



**HAL**  
open science

# Paramètres immunologiques dans les hépatites virales chroniques: évaluation des réponses lymphocytaires spécifiques CD4+ et CD8+ au cours de l'hépatite virale chronique C

Xavier Camous

► **To cite this version:**

Xavier Camous. Paramètres immunologiques dans les hépatites virales chroniques: évaluation des réponses lymphocytaires spécifiques CD4+ et CD8+ au cours de l'hépatite virale chronique C. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00610581

**HAL Id: tel-00610581**

**<https://theses.hal.science/tel-00610581>**

Submitted on 22 Jul 2011

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

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

**Université Joseph Fourier-Grenoble 1**  
**UFR de Biologie**

## **Thèse**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

Au titre de la formation doctorale

**Chimie et Sciences du Vivant**

Présentée et soutenue publiquement par

**Xavier Camous**

Le 23 décembre 2009

**Paramètres Immunologiques dans Les Hépatites Virales Chroniques :  
Evaluation des Réponses Lymphocytaires Spécifiques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au  
Cours de L'Hépatite Virale Chronique C**

Devant le Jury suivant :

Pr François <b>Boucher</b>	Président
Dr Filomena <b>Conti</b>	Rapportrice
Dr Vincent <b>Thibault</b>	Rapporteur
Pr Vincent <b>Leroy</b>	Directeur
Dr Patrice <b>Marche</b>	Co-Directeur

**Thèse préparée au sein du laboratoire IAPC**  
CRI-UJF Institut Albert Bonniot unité INSERM U823

<b>Abréviations</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>Le virus de l'hépatite C</b>	<b>8</b>
<b>Découverte :</b>	<b>8</b>
<b>Structure :</b>	<b>8</b>
<b>Gènes et fonctions</b>	<b>10</b>
1) Les gènes structuraux	10
1-1) Core	10
1-2) E1 et E2	10
1-3) p7	11
1-4) La protéine F	12
2) Les gènes non structuraux	12
2-1) NS2	12
2-2) NS3	13
2-3) NS4A	13
2-4) NS4B	13
2-5) NS5A	14
2-6) NS5B	14
<b>Le cycle viral</b>	<b>15</b>
1) L'entrée du virus :	15
2) La réplication :	18
3) La traduction :	18
4) Processing de la polyprotéine :	19
5) L'assemblage et la sécrétion des virions :	20
<b>L'hépatite C</b>	<b>21</b>
<b>Le foie</b>	<b>23</b>
1) Rôles et particularités générales	23
2) Un organe immunitaire à part	25
2-1) La tolérance alimentaire	26
2-2) Le foie, un cimetière de lymphocytes ?	28
<b>Virus et système immunitaire, une course contre la montre adaptative</b>	<b>29</b>
3-1) Les mécanismes d'échappement actifs du VHC.	29
3-2) Les mécanismes d'échappement passifs du VHC	31
<b>Réponse immunitaire durant la maladie</b>	<b>33</b>
<b>1) Les acteurs principaux, origines et rôles</b>	<b>33</b>
1-1) L'origine des lymphocytes et des cellules NK	33
1-2) Les lymphocytes T	33
1-3) Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>	34
1-4) Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup>	36
1-5) Les cellules NK	37
1-6) Les lymphocytes T régulateurs	38
1-7) Les cellules T NK	39
<b>2) Phase précoce et rencontre avec l'antigène</b>	<b>40</b>
<b>3) Réponse T CD4 durant la maladie</b>	<b>42</b>
<b>4) Réponse T CD8 durant la maladie</b>	<b>45</b>
<b>5) Les réponses NK et TNK durant la maladie</b>	<b>48</b>

<b><i>Impact du traitement sur l'immunité</i></b>	<b>50</b>
<b><i>Facteurs prédictifs de la réponse au traitement</i></b>	<b>57</b>
<b><i>Problématique</i></b>	<b>61</b>
<b><i>Résultats</i></b>	<b>65</b>
<b>Article 1: Fine Characterisation of Intrahepatic NK Cells Expressing Natural Killer Receptors in Chronic HCV and HBV Infections</b>	<b>66</b>
<b>Article 2: IFN-<math>\gamma</math> Gene Expression is Associated to SVR and Mainly Localized in NKT Cells in Chronic Hepatitis C Patients Treated with IFN-<math>\alpha</math> and Ribavirin</b>	<b>67</b>
<b>Article 3: Hepatitis C treatment suppresses T cell response in vivo and enhances TNK cells IFN<math>\gamma</math> secretion in vitro only during the first hours of culture</b>	<b>95</b>
<b>Article 4: Characterization and Role of Intra-Hepatic Regulatory T Cells in Chronic Hepatitis C Pathogenesis</b>	<b>120</b>
<b><i>Discussion</i></b>	<b>146</b>
<b><i>Conclusions générales et perspectives</i></b>	<b>155</b>
<b><i>Schéma récapitulatif de l'ensemble du travail</i></b>	<b>158</b>
<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>160</b>

## Abréviations

BCR: B Cell Receptor

APC: Antigen Presenting Cell

HBV/VHB: Hepatitis B virus

HCV/VHC: Hepatitis C virus

HLA-1/-2: Human Leukocyte Antigen type 1/2

IL: InterLeukine

ISG : Interferon Stimulated Gene

NK: Natural Killer cell

NKT: Natural Killer T cell

NS: Non Structural gene

NTR: Non Translated Region

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMC: Peripheral Blood Mononucleated Cells

TCR: T Cell Receptor

Th1: T cell Helper type 1

Th2: T cell Helper type 2

TLR: Toll-Like Receptor

TReg: Regulatory T cell

# Introduction

**L**orsque la vie est apparue sur Terre, la grande compétition pour survivre a été lancée. Depuis les organismes monocellulaires les plus primitifs jusqu'au niveau de complexité où nous nous trouvons, la course à la reproduction et à la préservation de l'espèce guide nos vies. Chaque organisme vivant a développé un éventail de systèmes offensifs et défensifs extrêmement variés dont l'efficacité est synonyme de survie et dans le cas contraire, d'extinction. Parmi les défenses les plus efficaces, se trouve le système immunitaire. Un système vieux de plusieurs millions d'années apparut en premier sous la forme d'amibes capables de phagocytose dans les cavités coelomiques des premiers êtres multicellulaires. Le parasite devenant utile à son hôte, à l'instar de la mitochondrie. Un nombre incalculable d'évolutions l'ont lentement amené à être un formidable moyen de se défendre virtuellement de toute attaque. Il se compose de deux grands ensembles : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire inné a été découvert en 1908 par Elie Metchnikoff à travers la phagocytose d'une épine de rose par l'étoile de mer. Il constitue notre première barrière non physique face à l'extérieur, au « non soi ». Il est composé d'une multitude de cellules pouvant phagocyter les éventuels éléments pathogènes, situés très souvent aux interfaces soi/non-soi telles que la peau, les muqueuses respiratoires, digestives ou sexuelles et sont capables de créer un environnement propice à la défense: l'inflammation. Ces cellules, granulocytes, lymphocytes TNK, NK et dendritiques, possèdent des éléments capables de reconnaître des motifs protéiques n'étant pas à l'état naturel dans notre organisme, les PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns). Ceux-ci sont reconnus par des récepteurs Toll chez la Drosophile et Toll-Like chez l'Homme (TLR) et vont induire *in fine* un élément crucial Nf-kB. Ce système répondra rapidement, toujours de la même manière au même stimulus, n'a aucune mémoire ni aucune spécificité. Il est certainement apparu en premier au cours de l'évolution puisque nous le retrouvons chez tous les êtres vivants animaux ou végétaux, sous différentes formes. Il existe également un système purement protéique et acellulaire, le complément, dont les premières molécules agissent à la manière des TLR en se fixant sur le pathogène ce qui conduit à une cascade d'assemblages dont la phase finale est le recrutement du complexe d'attaque membranaire créant des pores dans les membranes.

Le système immunitaire adaptatif, quant à lui, est apparu beaucoup plus récemment à l'échelle de l'évolution. Il est donc beaucoup moins répandu à travers les organismes vivants puisque apparu chez les prothèmes, poissons cartilagineux à mâchoire, ancêtres des vertébrés. La théorie actuelle est qu'il serait issu de l'insertion d'un rétrotransposon dans le génome d'un ancêtre commun codant un polypeptide proche des immunoglobulines ou des récepteurs T. Il est constitué de deux types cellulaires, les lymphocytes B et T, qui sont fabriqués respectivement au niveau de la moelle osseuse et du thymus (les organes lymphoïdes primaires). Chaque cellule nouvellement créée sera spécifique d'un seul motif présent dans le non-soi : l'antigène. Il sera reconnu par un récepteur B (BCR) ou T (TCR) spécifique d'un lymphocyte. Afin de répondre virtuellement à toute agression, le répertoire de ces récepteurs est bien entendu colossal, environ  $10^{15}$  combinaisons théoriques possibles. La stratégie est donc claire, générer en nombre et en diversité de spécificités afin de parer virtuellement à toute éventualité. Ce système peut être induit par le système immunitaire inné via l'inflammation, ce qui rend ces deux éléments interdépendants. Les cellules dendritiques, de l'immunité innée, peuvent activer parallèlement le système adaptatif. Il se met en place beaucoup plus lentement que le système inné car il agit après celui-ci en cas de première agression par un pathogène donné et nécessite une phase d'expansion clonale des lymphocytes spécifiques des différents peptides présents sur l'intrus. Les deux types de lymphocytes ont des fonctions très différentes. Les lymphocytes B naïfs vont rencontrer leur antigène spécifique via leur BCR et se différencier en plasmocytes capable de sécréter des anticorps ou en cellules B mémoires, activable beaucoup plus rapidement en cas de réexposition avec le même antigène. Les anticorps sécrétés peuvent être neutralisant du pathogène, une fois opsonisés ils peuvent activer un grand nombre de cellules immunitaire et induire la voie du complément en formant des complexes immuns. Les lymphocytes T se divisent très grossièrement en deux types : les cellules exprimant CD4 ont plutôt des fonctions de soutien (cellules T « helpers » (Th)) et sont capables de reconnaître un antigène présenté par une molécule de type HLA-2 (Human Leukocyte Antigen de type 2) via leur TCR. Ces cellules font parties des cellules appelées cellules présentatrices de l'antigène (APC) puisqu'elles peuvent recruter l'autre type de cellules T, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui expriment CD8. Ceux-ci reconnaissent un peptide présenté par une molécule HLA-1 sur une cellule infectée ou présenté par une APC. Cette reconnaissance de l'antigène lève le verrou sur les fonctions cytotoxiques et, après expansion clonale, permet l'élimination de la cible. Le système est ici simplifié à l'extrême puisqu'il ne prend pas en compte les cytokines,

facteurs solubles pouvant influencer l'immunité, ni tous les différents rôles que peuvent tenir ces 2 types de cellules.

Malgré cela, de nombreux microorganismes ont réussi à se frayer un chemin dans notre corps afin de s'y multiplier. Les bactéries tout d'abord, organismes procaryotes à très fort pouvoir reproductif et adaptatif, ont développé des membranes très complexes afin de contourner ou de survivre à l'action de notre système immunitaire, les parasites eux, entrent au cœur de nos cellules pour s'y cacher de nos défenses, les champignons possèdent une forme sporique les protégeant de tout et enfin, à la frontière du vivant, on trouve les virus. Simplifié à l'extrême, ce sont des informations génétiques et un matériel répliatif encapsidés dans une coque protéique. Les hypothèses sur leur origine sont au nombre de trois :

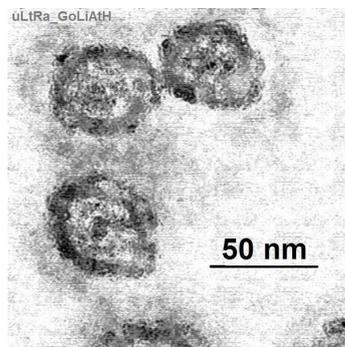
- Ils seraient apparus en même temps que la vie dans la soupe primordiale
- Ils seraient issus de cellules ayant régressé évolutivement
- Ils seraient originaires de séquences mal répliquées ou de plasmides ou de transposons s'étant échappés

Ils ne peuvent se reproduire en l'absence de cellule hôte, ce sont des parasites intracellulaires obligatoires, ni produire ou utiliser de l'énergie d'où leur classification à la limite du vivant. Les virus peuvent contenir leur génome sous forme d'ADN ou d'ARN, peuvent être encapsidés ou enveloppés, dans ce cas leur capsid est enfermée dans une partie de la bicouche lipidique de la cellule qui les a fabriqués. Ils existent sous deux formes, la forme intracellulaire, le code génétique est dénudé et processé par la machinerie cellulaire, et la forme extracellulaire, dite infectieuse, qui est la seule visualisable. De part leur immense variété, leurs stratégies d'infection sont extrêmement diverses et variées. Ils peuvent s'intégrer dans notre génome ou rester dans le cytoplasme et recruter les éléments nécessaires à sa répliation. L'évolution les a dotés de nombreux moyens d'échapper à nos défenses, comme la possibilité d'interférer dans la synthèse des messagers et effecteurs du système ou la faculté de muter très rapidement afin de s'adapter aux contraintes du système immunitaire. De plus, le coté pervers des systèmes immunitaires est bien entendu d'exercer une pression sélective sur les virus rendant l'émergence de clones résistants inévitable. La présente étude a été réalisée à partir de patients ayant été contaminés par l'un d'entre eux, le virus de l'hépatite C (HCV).

## Le virus de l'hépatite C

### **Découverte :**

Au milieu des années 70, un médecin américain travaillant au département de médecine transfusionnelle au NIH (National Health Institutes), Harvey Alter, a cherché à savoir quel agent était responsable des infections consécutives aux transfusions sanguines. En effet, celles-ci étaient parfois suivies d'un syndrome pseudo grippal et quelques années plus tard d'une maladie hépatique. Il a dans un premier temps découvert que la majorité d'entre elles était due à un virus inconnu et différent de ceux provoquant l'hépatite A ou B, le virus de l'hépatite non-A non-B transmissible au chimpanzé. Une dizaine d'années de recherche et les progrès immenses de la biologie moléculaire permirent à Qui-Lim Choo, Michael Houghton et George Kuo d'identifier l'agent inconnu en 1989 (Choo, Kuo et al. 1989) et la mise au point d'un test de dépistage (Kuo, Choo et al. 1989). La découverte du HCV (fig.1) est assez remarquable dans le sens qu'il s'agit de la première entièrement réalisée par des méthodes de biologie moléculaire.



*Fig.1 : Le VHC*

*(wikipédia)*

### **Structure :**

Le HCV est un virus enveloppé d'environ 60nm de diamètre dont le génome est un brin monocaténaire linéaire d'ARN de polarité positive contenu dans une capsidie icosaédrique. Il a été classifié dans le groupe IV, la famille des *Flaviviridae* et est l'unique représentant du genre *Hepacivirus*. Son mode d'infection est essentiellement parentéral, et, dans une moindre mesure sexuel. Sa prévalence est officiellement d'environ 3% au niveau mondial, soit 180 millions de malades, mais en réalité les chiffres pourraient être bien plus élevés. Ses cellules

cibles principales sont les hépatocytes, bien que sa réplication ait été montrée aussi au niveau des leucocytes (Castillo, Rodriguez-Inigo et al. 2005). Ceux-ci pourraient être un deuxième réservoir viral, expliquant les réinfections observées à la suite d'une greffe hépatique. Récemment, une étude a montré que les sous-populations de monocytes CD14<sup>+/++</sup> CD16<sup>++</sup> étaient certainement la source secondaire de virus (Coquillard and Patterson 2009).

Le génome du virus (fig.2) est long d'environ 9600 paires de bases flanquées de 2 régions non transcrites (NTR) en 5' et en 3' de la région codante (Kato 2000). Ces NTR ont une structure spatiale très complexe associée à leurs diverses fonctions. La NTR en 5', long d'environ 340 nucléotides, contient un IRES (séquence interne d'insertion des ribosomes) nécessaire à la réplication virale (Jubin 2001). La séquence est conservée à 92% entre les différentes souches, indiquant son importance dans le cycle viral. La NTR en 3' est constituée de trois parties distinctes, une région d'environ 40 nucléotides très variable, une queue poly(U/UC) longue au minimum de 25 nucléotides et une séquence de 98 nucléotides très conservée appelée 3X-Tail (Yi and Lemon 2003). La partie codante du génome viral est séparée en deux parties, les gènes structuraux en premier en 5' suivis des gènes non structuraux (NS) en 3', séparées par le gène de la protéine p7. L'ensemble est traduit sous la forme d'une polyprotéine de 3010 acides aminés qui va être clivée pour donner l'ensemble des protéines virales (Dubuisson 2007). Le nombre de génotypes actuellement identifiés est de sept, chacun d'eux étant à son tour divisé en sous-types, ce qui porte à près de 100 le nombre de variants.

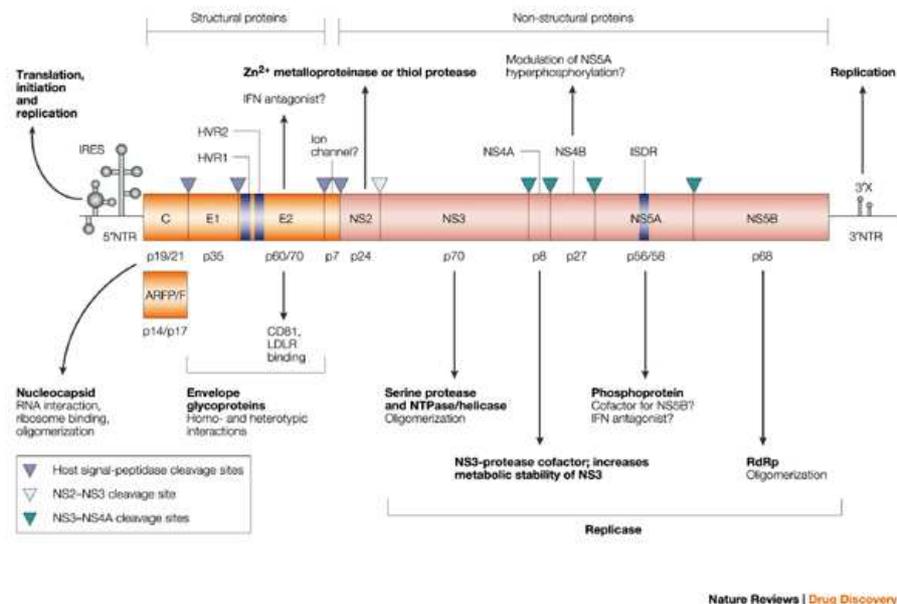


Fig.2 : Organisation génomique du VHC

(Nature Reviews Drug Discovery 1; 867-881 2002)

## **Gènes et fonctions**

### **1) Les gènes structuraux**

Situés à l'extrémité 5' du génome, ils codent majoritairement pour 3 protéines : core, E1 et E2. Une quatrième protéine peut éventuellement être traduite, la protéine F, qui résulte de l'épissage alternatif de core par un décalage d'un codon du cadre de lecture.

#### **1-1) Core**

La protéine core est la première protéine à être traduite lors des phases précoces de l'infection. Son rôle premier est d'encapsider le complexe formé par le génome et les protéines NS. Pour cela, elle est capable de se multimériser et d'interagir avec l'ARN viral et les protéines d'enveloppe (McLauchlan 2000). Cette protéine de 21kDa est principalement localisée dans le cytoplasme au niveau du réticulum endoplasmique mais on la retrouve également en quantités plus faibles dans les gouttelettes lipidiques et au niveau du noyau (Dubuisson, Penin et al. 2002). Ces deux éléments laissent ainsi à penser qu'elle joue un rôle dans l'installation de la stéatose (Piodi, Chouteau et al. 2008) et qu'elle possède une séquence NLS (Nuclear Localization Sequence). Ses rôles semblent encore plus nombreux puisqu'elle possède également des fonctions oncogènes, elle interagit avec et modifie l'expression de c-myc, qui régule 15% de tous nos gènes, et p53, agit sur la réponse au stress oxydatif. Elle peut également se lier à d'autres protéines virales, telles NS5A, avec une importance cruciale pour la production et l'assemblage de virions (Masaki, Suzuki et al. 2008). L'ensemble des mécanismes d'action de core n'a pas encore été élucidé.

#### **1-2) E1 et E2**

Les protéines d'enveloppe 1 et 2 sont des glycoprotéines de 30 et 70 kDa respectivement. Les sites de glycosylation de ces protéines, au nombre de 5-6 sur E1 et 9-10 sur E2, sont très conservés entre les différents génotypes (Goffard and Dubuisson 2003). Elles forment un hétérodimère non-covalent retenu dans un premier temps dans le réticulum endoplasmique (Duvet, Cocquerel et al. 1998). Par un mécanisme alternatif inconnu, se produisant sûrement par erreur, elles peuvent s'agréger via des ponts disulfures et rester dans la cellule sous forme d'agrégats (Deleersnyder, Pillez et al. 1997). Les complexes viables sont ensuite exportés vers la membrane plasmique au niveau des futurs bourgeonnements des virions afin de s'ancrer

dans leur future enveloppe (Bartosch, Dubuisson et al. 2003). De part leur position sur les virions, il a été postulé qu'elles devaient être liées à l'entrée du virus dans la cellule cible via une liaison sur un putatif récepteur membranaire. La protéine E1, dont le(s) rôle(s) exact(s) sont encore à élucider, possède deux particularités, une séquence interne de type peptide-fusion ainsi qu'une séquence superenroulée (Coiled Coil), caractéristiques des protéines impliquées dans la fusion membranaire (Perez-Berna, Moreno et al. 2006). De nombreuses recherches ont pour le moment identifié plusieurs marqueurs nécessaires à l'entrée du virus. Parmi ceux-ci, la molécule CD81, ou tétraspanine, a été identifiée (Pileri, Uematsu et al. 1998) puisque E2 peut se lier à elle (Drummer, Boo et al. 2006). Une étude ayant montré que des anticorps bloquant CD81 avaient la capacité de retirer son pouvoir infectieux au virus. Le virus n'infectant que le foie et CD81 étant exprimé ubiquitairement, un ou plusieurs autre(s) facteur(s) doivent entrer en jeu. Une protéine hépatique a montré une capacité à lier E2, SR-BI (Scavenger Receptor class B type 1) (Scarselli, Ansuini et al. 2002). Ce récepteur « éboueur » peut se lier à tous les types de lipides pour faciliter leur transport hors et dans la cellule. Le HCV étant enveloppé de lipides, on comprend aisément son importance. Le fait que les cellules non hépatiques transfectées pour exprimer ces deux récepteurs ne sont toujours pas permissives au virus, d'autres protéines sont requises et restent à identifier. Deux au moins d'entre elles ont été découvertes, la Claudine-1 et l'occludine. Leur rôle sera plus longuement détaillé dans la partie concernant le cycle viral.

