2013).

146. Schuurhuis, D. H., Fu, N., Ossendorp, F. & Melief, C. J. M. Ins and outs of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **140**, 53–72 (2006).

147. Balan, S., Saxena, M. & Bhardwaj, N. Dendritic cell subsets and locations. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 348 1–68 (Elsevier, 2019).

148. Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G. & Blair, G. E. Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 91–102 (2000).

149. Théry, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45–51 (2001).

150. Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J. & Steinkasserer, A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* **23**, 273–275 (2002).

151. Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. & Steinkasserer, A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 113–118 (2002).

152. Lim, T. S. *et al.* CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PloS One* **7**, e45185 (2012).

153. Dilioglou, S., Cruse, J. M. & Lewis, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* **75**, 217–227 (2003).

154. Martín-Fontecha, A., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Dendritic Cell Migration to Peripheral Lymph Nodes. in *Dendritic Cells* (eds. Lombardi, G. & Riffo-Vasquez, Y.) 31–49 (Springer, 2009). doi:10.1007/978-3-540-71029-5_2.

155. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* **34**, 440–445 (2013).

156. McCarthy, D. A. *et al.* Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood. *Immunology* **92**, 244–251 (1997).

157. Ziegler, S. F., Ramsdell, F. & Alderson, M. R. The activation antigen CD69. *STEM CELLS* **12**, 456–465 (1994).

158. Fergusson, J. R., Fleming, V. M. & Klenerman, P. CD161-Expressing Human T Cells. *Front. Immunol.* **2**, (2011).

159. Panda, S. K. & Colonna, M. Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. *Front. Immunol.* **10**, 861 (2019).

160. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R. & Santoni, A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today* **15**, 479–483 (1994).

161. Simms, P. E. & Ellis, T. M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**, 301–304 (1996).

162. Munneke, J. M. *et al.* Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood* **124**, 812–821 (2014).

163. von Burg, N. *et al.* Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12835–12840 (2014).

164. Bajnok, A., Ivanova, M., Rigó, J. & Toldi, G. The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–7 (2017).

165. Cibrián, D. & Sánchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* **47**, 946–953 (2017).

166. González-Amaro, R., Cortés, J. R., Sánchez-Madrid, F. & Martín, P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol. Med.* **19**, 625–632 (2013).

167. Marzio, R., Mauël, J. & Betz-Corradin, S. CD69 and Regulatiof the Immune Function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 565–582 (1999).

168. Takahashi, T., Dejbakhsh-Jones, S. & Strober, S. Expression of CD161 (NKR-P1A) Defines Subsets of Human CD4 and CD8 T Cells with Different Functional Activities. *J. Immunol.* **176**, 211–216 (2006).

169. Lanier, L. L., Chang, C. & Phillips, J. H. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* **153**, 2417–2428 (1994).

170. Maggi, L. *et al*. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2174–2181 (2010).

171. Nicol, B. *et al*. An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8 + T cells involved in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **88**, 61–74 (2018).

172. Montaldo, E. *et al*. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* **119**, 3987–3996 (2012).

173. Kleinschek, M. A. *et al*. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **206**, 525–534 (2009).

174. Kurioka, A. *et al*. CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **9**, 486 (2018).

175. Guia, S., Fenis, A., Vivier, E. & Narni-Mancinelli, E. Activating and inhibitory receptors expressed on innate lymphoid cells. *Semin. Immunopathol.* **40**, 331–341 (2018).

176. Simoni, Y. *et al*. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity* **46**, 148–161 (2017).

177. Salimi, M. *et al*. Activated innate lymphoid cell populations accumulate in human tumour tissues. *BMC Cancer* **18**, 341 (2018).

178. Trabanelli, S. *et al*. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B Clin. Cytom.* **94**, 392–399 (2018).

179. Turner, M. A., Middha, S., Hofherr, S. E. & Barry, M. A. Comparison of the Life Cycles of Genetically Distant Species C and Species D Human Adenoviruses Ad6 and Ad26 in Human Cells. *J. Virol.* **89**, 12401–12417 (2015).

180. Doerfler, W. Adenoviruses. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).

181. Pantelic, R. S., Lockett, L. J., Rothnagel, R., Hankamer, B. & Both, G. W. Cryoelectron Microscopy Map of Atadenovirus Reveals Cross-Genus Structural Differences from Human Adenovirus. *J. Virol.* **82**, 7346–7356 (2008).

182. Wellehan, J. F. X. *et al*. Detection and Analysis of Six Lizard Adenoviruses by Consensus Primer PCR Provides Further Evidence of a Reptilian Origin for the Atadenoviruses. *J. Virol*. **78**, 13366–13369 (2004).

183. Davison, A. J., Benkő, M. & Harrach, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol*. **84**, 2895–2908 (2003).

184. Doszpoly, A., Harrach, B., LaPatra, S. & Benkő, M. Unconventional gene arrangement and content revealed by full genome analysis of the white sturgeon adenovirus, the single member of the genus Ichtadenovirus. *Infect. Genet. Evol*. **75**, 103976 (2019).

185. Harrach, B., Tarján, Z. L. & Benkő, M. Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS Lett*. **593**, 3660–3673 (2019).

186. Ghebremedhin, B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol*. **4**, 26–33 (2014).

187. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. & Ward, T. G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **84**, 570–573 (1953).

188. De Jong, J. C. *et al*. Adenoviruses from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals, Including Two Strains That Represent New Candidate Serotypes Ad50 and Ad51 of Species B1 and D, Respectively. *J. Clin. Microbiol*. **37**, 3940–3945 (1999).

189. Khare, R., Chen, C. Y., Weaver, E. A. & Barry, M. A. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr. Gene Ther*. **11**, 241–258 (2011).

190. Zhang, Y. & Bergelson, J. M. Adenovirus Receptors. *J. Virol*. **79**, 12125–12131 (2005).

191. Ebner, K., Pinsker, W. & Lion, T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J. Virol*. **79**, 12635–12642 (2005).

192. Hage, E., Gerd Liebert, U., Bergs, S., Ganzenmueller, T. & Heim, A. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient. *J. Gen. Virol*. **96**, 2734–2742 (2015).

193. Huang, G.-H. & Xu, W.-B. [Recent advance in new types of human adenovirus]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol*. **29**, 342–348 (2013).

194. Jones, M. S. *et al*. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol*. **81**, 5978–5984 (2007).

195. Walsh, M. P. *et al*. Evidence of Molecular Evolution Driven by Recombination Events Influencing Tropism in a Novel Human Adenovirus that Causes Epidemic Keratoconjunctivitis. *PLOS ONE* **4**, e5635 (2009).

196. Robinson, C. M. *et al*. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci. Rep*. **3**, 1–7 (2013).

197. Han, G. *et al*. Identification and typing of respiratory adenoviruses in Guangzhou, Southern China using a rapid and simple method. *Virol. Sin*. **28**, 103–108 (2013).

198. Gopalkrishna, V., Ganorkar, N. N. & Patil, P. R. Identification and molecular characterization of adenovirus types (HAdV-8, HAdV-37, HAdV-4, HAdV-3) in an

epidemic of keratoconjunctivitis occurred in Pune, Maharashtra, Western India. *J. Med. Virol.* **88**, 2100–2105 (2016).

199. Nakamura, M. *et al.* Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J. Med. Virol.* **84**, 81–86 (2012).

200. Benkő, M. Adenoviruses: Pathogenesis☆. in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02526-5.

201. Ginsberg, H. S. Newer Aspects of Adenovirus Infections. *Am. J. Public Health Nations Health* **49**, 1480–1485 (1959).

202. Buescher, E. L. Respiratory Disease and the Adenoviruses. *Med. Clin. North Am.* **51**, 769–779 (1967).

203. Guo, L. *et al.* Detection of three human adenovirus species in adults with acute respiratory infection in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 1051–1058 (2012).

204. Richmond, S. J. *et al.* An outbreak of gastroenteritis in young children caused by adenoviruses. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1178–1181 (1979).

205. Uhnoo, I., Wadell, G., Svensson, L. & Johansson, M. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. *Dev. Biol. Stand.* **53**, 311–318 (1983).

206. Borovjagin, A. V., Gomez-Gutierrez, J. G., Shirwan, H. & Matthews, Q. L. Adenovirus-Based Vectors for the Development of Prophylactic and Therapeutic Vaccines. *Nov. Technol. Vaccine Dev.* 203–271 (2014) doi:10.1007/978-3-7091-1818-4_8.

207. Majhen, D. *et al.* Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. *Hum. Gene Ther.* **25**, 301–317 (2014).

208. Chen, H. *et al.* Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae. *J. Virol.* **84**, 10522–10532 (2010).

209. Shashkova, E. V., May, S. M. & Barry, M. A. Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents. *Virology* **394**, 311–320 (2009).

210. Tutykhina, I. L. *et al.* Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **89**, 331–341 (2011).

211. Schroers, R. *et al.* Gene transfer into human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors. *Exp. Hematol.* **32**, 536–546 (2004).

212. San Martín, C. & Burnett, R. M. Structural studies on adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**, 57–94 (2003).

213. Rekosh, D. M., Russell, W. C., Bellet, A. J. & Robinson, A. J. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**, 283–295 (1977).

214. Smith, J. G., Wiethoff, C. M., Stewart, P. L. & Nemerow, G. R. Adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **343**, 195–224 (2010).

215. Berk, A. Adenoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virol.* 2355–2394 (2007).

216. Stewart, P. L., Burnett, R. M., Cyrklaff, M. & Fuller, S. D. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* **67**, 145–154 (1991).

217. Roberts, M. M., White, J. L., Grutter, M. G. & Burnett, R. M. Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science* **232**, 1148–1151 (1986).

218. Zubieta, C., Schoehn, G., Chroboczek, J. & Cusack, S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol. Cell* **17**, 121–135 (2005).

219. Rux, J. J. & Burnett, R. M. Adenovirus structure. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1167–1176 (2004).

220. Harrison, S. C. Virology. Looking inside adenovirus. *Science* **329**, 1026–1027 (2010).

221. van Raaij, M. J., Louis, N., Chroboczek, J. & Cusack, S. Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 A resolution. *Virology* **262**, 333–343 (1999).

222. Persson, B. D. *et al*. Human species D adenovirus hexon capsid protein mediates cell entry through a direct interaction with CD46. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2020732118 (2021).

223. Chroboczek, J. & Jacrot, B. The sequence of adenovirus fiber: similarities and differences between serotypes 2 and 5. *Virology* **161**, 549–554 (1987).

224. Xia, D., Henry, L., Gerard, R. D. & Deisenhofer, J. Structure of the receptor binding domain of adenovirus type 5 fiber protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 1)**, 39–46 (1995).

225. Mei, Y. F. & Wadell, G. Molecular determinants of adenovirus tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 3)**, 213–228 (1995).

226. Stevenson, S. C., Rollence, M., White, B., Weaver, L. & McClelland, A. Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J. Virol.* **69**, 2850–2857 (1995).

227. Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y.-B., Freimuth, P. & Flanagan, J. M. Structural Analysis of the Mechanism of Adenovirus Binding to Its Human Cellular Receptor, CAR. *Science* **286**, 1579–1583 (1999).

228. Madisch, I. *et al*. Phylogenetic analysis and structural predictions of human adenovirus penton proteins as a basis for tissue-specific adenovirus vector design. *J. Virol.* **81**, 8270–8281 (2007).

229. Ma, H.-C. & Hearing, P. Adenovirus Structural Protein IIIa Is Involved in the Serotype Specificity of Viral DNA Packaging ▿ . *J. Virol.* **85**, 7849–7855 (2011).

230. San Martín, C. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses* **4**, 847–877 (2012).

231. Vellinga, J., Van der Heijdt, S. & Hoeben, R. C. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J. Gen. Virol.* **86**, 1581–1588 (2005).

232. Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L. & Nemerow, G. R. Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J. Virol.* **79**, 1992–2000 (2005).

233. Nemerow, G. R., Pache, L., Reddy, V. & Stewart, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* **384**, 380–388 (2009).

234. Arnberg, N. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 442–448 (2012).

235. Mathias, P., Wickham, T., Moore, M. & Nemerow, G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* **68**, 6811–6814 (1994).

236. Russell, W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**, 2573–2604 (2000).

237. Boulanger, P. [Cell receptors for human adenoviruses]. *J. Soc. Biol.* **193**, 77–84 (1999).

238. Loustalot, F., Kremer, E. J. & Salinas, S. Membrane Dynamics and Signaling of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **322**, 331–362 (2016).

239. Bergelson, J. M. *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320–1323 (1997).

240. Excoffon, K. J. D. A. The coxsackievirus and adenovirus receptor: virological and biological beauty. *FEBS Lett.* **594**, 1828–1837 (2020).

241. Richardson, C. *et al.* Susceptibility of B lymphocytes to adenovirus type 5 infection is dependent upon both coxsackie-adenovirus receptor and alpha v beta 5 integrin expression. *J. Gen. Virol.* **86**, 1669–79 (2005).

242. Freimuth, P., Philipson, L. & Carson, S. D. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **323**, 67–87 (2008).