### **1-3) p7**

Cette petite protéine de 7kDa est hydrophobe et nécessaire à l'assemblage et à l'excrétion des virions hors de la cellule (Sakai, Claire et al. 2003). Le ou les mécanismes auxquels elle participe sont encore inconnus. Son gène sépare ceux des protéines structurales et non structurales sur le génome viral. Elle forme un homo- hexa ou hepta -mère servant de canal ionique (famille des viroporines, comme la protéine M2 du virus de la grippe) ancré par deux domaines transmembranaires dans les membranes issues du réticulum endoplasmique (Griffin, Harvey et al. 2004). Des essais in vitro utilisant l'amantadine, inhibiteur connu de M2, ont montré un effet génotype-dépendant sur le niveau et la mobilité d'E2 dans la cellule et la réplication virale (Griffin, Beales et al. 2003; Castelain, Bonte et al. 2007).

## **1-4) La protéine F**

Elle est encodée par un cadre de lecture décalé par rapport à celui de core de -2/+1 lors de la traduction par les ribosomes. Elle est peu stable, sa demi-vie est très courte, inférieure à 10 minutes, et elle est localisée dans le réticulum endoplasmique. Sa dégradation semble médiée par le protéasome (Branch, Stump et al. 2005). Elle n'est pas nécessaire à la réplication virale. Son rôle est pour l'instant inconnu, tout comme le fait qu'elle résulte ou non d'un accident de traduction. Les études sur ce sujet sont peu nombreuses mais divergent, entre la démonstration d'un manque de contrainte fonctionnelle sur les mutations, une séquence ne contenant aucun domaine fonctionnel connu ou à l'inverse une interaction avec p53 et c-myc en sous-régulant le premier et en sur-régulant le second, tout comme core (Wu, Shao et al. 2007).

## **2) Les gènes non structuraux**

Ces gènes, 5'-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3', codent pour toute la machinerie répliquative nécessaire au virus. Les six protéines sont séparées après traduction par des protéases virales présentes dans le virion lors de l'infection. Ces protéines ont des interactions très complexes entre elles et avec les protéines cellulaires, influençant énormément de mécanismes comme le cycle cellulaire ou la réponse antivirale.

### **2-1) NS2**

Cette protéine de 24 kDa est codée par le premier gène non structural du génome viral. Un certain nombre de paramètres et de partenaires peuvent influencer ses fonctions et leur efficacité. Elle est impliquée dans le contrôle viral du cycle cellulaire en sous régulant la cycline A, bloquant ainsi le cycle en phase S, par un mécanisme encore inconnu. Le blocage en phase S est un mécanisme présent dans beaucoup d'infections virales telles que celles provoquées par le virus d'Epstein Barr, le cytomégalovirus ou encore HBV via sa protéine X (Yang, Liu et al. 2006). NS2 peut aussi activer les transcriptions dépendantes du CRE (cAMP Responsive Element) qui seraient une des clés de la réplication virale (Kim, Kwon et al. 2007). Elle peut enfin inhiber une des voies mitochondriales de l'apoptose, celle induite par CIDE-B (Erdtmann, Franck et al. 2003). NS2 peut se dimériser avec la partie N-terminale de NS3 et l'efficacité de son activité protéase s'en trouve modifiée. Elle forme alors l'autoprotéase NS2-3 qui catalyse le clivage NS2/NS3, élément nécessaire à la réplication. Le domaine de N-terminal de NS3 est le cofacteur de NS2 qui amène un site fixant  $Zn^{2+}$  capable

de découpler l'activité protéasique de NS2. Seule, elle possède une activité basale cystéine-protéase et est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (Pallaoro, Lahm et al. 2001). Le rôle exact de NS2-3 dans la réplication virale est encore inconnu, ainsi que celui de NS2 seule. Une des hypothèses désigne NS2 comme un régulateur du niveau de NS3, et donc un régulateur de la réplication virale.

## **2-2) NS3**

NS3 est la deuxième protéase codée par le virus de l'hépatite C. Cette protéine de 70kDa localisée dans le cytoplasme semble jouer beaucoup de rôles différents et est l'une des plus étudiées. Sa partie N-terminale est un cofacteur de la protéase NS2-3 et du site actif sérine-protéase et que sa partie C-terminale contient des domaines triphosphatases et ARN-hélicases (qui séparerait les ARN positifs néoformés et le brin négatif originel). Elle est donc un élément essentiel du complexe réplicatif viral qu'elle forme avec NS4A et NS5B. Seule, elle clive NS3-4A, complexée à NS4A elle catalyse le clivage des protéines NS en aval : NS4A/B, NS4B/NS5A et NS5A/B (Lindenbach and Rice 2005). Elle interfère également dans de nombreux processus cellulaires (Tellinghuisen and Rice 2002). Elle peut se complexer avec p53 et générer son accumulation dans le noyau, supprimer l'apoptose induite par l'actinomycine D et inhiber la protéine kinase dépendante de cAMP (PKA), ce qui lui donne un rôle potentiellement oncogène (Deng, Nagano-Fujii et al. 2006; Tanaka, Nagano-Fujii et al. 2006). Enfin, elle participe activement à l'échappement du virus au système immunitaire via plusieurs mécanismes.

## **2-3) NS4A**

NS4A est une petite protéine de 8kDa possédant plusieurs fonctions. Elle active tout d'abord l'activité sérine-protéase de NS3 en tant que cofacteur, elle participe à l'ancrage des protéines du complexe de réplication via son domaine hydrophobe et agirait sur NS5A en régulant sa phosphorylation (Wolk, Sansonno et al. 2000).

## **2-4) NS4B**

Cette protéine de 27kDa est encore très largement méconnue. A ce jour, ses seules fonctions connues sont de participer au complexe de réplication, elle est capable de se lier à NS3, NS4A et NS5A, et de réorganiser la membrane du réticulum endoplasmique. En dimère avec NS4A,

elle est capable d'inhiber le trafic intracellulaire et de former une « toile » (terme utilisé dans l'étude la décrivant) formée par les lipides de l'endosome précoce (EE) contenant Rab5. NS4B coprécipite avec Rab5 et beaucoup d'autres protéines de l'EE sont ainsi piégées dans cette toile et pourraient être, en quelque sorte prises en otages pour servir la réplication virale. Rab5 est crucial pour la formation de cette toile puisque qu'un siRNA Rab5 (ARN « silencing » inhibant spécifiquement la transcription de Rab5) l'inhibe complètement (Egger, Wolk et al. 2002).

## **2-5) NS5A**

La protéine NS5A est, tout comme NS3, une protéine jouant un grand nombre de rôles. Paradoxalement, celui ou ceux qu'elle joue exactement dans la réplication virale est méconnu alors que ceux qui l'impliquent dans les modifications des fonctions cellulaires sont bien mieux cernés. Elle existe sous deux isoformes de poids moléculaires 56 et 58 kDa en fonction de son niveau de phosphorylation sur résidu sérine dirigé par NS4A (Bartenschlager, Frese et al. 2004). Les données actuelles permettent de conclure que NS5A est vitale pour la réplication virale et l'assemblage des virions. Elle interagit uniquement sous forme phosphorylée avec core pour permettre au génome viral de se lier à cette dernière au niveau des gouttelettes lipidiques (Shi, Polyak et al. 2002). Une mutation en C-terminal de NS5A sur un résidu sérine empêchant une phosphorylation complète réduit d'un facteur 100.000 la production de virions. Les deux résidus sérine en C-terminal doivent impérativement être phosphorylés pour interagir avec core et une production optimale de virions. Le domaine N-terminal et son site de phosphorylation est aussi requis puisque aucun viron n'est observé si cette partie de la protéine est déplétée (Tellinghuisen, Foss et al. 2008). Elle peut aussi interagir avec NS5B pour moduler sa fonction polymérase (Bartenschlager, Frese et al. 2004). NS5A est également fortement suspectée d'être un oncogène. Par exemple, elle interagit avec FBP (FUSE Binding Protein) qui est un partenaire connu de c-myc. FBP est normalement dans le noyau mais dans le cadre de l'hépatite, elle co-localise avec NS5A dans le cytoplasme. Elle possède aussi une séquence NLS en C-terminal et induit la transcription de gènes, sans que nous ne sachions si c'est de manière directe ou indirecte (Zhang, Harris et al. 2008).

## **2-6) NS5B**

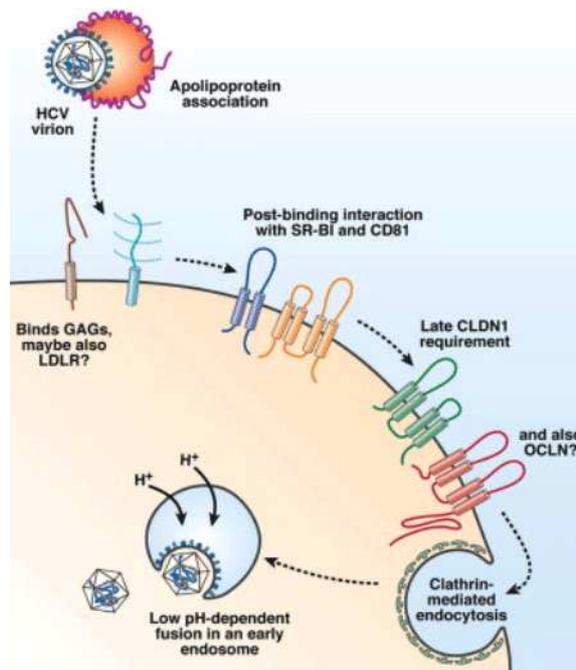
Dernière protéine codée par le HCV, d'une masse de 68kDa, NS5B est la protéine majeure de la réplication du virus. Il s'agit de la ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). C'est elle

qui synthétise les nouveaux brins d'ARN positifs à partir du brin négatif originel, servant de matrice à la machinerie traductionnelle de la cellule infectée. Elle ne dispose pas d'un système de lecture sur preuve et génère un nombre très élevé d'erreurs de copies,  $20 \times 10^{-4}$  par site par an (Behrens, Tomei et al. 1996). Elle fait partie du complexe réplcatif et aucune autre fonction ne lui est connue à ce jour.

## ***Le cycle viral***

Bien que de très nombreux progrès ont été réalisés concernant la compréhension du cycle viral du HCV, une multitude de zones d'ombres persiste, notamment sur l'implication exacte de chaque protéine virale et des acteurs cellulaires dans l'entrée, la réplication, l'assemblage et la libération des virus.

### **1) L'entrée du virus :**



*Fig.3 : Modèle théorique d'entrée du virus*

*(The Accelerating Pace of HCV Research: A Summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses - Gastroenterology January 2009)*

Plusieurs études récentes ont mis en lumière le rôle très important joué par les lipides dans l'infection par le HCV (fig.3). En effet, il a été montré que la particule virale pouvait se complexer avec les LDL et HDL (Low/High Density Lipoprotein) (Andre, Perlemuter et al.

2005) et que les VLDL (Very Low Density Lipoproteins) étaient nécessaires à la réplication (Huang, Sun et al. 2007), et enfin que les virions pouvaient interagir avec les VLDL durant l'assemblage de ces dernières et qu'ils étaient sécrétés ensemble (Chang, Jiang et al. 2007).

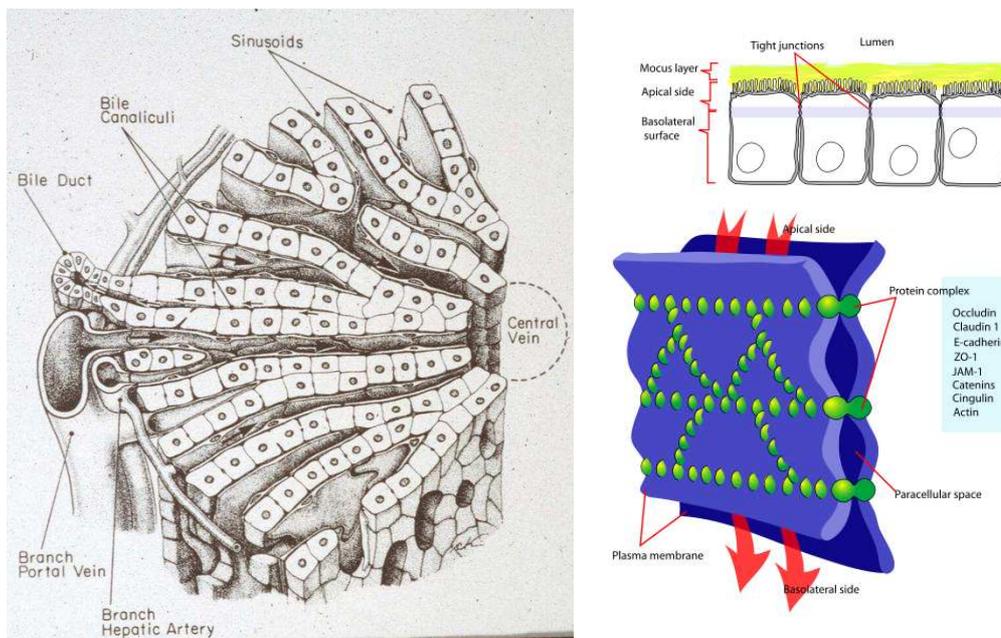
En partant de ce fait, on peut faire l'hypothèse que les virus circulent associés à une VLDL dans le sang et lorsqu'ils rencontrent leur cellule cible. En ce qui concerne l'attachement à la cellule cible, il a été montré que l'héparinase, qui clive l'héparane sulfate des glycosaminoglycanes (GAG), inhibait la protéine E2 et l'attachement du virus, tout comme des anticorps dirigés contre LDL-R (LDL Receptor) (Barth, Schafer et al. 2003; Koutsoudakis, Kaul et al. 2006). Le « docking » du virus à la surface des hépatocytes pourrait donc être réalisé par une co-réception de la lipoprotéine associée au virus par LDL-R et du GAG par E2 (Agnello, Abel et al. 1999). GAG et LDL-R étant ubiquitaires et le VHC spécifique du foie, d'autres molécules spécifiques aux hépatocytes doivent être requises pour permettre l'entrée du HCV.

Identifiée en 2002, la molécule SR-BI (Scavenger Receptor class B I) (Scarselli, Ansuini et al. 2002), récepteur majeur régulant l'approvisionnement hépatique en cholestérol via les HDL, est un des acteurs participant à l'entrée du virus (Catanese, Graziani et al. 2007). Il a été montré des interactions directes entre E2 et SR-BI (Scarselli, Ansuini et al. 2002) mais aussi indirectes puisqu'il est aussi récepteur aux LDL, dont celles liées au virus circulant (Connelly and Williams 2004). Il semblerait que le virus rencontre SR-BI avant CD81 puisque le virus peut se lier sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) SR-BI<sup>+</sup> KO CD81 mais pas sur celles SR-BI KO CD81<sup>+</sup> (Evans, von Hahn et al. 2007). Ceci est encore actuellement en débat.

La première protéine participant à l'entrée du virus à avoir été découverte est CD81 (ou tétraspanine) (Pileri, Uematsu et al. 1998). Cette molécule possède une région LEL (Large Extracellular Loop) qui contient la séquence nécessaire à la liaison avec E2 et à l'entrée du virus. L'accès à cette zone est barré au virus par des glycanes spécifiques. Ceux-ci pourraient disparaître lorsque CD81 réorganise des microdomaines protéo-lipidiques membranaires pour former des TEM (Tetraspanin-Enriched Domains), ce qui est sa fonction première. CD81 aurait alors besoin d'être au sein d'un TEM pour pouvoir lier le virus, ce qui pourrait expliquer le phénomène décrit ci-dessus dans le cas des cellules CHO (Kapadia, Barth et al. 2007; Voisset, Lavie et al. 2008).

Aucune de ces deux molécules ne donnant un pouvoir permissif au HCV par transfert à des cellules non-hépatiques, au moins une autre doit être impliquée. En 2007, la protéine présente au niveau des jonctions serrées Claudine-1 (CLDN-1) a été identifiée (Evans, von Hahn et al. 2007). En la transférant dans des cellules non-permissives, celles-ci peuvent être infectées, ce qui démontre le rôle tardif de CLDN-1 dans l'entrée du virus. De plus, cela démontre aussi l'importance de la polarisation cellulaire dans l'infectivité. Les hépatocytes étant organisés en monocouche autour des sinusoides, ils sont tous accolés les uns aux autres par des jonctions serrées. Le virus, arrivant certainement par les artères, a ainsi tout de suite accès à ces cibles.

Une autre protéine des jonctions serrées (fig.4), l'occludine, a récemment été mise en lumière de par son importance pour la pénétration du virus (Ploss, Evans et al. 2009). Son rôle exact étant à ce jour encore inconnu.



*Fig.4 : Organisation du foie et des jonctions serrées*

*Wikipédia*

Une fois lié à la membrane plasmique, le processus d'internalisation débute. Bien qu'encore largement inconnu, des éléments permettant de mieux le comprendre commencent à être mis en lumière. Tout d'abord l'internalisation se fait via un processus d'endocytose médié par la clathrine (Blanchard, Belouzard et al. 2006) et la fusion des membranes aurait lieu dans l'endosome précoce. Le processus d'acidification du compartiment pourrait changer la conformation des protéines d'enveloppe du virus et permettre le rapprochement et la fusion

des membranes. Les protéines E1 et E2 ne semblent pas réagir vis-à-vis des changements de pH, mais étant nécessaires, une ou plusieurs autres molécules présentes dans les vésicules et encore indéterminées devraient intervenir dans le mécanisme.

## 2) La réplication :

L'ARN viral étant de polarité positive, il va servir de matrice à la transformation en brin négatif, utilisable par la machinerie cellulaire, qui sera à son tour la matrice des brins positifs destinés à être encapsidés dans les futurs virions.

## 3) La traduction :

L'ARN viral ne possédant pas de coiffe en 5', la traduction se fait via un mécanisme indépendant contrôlé par l'IRES où les ribosomes sont directement recrutés sur le site de traduction à la surface du réticulum endoplasmique (Wang, Sarnow et al. 1993; Honda, Beard et al. 1999). La structure 3D complexe de l'UTR en 5' (fig.5) est capitale pour amorcer ce processus (Yoo, Spaete et al. 1992; Rijnbrand, Bredenbeek et al. 1995).

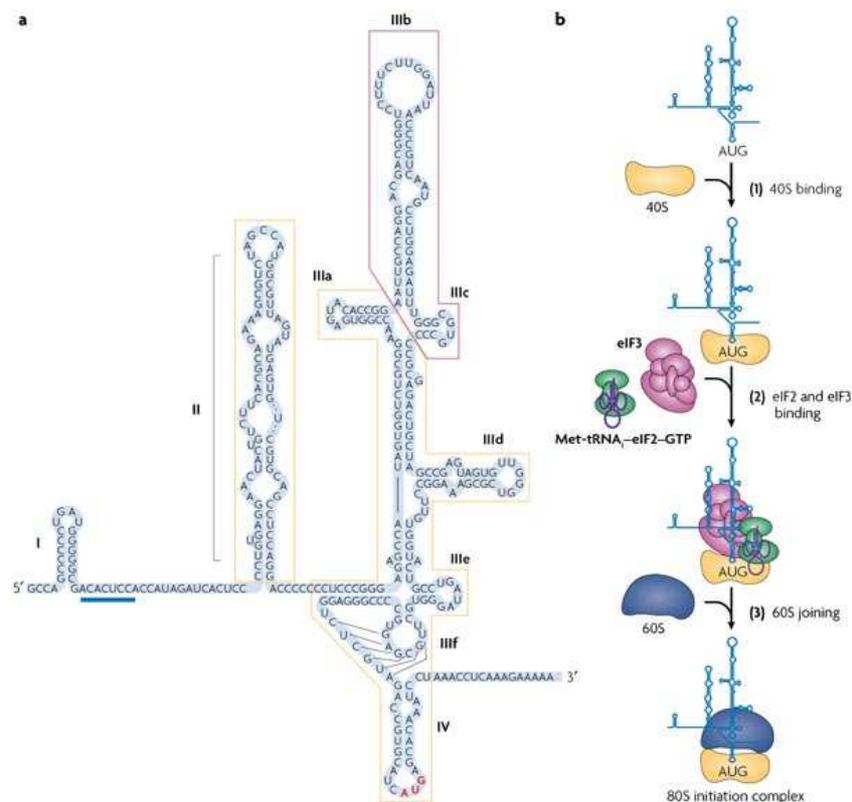


Fig.5 : Structure de la région 5' non traduite du virus et initiation de la traduction

(Nature Reviews Microbiology 5, 29-38 (January 2007))

La sous-unité 40s du ribosome va commencer par se fixer directement sur l'IRES de l'ARN. Ce complexe va ensuite se lier à eIF3 (eukariotic Initiation Factor 3) puis au dimère eIF2/ARNt méthylé/GTP, pour former le complexe 48s. Enfin, la sous-unité 60s du ribosome se fixe et le complexe 80s d'initiation est formé, la traduction peut commencer (Otto and Puglisi 2004). De plus, de nombreux facteurs cellulaires (l'autoantigène La (ou p57, protéine liant l'ARN et l'ARN polymérase III et renforçant la traduction) (Ali, Pruijn et al. 2000), RNP-L (RiboNucleoProtein L, impliquée dans l'épissage) (Hahm, Kim et al. 1998), PCBP (Poly-C Binding Protein, qui participe à la stabilisation, l'activation et au silencing des ARM messagers) (Fukushi, Okada et al. 2001), PTB (Pyrimidin-Tract Binding protein, qui se lie à l'ARN prémessager et participe à l'épissage) (Anwar, Ali et al. 2000), ...) participent à la régulation de la traduction de manière encore opaque en se liant à l'IRES et aux protéines virales.

#### **4) Processing de la polyprotéine :**

Le génome du virus étant traduit d'un seul trait sous forme de polyprotéine, la maturation protéique nécessite, dans un premier temps, des protéases de la cellule hôte. Les jonctions core/E1, E1/E1, E2/p7 et p7/NS2 seraient clivées par des signal-peptidases cellulaires, comme tendent à le prouver les analyses d'hydrophobicité et la localisation membranaire des protéines matures (Hussy, Langen et al. 1996). Les protéines non-structurales sont quant à elles clivées par les protéases virales. NS2/NS3 est clivée par NS2-3, les autres jonctions sont processées par NS3, certainement par clivage séquentiel NS3/4A → NS5A/NS5B → NS4A/NS4B → NS4B/NS5A (Bartenschlager, Ahlborn-Laake et al. 1994; Lin, Pragai et al. 1994; Tanji, Hijikata et al. 1994; Failla, Tomei et al. 1995).