243. Henaff, D. & Kremer, E. J. Tropisme in vivo de l'adénovirus - Rôle inattendu de l'hexon. *médecine/sciences* **24**, 673–675 (2008).

244. Salone, B. *et al.* Integrin α3β1 Is an Alternative Cellular Receptor for Adenovirus Serotype 5. *J. Virol.* **77**, 13448–13454 (2003).

245. Davison, E., Diaz, R. M., Hart, I. R., Santis, G. & Marshall, J. F. Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J. Virol.* **71**, 6204–6207 (1997).

246. Li, E. *et al.* Integrin αvβ1 Is an Adenovirus Coreceptor. *J. Virol.* **75**, 5405–5409 (2001).

247. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A. & Nemerow, G. R. Integrins αvβ3 and αvβ5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309–319 (1993).

248. Atasheva, S. & Shayakhmetov, D. Adenovirus sensing by the immune system. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 109–113 (2016).

249. Howitt, J., Anderson, C. W. & Freimuth, P. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**, 331–364 (2003).

250. Kremer, E. J. & Nemerow, G. R. Adenovirus Tales: From the Cell Surface to the Nuclear Pore Complex. *PLOS Pathog.* **11**, e1004821 (2015).

251. Keriel, A., Billet, O. & Kremer, E. J. L'adénovirus canin : meilleur ami de l'homme ? *médecine/sciences* **19**, 1048–1049 (2003).

252. Fleischli, C. *et al.* Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J. Gen. Virol.* **88**, 2925–2934 (2007).

253. Sirena, D. *et al.* The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* **78**, 4454–4462 (2004).

254. Teigler, J. E., Iampietro, M. J. & Barouch, D. H. Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. *J. Virol.* **86**, 9590–9598 (2012).

255. Camacho, Z. T., Turner, M. A., Barry, M. A. & Weaver, E. A. CD46-mediated transduction of a species D adenovirus vaccine improves mucosal vaccine efficacy. *Hum. Gene Ther.* **25**, 364–374 (2014).

256. Baker, A. T. *et al.* Diversity within the adenovirus fiber knob hypervariable loops influences primary receptor interactions. *Nat. Commun.* **10**, 741 (2019).

257. Baker, A. T., Mundy, R. M., Davies, J. A., Rizkallah, P. J. & Parker, A. L. Human adenovirus type 26 uses sialic acid-bearing glycans as a primary cell entry receptor. *Sci. Adv.* **5**, eaax3567 (2019).

258. Arnberg, N., Pring-Akerblom, P. & Wadell, G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J. Virol.* **76**, 8834–8841 (2002).

259. Crunkhorn, S. Identifying adenoviral receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 99–99 (2011).

260. Nilsson, E. C. *et al.* The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat. Med.* **17**, 105–109 (2011).

261. Nemerow, G. R. & Stewart, P. L. Insights into Adenovirus Uncoating from Interactions with Integrins and Mediators of Host Immunity. *Viruses* **8**, (2016).

262. Ison, M. G. & Hayden, R. T. Adenovirus. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).

263. Scott, M. K. *et al.* Human Adenovirus Associated with Severe Respiratory Infection, Oregon, USA, 2013–2014. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1044–1051 (2016).

264. Evans, A. S. Latent adenovirus infections of the human respiratory tract. *Am. J. Hyg.* **67**, 256–266 (1958).

265. Garnett, C. T. *et al.* Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J. Virol.* **83**, 2417–2428 (2009).

266. Leung, A. Y.-H., Chan, M., Cheng, V. C.-C., Yuen, K.-Y. & Kwong, Y.-L. Quantification of adenovirus in the lower respiratory tract of patients without clinical adenovirus-related respiratory disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **40**, 1541–1544 (2005).

267. Adrian, T., Schäfer, G., Cooney, M. K., Fox, J. P. & Wigand, R. Persistent enteral infections with adenovirus types 1 and 2 in infants: no evidence of reinfection. *Epidemiol. Infect.* **101**, 503–509 (1988).

268. Lion, T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management. *FEBS Lett.* **593**, 3571–3582 (2019).

269. Kosulin, K. *et al.* Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 381.e1-381.e8 (2016).

270. Radke, J. R. & Cook, J. L. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **31**, 251–256 (2018).

271. Schmttz, H., Wigand, R. & Heinrich, W. WORLDWIDE EPIDEMIOLOGY OF HUMAN ADENOVIRUS INFECTIONS. *Am. J. Epidemiol.* **117**, 455–466 (1983).

272. Gray, G. C. & Erdman, D. D. Adenovirus Vaccines. *Plotkins Vaccines* 121-133.e8 (2018) doi:10.1016/B978-0-323-35761-6.00010-9.

273. Lynch, J. P. & Kajon, A. E. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 586–602 (2016).

274. Zhang, L. *et al*. Virology and epidemiology analyses of global adenovirus-associated conjunctivitis outbreaks, 1953-2013. *Epidemiol. Infect.* **144**, 1661–1672 (2016).

275. Cooper, R. J., Hallett, R., Tullo, A. B. & Klapper, P. E. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol. Infect.* **125**, 333–345 (2000).

276. D'Ambrosio, E., Del Grosso, N., Chicca, A. & Midulla, M. Neutralizing antibodies against 33 human adenoviruses in normal children in Rome. *J. Hyg. (Lond.)* **89**, 155–161 (1982).

277. Li, Q. *et al*. Neutralizing antibodies against adenovirus type 2 in normal and HIV-1-infected subjects: Implications for use of Ad2 vectors in vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 1–8 (2017).

278. Yu, B. *et al*. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenovirus type 5 in healthy adults in China. *J. Med. Virol.* **84**, 1408–1414 (2012).

279. Yeung, R. *et al*. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virol. J.* **6**, 11 (2009).

280. Acute Respiratory Disease Among New Recruits. *Am. J. Public Health Nations Health* **36**, 439–450 (1946).

281. Binder, A. M. *et al*. Human Adenovirus Surveillance — United States, 2003–2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 1039–1042 (2017).

282. Barouch, D. H. *et al*. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* **29**, 5203–5209 (2011).

283. Zheng, X. *et al*. Seroprevalence of neutralizing antibodies against adenovirus type 14 and 55 in healthy adults in Southern China. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e43 (2017).

284. Noda, M. *et al*. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 140–145 (2002).

285. Aoki, K. & Tagawa, Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. *Int. Ophthalmol. Clin.* **42**, 49–54 (2002).

286. Nwanegbo, E. *et al*. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 351–357 (2004).

287. Mayindou, G. *et al*. Molecular epidemiology and surveillance of circulating rotavirus and adenovirus in Congolese children with gastroenteritis. *J. Med. Virol.* **88**, 596–605 (2016).

288. Moura, P. O. *et al*. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *J. Med. Virol*. **79**, 174–181 (2007).

289. Kajon, A. E. *et al*. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J. Med. Virol*. **48**, 151–156 (1996).

290. Varghese, B. M., Dent, E., Chilver, M., Cameron, S. & Stocks, N. P. Epidemiology of viral respiratory infections in Australian working-age adults (20-64 years): 2010-2013. *Epidemiol. Infect*. **146**, 619–626 (2018).

291. Fletcher, S. *et al*. Descriptive epidemiology of infectious gastrointestinal illnesses in Sydney, Australia, 2007-2010. *West. Pac. Surveill. Response J. WPSAR* **6**, 7–16 (2015).

292. Zhao, H. *et al*. Seroprevalence of Neutralizing Antibodies against Human Adenovirus Type-5 and Chimpanzee Adenovirus Type-68 in Cancer Patients. *Front. Immunol*. **9**, 335 (2018).

293. Weaver, E. A. & Barry, M. A. Low Seroprevalent Species D Adenovirus Vectors as Influenza Vaccines. *PLoS ONE* **8**, e73313 (2013).

294. Sakurai, F., Kawabata, K. & Mizuguchi, H. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr. Gene Ther*. **7**, 229–238 (2007).

295. Sakurai, F. [Development of a replication-incompetent adenovirus vector derived from subgroup B adenovirus serotype 35]. *Yakugaku Zasshi* **128**, 1751–1761 (2008).

296. Kennedy, M. A. & Parks, R. J. Adenovirus virion stability and the viral genome: size matters. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther*. **17**, 1664–1666 (2009).

297. Shenk, T. & Williams, J. Genetic analysis of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **111**, 1–39 (1984).

298. Berk, A. J. Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surv*. **5**, 367–387 (1986).

299. Barker, D. D. & Berk, A. J. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* **156**, 107–121 (1987).

300. Lichtenstein, D. L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A. E. & Wold, W. S. M. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol*. **23**, 75–111 (2004).

301. Weitzman, M. D. Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front. Biosci. J. Virtual Libr*. **10**, 1106–1117 (2005).

302. Matsui, T., Murayama, M. & Mita, T. Adenovirus 2 peptide IX gene is expressed only on replicated DNA molecules. *Mol. Cell. Biol*. **6**, 4149–4154 (1986).

303. Christensen, J. B., Ewing, S. G. & Imperiale, M. J. Identification and characterization of a DNA binding domain on the adenovirus IVa2 protein. *Virology* **433**, 124–130 (2012).

304. Berk, A. J. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* **24**, 7673–7685 (2005).

305. Halbert, D. N., Cutt, J. R. & Shenk, T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**, 250–257 (1985).

306. Täuber, B. & Dobner, T. Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**, 7847–7854 (2001).

307. Lochmüller, H. *et al*. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* **5**, 1485–1491 (1994).

308. Amalfitano, A. *et al*. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* **72**, 926–933 (1998).

309. Zhao, H., Granberg, F., Elfineh, L., Pettersson, U. & Svensson, C. Strategic Attack on Host Cell Gene Expression during Adenovirus Infection. *J. Virol.* **77**, 11006–11015 (2003).

310. Wold, W. S. & Gooding, L. R. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* **184**, 1–8 (1991).

311. Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. F. & Gooding, L. R. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**, 8299–8306 (1997).

312. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. & Abedi, M. R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J. Gene Med.* **20**, e3015 (2018).

313. Tatsis, N. & Ertl, H. C. J. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **10**, 616–629 (2004).

314. Ertl, H. C. J. Adenoviral Vector Vaccines Antigen Transgene. *Adenoviral Vectors Gene Ther.* 551–570 (2016) doi:10.1016/B978-0-12-800276-6.00021-8.

315. Crosby, C. M., Nehete, P., Sastry, K. J. & Barry, M. A. Amplified and persistent immune responses generated by single-cycle replicating adenovirus vaccines. *J. Virol.* **89**, 669–675 (2015).

316. Fauci, A. S., Marovich, M. A., Dieffenbach, C. W., Hunter, E. & Buchbinder, S. P. Immune Activation with HIV Vaccines: Implications of the Adenovirus Vector Experience. *Science* **344**, 49–51 (2014).

317. Zhang, C. & Zhou, D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* **12**, 2064–2074 (2016).

318. Huebner, R. J., Rowe, W. P., Schatten, W. E., Smith, R. R. & Thomas, L. B. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* **9**, 1211–1218 (1956).

319. Hendrix, R. M. *et al*. Large, persistent epidemic of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease in U.S. army trainees. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 798–801 (1999).

320. Abrahamsen, K. *et al*. Construction of an adenovirus type 7a E1A- vector. *J. Virol.* **71**, 8946–8951 (1997).

321. Hyer, R. N., Howell, M. R., Ryan, M. A. & Gaydos, J. C. Cost-effectiveness analysis of reacquiring and using adenovirus types 4 and 7 vaccines in naval recruits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**, 613–618 (2000).

322. Weaver, E. A. Vaccines within vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 544–556 (2014).

323. Collis, P. B., Dudding, B. A., Winter, P. E., Russell, P. K. & Buescher, E. L. Adenovirus vaccines in military recruit populations: a cost-benefit analysis. *J. Infect. Dis.* **128**, 745–752 (1973).

324. Hoke, C. H. & Snyder, C. E. History of the restoration of adenovirus type 4 and type 7 vaccine, live oral (Adenovirus Vaccine) in the context of the Department of Defense acquisition system. *Vaccine* **31**, 1623–1632 (2013).

325. Dudding, B. A. *et al.* Acute respiratory disease in military trainees: the adenovirus surveillance program, 1966-1971. *Am. J. Epidemiol.* **97**, 187–198 (1973).

326. Hilleman, M. R. Epidemiology of adenovirus respiratory infections in military recruit populations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **67**, 262–272 (1957).

327. Dingle, J. H. & Langmuir, A. D. Epidemiology of acute, respiratory disease in military recruits. *Am. Rev. Respir. Dis.* **97**, Suppl:1-65 (1968).

328. Sanchez, J. L. *et al.* Respiratory Infections in the U.S. Military: Recent Experience and Control. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 743–800 (2015).

329. Russell, K. L. *et al.* Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine* **24**, 2835–2842 (2006).

330. Danthinne, X. & Imperiale, M. J. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* **7**, 1707–1714 (2000).

331. Berkner, K. L. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *BioTechniques* **6**, 616–629 (1988).

332. Chasse, J. *et al.* L'adénovirus : vecteur de thérapie génique ? *médecine/sciences* **5**, 331 (1989).

333. Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines. WHO meeting, Geneva, 19-22 June, 1989. *Vaccine* **8**, 425–437 (1990).