## 5) L'assemblage et la sécrétion des virions :

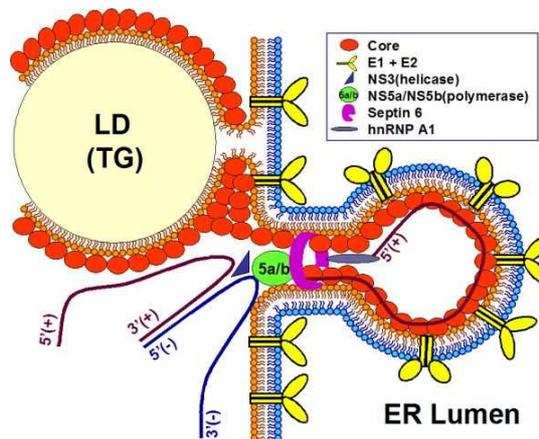


Fig.6 : Modèle hypothétique d'assemblage des virions (LD : lipid droplet, TG : trans-golgien, ER : endoplasmic reticulum)

<http://www.postech.ac.kr/dept/life/mv1/hcv.html>

Un modèle d'assemblage des virions, basé sur le peu d'éléments dont nous disposons, a été réalisé (fig.6). Il prévoit que l'ensemble du complexe répliatif viral est ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique. E1+E2 seraient implantés dans la membrane lors de la phase de glycosylation durant leur maturation (Cocquerel, Op de Beeck et al. 2002; Murakami, Ishii et al. 2006). La protéine core serait amenée autopolymérisée via des gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques sur lesquelles elle serait ancrée (Barba, Harper et al. 1997; Yan, Tam et al. 1998). La réplication du génome se ferait à l'interface cytoplasme/réticulum et le brin positif néoformé rentrerait dans le futur virion concomitamment à sa synthèse.

La sécrétion des virions se ferait par la voie classique de sécrétion. Le virus traverserait le réticulum, serait transporté vers le golgi (Serafino, Valli et al. 2003) puis vers la membrane plasmique pour être libéré dans le milieu extracellulaire (Aizaki, Lee et al. 2004).

## L'hépatite C

Contractée par plus de 3% de la population mondiale, soit environ 200 millions de personnes, l'hépatite C est un problème de santé publique majeur (*W.H.O. Hepatitis C: global prevalence. Weekly Epidemiologic Records 1997*). Les patients ont été essentiellement infectés de deux manières. La première, durant les années 60-80, par transfusions de produits sanguins contaminés, le virus n'ayant pas encore été découvert, et la deuxième étant le partage de seringues souillées chez les utilisateurs de drogues injectables, comme l'héroïne, responsable aussi de la majorité des coinfections SIDA/hépatite C.

Lors des tests de dépistages effectués lors des dons de sang, la présence d'anticorps anti-HCV se montre de plus en plus souvent, indiquant que le nombre de gens ayant été ou étant en contact avec le virus serait beaucoup plus important que prévu, de même que le nombre de résolutions spontanées. La phase aigüe de la maladie, se déclarant environ sept semaines après la contamination est malheureusement asymptomatique pour environ 70% des malades. Les symptômes, lorsqu'ils sont présents, sont non-spécifiques à la maladie, ce qui peut compliquer le diagnostic. Ils sont plutôt communs comme des douleurs abdominales, un état pseudo grippal, un prurit ou un ictère et durent moins de trois mois. Il est à noter qu'il existe une variante extrêmement violente, heureusement très rare, appelée hépatite fulminante dont les causes sont encore en discussion.

Cette période est cruciale pour la prise d'un traitement puisque son efficacité atteint 90% pour une durée de traitement diminuée de moitié par rapport à celle du traitement en phase chronique. Cette efficacité décroît rapidement au fur et à mesure que l'infection s'installe. Le virus est détectable dans le sang au bout de trois semaines et les anticorps dirigés contre lui apparaissent entre la troisième et la douzième semaine. Entre 20 et 30% des malades vont guérir spontanément. Durant cette phase de la maladie, le système immunitaire, en luttant contre le virus, exerce sur lui une pression sélective, ce qui peut provoquer l'apparition de mutations dites d'échappement et participer à l'installation de la phase chronique. D'autres facteurs entrent en jeu, notamment au niveau du système immunitaire de l'hôte et de ses paramètres génétiques, mais ils ne sont pas encore entièrement compris.

La phase chronique de la maladie est déclarée lorsque la durée de la phase aiguë dépasse six mois. Le fait qu'elle puisse être asymptomatique pendant plus de trente ans rend sa découverte souvent fortuite. Une très grande disparité parmi les patients est observée quant à sa gravité. Environ un tiers des malades ont une hépatite « modérément ou très active » développeront une cirrhose dans les 10 à 20 ans et verront leur risque de développer un cancer augmenter fortement, un tiers aura une hépatite « peu active » qui soit n'évoluera pas soit installera une cirrhose dans les trente ans et enfin un tiers ont une hépatite dont la fibrose progresse si lentement qu'elle n'aura pas le temps de dégénérer en cirrhose au cours de leur vie.

Différents facteurs aggravant la maladie ont été identifiés parmi lesquels se trouvent le génotype du virus infectant, la consommation d'alcool, le surpoids, la présence d'une stéatose, l'âge et le sexe masculin. Durant la phase fibrotique, les symptômes courants sont une fatigue générale, une perte de poids importante, un état pseudo-grippal, des douleurs musculaires et articulaires, une légère fièvre, des démangeaisons, des troubles du sommeil, des douleurs abdominales, des nausées et des troubles cognitifs ou dépressifs. Lorsque la cirrhose s'installe, les symptômes s'aggravent puisque provoqués par des défaillances des fonctions hépatiques. Une augmentation de la pression sanguine intrahépatiques (l'hypertension portale), une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale de l'abdomen (l'ascite), des ecchymoses et une tendance aux saignements, des douleurs osseuses, des varices œsophagiennes, un ictère et un syndrome de déficience cognitive (l'encéphalopathie hépatique). De plus de nombreuses manifestations extra-hépatiques, qui sont souvent les causes de la découverte de la maladie, sont associées à la présence du virus, telles que l'inflammation de thyroïde (thyroïdite), la cryoglobulinémie, une glomérulonéphrite, le diabète sucré et le syndrome lymphoprolifératif à cellules B. Il a été montré récemment que le virus était capable d'infecter les cellules de la microglie et les astrocytes au niveau du cerveau, ce qui pourrait expliquer les troubles comportementaux associés à l'hépatite C.

La cirrhose induite par le virus peut rendre l'environnement hépatique propice à l'apparition d'un cancer primitif du foie ou hépatocarcinome. Celui-ci est le huitième cancer le plus fréquent au monde et est presque exclusivement induit par les hépatites B et C. Plus rarement, en Afrique et en Asie, il peut être induit par l'ingestion d'aflatoxine, une mycotoxine sécrétée par *Aspergillus Flavus*, parasitant les arachides. Il est la première cause mondiale de greffe de foie, puisque seule alternative du patient à ce stade de la maladie. Dans presque tous les cas de

réimplantation, on observe une réinfection du greffon par le virus, ce qui indique la présence d'un ou plusieurs autres réservoirs viraux hors du foie.

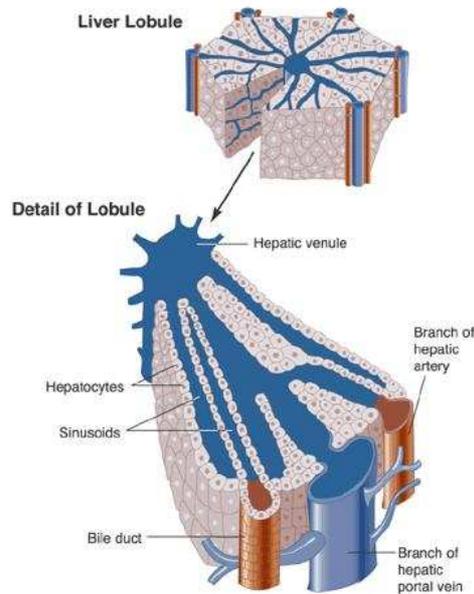
Le traitement actuellement utilisé, une bithérapie à base de ribavirine et d'IFN $\alpha$  pégylé, n'est efficace que dans la moitié des cas d'infections par le génotype 1 (et jusqu'à 80% pour les autres) et est très éprouvant pour le malade. En effet, il génère un nombre important d'effets secondaires qui induisent un arrêt de toutes les activités du malade. L'injection d'IFN $\alpha$  peut causer de fortes fièvres, des insomnies, une perte des cheveux et une grande sécheresse de la peau (pour s'aggraver en déshydratation et conjonctivite). La ribavirine elle peut entraîner une anémie, une accélération cardiaque ou des essoufflements. Les plus gros risques sont l'apparition d'un syndrome d'épuisement et l'induction d'une dépression à tendances suicidaires. Les effets du traitement sur l'immunité et la maladie seront détaillés dans un paragraphe leur étant consacré.

## **Le foie**

### **1) Rôles et particularités générales**

En plus d'être l'organe le plus volumineux du corps humain, dont il représente 2% du poids total, le foie est aussi l'un des plus importants. Il est l'organe réalisant le plus de transformations chimiques et possède des fonctions d'épuration, de synthèse, de stockage et immunologiques. Le thème principal de ce travail étant l'hépatite C, je vais donc naturellement m'attarder sur cette dernière fonction après avoir brièvement décrit sa structure et ses autres fonctions.

Le foie est un organe constitué de deux lobes asymétrique, gauche et droite, n'est pas innervé mais abondamment vascularisé. Le sang oxygéné lui parvient via l'artère hépatique et le sang riche en nutriments en période postprandiale du tube digestif via la veine porte. Ceux-ci se mélangent au niveau des sinusoides. Le retour veineux est assuré par les veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure.



*Fig.7 : L'unité fonctionnelle hépatique : le lobule  
(Wikipédia)*

Le foie est constitué à 80% de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (fig.7).

Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie. D'autres types cellulaires sont présents tels que les cellules des canaux biliaires, endothéliales, de Küppfer (macrophages), de Ito (fonction métabolique de la vitamine A et des lipides et qui fabriquent aussi la matrice extracellulaire autour de cellules endothéliales), ovales (cellules pluripotentes permettant la régénération du foie) et des lymphocytes intrahépatiques.

Il joue un rôle important au niveau du métabolisme des glucides puisqu'il décompose l'insuline, il s'y produit la néoglucogénèse (transformation d'acides aminés en glucose), la glycogénolyse (transformation du glycogène en glucose) et son opposé, la glyconéogénèse.

Le foie est aussi le plus important régulateur de glycémie sanguine (et plus précisément plasmatique). Il est le seul organe à passer de producteur à stockeur de glucose. On dit qu'il est hypoglycémiant (stockage de glucose sous forme de glycogène) ainsi qu'hyperglycémiant (libère du glucose dans le sang après avoir fait une glycogénolyse) en période de jeûne. Le foie est donc le seul organe hyperglycémiant, bien que le glycogène puisse être stocké ailleurs dans l'organisme (myocytes, adipocytes,...).

Pour ce qui est du métabolisme lipidique, il s'y déroule la synthèse des triglycérides, des lipoprotéines, du cholestérol mais surtout il s'agit du seul lieu de dégradation de ce dernier, via les acides biliaires.

C'est aussi le lieu de recyclage des hématies et des leucocytes, il s'y produit la synthèse de facteurs de coagulation (les fibrinogènes). Il transforme également la bilirubine libre (qui est toxique) due à la dégradation splénique des hématies en bilirubine conjuguée (qui est non toxique).

Enfin la fonction la plus connue du foie est celle de détoxification. La clairance hépatique permet la transformation de l'ammoniac en urée et la destruction de nombreuses toxines. Cette clairance peut aussi poser problème puisqu'elle peut éliminer les molécules présentes dans les médicaments durant les traitements, ce qui peut limiter leur efficacité.

Enfin, la particularité du foie qui en fait un organe à part est sa capacité de régénération spontanée. En effet, il est capable de reconstituer jusqu'à 30% de son volume. Ceci est dû aux cellules ovales, cellules souches hépatiques, et aux hépatocytes dormants (en phase G0 du cycle), qui sont capables, en cas de lésion, de retourner en phase G1 et de se multiplier afin de régénérer le tissu.

## **2) Un organe immunitaire à part**

Le foie étant en contact avec un très grand nombre d'antigènes étrangers importés via la nourriture, il doit absolument contrôler le système immunitaire pour éviter une destruction massive des hépatocytes. La manière la plus simple serait d'induire une ignorance immunitaire en excluant toute cellule participant à la réponse, comme dans les globes oculaires. La méthode utilisée par le foie consiste à induire une tolérance immunitaire périphérique envers les antigènes alimentaires. Le défaut majeur de ce système apparaît lorsque le foie est victime d'une infection virale. L'environnement dans lequel les cellules immunitaires vont agir tend plus vers l'induction d'une tolérance que vers une réponse antivirale forte et soutenue. Il faut donc une régulation locale unique du système immunitaire pour réaliser la ségrégation entre antigènes alimentaires et antigènes pathogènes. Ceci fait du foie un organe vraiment à part et d'un intérêt énorme pour les transplantations. En effet, la discordance de HLA n'affecte pas l'évolution de la greffe hépatique chez l'homme, même si la prise d'immunosuppresseurs est requise. De plus, la greffe simultanée d'un foie et d'un rein

améliore grandement la survie de ce dernier. Des expériences chez la souris ont montré que cet effet tolérogène de greffons était médié par les lymphocytes intrahépatiques. Il est à noter qu'en 2008, une greffe hépatique chez une petite fille n'a nécessité aucune prise d'immunosuppresseur puisque son groupe sanguin est devenu celui du receveur ainsi que ses défenses immunitaires. Des cellules souches sanguines se trouvaient dans le greffon et ont migré vers la moelle osseuse de l'enfant. Celles-ci y ont fait leur travail et progressivement remplacé les cellules de l'hôte. Cette fillette possède donc des leucocytes XY. Les circonstances exactes de cette tolérance naturelle sont encore aujourd'hui à élucider. Enfin, c'est un organe participant à l'homéostasie lymphocytaire puisqu'il régule l'apoptose des cellules activées devenues inutiles à l'issue d'une réponse immune.

## 2-1) La tolérance alimentaire

Le foie contient en moyenne  $10^{10}$  cellules immunitaires résidentes. Leur composition est très différente de la périphérie, les proportions lymphocytes/cellules NK sont de 80/20 dans le sang et de 50/50 dans le foie et les ratios de cellules  $CD3^+$  (marqueur lymphocytaire)  $CD4^+$  et  $CD8^+$  y sont inversés (fig.8). Une autre particularité du foie est la présence d'un très grand nombre de cellules NK et surtout de  $NKT\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  (Doherty, Norris et al. 1999).

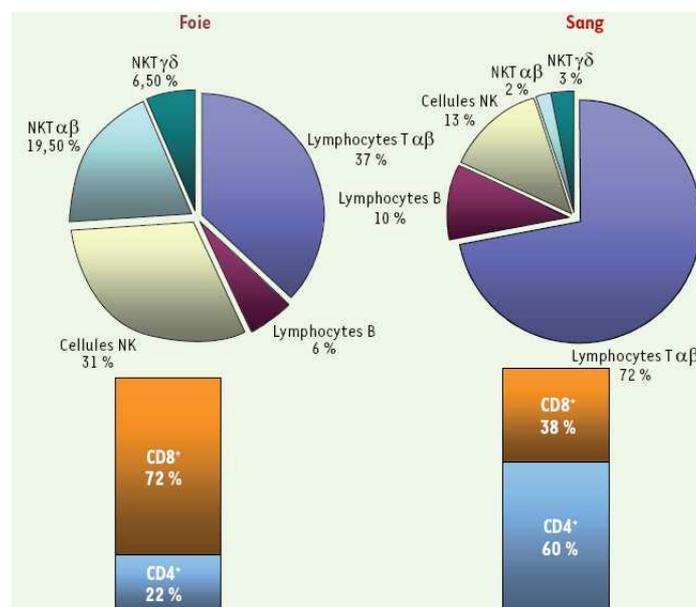
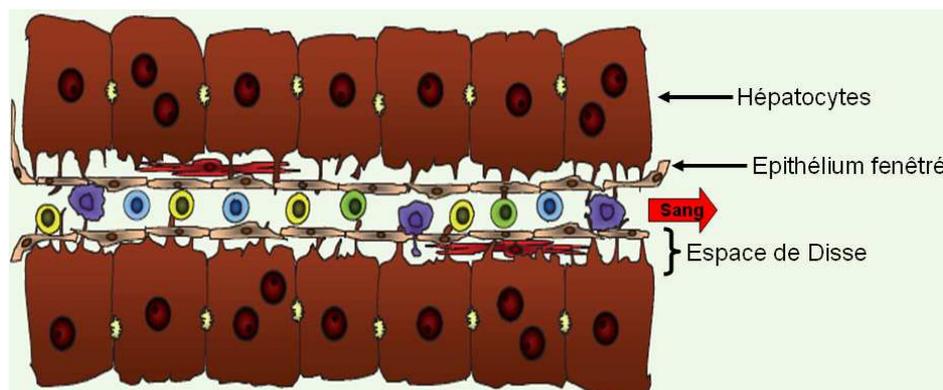


Fig.8 : Composition des populations immunitaires hépatiques et périphériques et des ratios lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$

Lapierre P. MEDECINE/SCIENCES 2007 ; 23 : 985-90

Ces dernières sont sécrétrices de cytokines Th1 et Th2 et donc capables d'orienter la réponse immunitaire vers la défense et non la tolérance. De plus, les cellules présentatrices d'antigène résidentes, ou cellules de Kupffer, peuvent sécréter de l'IL12 et 18 déclenchant ainsi la différenciation des NK et leur sécrétion d'IFN $\gamma$ . En contrepartie, dans l'espace de Disse, se trouvent des cellules dendritiques immatures captant tous les antigènes entrant dans les sinusoides rendus tolérogènes par la sécrétion constitutive de TGF $\beta$  et d'IL10 par les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules de Küppfer (Lau and Thomson 2003). Comme introduit plus haut, la tolérance hépatique est liée aux lymphocytes intrahépatiques. Des études chez la souris ont montré qu'une déficience en CD1d (glycoprotéine associée aux CMH I et à la présentation d'antigènes lipidiques du soi et du non-soi, nécessaire à l'activation des NKT) abolissait toute tolérance hépatique. Les NKT, cellules capables de sécréter des molécules de défense et de tolérance, seraient donc les effectrices immunosuppressives influencées par l'environnement cytokinique hépatique (Mars, Laloux et al. 2002).



*Fig.9 : Exemple de sinusoié hépatique.*

*Jaune, violet bleu et vert : cellules immunitaires, rouge : cellules de Ito.*

*Lapierre P. MEDECINE/SCIENCES 2007 ; 23 : 985-90*

Enfin, la tolérance orale, nécessaire pour éviter toute réponse immunitaire due aux antigènes alimentaires, implique une sous-population de NKT, les iNKT (Invariant NKT) (Trop, Samsonov et al. 1999). Celles-ci sont restreintes par CD1d et ont un TCR $\alpha$  invariant. Elles induiraient l'apoptose via Fas-FasL des cellules immunitaires activées qui seront ensuite phagocytées par les cellules dendritiques (Nowak, Kopp et al. 2006). Celles-ci deviennent alors tolérogènes et participeraient à la production de cellules T régulatrices spécifiques

## 2-2) Le foie, un cimetière de lymphocytes ?

Afin d'éviter des réponses immunitaires trop longues pouvant dégénérer et surtout devenues inutiles une fois le pathogène éliminé, les lymphocytes T entrent dans une phase apoptotique concomitamment à leur activation. Circulant dans le sang périphérique, les cellules activées et apoptotiques sont drainées au niveau des sinusoides du sang vers le tissu hépatique (fig.9). Il semblerait en effet que le foie soit en quelques sortes un « killing field » de lymphocytes. Cette particularité est partagée avec plusieurs autres organes tels que les intestins (Wack, Corbella et al. 1997). Une fois capturés par ses organes, les lymphocytes entrent en apoptose via la voie Fas/FasL et sont éliminés par les macrophages résidents (Crispe 1994; Crispe and Huang 1994). Dans un modèle de souris infectées par le virus de la grippe, bien que l'infection soit restreinte au tractus respiratoire, des cellules CD8<sup>+</sup> apoptotiques spécifiques du virus sont retrouvées en abondance dans le foie (Belz, Altman et al. 1998).

A l'heure actuelle, on ignore pourquoi celle-ci se fait préférentiellement dans le foie au détriment des autres « killing fields ». Une explication serait une utilisation détournée du mécanisme de tolérance alimentaire, détaillé dans le paragraphe précédent. Il serait utilisé pour tuer les cellules CD8<sup>+</sup> activées par les antigènes alimentaires mais aussi celles activées par un agent pathogène éliminé. Pour ce faire, le foie capturerait les lymphocytes via le rolling (Wong, Johnston et al. 1997), et donc des molécules d'adhérence. Celles-ci seraient ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) et VAP-1 (Vascular Adhesion Protein 1), exprimées uniquement en cas d'inflammation sauf dans le foie, où leur expression est constitutive et élevée (Morita, Watanabe et al. 1994; Iigo, Suematsu et al. 1997);(Bono, Salmi et al. 1998). Les lymphocytes activés exprimant LFA-1, le ligand d'ICAM-1, ils seraient captés par les cellules de l'endothélium et les cellules de Küppfer captureraient les lymphocytes non adhérents via leurs dendrites étirées dans la lumière des vaisseaux sanguins hépatiques. Le rôle de VAP-1 semble important puisqu'il provoque l'adhérence des cellules CD8<sup>+</sup> de manière très préférentielle (McNab, Reeves et al. 1996). Les hépatocytes exprimant de manière constitutive Fas, les lymphocytes pénétrant dans le foie qui eux portent FasL de par leur activation, vont donc entrer très rapidement en apoptose et ainsi être éliminés.

Les sites d'élimination des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> semblent différents et ces derniers subissent en très grande majorité cette déplétion. Quelques cellules CD4<sup>+</sup> sont piégées et éliminées au niveau hépatique, mais ce phénomène est relativement marginal. Les

« cimetières » de ces cellules semblent être les follicules lymphoïdes associés aux intestins (Ferrari, Urbani et al. 1999).