334. Rosenfeld, M. A. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* **252**, 431–434 (1991).

335. Crystal, R. G. Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Hum. Gene Ther.* **25**, 3–11 (2014).

336. Zabner, J. *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* **75**, 207–216 (1993).

337. Brody, S. L. & Crystal, R. G. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **716**, 90–101; discussion 101-103 (1994).

338. Zuckerman, J. B. *et al.* A Phase I Study of Adenovirus-Mediated Transfer of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene to a Lung Segment of Individuals with Cystic Fibrosis. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2973–2985 (1999).

339. Benihoud, K. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 440–447 (1999).

340. Shaw, A. R. & Suzuki, M. Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **15**, 418–429 (2019).

341. Jönsson, F. & Kreppel, F. Barriers to systemic application of virus-based vectors in gene therapy: lessons from adenovirus type 5. *Virus Genes* **53**, 692–699 (2017).

342. Hofmayer, S., Madisch, I., Darr, S., Rehren, F. & Heim, A. Unique sequence features of the Human adenovirus 31 complete genomic sequence are conserved in clinical isolates. *BMC Genomics* **10**, 557 (2009).

343. Gao, W., Robbins, P. D. & Gambotto, A. Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. *Gene Ther.* **10**, 1941–1949 (2003).

344. Omosa-Manyonyi, G. *et al.* A Phase I Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of the Safety and Immunogenicity of an Adjuvanted HIV-1 Gag-Pol-Nef Fusion Protein and Adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef Vaccine in Healthy HIV-Uninfected African Adults. *PloS One* **10**, e0125954 (2015).

345. Ouédraogo, A. *et al.* A phase 1b randomized, controlled, double-blinded dosage-escalation trial to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an adenovirus type 35 based circumsporozoite malaria vaccine in Burkinabe healthy adults 18 to 45 years of age. *PloS One* **8**, e78679 (2013).

346. Su, X. *et al.* Human Adenovirus Serotype 3 Vector Packaged by a Rare Serotype 14 Hexon. *PloS One* **11**, e0156984 (2016).

347. Liu, T. *et al.* A recombinant trivalent vaccine candidate against human adenovirus types 3, 7, and 55. *Vaccine* **36**, 2199–2206 (2018).

348. Kim, K. H. *et al.* A phase I clinical trial of Ad5.SSTR/TK.RGD, a novel infectivity-enhanced bicistronic adenovirus, in patients with recurrent gynecologic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 3440–3451 (2012).

349. Lhomme, E. *et al.* Early CD4+ T Cell Responses Are Associated with Subsequent CD8+ T Cell Responses to an rAd5-Based Prophylactic Prime-Boost HIV Vaccine Strategy. *PLOS ONE* **11**, e0152952 (2016).

350. Kaulfuß, M., Wensing, I., Windmann, S., Hrycak, C. P. & Bayer, W. Induction of complex immune responses and strong protection against retrovirus challenge by adenovirus-based immunization depends on the order of vaccine delivery. *Retrovirology* **14**, (2017).

351. Fonseca, J. A. *et al.* A Plasmodium Promiscuous T Cell Epitope Delivered within the Ad5 Hexon Protein Enhances the Protective Efficacy of a Protein Based Malaria Vaccine. *PLoS ONE* **11**, (2016).

352. McGuire, K. A., Miura, K., Wiethoff, C. M. & Williamson, K. C. New adenovirus-based vaccine vectors targeting Pfs25 elicit antibodies that inhibit Plasmodium falciparum transmission. *Malar. J.* **16**, 254 (2017).

353. Shen, C. F. *et al.* Optimization and scale-up of cell culture and purification processes for production of an adenovirus-vectored tuberculosis vaccine candidate. *Vaccine* **34**, 3381–3387 (2016).

354. Li, J.-X. *et al.* Immunity duration of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine and a homologous prime-boost immunisation in healthy adults in China: final report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Glob. Health* **5**, e324–e334 (2017).

355. Dolzhikova, I. V. *et al*. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 613–620 (2017).

356. Wang, L., Liu, J., Kong, Y., Hou, L. & Li, Y. Immunogenicity of Recombinant Adenovirus Type 5 Vector-Based Ebola Vaccine Expressing Glycoprotein from the 2014 Epidemic Strain in Mice. *Hum. Gene Ther.* **29**, 87–95 (2018).

357. Van Kampen, K. R. *et al*. Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine* **23**, 1029–1036 (2005).

358. Guo, Q. *et al*. Immunization With a Novel Human Type 5 Adenovirus-Vectored Vaccine Expressing the Premembrane and Envelope Proteins of Zika Virus Provides Consistent and Sterilizing Protection in Multiple Immunocompetent and Immunocompromised Animal Models. *J. Infect. Dis.* **218**, 365–377 (2018).

359. Kim, E. *et al*. Preventative Vaccines for Zika Virus Outbreak: Preliminary Evaluation. *EBioMedicine* **13**, 315–320 (2016).

360. Vos, A. *et al*. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabies by different routes of administration. *J. Gen. Virol.* **82**, 2191–2197 (2001).

361. Xiang, Z. Q., Greenberg, L., Ertl, H. C. & Rupprecht, C. E. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. *Virology* **450–451**, 243–249 (2014).

362. Khanam, S., Pilankatta, R., Khanna, N. & Swaminathan, S. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. *Vaccine* **27**, 6011–6021 (2009).

363. Raja, N. U. *et al*. Induction of bivalent immune responses by expression of dengue virus type 1 and type 2 antigens from a single complex adenoviral vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**, 743–751 (2007).

364. Zeng, M. *et al*. Protective immunity against botulism provided by a single dose vaccination with an adenovirus-vectored vaccine. *Vaccine* **25**, 7540–7548 (2007).

365. Chen, S., Xu, Q. & Zeng, M. Oral vaccination with an adenovirus-vectored vaccine protects against botulism. *Vaccine* **31**, 1009–1011 (2013).

366. Xie, Y., Gao, P. & Li, Z. A Recombinant Adenovirus Expressing P12A and 3C Protein of the Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Stimulates Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice. *BioMed Res. Int.* **2016**, (2016).

367. Jung, S.-Y. *et al*. Heterologous prime-boost vaccination with adenoviral vector and protein nanoparticles induces both Th1 and Th2 responses against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Vaccine* **36**, 3468–3476 (2018).

368. Guo, X. *et al*. Systemic and mucosal immunity in mice elicited by a single immunization with human adenovirus type 5 or 41 vector-based vaccines carrying the spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Immunology* **145**, 476–484 (2015).

369. Fausther-Bovendo, H. & Kobinger, G. P. Pre-existing immunity against Ad vectors. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 2875–2884 (2014).

370. Smith, C. A., Woodruff, L. S., Rooney, C. & Kitchingman, G. R. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1419–1427 (1998).

371. Barouch, D. H. *et al.* Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine in healthy adults (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.* **207**, 248–256 (2013).

372. Baden, L. R. *et al.* First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.* **207**, 240–247 (2013).

373. Stephenson, K. E. *et al.* First-in-human randomized controlled trial of an oral, replicating adenovirus 26 vector vaccine for HIV-1. *PloS One* **13**, e0205139 (2018).

374. Baden, L. R. *et al.* Induction of HIV-1-specific mucosal immune responses following intramuscular recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccination of humans. *J. Infect. Dis.* **211**, 518–528 (2015).

375. Milligan, I. D. *et al.* Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **315**, 1610–1623 (2016).

376. Anywaine, Z. *et al.* Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. *J. Infect. Dis.* **220**, 46–56 (2019).

377. Sadoff, J. *et al.* Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* NEJMoa2034201 (2021) doi:10.1056/NEJMoa2034201.

378. Stephenson, K. E. *et al.* Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19. *JAMA* **325**, 1535–1544 (2021).

379. Colloca, S. *et al.* Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Sci. Transl. Med.* **4**, 115ra2 (2012).

380. Johnson, M. J. *et al.* Type I interferon-dependent activation of NK cells by rAd28 or rAd35, but not rAd5, leads to loss of vector-insert expression. *Vaccine* **32**, 717–724 (2014).

381. Belousova, N. *et al.* Native and engineered tropism of vectors derived from a rare species D adenovirus serotype 43. *Oncotarget* **7**, 53414–53429 (2016).

382. Thorner, A. R. *et al.* Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. *J. Virol.* **80**, 12009–12016 (2006).

383. D, L., Z, R., C, T. & M, T. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. *Vaccine* **36**, 2712–2720 (2018).

384. Zhou, X. *et al.* Analysis of human adenovirus type 19 associated with epidemic keratoconjunctivitis and its reclassification as adenovirus type 64. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 2804–2811 (2012).

385. Duffy, M. R. *et al.* Generation and characterization of a novel candidate gene therapy and vaccination vector based on human species D adenovirus type 56. *J. Gen. Virol.* **99**, 135–147 (2018).

386. Lubeck, M. D. *et al*. Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6763–6767 (1989).

387. Bullard, B. L., Corder, B. N., Gordon, D. N., Pierson, T. C. & Weaver, E. A. Characterization of a Species E Adenovirus Vector as a Zika virus vaccine. *Sci. Rep.* **10**, 3613 (2020).

388. Lemiale, F. *et al*. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. *Vaccine* **25**, 2074–2084 (2007).

389. Lu, Z.-Z. *et al*. Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. *J. Gene Med.* **11**, 128–138 (2009).

390. Lu, Z.-Z. *et al*. Enhanced growth of recombinant human Adenovirus type 41 (HAdV-41) carrying ADP gene. *Virus Res.* **176**, 61–68 (2013).

391. Yamasaki, S., Miura, Y., Davydova, J., Vickers, S. M. & Yamamoto, M. A Single Intraduodenal Administration of Human Adenovirus 40 Vaccine Effectively Prevents Anaphylactic Shock. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **20**, 1508–1516 (2013).

392. Chandler, R. J. & Venditti, C. P. Gene therapy for metabolic diseases. *Transl. Sci. Rare Dis.* **1**, 73–89.

393. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L. & Pistello, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* **36**, 1–22 (2013).

394. Vitelli, A. *et al*. Chimpanzee adenoviral vectors as vaccines - challenges to move the technology into the fast lane. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 1241–1252 (2017).

395. Dicks, M. D. J. *et al*. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PloS One* **7**, e40385 (2012).

396. Guo, J., Mondal, M. & Zhou, D. Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. *Hum. Vaccines Immunother.* **14**, 1679–1685 (2018).

397. Wu, D., Wu, T., Liu, Q. & Yang, Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **94**, 44–48 (2020).

398. Baloch, S., Baloch, M. A., Zheng, T. & Pei, X. The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *Tohoku J. Exp. Med.* **250**, 271–278 (2020).

399. Li, H. *et al*. Updated Approaches against SARS-CoV-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, (2020).

400. Liu, Y., Wang, K., Massoud, T. F. & Paulmurugan, R. SARS-CoV-2 Vaccine Development: An Overview and Perspectives. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* (2020) doi:10.1021/acsptsci.0c00109.

401. Koirala, A., Joo, Y. J., Khatami, A., Chiu, C. & Britton, P. N. Vaccines for COVID-19: The current state of play. *Paediatr. Respir. Rev.* **35**, 43–49 (2020).

402. Mirzaei, R. *et al*. Overview of the current promising approaches for the development of an effective severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine. *Int. Immunopharmacol.* **88**, 106928 (2020).

403. Zhu, F.-C. *et al*. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 1845–1854 (2020).

404. Logunov, D. Y. *et al*. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet Lond. Engl.* **396**, 887–897 (2020).

405. Feng, L. *et al*. An adenovirus-vectored COVID-19 vaccine confers protection from SARS-COV-2 challenge in rhesus macaques. *Nat. Commun.* **11**, 4207 (2020).

406. Zhu, F.-C. *et al*. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **396**, 479–488 (2020).

407. Moore, J. P. & Klasse, P. J. COVID-19 Vaccines: 'Warp Speed' Needs Mind Melds, Not Warped Minds. *J. Virol.* **94**, (2020).

408. Coltart, C. E. M., Lindsey, B., Ghinai, I., Johnson, A. M. & Heymann, D. L. The Ebola outbreak, 2013-2016: old lessons for new epidemics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372**, (2017).

409. Baseler, L., Chertow, D. S., Johnson, K. M., Feldmann, H. & Morens, D. M. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annu. Rev. Pathol.* **12**, 387–418 (2017).

410. Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C. & Musso, D. An update on Zika virus infection. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 2099–2109 (2017).

411. Wikan, N. & Smith, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect. Dis.* **16**, e119–e126 (2016).

412. NOORBAKHSH, F. *et al*. Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. *Iran. J. Public Health* **48**, 20–31 (2019).

413. The Lancet, null. Yellow fever: a global reckoning. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 1348 (2016).

414. Barnett, E. D., Wilder-Smith, A. & Wilson, M. E. Yellow fever vaccines and international travelers. *Expert Rev. Vaccines* **7**, 579–587 (2008).