## **Virus et système immunitaire, une course contre la montre adaptative**

Si tant est qu'un virus ait un but dans la vie, il serait sans nul doute de pouvoir être invisible aux yeux du système immunitaire de son hôte. En effet, les virus n'échappent pas à la loi du plus fort et du mieux adapté dans la course à la survie. La capacité à s'adapter à leur hôte, et à le maintenir en vie le mieux et le plus longtemps possible est vitale. Le virus du rhume et ses pandémies annuelles en est le plus parfait exemple. Il mute rapidement pour échapper au système immunitaire, utilise la voie aérienne pour maximiser sa zone d'effet, contamine son hôte humain, le rendant peu malade, donc capable de bouger et d'aller contaminer d'autres hôtes. L'exemple inverse serait le virus Ebola, responsable de la fièvre hémorragique qui tue tellement rapidement son hôte que celui-ci n'a pas le temps de le transmettre à d'autres personnes, ce qui en fait heureusement un virus très peu « humanisé » et incapable d'induire une pandémie.

Durant leur évolution les virus ont mis au point un très grand nombre de stratagèmes visant à éradiquer, ou à rendre inoffensive, la réponse immunitaire dirigée contre eux. Ceux-ci peuvent être classés en deux grandes catégories, les défenses actives, spécifiques à chaque virus, et passives, dont l'induction est provoquée par l'hôte. Je vais détailler ici ceux entrant en jeu lors d'une infection par le VHC. Cette liste n'est bien évidemment pas exhaustive, puisque nous sommes encore très loin d'avoir découvert et compris tous ces mécanismes.

### **3-1) Les mécanismes d'échappement actifs du VHC.**

Le virus est capable d'échapper à nos défenses immunitaires dès les tous premiers stades de son cycle. En effet, le premier produit du génome viral, la polyprotéine, est capable à elle seule d'activer PP2A (Phosphoprotéine Phosphatase 2A) qui est un inhibiteur de la voie STAT (Duong, Filipowicz et al. 2004).

La protéine structurale Core du virus possède de nombreuses fonctions immunomodulatrices. Elle peut dans un premier temps inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire du complément en liant et séquestrant le fragment C1q. Ceci bloque la maturation Th1 et les sécrétions d'IFN $\gamma$  des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et d'IL12 par les cellules dendritiques induites par

la reconnaissance des complexes antigène-complément. Core peut aussi agir sur la voie IL12 des macrophages en supprimant la synthèse en interférant dans l'activation de AP-1 (Eisen-Vandervelde, Waggoner et al. 2004). Core possède la capacité d'interagir directement avec la voie des interférons et en particulier avec STAT1. Ceci a pour conséquence de diminuer l'activation d'IRF3 (Interferon Responding Factor 3), intermédiaire nécessaire à une transcription de facteurs antiviraux induits par les interférons. Parmi ceux-ci, PKR (Protein Kinase R) qui peut être lié par Core et être totalement neutralisé. Enfin, un mécanisme de résistance probablement lié à la carcinogénèse, Core rend les cellules résistantes à l'apoptose en sur-exprimant des inhibiteurs de caspases (Sacco, Tsutsumi et al. 2003).

La protéine d'enveloppe E2 reconnaît un des récepteurs cellulaires au virus, CD81. Celui-ci étant ubiquitaire, il se retrouve aussi sur les cellules NK. Lorsque E2 interagit avec CD81 sur ces dernières, cela leur envoie un signal inhibiteur pour la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ .

NS2 est également impliquée dans l'immunomodulation de la réponse anti-VHC. Elle pourrait hypothétiquement sous réguler la voie NF-kB via un mécanisme utilisant l'inhibition d'I $\kappa$ B, facteur stabilisant du complexe NF-kB. Son rôle le plus détaillé est celui joué dans la modulation de l'expression d'un grand nombre de gènes, notamment ceux sous le contrôle des promoteurs du TNF $\alpha$ , de l'IFN $\beta$  et des chémokines CCL5/RANTES et CXCL10/IP10.

Parmi les protéines virales, NS3 semble être la plus compétente pour maîtriser le système immunitaire une fois complexée à NS4A. Elle peut bloquer à la fois le système immunitaire inné et la voie des interférons en interférant avec la voie TLR3, qui est impliquée dans la reconnaissance des dsRNA viraux ou parasitaires. Ceci se produit soit en clivant TRIF (Toll Like Receptor adaptor Inducing IFN $\beta$ ) soit en clivant MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling protein), ce qui empêche l'activation de NF-kB et d'IRF3 (Li, Sun et al. 2005). De plus, une étude suggère que le domaine protéasique de NS3 peut interférer avec la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I en interagissant avec LMP7 (Low Molecular Mass Protein 7). Celle-ci est une composante du protéasome impliquée dans la dégradation du peptide antigénique qui peut être d'origine virale, ce qui rend le virus invisible à la surveillance du système immunitaire (Khu, Tan et al. 2004). Enfin, comme NS2, elle est capable de réguler positivement ou négativement un grand nombre de gènes impliqués dans la survie et la prolifération ainsi que dans la réponse immunitaire.

Protéine aux multiples implications dans le cycle viral, NS5A participe également à l'échappement viral. Elle est capable de se fixer sur STAT1, facteur clé de la réponse antivirale puisque initiateur, et ainsi d'empêcher sa migration vers le noyau (Lan, Lan et al. 2007). Elle peut aussi provoquer la synthèse d'IL8 (ou CXCL8), chémokine attirant les granulocytes et les neutrophiles qui tend à inhiber la voie antivirale. Tout comme Core, NS5A peut se lier sur PKR et le séquestrer pour empêcher l'activation de eIF2 (Eucaryotic Initiation Factor 2) ce qui a pour conséquence de rendre les dsRNA invisibles au système immunitaire adaptatif.

La différence entre le nombre de protéines codées et le nombre d'actions qu'elles sont capables d'effectuer est un exemple frappant de la capacité d'adaptation des virus en dépit de leur génome limité. Les protéines en quelque sorte apprennent de nouvelles fonctions en évoluant tout en conservant celles déjà acquises. De plus, le virus étant capable de se répliquer dans toutes les cellules immunitaires périphériques (Castillo, Rodriguez-Inigo et al. 2005) de manière certes moins efficace que dans les hépatocytes, ceci pourrait influencer la réponse immunitaire anti VHC et le devenir de la thérapie (Gong, Lai et al. 2003).

### **3-2) Les mécanismes d'échappement passifs du VHC**

Le premier d'entre eux, la formation de quasi-espèces, est situé à la frontière des deux groupes, puisque aléatoire mais provoqué par la RNA polymérase NS5B (Manns, Foster et al. 2007). Comme décrit plus haut, cette enzyme génère un nombre énorme d'erreurs de copies à chaque réplication. Si une majorité d'entre elles conduisent à la formation de virions altérés, une partie en revanche générera des nouveaux virus qui ne seront pas reconnus par les cellules immunitaires déjà sur les lieux de l'infection et faire apparaître un retard temporel du système immunitaire sur la diversification virale, le virus fera donc toujours la course en tête. Le premier danger est bien sûr dû aux molécules du traitement et à celles de la défense immunitaire. Elles exercent une pression sélective sur le virus qui tend à faire émerger les clones les plus résistants (ou les plus discrets). Par exemple, NS5B elle-même peut muter sur l'acide aminé 415, dans la putative zone de liaison aux ARN viraux, ce qui la rendrait résistante à la ribavirine (Young, Lindsay et al. 2003).

L'autre conséquence directe de la faible fidélité de copie de la RNA polymérase et de la pression sélective est l'apparition de régions du génome appelée HVR (Hyper Variable Region). A l'instar du VIH, les protéines les plus exposées au système immunitaire sont aussi

celles qui mutent le plus. Dans le cas du VHC, il s'agit de la protéine d'enveloppe E2, qui possède 2 HVR. La région HVR1 est un épitope neutralisant car impliquée dans la liaison du virus avec SR-BI. La pression sélective sur cette épitope étant majeure, elle va très vite muter pour faire échapper le virus au système humoral. Pourtant, lors de maladies sévères, HVR1 tend à devenir homogène, ce qui indique la présence de séquences très faiblement immunogènes stables. De plus certains malades ne présentent aucune variation d'HVR1 et pourtant n'éliminent pas le virus, ce qui tend à démontrer l'inutilité du système humoral dans le contrôle viral. HVR2 est intercalée dans la zone de liaison de E2 à CD81, et est plutôt stable chez les patients chroniques. Il est à noter que ses mutations corrélerent avec la réponse au traitement (Li, McMahon et al. 2008). Cette zone étant cruciale pour le virus, elle doit pouvoir muter en conservant le motif de liaison à CD81 tout en diminuant son exposition aux anticorps neutralisants de l'immunité humorale. Cette contrainte est probablement à l'origine de l'inefficacité d'un grand nombre des virions mutés néoformés.

Enfin, la séquence de NS5A contient elle aussi deux régions d'une importance capitale. La première, l'ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region), est située sur le site de fixation à PKR (Tsai, Kuang et al. 2008) et détermine, comme son nom l'indique, la sensibilité du virus à l'environnement induit par les interférons. La seconde, IRRDR (IFN Ribavirin Resistance Determining Region) est située dans le domaine V3 (Variable 3) de NS5A. Elle semble être corrélée avec l'apparition d'une EVR (Early Virologic Response). En effet, des corrélations positives ont été trouvées entre ses séquences et la réponse à la thérapie par IFN $\alpha$  chez des patients Japonais infectés par le génotype 1b. Dans ce cas, si ces régions possèdent plus de 4 (ISDR) ou 6 (IRRDR) résidus mutés, la sensibilité du virus à la thérapie est maximale. Contrairement aux HVR, ces régions doivent donc être conservées le plus possible.

Enfin, ce qui participe certainement le plus massivement à l'échappement immunitaire du VHC est simplement l'organe visé. Comme décrit plus haut, le foie est un organe tolérogène, incapable de faire la différence entre un antigène alimentaire, dont les cellules spécifiques doivent être éliminées, et un antigène viral infectant le foie dont les cellules spécifiques ne devraient surtout pas être éliminées rapidement. L'effet « killing field » lymphocytaire hépatique poursuit son œuvre durant la maladie en tuant les cellules spécifiques au virus, ce qui appauvrit le champ de bataille en cellules spécifiques et compétentes. Cela provoquera plus tard des dommages collatéraux importants sur des hépatocytes sains, le foie étant envahi de cellules usées dont la spécificité laisse à désirer.

# Réponse immunitaire durant la maladie

## **1) Les acteurs principaux, origines et rôles**

### **1-1) L'origine des lymphocytes et des cellules NK**

Les lymphocytes et les cellules NK trouvent leurs origines dans la moelle osseuse, lors de l'hématopoïèse. Ce processus de génération cellulaire,  $10^{13}$  cellules/jours, permet un renouvellement de toutes les cellules sanguines. C'est aussi le processus par lequel notre immunité est bâtie de manière brute. Les ajustements seront effectués plus tardivement lors d'un phénomène différent, détaillé plus bas.

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes sont à la base de tout. Elles sont présentes à hauteur de 0.05% du nombre total de cellules dans la moelle osseuse. La première étape est une première différenciation en CLP (Common Lymphoid Progenitor) sous l'effet de plusieurs facteurs solubles, tels que les interleukines 1, 6 et 12. Les cellules sont alors pluripotentes, puisque déjà engagées dans une des 2 voies de différenciations hématopoïétiques. L'origine commune des lymphocytes et des cellules NK s'arrête ici, puisque le CLP peut à son tour s'engager dans 3 voies de différenciations, la voie NK, la voie T ou B.

### **1-2) Les lymphocytes T**

Si le CLP est engagé dans la voie lymphocytaire T, il va migrer vers le thymus et le coloniser pour se différencier et devenir un pro-thymocyte. Le thymus est un organe lymphoïde primaire, situé derrière le sternum, dans le médiastin antérieur au dessus du cœur. C'est un organe lympho-épithélial constitué de deux lobes séparés par une cloison et entourés d'une capsule. Chaque lobe thymique est divisé en lobules par des travées conjonctives. L'irrigation et l'apport en CLP sont assurés par des vaisseaux provenant des artères thoraciques. Les lobules thymiques comportent 2 zones distinctes. La zone périphérique ou cortex est peuplée de thymocytes corticaux qui sont produits par la multiplication des pro-thymocytes tout juste arrivés de la moelle osseuse. La zone médullaire, qui contient les lymphocytes T matures et pleinement différenciés avant leur départ en périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires. La composition cellulaire des différentes zones est assez semblable puisqu'elles contiennent toutes deux des cellules épithéliales qui produisent des hormones thymiques qui

influencent la maturation des thymocytes. Des cellules dendritiques et des macrophages résidentes assurent le rôle de CPA (cellules présentatrices d'antigène) via les molécules du CMH I et II. Lors de la migration du cortex vers la zone médullaire, le thymocyte cortical va subir une différenciation et exprimer successivement plusieurs marqueurs spécifiques tels que CD1, CD4 et CD8 simultanément. Lorsqu'il atteindra la zone médullaire, il n'exprimera plus CD1 mais CD3 (associé à son TCR) et exprimera soit CD4 soit CD8.

Les récepteurs TCR étant produits au hasard des recombinaisons V(D)J, le risque de voir apparaître une auto-immunité est très élevé. C'est pour cela que l'évolution a dessiné un système de protection efficace de l'individu contre son propre système immunitaire, la sélection thymique. Ce processus se déroule en 2 grandes étapes.

Dans le cortex, une première sélection positive se fait sur les thymocytes via leur capacité à reconnaître une molécule du CMH via leur TCR. Ce sont les cellules thymiques corticales qui vont provoquer ce phénomène. Les thymocytes incapables de reconnaître un CMH, du fait d'un TCR défaillant, vont entrer en apoptose. Les autres vont recevoir un signal de survie et continuer leur entretien d'embauche en migrant vers la zone médullaire. A ce stade, 95% des thymocytes sont éliminés, les cellules ayant reconnu un CMH I deviendront CD8<sup>+</sup> et celles ayant reconnu un CMH II, CD4<sup>+</sup>.

Une fois la zone médullaire atteinte, la deuxième phase de sélection peut débuter. Celle-ci se fait par sélection négative des cellules ne reconnaissant pas un peptide du soi présenté dans le contexte d'une molécule du CMH I ou II. Si la cellule reconnaît ce complexe, elle est éliminée, dans le cas contraire, elle est dite mature et immunocompétente et va quitter le thymus pour toujours, celui-ci n'ayant pas de circulation lymphatique, pour aller coloniser les organes lymphoïdes secondaires (ou périphériques).

### **1-3) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

La différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes helpers effecteurs de type Th1 ou Th2 requiert la rencontre dans un organe lymphoïde secondaire entre un lymphocyte T CD4 naïf et une CPA, macrophage ou cellule dendritique, ayant acquis l'antigène. La capture de l'antigène ainsi que l'environnement cytokinique induit par la réponse innée, confère aux CPA un état activé (ou mature). Dans celui-ci, les CPA expriment fortement les molécules du CMH II ainsi que des molécules de costimulation telles que B7. Par l'intermédiaire des

molécules du CMH II, les CPA vont présenter à leur surface les antigènes du pathogène. Parallèlement elles quittent les tissus pour gagner les organes lymphoïdes secondaires drainants. La rencontre entre la CPA activée et un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf va mettre en jeu le complexe antigène-CMH II et le complexe TCR/CD3 du lymphocyte CD4<sup>+</sup>. Cette interaction va former le premier signal d'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>. Celui-ci va induire l'expression de CD28 et CD40L à sa surface. Il s'agit de deux molécules de costimulation qui peuvent interagir avec CD80 ou 86 et CD40 respectivement. Le tout forme une synapse immunologique (ou SMAC (SupraMolecular Activation Complex)) où tous les éléments sont rassemblés autour du TCR par des radeaux lipidiques.

L'interaction CD28/CD80 ou 86 va fournir au lymphocyte le signal définitif d'activation et celle entre CD40L/CD40 maintient la CPA dans un état activé et augmenter ses capacités de présentation par un plus grand nombre de CMH II et de molécules de costimulation à sa surface.

A la fin de ceci, le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> sera mature, activé et via une stimulation autocrine par IL2, l'activation induisant l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2, va proliférer. Il pourra orienter la réponse immunitaire vers un profil Th1, avec sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  et mise en place de la réponse cellulaire, ou Th2 avec sécrétion d'IL10 inhibant la réponse cellulaire au profit de la réponse humorale.

A la suite de nombreuses divisions, différentes différenciations sont possibles pour un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. Ils peuvent devenir des Th effecteurs, produisant des cytokines et autres facteurs stimulant les autres cellules Th, devenir des cellules mémoires, dont la génération est le but de tout vaccin, qui permettent de mettre en place la réponse immunitaire après une réinfection beaucoup plus efficacement et rapidement, ou enfin des cellules régulatrices. Celles-ci servent à supprimer les réponses immunitaires par la sécrétion d'IL10, le piégeage local des cytokines ou le contact cellules/cellules. Elles évitent au système immunitaire de s'emballer à chaque réponse, mais sont aussi utilisées par les pathogènes pour subsister.

Ce modèle Th1 ou 2 est évidemment beaucoup trop simple puisqu'il existe des cellules régulatrices naturelles surnommées Th3, des cellules CD4<sup>+</sup> cytotoxiques, un profil Th17 auto-immun mais ayant sa propre régulation. Les exemples sont très nombreux et d'autres

s'ajoutent continuellement, néanmoins, ce modèle simple a le mérite de poser les bases de l'immunologie.

#### 1-4) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Tout comme l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, celle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> requiert une rencontre dans un organe lymphoïde secondaire avec une CPA activée. Ici, il s'agira le plus souvent d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de type Th1 mais une cellule dendritique peut dans certains cas l'activer directement de manière CD4-indépendante. Reconnaisant son antigène dans le contexte du CMH I via son TCR, le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> devra lui aussi recevoir des signaux de costimulation pour atteindre l'état activé. Le plus souvent, la CPA présentera ses antigènes aux cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> simultanément. Cela fournira le premier signal d'activation au T CD8<sup>+</sup> (fig.10) et la présence de T CD4<sup>+</sup> suractivera la CPA qui pourra alors aussi costimuler le T CD8<sup>+</sup>. Le TCR et CD8 reconnaissent le complexe CMH I/peptide, ce qui fournit le premier signal d'activation, puis le lymphocyte va alors exprimer CD28 qui, en se liant à CD80 ou 86 sur la CPA, fournira le 2<sup>ème</sup> signal de stimulation. A la suite de cette interaction, le T CD8 naïf sera différencié en T CD8 effecteur, va subir une multiplication clonale et va produire de la perforine, des granzymes et des cytokines.

La présence de cellules CD4<sup>+</sup> effectrices productrices d'IL2 au milieu des CD8<sup>+</sup> activés est absolument nécessaire puisque sans elles, les CD8<sup>+</sup> ne prolifèrent plus et deviennent anergiques. Ce n'est qu'un moyen supplémentaire de contrôler l'auto-immunité médiée par les cellules cytotoxiques.

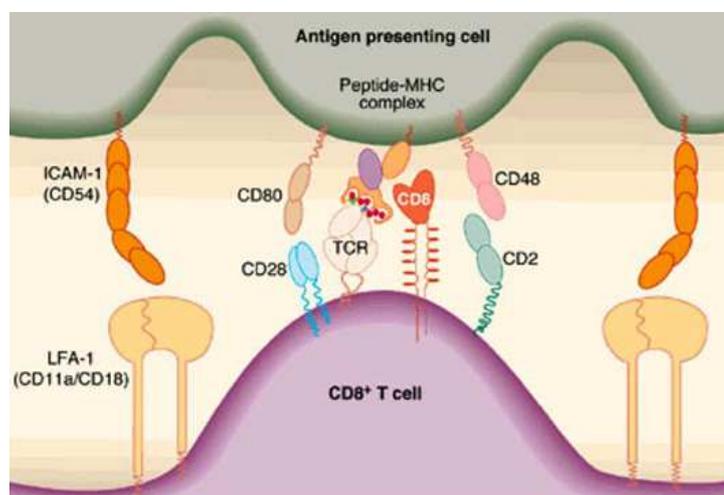


Fig.10 : La synapse immunologique simplifiée

## 1-5) Les cellules NK

Cellules de l'immunité innée, leurs origines sont communes à celles des lymphocytes T jusqu'à leur entrée dans le thymus. Le développement des cellules NK est exclusivement extra-thymique. La principale cytokine gouvernant la différenciation en cellules NK est l'interleukine 15. Le CPL, alors cellule pro-NK, va quitter la moelle osseuse par la voie sanguine pour migrer vers l'espace périfolliculaire des ganglions lymphatiques et achever sa différenciation en cellule NK pour créer à la fois des cellules CD3-CD56<sup>dim</sup> et CD3-CD56<sup>bright</sup>. Les CD56<sup>dim</sup> maturanates vont retourner vers la circulation par la lymphe efférente alors que les CD56<sup>bright</sup> vont rester dans les ganglions, principalement pour interagir avec les cellules dendritiques.

Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont situées à 95% dans le sang, sont très cytotoxiques et possèdent des récepteurs aux cytokines inflammatoires. Leur cytotoxicité est dite « naturelle » puisqu'elle ne nécessite aucune reconnaissance d'un antigène ou d'une préparation particulière. Elles sont toujours « armées pour tuer ». Elles peuvent tuer directement (via la perforine, granzyme, Fas ou TRAIL) par contact cellulaire une cellule infectée mais aussi reconnaître le fragment C des anticorps via CD16 et enclencher le processus appelé ADCC ("Antibody Dependent Cell Cytotoxicity").

Les NK CD56<sup>bright</sup> se retrouvent en énorme majorité dans les ganglions lymphatiques de part leur forte expression de CCR7. Elles sont très peu cytotoxiques, sauf en présence d'une grande quantité d'IL2 puisqu'elles expriment CD25, et ont plutôt des fonctions sécrétrices. En présence d'IL2, 12 ou 15 elles peuvent synthétiser de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ .

Etant donné le potentiel cytotoxique des cellules NK, leur régulation est extrêmement fine et complexe. Le choix de la réponse d'une cellule NK se fait sur la base d'une balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs reçus, sachant que les signaux inhibiteurs ont plus de poids dans la décision. Chaque cellule NK est dotée aléatoirement de récepteurs inhibiteurs et activateurs car cette population est très hétérogène. La règle étant qu'elles possèdent toutes au moins un récepteur inhibiteur pour former un couple inhibiteur-activateur. Les récepteurs activateurs sont Nkp30, 44 et 46 ainsi que NKG2C et D. Leurs ligands sont ubiquitaires afin de pouvoir tuer n'importe quelle cellule. Les récepteurs inhibiteurs comme les KIR (Killing Inhibitory Receptor, comme les CD158), l'hétérodimère CD94 (reconnaissant HLA-E qui est

ubiquitaire) et NKG2A/B. L'élément déclencheur de la cytotoxicité sera soit l'absence d'un CMH I, qui donne normalement le signal inhibiteur à la cellule NK (fig.11), soit le fragment Fc reconnu par CD16 sur un complexe immun.

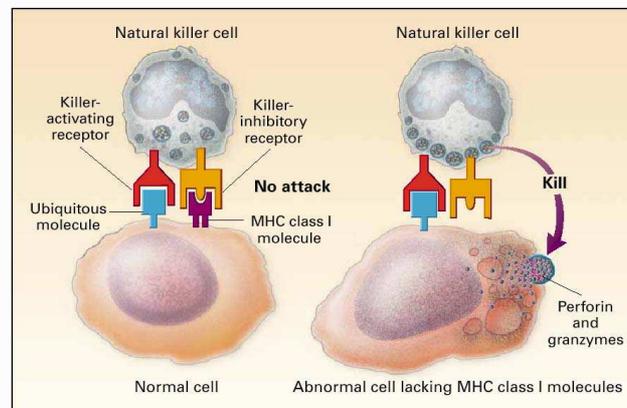


Fig.11 : Schéma simplifié de la différence entre une réponse et une tolérance des NK

## 1-6) Les lymphocytes T régulateurs

Cette sous-population lymphocytaire est spécialisée dans la suppression de l'activation du système immunitaire. Elles participent à l'homéostasie lymphocytaire, à la tolérance envers le soi et à la disparition des réponses immunitaires devenues inutiles une fois les pathogènes éliminés. Elles empêchent également la mise en place d'une réaction immunitaire disproportionnée envers un pathogène qui pourrait être plus lourde de conséquences pour l'organisme infecté que le pathogène lui-même.

Il existe différentes sous-catégories de cellules suppressives, les plus communes étant les lymphocytes T  $CD4^+ CD25^{high} FoxP3^+$  (environ 2% de la population T helper mature). Elles expriment constitutivement CD25, contrairement aux autres lymphocytes qui ne l'expriment qu'une fois activés (Zhang and Zhao 2007). FoxP3 (Forkhead bOX P3) est un facteur de transcription qui dirige le devenir d'une cellule T vers la voie suppressive. Les gènes dont la transcription est régulée par FoxP3 sont encore inconnus. Il existe aussi d'autres populations suppressives comme par exemple les T  $CD8^+ Fox P3^+$  mais leur très faible nombre les rend difficiles à étudier et *de facto*, nos connaissances à leur sujet sont très minces.

Leur origine est commune à celle des autres lymphocytes, c'est-à-dire thymique. Ils divergent dans leur devenir puisqu'ils peuvent être des TRegs naturels, c'est-à-dire que durant leur différenciation le facteur Fox P3 s'est activé, ou induit, après une réponse T normale comme

décrit à la fin du chapitre concernant les T helpers. Les causes de l'activation de Fox P3 dans les deux cas sont pour le moment encore inconnues.

Leur mode de fonctionnement est encore débattu puisqu'ils peuvent agir à distance directement via l'IL10, et sont alors antigène-non spécifiques, ou par contact avec une cellule activée spécifique du même antigène que le TReg puis par sécrétion d'IL10, et sont alors antigène-spécifiques. Un travail publié dans Nature en 2007 (Pandiyan, Zheng et al. 2007) montre une troisième facette des TRegs puisqu'ils sont décrits comme des éponges à cytokines (d'IL2 en particulier) et à facteurs de croissance. Ils en priveraient tout leur microenvironnement et donc provoqueraient la disparition par apoptose des cellules T activées alentour. La compréhension devient plus trouble lorsque l'on note un revirement des TRegs devenant cytotoxiques dans certaines conditions. Ils expriment CD127 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL7, impliquée dans la résistance à l'apoptose après activation) à un niveau très bas et ne sécrètent pas d'IL2. Ce dernier fait indique le faible potentiel de divisions de ces cellules et leur efficacité puisqu'elles se retrouvent allègrement submergées de cellules activées mais parviennent quand même à les stopper.

Bien entendu, les enjeux de leur études sont énormes puisque les maîtriser ouvrirait peut être la voie à des greffes dont nous n'osons même pas encore rêver à l'heure actuelle et au traitement de toutes les maladies auto-immunes.

### **1-7) Les cellules T NK**

Cette sous-population de cellules T est très hétérogène. Elle partage comme son nom l'indique des caractéristiques des cellules T et NK et représente environ 5% des cellules T en périphérie mais se retrouve surreprésentée dans le foie (environ 25% des cellules T totales). Elles expriment un TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  simultanément avec des marqueurs NK tels que CD16, CD56 ou la production de granzyme. La diversité du répertoire des TNK est infiniment plus restreinte que celle des cellules T conventionnelles. La plupart de ces cellules reconnaissent via leur TCR la molécule présentatrice d'antigène invariante CD1d. Celle-ci peut présenter des lipides ou des glycolipides du soi comme du non soi. Les TNK sont classées en 3 catégories, les types 1, 2 et TNK-like. Les types 1 comprennent les cellules TNK classiques (ou iNKT (Invariant NK T), sont restreintes par CD1d et expriment un TCR invariable. Les types 2 ou T NK non-classiques, sont restreintes par CD1d également mais possèdent un

répertoire plus étendu. Enfin, les TNK-like comprennent toutes les cellules T exprimant CD3 et CD56, qui sont restreintes par le CMH. Les cellules TNK, une fois activées, sont capables de sécréter rapidement de très grandes quantités d'IFN $\gamma$ , de TNF $\alpha$ , de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), d'IL2 d'IL4 et de chémokines. Elles sont donc capables d'orienter la réponse immune rapidement vers la voie cellulaire ou humorale et pourraient être le réservoir d'IFN $\gamma$  de l'immunité. Elles ont certainement d'autres fonctions puisque en leur absence, on note de sévères maladies auto-immunes, de cancers et d'asthme (Tupin, Kinjo et al. 2007).

## ***2) Phase précoce et rencontre avec l'antigène***

L'entrée de virus dans l'organisme déclenche une série de réactions immunitaires. En général, ils sont reconnus en premier et captés par les cellules dendritiques immatures présentes dans les muqueuses et les épithéliums. Celles-ci, surnommées cellules sentinelles, n'expriment que très faiblement les molécules du CMH, ceux-ci sont internalisés dans les lysosomes pour optimiser la présentation, et les signaux de co-stimulation lymphocytaires tels que CD40, CD80 ou CD86. En revanche, elles ont de très fortes capacités phagocytaires et ainsi vont internaliser des virus libres grâce au récepteur du mannose, des complexes immuns via le récepteur aux fragments Fc ou des cellules infectées. Ceci va enclencher le processus de maturation uniquement si l'antigène est capté en grandes quantités. Les cellules dendritiques vont alors quitter le tissu où elles résident et migrer vers le ganglion lymphatique drainant le plus proche en suivant un gradient de chémokines sécrétées par le ganglion. Parallèlement, les cellules infectées mortes sont phagocytées par les macrophages, qui sont aussi capables de présenter des antigènes qu'ils ont préalablement internalisés. Ces cellules participent à la mise en place de l'état d'urgence immunologique, l'inflammation. Ce phénomène consiste à créer un environnement propice à la réponse immune grâce à un très vaste panel de molécules, les chémokines et les cytokines. Elles sont capables de guider les cellules immunitaires vers le lieu de l'infection, de perméabiliser les vaisseaux sanguins pour faciliter l'infiltration immunitaire dans les tissus ou encore d'augmenter la température localement ou de créer un état pyrexique ralentissant les fonctions vitales des pathogènes.

Les cellules dendritiques vont se différencier durant la migration pour à terme arriver dans le ganglion pleinement mature. Les cellules matures ont des fonctions inverses de celles immatures puisqu'elles ont pratiquement perdu leurs capacités phagocytaires mais ont gagné

des fonctions stimulatrices. Elles vont présenter les antigènes du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> respectivement via les molécules CMH-2 et CMH-1, qu'elles expriment désormais à forte quantité, et aux lymphocytes B. Leurs dendrites, permettant de gagner en surface de présentation sans trop augmenter le volume cellulaire, recouvertes de CMH vont alors activer les cellules T et B spécifiques de l'antigène présenté et la deuxième partie de la réponse immunitaire peut alors débuter.

Une dernière sécurité se trouve à ce niveau, en effet, pour pouvoir stimuler des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques en réponse à des cellules infectées par un virus, la dendritique doit recevoir l'accord des lymphocytes auxiliaires CD4<sup>+</sup> via l'interaction CD40-CD40L(Ridge, Di Rosa et al. 1998).

Le départ de la cellule dendritique immature du lieu de l'infection lui a permis de sécréter à son tour un gradient de chémokines inverse à celui du ganglion drainant afin de laisser une piste à suivre pour les futurs lymphocytes B et T activés. Ceux-ci vont migrer sur le site de l'infection où l'environnement inflammatoire va leur donner le signal final d'activation. Les lymphocytes T auxiliaires, les macrophages et les cellules infectées vont alors donner les signaux d'activation terminaux des cellules cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> et des cellules NK par contacts et stimulations par des facteurs solubles, les cytokines. Parmi celles-ci, les interférons sont les molécules les plus efficaces et connues dans la lutte antivirale. Ils se classent en deux types, les interférons de type I (IFNI),  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\omega$ , et de type II (IFNII),  $\gamma$ . Ces glycoprotéines sont sécrétées par une multitude de cellules en réponse à un double brin d'ARN. Ils régulent environ 2000 gènes et la principale voie de signalisation empruntée est la voie Jak-STAT (fig.12). Les deux types d'interférons possèdent des qualités communes telles que son action antioncogénique, l'activation des cellules NK, des macrophages et de l'expression des molécules des CMH I et II ou encore l'accélération de la présentation d'antigènes aux cellules T.

Les IFNI reconnaissent le récepteur IFNAR (InterFeroN Alpha Receptor) composé de deux chaînes IFNAR1 et IFNAR2, et l'IFNII reconnaît IFNGR (InterFeroN Gamma Receptor). Lorsque les interférons se fixent sur leur récepteur, la transmission du signal débute par la phosphorylation du récepteur par Jak (Janus-kinase) qui va alors pouvoir recruter la protéine STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Celle-ci va être phosphorylée à son tour par Jak et acquérir la possibilité de se dimériser. IRF9 (Interferon Regulated Factor 9) va

aller se fixer sur le dimère pour former le complexe ISGF (Interferon Stimulated Gene Factor) qui se fixera sur une séquence promotrice contenant un ISRE (Interferon Stimulated Responsive Element) et exercera sa fonction de régulateur transcriptionnel. Parmi la multitude de gènes induit par les ISGF, les plus connus sont les Mx, les OAS (Oligo-Adénylate Synthases) et PKR (Protéine Kinase R).

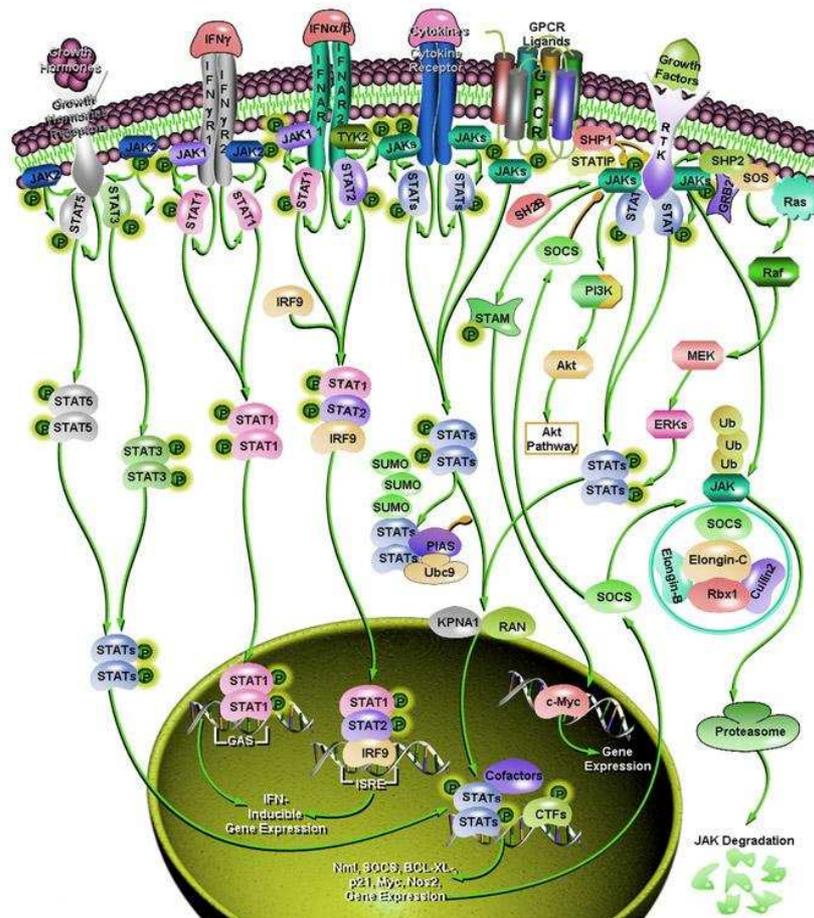


Fig.12 : Les voies Jak-STAT

Adapté de <http://www.sabiosciences.com>

### 3) Réponse T CD4 durant la maladie

La réponse T helpers est critique durant la phase aigue, une réponse proliférative dirigée contre E2, NS3, 4 et 5A étant associée à une SVR (Sustained Viral Response) et à un niveau d'ALAT normalisé. Si la réponse des cellules CD4<sup>+</sup> mémoires disparaît, un patient en voie de guérison rechute et se dirige vers la chronicité. Leur activation se ferait par des antigènes VHC intrahépatiques indétectables par PCR et/ou ceux captés par les cellules dendritiques dans les nœuds lymphatiques (LN (Lymph Node)). Cette hypothèse est viable puisqu'il a été

montré (Moonka, Milkovich et al. 2008) que la majorité de la réponse proliférative et sécrétrice d'IFN $\gamma$  se trouvait dans les LN, et non dans le sang ou le foie. Les cellules T CD4 et CD8 exprimant CD57, marqueur de différenciation terminale sans possibilité de divisions supplémentaires, sont en majorité dans le foie, puis dans le sang et enfin très peu nombreuses dans les LN. Ce qui montre que la distribution de cellules encore capables de se diviser est compartimentalisée, ce qui est une particularité de l'hépatite C. Les réponses IFN $\gamma$  aux peptides viraux atteignent 17 et 25% dans le sang et le foie contre 43% dans les LN, de même que le taux de prolifération en présence du virus est de 10 et 8% dans le sang et le foie contre 45% dans les LN. Les cellules présentatrices d'antigène (APC) ne seraient pas assez nombreuses en périphérie pour rendre le compartiment hépatique suffisamment fourni en APC. Cet environnement intrahépatique co-stimulant suboptimal tend à une accumulation de cellules aux phénotypes et aux fonctions très diverses. Le débat sur le(s) rôle(s) du virus dans la séquestration des cellules compétentes dans les LN est toujours d'actualité. Est-ce actif ou simplement un phénomène physiologique de retenue dans le but d'éviter au maximum d'endommager l'organe ? La réponse à cette question pourrait donner d'immenses espoirs thérapeutiques.

L'antigène étant présenté aux CD4 via une molécule CMH-II, leur rôle a été particulièrement étudié (Wiegard, Wolint et al. 2007). Les hépatocytes sains n'expriment pas les CMH-II, l'inflammation ou l'infection par un virus va déclencher celle-ci. Une cellule T4 naïve Th0, pouvant donc se différencier en Th1 ou Th2, sera toujours orientée vers le profil Th2 en absence de cytokine si le peptide est présenté par un hépatocyte. Pourtant, dans le cas du VHC, qui devrait normalement induire une réponse Th1 aux vues des cytokines produites, les cellules T CD4 primées par les hépatocytes infectés ne le sont que très faiblement. Cette faiblesse est proportionnelle au nombre de fois que la cellule T CD4 sera primée par un hépatocyte, et à terme, elle se transformera en cellule Th2. In vivo, les hépatocytes exprimant les molécules du CMH-II sont associées à une mauvaise réponse contre le virus.

Une des clés de l'inhibition des lymphocytes par les hépatocytes semble être l'expression membranaire de PD-1 (Programmed Death receptor 1) à la surface des lymphocytes intrahépatiques (Urbani, Amadei et al. 2006). En effet, les hépatocytes exprimant constitutivement PD-L1 (Programmed Death receptor Ligand 1) à leur surface, ils sont potentiellement capables de faire entrer en apoptose toutes les cellules T CD4 ou 8 entrant en leur contact. Lorsque l'on bloque PD-L1 par des anticorps neutralisants, on peut restaurer la

réponse proliférative des cellules T spécifiques au virus. PD-L1 étant inductible par l'IFN $\gamma$ , les molécules de l'inflammation et l'IL10 sur les APC (macrophage et cellules dendritiques) et exprimé aussi sur les cellules cancéreuses (Brown, Dorfman et al. 2003).

Un autre mécanisme sert l'infection, celui des cellules TRegs. Une population a été récemment décrite, les Tr1 (TRegs Th1) (Kaplan, Ikeda et al. 2008). Elles sont distinctes des habituelles cellules TRegs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, produisent énormément d'IL10 mais pas de TGF $\beta$  et sont antigène spécifiques. Il y a beaucoup plus de cellules Tr1 IL10 en phase chronique en comparaison des cas normaux et des hépatites aiguës résolues, ce qui est l'inverse du taux d'IFN $\gamma$ . Plus les cellules T CD4 et CD8 spécifiques au virus sont nombreuses et actives, plus les cellules Tr1 IL10 sont présentes en périphérie. Elles empêchent la mise en place de la réponse antivirale en phase aiguë mais parallèlement limitent les dommages hépatiques, ce qui rendrait leur éventuelle manipulation thérapeutique très délicate. Une autre étude sur ces cellules (Ebinuma, Nakamoto et al. 2008) décrit que le ratio entre les cellules CD25<sup>dim</sup> et CD25<sup>high</sup> (les cellules activées et régulatrices respectivement) influence la virémie et que leur phénotype reste inchangé lorsque l'on compare des sujets sains et des malades. Ces cellules régulatrices antigènes-spécifiques sont hyper prolifératives en présence de leur antigène à l'instar de leur consœurs Th1, et chose importante, que la mise en présence de cellules T CD4 avec le virus augmente l'expression de FoxP3. Enfin, dans le cas d'une coinfection VHC VIH, les cellules CD4<sup>+</sup>, et donc des TRegs et des Tr1, disparaissent ce qui entraîne de très lourds dommages hépatiques, ce qui confirme l'étude précédemment citée.

Pour terminer, les APC présentant les antigènes viraux aux T CD4<sup>+</sup> sont elles aussi sujettes aux dysfonctions (Della Bella, Crosignani et al. 2007). Les sujets malades ont moins de cellules dendritiques périphériques et celles-ci sont moins activées (expression de CD80 plus faible). Les cellules dendritiques et les monocytes IL12<sup>+</sup> diminuent en nombre, contrairement aux cellules dendritiques IL10<sup>+</sup>. Ces dernières, lorsqu'elles présentent des antigènes à des cellules T CD4 ou CD8, elles ne vont pas les activer mais les anergiser. Les tests statistiques de corrélation ont montré une corrélation positive entre le nombre de cellules dendritiques IL12<sup>+</sup> et une réponse efficace et une corrélation inverse entre le nombre de cellules dendritiques IL10<sup>+</sup> et la réponse antivirale.

#### **4) Réponse T CD8 durant la maladie**

Les premières difficultés rencontrées par les cellules T CD8 sont les dysfonctionnements des cellules les activant, les cellules T CD4 ou dendritiques. N'étant pas suffisamment activés, ils sont incapables d'éradiquer le virus mais ils le sont assez pour endommager le foie à cause de l'environnement cytokinique et de leur cytotoxicité (Gruener, Lechner et al. 2001). Dans l'hépatite B par exemple, les cellules T CD8 spécifiques du virus sécrètent du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ , contrôlent la réplication virale dans les cellules infectées et protègent l'organisme (Matsumura, Yamamoto et al. 2001). Dans le cas de l'hépatite C, les cellules T CD8, bien que vitales lors de la phase aiguë pour obtenir une guérison, sont plus nombreuses dans le sang que dans le foie, sont moins efficaces, prolifèrent moins et ne sécrètent pas d'IFN $\gamma$  en présence d'antigènes du VHC. Ils ont donc un double rôle très délicat à manipuler en thérapie puisqu'ils sont nécessaires à la résolution naturelle de la maladie mais une fois activés, ils échouent à tuer le virus mais dirigent la destruction hépatiques.

Une étude a tenté de résumer les raisons de l'échec des cellules T CD8 intrahépatiques (Neumann-Haefelin, Timm et al. 2008). Dans un premier temps, celui-ci est lié aux mutations d'échappement, particulièrement sur les épitopes présentés par HLA-B (78% des épitopes mutent) aux cellules T CD8, comme c'est aussi le cas lors d'un SIDA. En étudiant les peptides présentés par HLA-A, ils notent un fort taux de mutations d'échappement également (54%). De plus ils ont pu générer des T CD8 spécifiques des peptides consensus mais n'ont pas pu avec des variants autologues, ce qui signifierait que la plupart des épitopes viraux circulant sont invisibles aux cellules T CD8. Enfin, ils remarquent que le phénotype des cellules T CD8 est plus mémoire (CD127<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) qu'effecteur (CD38<sup>high</sup> CD57<sup>high</sup>). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les effecteurs se trouvent tellement rapidement sans cible du fait des mutations du virus, qu'ils deviendraient mémoires et resteraient bloqués dans le foie. Ils pourraient alors participer aux lésions hépatiques. Enfin, l'auteur se pose une question qui pour l'instant est encore sans réponse, pourquoi la réponse T CD8 spécifique d'antigènes invariables et viraux pour le virus ne l'éradique pas ?