415. Zhu, F.-C. *et al*. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Lond. Engl.* **385**, 2272–2279 (2015).

416. Gilbert, S. C. Adenovirus-vectored Ebola vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 1347–1357 (2015).

417. Bullard, B. L., Corder, B. N., Gordon, D. N., Pierson, T. C. & Weaver, E. A. Characterization of a Species E Adenovirus Vector as a Zika virus vaccine. *Sci. Rep.* **10**, 3613 (2020).

418. Garske, T. *et al*. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* **11**, e1001638 (2014).

419. Chafekar, A. & Fielding, B. C. MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses* **10**, (2018).

420. Global influenza strategy 2019 - 2030 WHO.

421. Hollingdale, M. R., Sedegah, M. & Limbach, K. Development of replication-deficient adenovirus malaria vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 261–271 (2017).

422. Cheng, C. *et al*. Mechanism of ad5 vaccine immunity and toxicity: fiber shaft targeting of dendritic cells. *PLoS Pathog*. **3**, e25 (2007).

423. Buchbinder, S. P. *et al*. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet Lond. Engl*. **372**, 1881–1893 (2008).

424. Fitzgerald, D. W. *et al*. An Ad5-vectored HIV-1 vaccine elicits cell-mediated immunity but does not affect disease progression in HIV-1-infected male subjects: results from a randomized placebo-controlled trial (the Step study). *J. Infect. Dis*. **203**, 765–772 (2011).

425. Gray, G. E. *et al*. The phase 2b HVTN 503/Phambili study test-of-concept HIV vaccine study, investigating a recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up. *Lancet Infect. Dis*. **14**, 388–396 (2014).

426. Hertz, T. *et al*. A study of vaccine-induced immune pressure on breakthrough infections in the Phambili phase 2b HIV-1 vaccine efficacy trial. *Vaccine* **34**, 5792–5801 (2016).

427. Hammer, S. M. *et al*. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *N. Engl. J. Med*. **369**, 2083–2092 (2013).

428. Mast, T. C. *et al*. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* **28**, 950–957 (2010).

429. Folegatti, P. M. *et al*. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* **396**, 467–478 (2020).

430. Abbink, P. *et al*. Rapid Cloning of Novel Rhesus Adenoviral Vaccine Vectors. *J. Virol*. **92**, e01924-17, /jvi/92/6/e01924-17.atom (2018).

431. De Vleeschauwer, A. R. *et al*. A canine adenovirus type 2 vaccine vector confers protection against foot-and-mouth disease in guinea pigs. *Vaccine* **36**, 2193–2198 (2018).

432. Yu, Z. *et al*. A simplified system for generating recombinant E3-deleted canine adenovirus-2. *Plasmid* **77**, 1–6 (2015).

433. Smith, J. G. & Nemerow, G. R. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins. *Cell Host Microbe* **3**, 11–19 (2008).

434. Kremer, E. J., Boutin, S., Chillon, M. & Danos, O. Canine Adenovirus Vectors: an Alternative for Adenovirus-Mediated Gene Transfer. *J. Virol*. **74**, 505–512 (2000).

435. Maguire, C. A. *et al*. Recombinant Adenovirus Type 5 Vectors That Target DC-SIGN, ChemR23 and αvβ3 Integrin Efficiently Transduce Human Dendritic Cells and Enhance Presentation of Vectored Antigens. *Vaccine* **24**, 671–682 (2006).

436. Adams, W. C. *et al*. Adenovirus serotype 5 infects human dendritic cells via a coxsackievirus–adenovirus receptor-independent receptor pathway mediated by lactoferrin and DC-SIGN. *J. Gen. Virol*. **90**, 1600–1610 (2009).

437. Sonnenberg, G. F. & Hepworth, M. R. Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol*. **19**, 599–613 (2019).

438. Roy, S. *et al*. Viral vector and route of administration determine the ILC and DC profiles responsible for downstream vaccine-specific immune outcomes. *Vaccine* **37**, 1266–1276 (2019).

439. Rahman, M. A. *et al*. Differential Effect of Mucosal NKp44+ Innate Lymphoid Cells and Δγ Cells on Simian Immunodeficiency Virus Infection Outcome in Rhesus Macaques. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **203**, 2459–2471 (2019).

440. L, S. *et al*. Non-canonical Activation of Human Group 2 Innate Lymphoid Cells by TLR4 Signaling. (2020) doi:10.1101/2020.10.29.361345.

441. Cruz-Zárate, D. *et al*. Innate Lymphoid Cells Have Decreased HLA-DR Expression but Retain Their Responsiveness to TLR Ligands during Sepsis. *J. Immunol.* **201**, 3401–3410 (2018).

442. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15–31 (2017).

443. Wiley, J. S., Sluyter, R., Gu, B. J., Stokes, L. & Fuller, S. J. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* **78**, 321–332 (2011).

444. Scheppler, J. A., Nicholson, J. K., Swan, D. C., Ahmed-Ansari, A. & McDougal, J. S. Down-modulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **143**, 2858–2866 (1989).

445. Benz, C. *et al*. Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2061–2070 (2001).

446. Bar-Ephraim, Y. E. *et al*. CD62L Is a Functional and Phenotypic Marker for Circulating Innate Lymphoid Cell Precursors. *J. Immunol.* **202**, 171–182 (2019).

447. Campana, S. *et al*. Circulating ILC precursors expressing CD62L exhibit a type 2 signature distinctly decreased in psoriatic patients. *Eur. J. Immunol.* eji.202048893 (2021) doi:10.1002/eji.202048893.

448. Bienvenu, J., Monneret, G., Fabien, N. & Revillard, J. P. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**, 267–285 (2000).

449. Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R. E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**, 2341–2364 (2000).

450. Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K. & Kishimoto, T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **941**, 79–88 (2016).

451. Kimura, A. & Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1830–1835 (2010).

452. Elsaesser, H., Sauer, K. & Brooks, D. G. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* **324**, 1569–1572 (2009).

453. Parmigiani, A., Pallin, M. F., Schmidtmayerova, H., Lichtenheld, M. G. & Pahwa, S. Interleukin-21 and cellular activation concurrently induce potent cytotoxic function and promote antiviral activity in human CD8 T cells. *Hum. Immunol.* **72**, 115–123 (2011).

454. Lim, A. I. & Di Santo, J. P. ILC-poiesis: Ensuring tissue ILC differentiation at the right place and time. *Eur. J. Immunol.* **49**, 11–18 (2019).

455. Liu, M. *et al*. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. **22**, 121–130 (2011).

456. Yang, J. & Richmond, A. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther*. **9**, 846–855 (2004).

457. Pandya, J. M. *et al*. Blood chemokine profile in untreated early rheumatoid arthritis: CXCL10 as a disease activity marker. *Arthritis Res. Ther*. **19**, 20 (2017).