Durant ces dernières années, un marqueur a commencé à prendre de l'importance dans la compréhension de l'immunité durant l'hépatite C, CD127. En 2006, une étude a ciblé les cellules T CD8 intrahépatiques inefficaces, surnommées « exhausted » (Radziewicz, Ibegbu et

al. 2007) et a essayé d'en élucider les causes et les caractéristiques. Tout comme les cellules T CD4, le taux de PD1 dans les cellules spécifiques du VHC est beaucoup plus élevé, 94%, que celui des autres cellules T CD8, qui est comparable à celui d'une personne saine. Ici aussi, la forte expression de PD-L1 dans le foie peut être responsable de l'anergie des lymphocytes. L'originalité de l'étude a été la mesure du taux d'expression de CD127. Il s'agit de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL7 qui était connu pour être sous régulé sur les cellules T antigènes-spécifiques dans certaines pathologies chroniques. Il est associé à la maintenance des T8 mémoires et à la protection contre l'apoptose une fois ces cellules activées. Dans le cadre de l'hépatite B, la perte en CD127 corrèle avec des fonctions altérées (production de cytokines, mort des cellules mémoires). En périphérie, les cellules T CD8 sont toutes CD127<sup>high</sup> alors que dans le foie elles ne le sont plus qu'à 13%. En résumé, les cellules T CD8 intrahépatiques sont PD-1<sup>+</sup> à 94% et CD127<sup>-</sup> à 87%, elles sont donc très sensibles à l'apoptose dans un milieu riche en PD-L1. Ceci a été confirmé en 2008 par la même équipe (Radziewicz, Ibegbu et al. 2008). La dynamique d'expression de PD-1 et de CD127 est la même entre le sang de phase aiguë et le foie de phase chronique, de même que pour le phénotype des cellules T CD8. Malgré leur état « super activé », les T CD8 sont incapables d'être pleinement fonctionnels et de sécréter de l'IL2, de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  ou d'avoir une cytotoxicité efficace.

En revanche, les cellules T CD8 spécifiques au VHC expriment très fortement l'annexine V et faiblement Bcl2 dans le sang de phase aiguë et le foie de phase chronique. Cette dernière étant l'une des principales molécules anti apoptotiques de l'organisme. Le peu de cellules T CD8 survivantes et encore efficaces ont comme point commun d'être tous CD127<sup>+</sup>. De plus, lorsque de l'IL7 est rajoutée au milieu de culture, une amélioration de l'état apoptotique est observée. Les causes de l'état pré apoptotique de toutes les cellules T CD8 intrahépatiques impliquées dans la réponse anti VHC ne sont pas encore élucidées même si certaines hypothèses commencent à émerger comme l'implication des TRegs dans la suppression de l'activation et le piégeage des cytokines.

La restauration des fonctions des cellules T lors des maladies chroniques est devenue un enjeu majeur de l'immunologie, les hépatites B et C plus le SIDA touchant plus de 500 millions de malades en 2005. Une étude très intéressante de 2006 (Barber, Wherry et al. 2006) chez la souris permet de mieux comprendre l'évolution du phénotype et des fonctionnalités des cellules T CD8 spécifique au VHC. Ils ont comparés 2 souches de virus d'hépatite murine (LMCV), une mimant l'infection aiguë et l'autre chronique. Il est amusant de noter que les

seules différences entre les 2 souches sont 2 acides aminés situés hors des épitopes. Sur les cellules T CD8 spécifiques de souris contaminées par la souche chronique, ils notent l'apparition rapide de PD-1 dans les 2 modèles d'infection mais il ne persiste que dans le modèle chronique. Le ligand, PD-L1, présent naturellement sur les hépatocytes est sur-régulé lorsque ceux-ci sont infectés. Ceci pourrait être un détournement de la tolérance alimentaire. Deux anticorps neutralisants sont testés sur le modèle chronique, un pour PD-1 et l'autre pour PD-L1. Ce dernier semble être beaucoup plus efficace puisque les souris du modèle chronique guérissent, que même en absence des T CD4, les T CD8 spécifiques du LCMV continuent de tuer les cellules infectées et que leur dégranulation est énormément augmentée. L'anticorps bloquant PD-1 a aussi une certaine efficacité mais les chercheurs ont noté l'apparition de maladies auto-immunes chez les souris. Un autre inhibiteur de la réponse T a été étudié dans cette étude, CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) puisque ses ARNm sont très présents dans les cellules T CD8 exhausted spécifiques au LCMV. Un anticorps neutralisant dirigé contre lui est inefficace, d'autant plus qu'il n'améliore pas les effets bénéfiques de ceux dirigés contre PD-1 et PD-L1. Les chercheurs concluent que l'expression de PD-1 sur les lymphocytes ne serait que leur adaptation à la présence continue du pathogène en diminuant la force du signal induit par le TCR. Un ciblage de PD-L1 semble donc être beaucoup plus intéressant pour une thérapeutique.

Cette hypothèse a été mise à l'épreuve en 2007 (Penna, Pilli et al. 2007). Les auteurs ont eux aussi noté les dysfonctions des cellules T CD8 spécifiques au VHC, pas d'IFN $\gamma$ , peu de TNF $\alpha$ , dégranulation mesurée par l'expression membranaire de CD107a faible, moins de granzyme A intracellulaire, expression faible de CD127 et élevée de PD-1. Ils ont affiné ces résultats en montrant que la moitié du faible nombre de cellules IFN $\gamma$  ne font pas de TNF $\alpha$ , mais que celles produisant du TNF $\alpha$  font toutes également de l'IFN $\gamma$ . L'incubation des cellules T CD8 de malades avec des anticorps neutralisant PD-L1 a donné des résultats encourageants. Chez les malades très sévères, un léger mieux est observé en ce qui concerne les fonctions des T CD8 spécifiques aux virus, chez les malades moins sévères, l'amélioration est nettement plus marquée. Il s'agit donc d'un traitement potentiel pouvant s'avérer très efficace.

Enfin, une étude a été réalisée sur une population alors nouvellement décrite, les cellules TReg CD8 (Billerbeck, Blum et al. 2007). Il a été montré que les cellules T CD8

surexprimaient transitoirement FoxP3 et étaient restreintes par HLA-E, tout comme les cellules NK, et pourraient donc avoir un effet suppresseur sur l'immunité adaptative et innée. Les TRegs CD8 CD25 FoxP3 sont anti-gène-spécifiques, sécrètent du TGF $\beta$  et de l'IL10 et inactivent les cellules T CD4 et CD8 dans le cadre d'une infection par VIH et VHC. En plus, durant cette dernière, elles peuvent inhiber en plus les cellules T CD4 et CD8 non spécifiques de leur antigène par contact. Elles pourraient être la principale source d'IL10 et en avoir besoin pour proliférer.

### **5) Les réponses NK et TNK durant la maladie**

Les cellules NK reconnaissant l'absence de molécules du CMH à la surface des cellules, stratégie connue d'échappement aux lymphocytes, le VHC doit pouvoir les inhiber spécifiquement pour survivre. Une de ses protéines d'enveloppe, E2, est capable de se lier à CD81 ce qui inhibe l'activation, la prolifération et la sécrétion de cytokines des cellules NK au lieu d'être un signal positif de costimulation. Au cours de la maladie, les cellules NK et TNK, en grand nombre dans le foie sain, vont devenir de moins en moins nombreuses et perdre leur capacité à sécréter de l'IFN $\gamma$ .

Cette perte sécrétrice est lourde de conséquence comme le montre une étude réalisée sur la fibrose alcoolique (Jeong, Park et al. 2008). En effet, l'alcool est interdit durant l'hépatite C puisqu'il a des effets délétères sur le foie et l'immunité. Ce que montre cet article, c'est que l'alcool sous-régule l'expression de NKG2D et de TRAIL des cellules NK, ce qui rend les hépatocytes résistants à l'apoptose induite par les NK. L'accélération de la fibrose, et donc l'apparition de la cirrhose, est corrélée avec la perte de sécrétion d'IFN $\gamma$  des cellules NK. Les NK seraient donc les cellules protectrices de l'intégrité du foie, leur dérégulation due au virus expliquerait l'apparition progressive de la fibrose.

Les NK sont environ 30% moins nombreuses en périphérie et les CD56<sup>dim</sup> 35% moins cytotoxiques (Morishima, Paschal et al. 2006). En revanche, leur potentiel cytotoxique est similaire à celui d'une personne saine. En corrélant la cytolyse et le nombre de NK, les chercheurs n'ont obtenu qu'une très faible corrélation, ce qui signifie que le virus est bien capable d'empêcher la réponse NK. Ce dernier résultat est néanmoins à reconsidérer aux vues d'une étude très récente de Yoon et al. (Yoon, Shiina et al. 2009) qui montre que les fonctions des cellules NK ne seraient pas modifiées par un lien direct avec la protéine virale E2.

Les cellules NK se divisent en 3 catégories, les précurseurs ( $CD3^- CD16^+ CD56^-$ ), les cellules matures cytotoxiques et proliférantes ( $CD3^- CD16^+ CD56^+$ ) et les cellules activées cytotoxiques ( $CD3^- CD16^- CD56^+$ ) (Zarife, Reis et al. 2009). Chez les malades non virémiques, le nombre de précurseurs est supérieur à celui des cellules matures, en revanche celui des cellules activées est le même que celui des malades non-virémiques. Les auteurs notent une plus forte présence de cellules  $CD56^{bright}$  chez les malades ayant une charge virale très faible. Cette étude a également étudié les cellules TNK. Elles se divisent aussi en 3 sous-populations, les TNK1 ( $CD3^+ CD16^+ CD56^+$ ), TNK2 ( $CD3^+ CD16^+ CD56^+$ ), qui produisent de l'IL4, et les TNK3 ( $CD3^+ CD16^- CD56^+$ ). Les malades ayant une charge virale faible possèdent un plus grand nombre de cellules TNK2. Les auteurs posent l'hypothèse que les TNK seraient capables d'éliminer les cellules T activées, ce qui empêcherait l'apparition du phénotype exhausted et donc un apport continu en cellules T fraîches et opérationnelles. Toutes les différences de sous-population NK et TNK ont été corrélées avec la charge virale, ce qui démontre leur importance dans le contrôle de l'expansion du VHC.

Le rôle crucial des cellules TNK a été démontré dans une étude très récente (Ye, Wang et al. 2009). Elles sont très nombreuses dans le foie et rares en périphérie, possèdent les fonctions des lymphocytes T et des NK, sécrètent rapidement et en grandes quantités des cytokines Th1 ou 2 ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL2, IL4 et IL13) sans avoir besoin de priming ou d'expansion clonale préalable. Elles seraient donc la toute première ligne de défense hépatique et orienteraient la réponse immunitaire en Th1 ou 2. Dans un foie VHC, ces cellules sont en moindre quantité par rapport à un foie sain. Les auteurs de cette étude ont mis en coculture des cellules TNK et des hépatocytes infectés par la souche JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis (Wakita, Pietschmann et al. 2005)). Ils ont noté une inhibition de la réplication dose-dépendante du virus par les TNK. En mettant les hépatocytes en présence des cellules et des surnageants  $CD56^-$ , ils n'ont vu qu'un très faible effet sur la réplication virale. La même expérience a été réalisée avec les surnageants  $CD56^+$ , les résultats positifs dose-dépendants montrent que les effets inhibiteurs sur la réplication virale passent par des médiateurs solubles. Ce médiateur semble être en majeure partie l' $IFN\gamma$ . La mise en présence du surnageant TNK modifie le profil transcriptionnel des hépatocytes infectés. Certains gènes sont sur-régulés, comme CXCL9,  $IFN\gamma$ , CD25, IRF-1, IRF-3 gènes (connus pour induire l' $IFN\beta$ ), IRF-7 (induisant les IFN de types I), STAT 1, 2 et 5, Jak2 et 3, OAS1 ou ISG15. Parmi les gènes sous-régulés, le

plus notable est PIAS1, puisqu'il s'agit d'un inhibiteur de la voie d'activation des STATS, et donc de la voie antivirale induite par les interférons. Le crosstalk entre les 2 types d'interférons permet une inhibition de la réplication virale mais aussi agit à un niveau différent. Ils inhibent l'action d'un miRNA, miRNA 122, qui est connu pour avoir des effets positifs sur la réplication virale et être spécifique au foie, et activent celle d'un autre miRNA, miRNA 196. Celui-ci est connu pour son effet inhibiteur de la réplication du VHC (Chen 2009). Ce nouveau rôle des interférons met en lumière la complexité encore inconnue et récemment insoupçonnée de la réponse antivirale induite par les interférons mais ouvre de nombreuses possibilités thérapeutiques.

## **Impact du traitement sur l'immunité**

Le débat sur les effets réels du traitement sur l'immunité fait actuellement rage. Longtemps, les chercheurs se sont basés sur la résolution naturelle de la maladie pour expliquer les effets de la thérapie. Plus les données cliniques s'accumulent, plus ce dogme est ébranlé. La réponse obtenue semblant être très différente de la réponse dite naturelle ou spontanée.

Si une importante partie des activités de l'IFN $\alpha$  sont aujourd'hui connues, celles de la ribavirine sont encore hypothétiques et n'ont jamais été montrées dans le cadre de l'hépatite C sur un sujet humain. Aujourd'hui, les chercheurs semblent avoir abandonné la compréhension des mécanismes d'action de cette dernière puisque que pratiquement plus aucun article sur ce sujet n'est sorti depuis 4 ans.

Une étude de Pawlotsky et al. s'est intéressée à ce sujet et a pu montrer que la ribavirine inhibait très faiblement la RpRd virale NS5B, et ce durant environ 4 jours seulement. Ensuite, ce mécanisme devenait totalement inefficace (Pawlotsky, Dahari et al. 2004). Une hypothèse prévoyait que la ribavirine pourrait augmenter la génération « d'erreurs catastrophes » et ainsi augmenter la génération de virions imparfaits et inactifs. Toutes les études ont fini par admettre que ce n'était pas le cas. Enfin, chez la souris, la ribavirine inhibe la production d'IL4 et 10 ce qui modifierait la balance cytokinique Th1/Th2 et orienterait la réponse immunitaire vers une action des cellules T CD8 plutôt que celle par anticorps. Ceci n'a pas encore été démontré *in vivo* chez l'homme à ce jour. L'unique intérêt de la ribavirine serait donc de donner un coup de pouce à l'inhibition de la réplication virale initiée par l'IFN $\alpha$  en

tout début de traitement. Dans ce cadre, faut-il encore en donner aux malades passés ces 4 premiers jours ?

Une étude contradictoire de la même année (Barnes, Salio et al. 2004), a étudié l'impact de la bithérapie sur l'immunité plus particulièrement les cellules dendritiques. Elle pensait que l'IFN $\alpha$  pourrait restaurer la réponse T spécifique, diminuer la charge virale et suractiver les APC. Pour vérifier cela, elle a incubé des cellules dendritiques avec ou sans dsRNA et de l'IFN $\alpha$ . Ce dernier n'a qu'un effet très modeste sur la maturation des cellules dendritiques en présence de dsRNA et aucun en leur absence. La ribavirine, elle, n'agit pas du tout sur ce phénomène ni n'améliore l'effet de l'IFN $\alpha$ . Le duo dsRNA plus IFN $\alpha$  stimule la production d'IL12 et de TNF $\alpha$  par les cellules dendritiques et n'a aucun effet sur celle d'IL10. Seul, l'IFN $\alpha$  n'a aucun effet sur ceci non plus. La ribavirine seule inhibe la production d'IL12, 10 et de TNF $\alpha$  sans que cela soit dû à l'apoptose des cellules dendritiques. Elle diminue le nombre de mRNA de ces molécules dans les cellules dendritiques sans pour autant introduire des erreurs catastrophes ni inhiber la RNA polymérase. Dans les cellules en division, la ribavirine n'a plus aucun effet, ce qui pourrait expliquer en partie sa faible efficacité dans le foie, organe constamment renouvelé. La forte concentration d'IFN $\alpha$  in vivo durant le traitement pourrait avoir un effet inverse sur les cellules dendritiques et les inhiber même en présence de dsRNA du fait de la trop grande stimulation reçue.

Une des pistes explorées est celle des chémokines et de leur modulation au cours du traitement (Larrubia, Calvino et al. 2007). En étudiant les cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant CCR5 et CXCR3, 2 récepteurs « Th1 » des chémokines, ils ont pu noter que le foie malade pouvait recruter les T CD8 portant ces récepteurs, même ceux qui ne sont pas spécifiques d'un antigène viral. La périphérie se vide en cellules T CD8<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> ou CXCR3<sup>+</sup> alors que le foie s'en enrichit. Parmi ces 2 récepteurs, seul CXCR3 est fortement corrélé à la fibrose et à l'inflammation. Durant le traitement, le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> et CXCR3<sup>+</sup> augmente dans le foie. En regardant les liaisons entre les expressions des récepteurs et une réponse soutenue, là aussi seul CXCR3 est corrélé positivement. Les chercheurs ont calculé qu'un enrichissement hépatique de 14% minimum en cellules T CD8<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> amenait 100% de SVR. Inversement, s'il est inférieur à 1% au bout de 24 semaines, 0% de SVR n'est observé. La surproduction de chémokines dans le foie due à l'inflammation généralisée pourrait interférer avec les récepteurs de chémokines Th1 et ainsi être un moyen indirect de survie du virus.

La technologie des RNA Chips a été utilisée dans le cadre de l'hépatite C de manière fort intéressante dans un travail de 2007 (Feld, Nanda et al. 2007). Les auteurs ont comparé les profils transcriptionnels de malades avant et pendant le traitement, des répondeurs et non répondeurs (R et NR) et enfin de répondeurs rapides et lents (RR et SR). Bien entendu, le traitement influence des centaines de gènes de pathways différents, les auteurs se sont donc focalisés sur les gènes immunologiques, et parmi eux, ceux étant exprimés au moins 1.5 fois plus durant le traitement. Les expressions d'une trentaine de gènes diffèrent entre les malades traités et non traités. Parmi eux, 20 sont directement liés aux interférons (16 sont des gènes stimulés par l'interféron (ISG)). En comparant les groupes R et NR, les plus grandes différences apparaissent dans les expressions des ISG tels que Mx1, OAS1 et 3 et ISG15, c'est-à-dire les effecteurs antiviraux induits par les interférons. Entre les groupes SR et RR, les seules différences remarquables apparaissent sur 3 gènes connus pour inhiber la réponse interféron. Ceci a été vérifié en comparant les gènes sous-régulés cette fois-ci entre les RR et SR, ils sont en effet nombreux à être des inhibiteurs de la voie interféron. N'ayant pas de différence entre les SR et les RR au niveau des ISG, les auteurs en déduisent que la stimulation IFN $\alpha$  est déjà maximale chez les malades SR, donc ils ne tirent aucun bénéfice à ce niveau là du traitement. En étudiant les effets de la ribavirine par ce système, les auteurs montrent qu'elle induit des gènes liés aux interférons, des gènes de cellules stellaires hépatiques (HSC) et des gènes pro et anti-apoptotiques. L'effet remarqué sur les HSC est très intéressant puisque ce sont les cellules responsables de la fibrose. Sans connaître les mécanismes d'action, on serait tenté de penser que la ribavirine agirait plutôt sur les hépatocytes, en les rendant plus sensibles à l'IFN $\alpha$ , et les HSC, peut être en les rendant apoptotiques donc incapables d'installer la fibrose. Enfin, dernière observation de ce travail, l'apoptose induite par le traitement se ferait via la voie Fas/FasL, qui est très lente.

Un travail de 2007 sur les hépatocytes et l'IFN $\alpha$  m'a interpellé uniquement à la lecture de son titre (Willberg, Ward et al. 2007). Leur découverte était que l'IFN $\alpha$  protégeait les hépatocytes de la mort cellulaire par cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> et des NK. Soit l'inverse de l'étude de Feld précédemment citée. En stimulant des hépatocytes avec de l'IFN $\alpha$ , les auteurs ont certes augmenté l'expression des molécules du CMH-I mais n'ont pas rendu les cellules plus faciles à tuer, au contraire. Ceci n'est pas dû à un quelconque défaut de présentation d'antigène ou de résistance à l'apoptose via Fas/FasL. En étudiant le profil transcriptionnel, ils ont

remarqué que Pi9, un inhibiteur de sérine protéase et de granzyme, était induit par l'IFN $\alpha$  et permettait aux hépatocytes de survivre à la cytotoxicité. Ceci est sûrement en partie responsable de la persistance du virus puisque les hépatocytes ne peuvent alors plus être tués que via la voie Fas/FasL qui est beaucoup moins rapide, mais protège des dégâts hépatiques concomitants à l'inflammation. Il serait d'ailleurs très intéressant de noter les effets de la ribavirine seule sur l'expression de Pi9.

A notre connaissance, le premier article mettant en cause l'impact de l'IFN $\alpha$  sur l'immunité lymphocytaire date de 1996 (Rehermann, Chang et al. 1996). Il montre que la multi spécificité et la force de la réponse T cytotoxique sont très importantes dans la résolution de la maladie. Par contre, durant la thérapie, le niveau d'ALAT, la charge virale mais aussi la réponse T diminuent. La guérison induite par le traitement serait donc indépendante de la réponse T CD8 cytotoxique, qui n'est pas améliorée durant le traitement mais plutôt inhibée. La question du moyen employé par les T CD8<sup>+</sup> pour contrôler le virus est encore inconnue aujourd'hui.

Encore aujourd'hui, les scientifiques sont divisés entre ceux pensant que l'IFN $\alpha$  module la réponse immune et permet l'élimination directe par les cellules T et NK du virus, et ceux pensant que l'IFN $\alpha$  n'agit pas directement sur l'immunité mais via une multitude de cellules amenant une baisse de pression virale sur le système immunitaire et à terme l'élimination du virus par celui-ci. Deux études récentes vont dans le sens de cette dernière hypothèse, que nous soutenons également.

La première (Burton, Klarquist et al. 2008) a étudié les populations T CD4<sup>+</sup> effectrices et régulatrices au cours du traitement. Les fonctions sécrétrices d'IFN $\gamma$  ont été mesurées par ELISpot et le nombre et l'expression de Fox P3 ont été calculés par cytométrie de flux avant, pendant et après traitement sur un groupe répondeur et un non-répondeur. Les ELISpots ont révélé que la thérapie, au lieu d'augmenter la sécrétion d'IFN $\gamma$ , la diminuait drastiquement. Celle-ci passe en effet en dessous de la baseline, la valeur avant traitement, et ne la rejoint que 24 semaines après l'arrêt du traitement. Cette sécrétion n'est corrélée ni avec la charge virale ni avec le pronostic de guérison. En revanche, chose pour le moins surprenante, la rechute après traitement est fortement corrélée avec une augmentation de la réponse spécifique au VHC. Un des effets du traitement pourrait être de séquestrer les virions dans les cellules hépatiques qui seraient ensuite libérés par le système immunitaire dans la circulation et

provoquer la rechute. En ce qui concerne les TRegs, aucune différence significative n'a été relevée entre les différents groupes sur le phénotype et leur fréquence, ni aucune corrélation entre la rechute, la charge virale ou le pronostic. Ils ne seraient donc pas responsables de l'échec thérapeutique.

L'autre étude (Barnes, Gelderblom et al. 2009) a été réalisée sur 31 patients sous ribavirine et forte dose d'IFN $\alpha$ . La réponse antivirale dirigée contre le VHC et le CMV a été mesurée avant, pendant et après traitement par la sécrétion d'IL2 et d'IFN $\gamma$ . Dans les 2 groupes, SVR et NR, la sécrétion d'IFN $\gamma$  des cellules T spécifiques est corrélée au niveau d'ALAT circulant et la majorité des malades possédaient des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques au virus en baseline positives à l'IFN $\gamma$  (10/15 SVR, 11/16 NR). Lorsque le traitement débute, une perte énorme des cellules T spécifiques au VHC et au CMV et sécrétrices d'IL2 et d'IFN $\gamma$  est observée dans les deux groupes, celle du groupe SVR étant plus importante. Cette chute va progressivement être comblée et les fréquences cellulaires reviennent à la normale seulement après la fin du traitement. Cette perte n'étant pas corrélée avec la charge virale ou le pronostic, les auteurs des deux études arrivent à une conclusion commune : ce n'est pas grâce à son immunité cellulaire adaptative que l'on peut guérir de l'hépatite C chronique sous traitement. Celui-ci au contraire est délétère pour elle, et son action bénéfique menant à la guérison est inconnue.

Les exemples contradictoires qui sont légions dans la littérature sur l'hépatite C font qu'il est très difficile de tirer des conclusions générales. Ce phénomène est d'autant plus délicat, que l'espèce étudiée, l'homme, est bien loin d'être aussi homogène qu'une lignée de souris. Chaque cas étant spécifique ne serait-ce que par le passé médical ou la génétique du malade étudié, il est nécessaire d'avoir des cohortes immenses de malades pour se faire aider des statistiques, ce qui n'est pas à la portée de tous les laboratoires.

S'il est un moment où le traitement est unanimement reconnu comme efficace, c'est durant la phase aigue. En effet, en raisonnant simplement, la meilleure manière de restaurer les fonctions des cellules T spécifiques est d'éviter qu'elles ne les perdent. Une étude très complète sur les effets d'un traitement par IFN $\alpha$  durant les premiers mois de la phase aigue a été réalisée en 2008 avec des conclusions très intéressantes (Badr, Bedard et al. 2008). De nombreux marqueurs de différenciation et sous-populations cellulaires ont été étudiés et suivis durant le traitement. En résumant rapidement, les cellules « mémoires centrales » sont CCR7<sup>+</sup>

CD45RA<sup>-</sup>, prolifèrent mais ne sécrètent pas d'IFN $\gamma$ . Les « effecteurs mémoires » CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> ne prolifèrent pas mais sécrètent de l'IFN $\gamma$ . Enfin les cellules CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>, effecteurs mémoire au maximum de leur différenciation, ne prolifèrent pas non plus mais sécrètent beaucoup d'IFN $\gamma$ . La maturation des cellules a été suivie par marquage de CD27 et CD28 et le phénotype « exhausted » par marquage de CD127 et PD-1. Les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC sont bloquées en différenciation au stade CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, n'expriment ni CCR7 ni CD45RA et très peu PD-1 et CD127. Chez les patients résolvant naturellement leur hépatite aigue, l'expression de CD127 augmente en même temps que celle de PD-1 diminue, jusqu'à la clairance virale. Sur ces mêmes malades, les marquages de CD127 et de Bcl2 augmentent parallèlement à l'augmentation des capacités prolifératives de cellules T CD8<sup>+</sup> en réponse aux peptides viraux. En ELISpot, ces cellules sécrètent beaucoup d'IL2 et d'IFN $\gamma$  et expriment fortement CD107a, donc dégranulent. Ces cellules polyfonctionnelles puisque mémoires, effectrices et cytotoxiques représentent à la fin de l'infection entre 15 et 26% des cellules produisant de l'IFN $\gamma$  chez les répondeurs spontanés. Chez les malades évoluant vers la chronicité, les cellules restent CD127<sup>low</sup> et Bcl2<sup>low</sup>, ne prolifèrent pas et ne sécrètent que très peu d'IFN $\gamma$  et expriment très faiblement CD107a. Lorsque les patients ont une monothérapie à l'IFN $\alpha$  et y répondent, leur cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC réexpriment Bcl2 et CD127 jusqu'à un niveau presque comparable à celui des répondeurs naturels. Ceux qui ne répondent pas à la monothérapie voient leurs cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques devenir polyfonctionnelles, Bcl2<sup>+</sup> et CD127<sup>+</sup> puis d'un seul coup leur nombre s'effondre, elles redeviennent monofonctionnelles puis plus fonctionnelles du tout. Ceci n'étant pas dû aux mutations du virus, les causes de ce phénomène sont encore inconnues. La littérature décrit les cellules CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> comme ayant une très forte activité télomérase, donc très résistantes à la mort et avec une longue durée de vie. Les cellules mémoires sont aussi connues pour être impliquées dans le contrôle du VIH, peut être en suivant un mécanisme similaire. Enfin, les auteurs n'ont trouvé aucune corrélation entre la capacité de prolifération et l'expression de PD-1 avec le pronostic de réussite du traitement. Pour résumer, la thérapie engendre la création de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC multifonctionnelles CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> Bcl-2<sup>+</sup> produisant de fortes quantités d'IFN $\gamma$ , d'IL2 et de CD107a. Ce changement ne touche que les cellules T CD8 spécifiques du virus.

Le traitement, si pris très tôt durant la phase aigue, pourrait sauver les cellules T spécifiques de la disparition et les amènerait vers un profil multifonctionnel apte à éradiquer le virus. La

fenêtre d'action de l'IFN $\alpha$  semble donc très restreinte mais peut amener jusqu'à 71% de guérison en phase aiguë en monothérapie contre 29% en phase chronique.

J'aimerais clore ce chapitre sur 3 exemples d'action directe antivirale que le traitement pourrait avoir qui n'ont aucun rapport avec le système immunitaire mais qui me semblent très pertinentes et auraient l'avantage de réunifier les immunologistes travaillant sur l'hépatite puisque ils auraient eu tous à la fois tort et raison.

Les 2 premières études portent sur la protéine Claudine-1. Celle-ci est une des clés d'entrée du virus dans les hépatocytes et est surtout le premier facteur permettant d'exporter la perméabilité au VHC à d'autres types cellulaires. Cette protéine se trouve principalement au niveau des jonctions serrées des endothéliums. Dans le foie, elle se situe au niveau des jonctions serrées entre hépatocytes dans les sinusoides. Ici, les cellules étudiées dans un premier temps sont les thyrocytes (Tedelind, Ericson et al. 2003). Une des principales fonctions de l'inflammation dans un tissu un peu éloigné d'un vaisseau sanguin est de pouvoir faire pénétrer les cellules immunitaires à travers la paroi vasculaire dans un premier temps, mais aussi à travers les endothéliums dans un deuxième afin qu'elles puissent atteindre le lieu adéquat. Il se trouve que c'est une des propriétés de l'IFN $\gamma$ . Celui-ci est capable de perméabiliser les endothéliums pour les préparer au passage des cellules immunitaires. Là où cette propriété devient extrêmement intéressante, c'est que le moyen utilisé par la cytokine pour arriver à son but est la sous-régulation de la Claudine-1. En déstabilisant les endothéliums en les privant de Claudine-1 au niveau des jonctions serrées, ils deviennent perméables.

En 2009, une équipe chinoise a tenté d'utiliser l'étude précédente en l'adaptant au foie dans le cadre de l'hépatite C (Wei, Jia et al. 2009). Leurs résultats sont extrêmement intéressants puisque la sous-régulation de Claudine-1 induite par l'IFN $\gamma$  cause une redistribution de celle-ci et des molécules CD81 et SR-BI sur la membrane, toutes trois impliquées dans l'entrée du virus dans la cellule hôte. De plus, elle casse la perméabilité de l'endothélium hépatocytaire en brisant les jonctions serrées mais surtout elle rend les hépatocytes beaucoup moins perméables au VHC. Cet effet jusque alors inconnu de l'IFN $\gamma$  dans le foie pourrait être l'un des principaux mécanismes de lutte contre le virus.

La dernière étude que je vais vous présenter pourrait à la fois expliquer une partie de la résolution de l'hépatite C, mais aussi pourquoi l'indice de masse corporelle (IMC) et le diabète sont des facteurs aggravants (Palmer, Hampartzoumian et al. 2008). L'adiponectine est un médiateur anti-inflammatoire sécrété par le tissu adipeux, régulateur de la sensibilité à l'insuline. Elle existe sous 2 formes, la forme de haut poids moléculaire (HMW) qui augmente la sécrétion d'IL6 par les monocytes et de faible poids moléculaire (LMW) qui elle diminue la sécrétion d'IL6 et augmente celle d'IL10. Elles agissent sur la voie MAPK qui est connue pour réguler celles des IFN $\alpha$  et  $\gamma$ . Cette étude montre que le niveau sérique d'HMW corrèle positivement avec la réponse dirigée contre le VHC. Les personnes obèses, donc avec un fort IMC, sont connues pour produire moins d'adiponectine ce qui en expliquerait l'impact négatif. Lorsque les chercheurs ont stimulé des cellules T de malades avec de l'adiponectine, ils ont observé une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  mais celle-ci était encore plus forte en présence en plus du VHC. En séparant les 2 formes moléculaires, ils ont remarqué que seule la forme HMW provoquait cette augmentation. Les cellules T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et les monocytes sont pourvus de récepteurs à l'adiponectine, Adipo-1, mais seules les cellules T et les NK répondent à HMW en sécrétant de l'IFN $\gamma$ . HMW agirait sur les cellules T via la voie p38MAPK les poussant à produire de l'IFN $\gamma$  qui à son tour provoquerait celle des cellules NK. Ces types de cellules supporteraient mutuellement leur prolifération et leur activation puisque les cellules NK entretiennent la production en IFN $\gamma$  des cellules T CD4<sup>+</sup> qui elles-mêmes avec les cellules T CD8<sup>+</sup> supportent celles des NK. Le profil Th2 observé en majorité chez les malades chroniques pourrait être dû à des défauts de dialogues entre ces 3 types cellulaires. A contrario, des interactions correctes chapeautées par l'adiponectine permettraient une éradication du virus.

## **Facteurs prédictifs de la réponse au traitement**

Le nombre élevé d'effets secondaires induits par le traitement ainsi que sa faible efficacité rendent crucial le développement d'outils prédictifs. Le but *in fine* serait de ne traiter que les patients pouvant répondre et ainsi éviter une thérapie très lourde et inutile aux patients qui seraient prédits comme non répondeurs. De nombreuses possibilités sont envisageables pour estimer la réponse au futur traitement, telle que la culture de leucocytes périphériques en présence de doses physiologiques d'IFN $\alpha$  et de ribavirine suivie d'analyses transcriptomiques et protéomiques ou de techniques dites de « lab-on-chip » à l'instar du test développé par Advanced MicroLabs LLC pour le diabète.

De nombreux laboratoires, dont le notre, se sont lancés dans le développement d'un tel outil. Ces recherches passent bien sur en priorité par une meilleure compréhension des interactions virus- cellules hôtes, en particulier dans la voie de signalisation des interférons de type I et II, et par une étude poussée de la réponse immunitaire innée et adaptative lors de l'hépatite C. Des avancées majeures telles que le système de culture *in vitro* du virus mis au point par Takeji Wakita (Wakita, Pietschmann et al. 2005) ou la découverte des clés d'entrée du virus dans nos cellules, CD81 (Pileri, Uematsu et al. 1998), Claudin-1 (Evans, von Hahn et al. 2007), l'Occludine (Ploss, Evans et al. 2009) et SR-BI (Catanese, Graziani et al. 2007) permettent d'étudier les paramètres viraux entrant en jeu lors de la phase chronique de la maladie. A l'immense complexité de la réponse immunitaire viennent s'ajouter celles des mécanismes vitaux, de résistance et d'échappement du virus ainsi que la diversité intrinsèque des hôtes eux-mêmes qui semble jouer un rôle décisif.

Un grand nombre de facteurs se sont révélés prédictifs. Parmi ceux-ci nous pouvons distinguer 3 catégories :

- Les facteurs intrinsèques au virus,
- Les paramètres immunitaires de l'hôte,
- Les facteurs génétiques de l'hôte.

Parmi les facteurs viraux, les séquences appelées ISDR et IRRDR de NS5A semblent liées à l'induction d'une réponse soutenue (SVR). Les mutations apparaissant dans ces régions ont pour effet de rendre le virus plus sensible aux molécules du traitement. La meilleure réponse possible s'obtient lorsque celles-ci sont au moins au nombre de 6. Il faut aussi noter que l'ISDR se situe dans la zone de contact de NS5A avec PKR, une molécule induite par l'IFN $\alpha$  à fort pouvoir antiviral. NS5A semble être une des clés de la prédiction de la réponse au traitement puisqu'elle est aussi capable de se lier à STAT1, effecteur capital dans la cascade de signalisation des interférons de type I. Deux résidus semblent être de très bons marqueurs de la sensibilité du virus à l'IFN $\alpha$ , l'alanine 2360 et la thréonine 2378, qui sont très fortement associés à une réponse soutenue (El-Shamy, Nagano-Fujii et al. 2008). L'étude séquentielle de NS5A des souches virales infectant chaque patient semble prometteuse ainsi que le développement de test révélant la présence de mutations influençant la sensibilité à l'interféron.

Les paramètres immunologiques prétraitement se révèlent être des prédicateurs fiables de la réponse au traitement. Par exemple, il a été récemment montré que la numération des neutrophiles ( $>2300/\mu\text{l}$ ) et le ratio Th1/Th2 des lymphocytes  $\text{CD4}^+$  ( $< 15,5$ ) étaient corrélés avec l'apparition d'une réponse soutenue (Shirakawa, Matsumoto et al. 2008). Différents marqueurs sont connus pour être spécifiques d'un système immunitaire déficient, tel qu'un fort taux de PD-1 sur les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  (Radziewicz, Ibegbu et al. 2007), un faible taux de Bcl-2 associé à une augmentation du marquage annexine V (Radziewicz, Ibegbu et al. 2008), la présence d'interleukine 4 et 10 dans le sérum qui inhibent le profil Th1 des lymphocytes spécifiques au virus (Sriram, Biswas et al. 2007). Le taux d'expression de CD38 à la surface des lymphocytes semble réguler la durée de la phase aigüe de la maladie (Thimme, Oldach et al. 2001) et cela sous-entend que son expression peut être liée positivement aux effets du traitement par  $\text{IFN}\alpha$ . Fait très important récemment mis en lumière, la présence de lymphocytes T polyfonctionnels ayant les propriétés prolifératives des cellules mémoires ainsi que cytolytiques et antivirales des cellules effectrices (Badr, Bedard et al. 2008). Une étude de 2007 (Pilli, Zerbini et al. 2007) a étudié l'impact de la réponse T spécifique au virus sur la cinétique virale et la prédiction de la réponse au traitement. Outre le fait qu'ils ne trouvent aucune fonction des cellules T  $\text{CD4}^+$  ou  $\text{CD8}^+$  qui est restaurée par le traitement, ils sous entendent que tout est déjà joué avant la première prise du traitement. En effet, les cellules T  $\text{CD8}^+$  de patients répondeurs ont une meilleure prolifération *ex vivo* avant traitement. Aucune différence n'est trouvée concernant la cytotoxicité, la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$  avant ou durant le traitement. La différence significative entre les répondeurs et les non répondeurs observée prétraitement ne l'est plus au cours de celui-ci, ce qui indique une baisse des fonctions T provoquée par le traitement. Parmi les facteurs prédictifs de la future réponse au traitement, une étude très minutieuse des cellules T  $\text{CD8}^+$  semble requise afin de comprendre quel paramètre influence la future réponse. Cette étude est contradictoire avec un article plus ancien (Kaplan, Sugimoto et al. 2005) disant que la présence et le nombre de lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  spécifiques au virus avant traitement ainsi que la production d' $\text{IFN}\gamma$  après traitement ne corrèlaient pas avec la clairance virale ni la réponse immédiate. En revanche, ces faits corrèlent lors d'une résolution naturelle de la maladie indiquant le fait que le traitement peut induire une réponse tout à fait artificielle.

Enfin, le background génétique de l'hôte se révèle aussi primordial dans l'établissement d'une réponse forte et durable dirigée contre le virus de l'hépatite C. Le premier niveau de

prédiction se trouve être le typage HLA du malade. Alors que certains allèles sont connus pour être associés à une forte réponse (HLA-B27, DQB1 et DRB1 (dans la population caucasienne), HLA-A03 et HLA-Cw01) d'autres le sont à la chronicité (HLA-B01 et HLA-B18) (McKiernan, Hagan et al. 2004; Kaplan, Sugimoto et al. 2005; Neumann-Haefelin, Timm et al. 2008). Enfin, de nombreuses mutations possibles sur les récepteurs aux cytokines ou chémokines, sur les promoteurs des gènes antiviraux jouent certainement un rôle dans la sensibilité de l'organisme face à un agent pathogène tel que le virus de l'hépatite C. Une étude des SNP (single nucleotid polymorphisms) sur 6 gènes a montré qu'elles n'étaient pas liées à la réponse à l'exception d'un haplotype du gène de l'IL10 (dit IL10 ACC) et une réponse soutenue (Morgan, Lambrecht et al. 2008). Une étude transcriptomique très complète (Feld, Nanda et al. 2007) a été réalisée. Les profils transcriptomiques hépatiques de patients non répondeurs et répondeurs ont été comparés afin d'en déduire les marqueurs typiques d'une réponse. Ceux-ci sont également discriminés entre les répondeurs rapides et lents. Les différences les plus flagrantes sont montrées pour les gènes inclus directement ou indirectement dans les voies de signalisation relatives aux interférons. Prétraitement, 22 gènes ont été marqués comme étant au moins 1.5 fois plus exprimés chez les répondeurs. Ces 22 gènes sont répartis en 15 ISG (parmi eux OAS2, OAS3 et Mx1), 2 liés directement aux IFN (RIG-1 et STAT1) et 5 gènes immunitaires (CXCL9 par exemple). Cette dernière étude fournit une liste très intéressante de gènes candidats à un éventuel test prédictif. Enfin, l'indice de masse corporelle jouerait un grand rôle dans la prédiction de la réponse au traitement. En effet, une étude précédemment citée sur l'adiponectine (Palmer, Hampartzoumian et al. 2008) montre que cette hormone sécrétée par le tissu adipeux agit sur les monocytes et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et augmente significativement la sécrétion d'IFN $\gamma$  de ces dernières et des cellules NK. Le taux sérique de la forme HMW a été corrélé positivement avec la réponse au traitement et pourrait donc être un bon prédictateur de l'issue du traitement.

Un système permettant de synthétiser toutes ces données de manière rapide et peu onéreuse dans l'optique de prédire si un patient répondra ou non au traitement IFN $\alpha$  plus ribavirine de plus qu'une alternative à celui-ci en cas d'échec thérapeutique sont plus que jamais nécessaires afin d'améliorer la qualité de vie des patients ainsi que leur pronostic vital.

## Problématique

Les rôles des cellules T dans la phase aiguë de l'hépatite virale C commencent à être relativement bien connus et documentés. Ce sont les cellules effectrices de l'immunité adaptative, capable d'amener une clairance virale rapide si les réponses T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sont fortes et diversifiées. Leur présence paraît donc fortement corrélée avec la guérison spontanée en phase aiguë (Thimme, Oldach et al. 2001). En phase chronique en revanche, les données sont beaucoup plus disparates et sont loin d'aller toutes dans la même direction. Dans les précédents travaux de notre équipe, une étude publiée en 2002 a utilisé la cytométrie en flux pour montrer les différences entre les populations lymphocytaires T, NK et TNK entre la périphérie et le foie (Pernollet, Jouvin-Marche et al. 2002). Les cellules T représentent 60% des lymphocytes intrahépatiques (60% étant CD8<sup>+</sup>), les NK et TNK 15% chacune. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les pourcentages de cellules T dans le foie et le contrôle de la maladie. En revanche une corrélation positive a été trouvée entre la sévérité de la maladie (score Knodell et ALT sériques) et le pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (cellules T) intrahépatiques.

La présence des cellules T en phase chronique au niveau intrahépatique étant donc plutôt associée à l'apparition et à la diffusion des lésions hépatiques plutôt qu'au contrôle de la maladie, il restait à trouver quel type de cellules T était particulièrement impliqué dans ces mécanismes. Notre équipe a postulé en 2003 (Leroy, Vigan et al. 2003) qu'il s'agirait des cellules T CD8<sup>+</sup>. Celles-ci seraient les cellules effectrices des lésions contrastant avec le contrôle viral.

Parallèlement, nous avons également étudié le répertoire TCR $\alpha\beta$  de l'infiltrat CD8<sup>+</sup> intrahépatiques (Vigan, Jouvin-Marche et al. 2003). Ce travail a montré que les répertoires périphériques et intra-hépatiques étaient comparables en termes de diversité. Cette étude montre que les T CD8 subissent une très modeste expansion et que la diversité du TCR est corrélée avec le nombre de T CD8<sup>+</sup> hépatiques chez les malades. Ceci peut à la fois montrer une réponse multispécifique et polyclonale dirigée contre le virus mais aussi la présence de cellules beaucoup moins spécifiques au virus, capables de générer d'importantes lésions.

L'étude la plus récente s'est attardée à caractériser le phénotype de ces cellules T CD8<sup>+</sup> intrahépatiques (Bonorino, Leroy et al. 2007). La stimulation chronique de ces cellules par le virus pourrait engendrer l'expression de récepteurs inhibiteurs de type NK spécifiques d'antigène présenté par les molécules HLA-I (NKR). Une corrélation a été trouvée entre la fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> NKR<sup>+</sup> dans le foie et la périphérie et l'activité histologique des

patients infectés par le VHC. Les cellules T CD8<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> (Killer cell Ig-like Receptor) n'étaient pas corrélées aux lésions mais présentaient des caractéristiques de cellules mémoires avec une sénescence avancée, comme en témoigne leur forte expression de CD57. Le contenu en perforine de ces cellules, NKR<sup>+</sup> et KIR<sup>+</sup>, était très faible dans le cadre de l'infection par VHC. Ces cellules ont donc de fortes altérations fonctionnelles et pourraient être les responsables des lésions hépatiques. Partant de ces acquis, de nombreuses nouvelles questions se sont posées.