458. Hayney, M. S. *et al*. Serum IFN-γ-induced protein 10 (IP-10) as a biomarker for severity of acute respiratory infection in healthy adults. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol*. **90**, 32–37 (2017).

459. Spurrell, J. C. L., Wiehler, S., Zaheer, R. S., Sanders, S. P. & Proud, D. Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. **289**, L85-95 (2005).

460. Yuan, Y., Yang, Y. & Huang, X. IL-21 is required for CD4 memory formation in response to viral infection. *JCI Insight* **2**, e90652 (2017).

461. Lim, A. I. *et al*. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* **168**, 1086-1100.e10 (2017).

462. Nagasawa, M., Spits, H. & Ros, X. R. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **10**, (2018).

463. Vonarbourg, C. *et al*. Regulated expression of nuclear receptor RORγt confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORγt(+) innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751 (2010).

464. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol*. **8**, 34–47 (2008).

465. Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol*. **14**, 94–108 (2014).

466. Junker, F., Gordon, J. & Qureshi, O. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Front. Immunol*. **11**, 1393 (2020).

467. Vogelpoel, L. T. C., Baeten, D. L. P., de Jong, E. C. & den Dunnen, J. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front. Immunol*. **6**, 79 (2015).

468. Bournazos, S., Gupta, A. & Ravetch, J. V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat. Rev. Immunol*. **20**, 633–643 (2020).

469. Rosales, C. Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front. Immunol*. **8**, 280 (2017).

470. Jans, J. *et al*. Fc gamma receptors in respiratory syncytial virus infections: implications for innate immunity. *Rev. Med. Virol*. **24**, 55–70 (2014).

471. Taylor, A. *et al*. Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. *Immunol. Rev*. **268**, 340–364 (2015).

472. Lee, W. S., Wheatley, A. K., Kent, S. J. & DeKosky, B. J. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat. Microbiol.* **5**, 1185–1191 (2020).

473. Tirado, S. M. C. & Yoon, K.-J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* **16**, 69–86 (2003).

474. Laborde, E. A. *et al.* Immune Complexes Inhibit Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* **179**, 673–681 (2007).

475. Arruvito, L. CD32 Ligation Promotes the Activation of CD4+ T Cells. *Front. Immunol.* **9**, 12 (2018).

476. Sandilands, G. P. *et al.* Differential expression of CD32 isoforms following alloactivation of human T cells. *Immunology* **91**, 204–211 (1997).

477. Bertagnolli, L. N. *et al.* The role of CD32 during HIV-1 infection. *Nature* **561**, E17–E19 (2018).

478. Sananez, I. *et al.* Upregulation of CD32 in T Cells from Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Disease: A New Costimulatory Pathway? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **63**, 133–136 (2020).

479. Bánki, Z. *et al.* Fcγ Receptor Type I (CD64)-Mediated Impairment of the Capacity of Dendritic Cells to Activate Specific CD8 T Cells by IgG-opsonized Friend Virus. *Viruses* **11**, (2019).

480. Baker, K., Rath, T., Lencer, W. I., Fiebiger, E. & Blumberg, R. S. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1319–1334 (2013).

481. Regnault, A. *et al.* Fcγ Receptor–mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I–restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. 10.

482. Yang, J., Zhao, L., Xu, M. & Xiong, N. Establishment and function of tissue-resident innate lymphoid cells in the skin. *Protein Cell* **8**, 489–500 (2017).

483. Geremia, A. & Arancibia-Cárcamo, C. V. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* **8**, 1296 (2017).

484. Withers, D. R. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology* **149**, 123–130 (2016).

485. Penny, H. A., Hodge, S. H. & Hepworth, M. R. Orchestration of intestinal homeostasis and tolerance by group 3 innate lymphoid cells. *Semin. Immunopathol.* **40**, 357–370 (2018).

486. Symowski, C. & Voehringer, D. Interactions between Innate Lymphoid Cells and Cells of the Innate and Adaptive Immune System. *Front. Immunol.* **8**, 1422 (2017).

487. Hepworth, M. R. & Sonnenberg, G. F. Regulation of the adaptive immune system by innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 75–82 (2014).

488. Kumar, V. Innate lymphoid cell and adaptive immune cell cross-talk: A talk meant not to forget. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 397–417 (2020).

489. Kim, H. S. *et al.* A novel IL-10-producing innate lymphoid cells (ILC10) in a contact hypersensitivity mouse model. *BMB Rep.* **49**, 293–296 (2016).

490. Wang, S. *et al*. Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* **171**, 201-216.e18 (2017).

491. Martinez-Gonzalez, I. *et al*. ILC2 memory: Recollection of previous activation. *Immunol. Rev.* **283**, 41–53 (2018).

492. Wolfrum, N. & Greber, U. F. Adenovirus signalling in entry. *Cell. Microbiol.* **15**, 53–62 (2013).

493. Arnberg, N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev. Med. Virol.* **19**, 165–178 (2009).

494. Elisabeth Prchla, Christian Plank, Ernst Wagner, Dieter Blaas, and Renate Fuchs. Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J. Cell Biol.* **131**, 111–123 (1995).

495. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A. & Nemerow, G. R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309–319 (1993).

496. Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A. & Nemerow, G. Adenovirus Internalization and Infection Require Dynamin. *J. Virol.* **72**, 3455–3458 (1998).

497. Meier, O. & Greber, U. F. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* **6 Suppl 1**, S152-163 (2004).

498. Blumenthal, R., Seth, P., Willingham, M. C. & Pastan, I. pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry* **25**, 2231–2237 (1986).

499. Nakano, M. Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R. P. & Greber, U. F. The First Step of Adenovirus Type 2 Disassembly Occurs at the Cell Surface, Independently of Endocytosis and Escape to the Cytosol. *J. Virol.* **74**, 7085–7095 (2000).

500. Henaff, D., Salinas, S. & Kremer, E. J. An adenovirus traffic update: from receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol.* **6**, 179–192 (2011).

501. Suomalainen, M. *et al*. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* **144**, 657–672 (1999).

502. Leopold, P. L. *et al*. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 367–378 (1998).

503. Greber, U. F., Webster, P., Weber, J. & Helenius, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* **15**, 1766–1777 (1996).

504. Pirhonen, J., Sareneva, T., Kurimoto, M., Julkunen, I. & Matikainen, S. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 7322–7329 (1999).

505. Wilson, S. S., Wiens, M. E. & Smith, J. G. Antiviral mechanisms of human defensins. *J. Mol. Biol.* **425**, 4965–4980 (2013).

506. Perreau, M. *et al*. The number of Toll-like receptor 9-agonist motifs in the adenovirus genome correlates with induction of dendritic cell maturation by adenovirus immune complexes. *J. Virol.* **86**, 6279–6285 (2012).