*Les cellules T semblant responsables des lésions, quelle(s) population(s) sont en mesure de contrôler le virus ?*

Dans les cas de d'immunosuppression pathologique (VIH) ou thérapeutique (transplantations), les lésions hépatiques dues au VHC sont plus sévères. Il existe donc des populations capables de contrôler le VHC sans léser le foie.

Le premier travail auquel j'ai participé est la suite directe de ce dernier article et tente de donner un élément de réponse à la question posée. Parmi les lymphocytes intrahépatiques, une population est abondante, possède des propriétés cytotoxiques, donc de lyser les hépatocytes infectés, est capable de sécréter un grand nombre de cytokines : les cellules NK. Nous avons finement étudié leur phénotype et leur(s) rôle(s) au court de la maladie (Bonorino, Ramzan et al. 2009). Brièvement, cette étude comporte 2 parties, une analyse immunohistochimique et une analyse cytométrique. La première permet de localiser les cellules NK dans l'environnement hépatique et la deuxième d'en décrire le phénotype. Les cellules NK, du fait de leurs propriétés, pourraient aussi bien contrôler le virus que promouvoir les lésions engendrées par les cellules T CD8<sup>+</sup> en phase chronique. Nous les avons donc finement étudié afin d'essayer de déterminer leur rôle(s) exact(s) dans la pathologie.

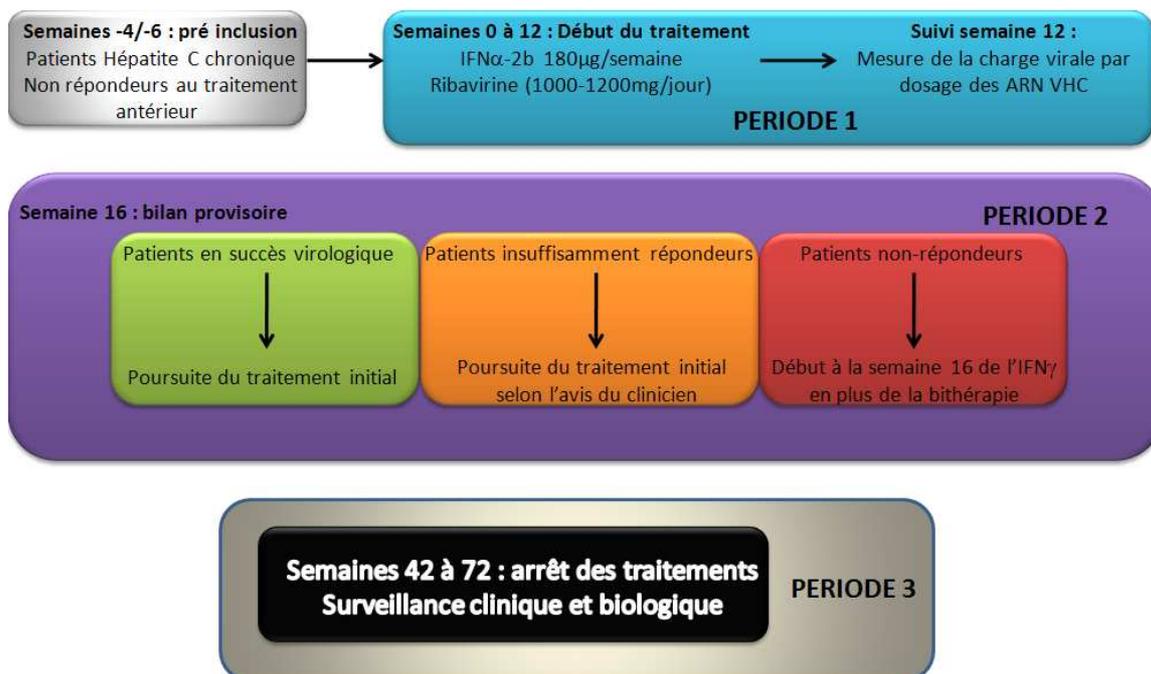
*Le contrôle immunitaire via les NK et l'IFN $\gamma$  semblant être une condition favorable, quels paramètres immunitaires préthérapeutiques peuvent influencer et nous indiquer la future réponse au traitement ?*

Nous savons que certains paramètres s'avèrent relativement prédictifs du devenir de la maladie, notamment le niveau d'ALT sérique, l'âge, la présence de fibrose et le génotype du virus infectant. Aux vues des effets secondaires importants induits par le traitement, il est absolument nécessaire de sélectionner les patients qui y répondront pour éviter aux autres des effets secondaires inutiles. De plus, avec l'arrivée prochaine des nouvelles molécules

thérapeutiques telles que les anti-protéases et anti-polymérase, il est vital de pouvoir prédire la réponse au traitement pour éviter l'avènement de souches virales résistantes aux multi-thérapies. Notre étude (Dufeu-Duchesne et al. manuscrit en finalisation) s'est donc intéressée aux possibles paramètres prédictifs de la réussite ou de l'échec de la thérapie ainsi qu'aux cellules les exprimant.

Les mécanismes d'action du traitement par PEG-IFN $\alpha$  et ribavirine sont encore très largement méconnus. Quel impact peut-il avoir sur les cellules immunitaires au cours de la maladie ? Restaure-t-il une réponse déficiente ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une cohorte de patients issue d'un essai clinique de phase III, l'étude Gammatri. A la suite de notre précédent article, nous avons postulé que la prise d'IFN $\gamma$  en supplément de la thérapie habituelle pouvait apporter un réel bénéfice aux patients et augmenter le taux de clairance virale. Il en a résulté un essai clinique encadré par l'ANRS (Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites). Le protocole thérapeutique peut être résumé comme suit :



Nous avons pu suivre l'impact du traitement ainsi que de l'ajout d'IFN $\gamma$  durant toutes les périodes de la phase chronique, avant, durant et après traitement, et ce chez des répondeurs et non-répondeurs. Pour mieux cibler les effets spécifiques des IFN $\alpha$  et  $\gamma$  et de la ribavirine, nous avons développé un système de culture de lymphocytes *in vitro* permettant la culture de PBMC en présence des molécules d'intérêt souhaitées.

Les cellules T anti-VHC présentant des déficits fonctionnels, les cellules T régulatrices sont-elles impliquées dans leur initiation?

Enfin, nous avons cherché à expliquer les rôles des cellules TReg intrahépatiques et périphériques afin de déterminer si ces cellules inhibaient la réponse immunitaire dirigée contre le VHC et quelles pouvaient en être les conséquences. L'étude réalisée (Sturm et al. 2009, soumise au *Journal of Hepatology*) les a observés durant la phase chronique de la maladie. Par immunohistochimie nous avons pu étudier leur localisation intrahépatique et par cytométrie en flux, leur phénotype, pour mettre ces données en parallèle avec les facteurs cliniques.

# Résultats

## **Article 1: Fine Characterisation of Intrahepatic NK Cells Expressing Natural Killer Receptors in Chronic HCV and HBV Infections**

Les cellules NK sont un type de lymphocytes cytolytiques qui constituent un composant essentiel du système immunitaire inné et qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules tumorales ou infectées. Potentiellement, elles peuvent jouer un rôle vital dans le contrôle de la réplication du VHC dans les hépatocytes (Li, Zhang et al. 2004). Il est connu que le virus de l'hépatite C, tout comme celui de la B, peut interférer avec la réponse NK chez la souris et chez l'homme. La protéine E2 du VHC peut par exemple se lier à CD81 à la surface des NK et inhiber très fortement leurs fonctions sécrétrices, cytolytiques ou encore leur prolifération (Tseng and Klimpel 2001). NS3 et NS4A ont aussi un effet inhibiteur sur les cellules NK (Taylor, Shi et al. 1999). Durant la phase chronique de l'hépatite C, le microenvironnement hépatique est soumis à une inflammation constante, et est caractérisé par une augmentation de l'expression de HLA-E sur de nombreux types cellulaires et sa stabilisation par la liaison de la protéine core du virus (Natterman, Nischalke et al. 2005), ce complexe HLA-E/Core est alors reconnu par l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A. Il est établi que le nombre de cellules NK dans un foie VHC est plus faible que dans un foie sain, beaucoup d'études suggèrent qu'en plus leur pouvoir cytolytique est diminué. Il semble donc que toutes les conditions soient réunies pour favoriser une inhibition des cellules NK dans un foie VHC chronique.

Notre étude a consisté à examiner finement la distribution des populations NK et leurs possibles associations avec les paramètres cliniques dans les cadres de l'hépatite chronique C. Nous avons observé une diminution significative de la fréquence des cellules NK et un déséquilibre quantitatif entre les populations cytotoxiques, CD56<sup>dim</sup>, et sécrétrices, CD56<sup>bright</sup>, dans le foie et le sang des patients VHC. De plus, le nombre de cellules NK exprimant les récepteurs inhibiteurs CD158a,h et CD158b,j était significativement plus faible dans le foie qu'en périphérie chez les patients VHB et VHC. Dans le foie VHC chronique, les cellules CD56<sup>+</sup> se localisent préférentiellement hors des zones nécrotiques. Le nombre de cellules CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> circulantes était positivement corrélé avec une augmentation de la nécro-inflammation et de la fibrose. De plus, la fréquence des cellules CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> corrèle négativement avec la charge virale chez les patients atteints d'hépatite B ou C chronique. En résumé, notre travail fournit des données sur les corrélations entre le nombre de cellules NK, leur distribution et leur phénotype et la charge virale des patients en phase chronique d'hépatite.

## ***Article 2: IFN- $\gamma$ Gene Expression is Associated to SVR and Mainly Localized in NKT Cells in Chronic Hepatitis C Patients Treated with IFN- $\alpha$ and Ribavirin***

De plus en plus d'études cliniques et scientifiques tendent à montrer que l'IFN $\gamma$  jouerait plusieurs rôles clé dans l'évolution de l'hépatite C. Une étude de 2009 a montré qu'il était capable, seul, d'inhiber la réplication virale dans des hépatocytes de malades chroniques (Ye, Wang et al. 2009). L'expression préthérapeutique de l'IFN $\gamma$  pourrait donc être l'un des facteurs déterminants pour la réussite du traitement. Celui-ci consiste en une bithérapie à base d'IFN $\alpha$  pégylé et de ribavirine, induit un nombre important d'effets secondaires et n'est efficace que dans environ 50% des cas d'infection par le génotype 1 du virus. La recherche de facteurs immunitaires prédictifs de cette réponse pourrait éviter aux patients décrits comme futurs non répondeurs beaucoup de désagréments inutiles. A l'heure actuelle, certains facteurs comme le génotype infectant, l'indice de masse corporelle, le sexe ou l'âge donnent des indications sur la réponse potentielle au traitement de manière assez fiable. En revanche, au niveau immunitaire, aucun facteur prédictif dosable avant traitement ne fait l'unanimité.

Dans cette optique, pour notre étude, nous avons mesuré le taux basal d'expression de l'IFN $\gamma$  dans le sang et le foie de 45 patients atteints d'hépatite C chronique avant traitement par PCR en temps réel. Nous avons cherché s'il existait des corrélations entre celui-ci et les caractéristiques cliniques. Nous avons également cherché à identifier quelles étaient les principales cellules productrices d'IFN $\gamma$  avant traitement.

Nous avons trouvé que les niveaux d'expressions des ARNm IFN $\gamma$  pré-thérapeutique étaient significativement plus élevés chez les 41 patients en comparaison de ceux des 5 témoins. Chez les malades, l'expression d'IFN $\gamma$  dans les PBMCs était fortement corrélée à celle observée dans le foie ( $r=0.84$ ,  $p<0.01$ ). Cette expression n'était corrélée ni avec la charge virale ni avec les lésions. Nous confirmons aussi que la réponse dirigée contre un virus de génotype 1 est bien plus faible que celle en réponse à un génotype 3. En comparant les patients répondeurs et non répondeurs, nous avons trouvé que le taux d'expression pré-thérapeutique d'IFN $\gamma$  était significativement plus élevé chez ceux développant une réponse virologique prolongée. Nous avons ensuite tenté d'identifier la source principale d'IFN $\gamma$  pré-thérapie en utilisant à la fois des tris cellulaires magnétiques successifs et la cytométrie en flux. Nous en avons conclu que celles-ci étaient les cellules TNK CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.

En conclusion, nous avons démontré que les niveaux d'expression des transcrits IFN $\gamma$  étaient positivement corrélés avec la réponse thérapeutique positive. Les cellules TNK étaient la principale source d'IFN $\gamma$  directement mobilisable. Ce qui pourrait en faire des cibles très intéressantes pour de futures immunothérapies. Enfin, ces résultats laissent à penser que l'ajout d'IFN $\gamma$  à la bithérapie pourrait améliorer le taux de réussite de celle-ci.

# **IFN- $\gamma$ Gene Expression is Associated to SVR and Mainly Localized in NKT Cells in Chronic Hepatitis C Patients Treated with IFN- $\alpha$ and Ribavirin**

Dufeu-Duchesne T<sup>a, b</sup>, Camous X<sup>a, b</sup>, Ramzan M<sup>a, b</sup>, O'Brian C, Marche Pa, b, Zarski JP<sup>a, b</sup>, O'Farelly C, Jouvin-Marche E<sup>a, b</sup>, Leroy V<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 823-Equipe IAPC Institut Albert Bonniot, Grenoble Cedex 09, France

<sup>b</sup>Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut Albert Bonniot, UMR-U823, Grenoble, France

**Keywords:** Hepatitis C, TNK cells, interferon gamma, outcome prediction, interferon alpha and ribavirine therapy

## Abstract

The outcome of HCV infection and the response to antiviral treatment depend on both viral and host factors. Host immune response contributes to viral control, clinical recovery and protective immunity to chronic hepatitis and liver cirrhosis. Establishing immunological status and identifying pretreatment immunological factors associated with better response to therapy might be of importance in understanding of the successful immune response and in future of combination therapy to HCV infection. In this study, we investigated the expression of IFN- $\gamma$  before treatment with interferon alpha and ribavirin in the blood and liver of chronic HCV patients (CHC). Our results showed that the expressional levels of IFN- $\gamma$  were higher ( $p < 0.05$ ) in PBMCs of CHC patients than healthy control. Comparing their expressional levels in PBMCs and liver, no difference was observed in the expressional levels of IFN- $\gamma$ , however, they were significantly ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.01$ ) correlated in PBMCs and liver. Interestingly, we found that IFN- $\gamma$  was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in PBMCs of CHC patients who showed sustained virological response (SVR) and with HCV genotype 3 than those with non-responder (NR) and HCV genotype 1. To determine the source of higher levels of IFN- $\gamma$  in CHC patients, we investigated that CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells were the main source of IFN- $\gamma$  in PBMCs of these patients. No correlation was observed in different polymorphic forms of IFN- $\gamma$  in CHC patients. In conclusion, we demonstrated that the pretreatment PBMCs levels of IFN- $\gamma$  could be a predictor of treatment outcome and NKT cells might be a better prospect for immunotherapy in chronic HCV patients.

## Introduction

Immune response plays an important role in the control and spontaneous eradication of HCV infection. Identification of patients infected with HCV who have the greatest chance of treatment success is quite attractive. A personalized approach to HCV treatment could maximize efficacy and limit the unnecessary side effects and cost for patients who are unlikely to achieve SVR. Therefore, the development of validated biomarkers capable of predicting SVR before treatment could be helpful for managing patients with chronic hepatitis C. To achieve this, many serological and immunological parameters have been described as predictors of treatment outcome or SVR in chronic hepatitis C patients who were treated with IFN- $\alpha$ /ribavirin combination therapy. Among immunological parameters, different chemokines (MIG, IP-10), cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) and immune cells (HCV-specific T cells, pDC (plasmacytoid dendritic cells), NK cells, NKT cells in the liver, inflammatory cells in portal tracts) have been described as predictors of treatment outcome in these patients (Diago, Castellano et al. 2006; Kanto and Hayashi 2006; Itose, Kanto et al. 2007; Rosen, Weston et al. 2007; Badr, Bedard et al. 2008; Chang, Hsu et al. 2008; Fujimoto, Tomimatsu et al. 2008; Yamagiwa, Matsuda et al. 2008; Wan, Kung et al. 2009).

Type I interferons (IFNs) have diverse biological properties, including antiviral, growth inhibitory, and immunomodulatory effects (Stark, Kerr et al. 1998). In chronic HCV patients, the treatment with IFN- $\alpha$ /ribavirin changes the cytokines profile both secreted by T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cells (Shapiro, Gershtein et al. 1998; Abayli, Canataroglu et al. 2003; Blackard, Komurian-Pradel et al. 2006). Among pro-inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are immunostimulatory and immunomodulatory cytokines and are active against viral and tumor control (Schoenborn and Wilson 2007). IFN- $\gamma$  seems to be of crucial interest because it is known to inhibit HBV and HCV replication in different culture systems such as replicons (REF). Conflicting results regarding *in vivo* IFN- $\gamma$  profile during the treatment have been reported (Shapiro, Gershtein et al. 1998; Trepo 2000; Barnes, Gelderblom et al. 2009), however, many studies showed that IFN- $\gamma$  profile increase in the early treatment specifically in patient with sustained virological response (SVR), suggesting that IFN- $\gamma$  production is important at least in the first phase of treatment (Amati, Caradonna et al. 2002; Trapero, Garcia-Buey et al. 2005; Tox, Schulte et al. 2008). Increase in the expressional levels of TNF- $\alpha$  in PBL of hepatitis C patients but decrease in SVR patients during the treatment has also

been observed (Shapiro, Gershtein et al. 1998; Wan, Kung et al. 2009), suggesting its role in the treatment outcome.

During IFN- $\alpha$ /ribavirin therapy, increased HCV specific T cell response has been observed which is associated with SVR (Rosen, Weston et al. 2007; Badr, Bedard et al. 2008). NK (Natural Killer), NKT (T cells expressing NK receptors) cells activity also increase during the treatment, specially, in SVR patients (Lin, Gonzalez et al. 2004; Yamagiwa, Matsuda et al. 2008). Taken together, these results suggest that combination therapy with IFN- $\alpha$ /ribavirin enhance the immune response against HCV. In the present study, we examined the expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the blood and liver of patients with persistent HCV infection. In order to define the prognostic parameters for sustained virological response, we examined the expressional levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in PBMCs and in liver in CHC patients before treatment. We then analyzed the expression of both these cytokine in regard to the response to treatment and searched the main source of IFN- $\gamma$  in the different subsets of blood immune cells.

## **Patients and Methods.**

### ***Patients.***

Forty five patients with chronic hepatitis C seen at the Grenoble University Hospital (France) Hepatology Unit who received a first course of peg-IFN $\alpha$  and Ribavirin were studied. All patients were anti-HCV-positive, had detectable serum HCV RNA using PCR, had ALT serum levels higher than the upper limit of normal on at least one occasion in the 6 months before the initiation of treatment, had a histological diagnosis of chronic hepatitis by liver biopsy and received more than 80% of the dose of Peg-IFN $\alpha$  and/or Ribavirin and more than 80% of the expected duration of treatment. The criteria for exclusion were age under 18 years, presence of serum HBsAg or anti-HIV antibodies, other causes of chronic liver disease, severe cirrhosis, severe systemic illness, and pregnancy. Patients who had undergone previously a course of interferon therapy or an immunosuppressive treatment were also excluded. Patients were treated with peg-IFN $\alpha$  2a (Pegasys 180  $\mu$ g/week) or peg-IFN $\alpha$  2b (Viraferon-Peg 1.5  $\mu$ g/kg/week) and Ribavirin (800–1400 mg according to weight) for 12 or 48 weeks according to the HCV genotype and the virological response to treatment at weeks 12 and 24. Sustained virological response to treatment was defined by the absence of

detectable serum HCV RNA using PCR 24 weeks after the end of treatment. The main characteristics of the patients are presented in Table 1.

### ***Serologic and HCV RNA analysis***

Commercially available ELISA kits (AxSYM, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA and VIDAS, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) were used to determine hepatitis B markers (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs). HCV antibodies were tested using two third-generation HCV EIA systems (AxSYM, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA and Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Serum HCV RNA was quantitated with the COBAS Amplicor HCV Monitor 2.0 assay (Roche Diagnostics, Meylan, France). The detection threshold of this assay was 600 IU/mL. Qualitative detection of HCV RNA was carried out to assess the virological response using the COBAS AMPLICOR HCV 2.0 assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) whose detection limit is 50 IU/mL. HCV genotypes were determined with the Trugene HCV 5'NC Genotyping Kit (Bayer Diagnostics, Puteaux, France) using the OpenGene DNA Sequence.

### ***Liver samples***

For each patient, a liver biopsy was obtained within 6 months before therapy. Each liver biopsy was divided in two parts. The first part was directly fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin for histological evaluation. The second part, which was available in 21 patients, was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for mRNA analysis. Histological evaluation was performed to describe Knodell score and METAVIR activity and fibrosis index by a single independent pathologist who was unaware of the patient's clinical data.

### ***Leucocytes isolation Immunostaining and Flow Cytometry***

PBMCs were collected immediately before starting therapy. Leucocytes were separated from peripheral blood by density gradient centrifugation on ficoll (Eurobio). The monoclonal antibodies used for immunophenotyping were anti-CD3-Phycoerythrin/Cyanine7 (PC7) and anti-CD8-Allophycocyanine (APC) from Immunotech, anti-CD56-fluoresceine (FITC) and anti-IFN- $\gamma$ -Phycoerythrin (PE) from Becton-Dickinson Biosciences. Immunostaining and flow cytometric analysis were performed as described previously (Pernollet, Jouvin-Marche et al. 2002; Bonorino, Leroy et al. 2007).

### ***Magnetic cell sorting***

Fifty ml blood sample of two patients were taken and 90 millions of PBMCs were obtained after ficoll separation. For isolation of leucocytes subsets, microbead-coupled antibodies and the Mini-MACS™ (Milteny, Bergisch-Gladbach, Germany) device were used, followed by manufacturer's recommendations. The antibodies labeled microbeads (Milteny, Germany) were used for T cells (CD3, CD4 and CD8), NK cells (CD56), B cells (CD19) and monocytes (CD14). Separated cell purity was found over than 90%, confirmed by fluorescence-activated cell sorting analysis using fluorescence-labeled-monoclonal antibodies.

### ***RT-PCR***

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real time PCR were performed as described previously (Leroy, Vigan et al. 2003). Briefly, primer pairs for quantification of CD3 $\epsilon$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and G3PDH, were designed using Primer3input software and were synthesized by Genset (Paris, France). The sequences and main characteristics of each primer used are summarized in Table 2. Results were expressed as the ratio of the target sequence concentration relative to G3PDH and CD3 $\epsilon$  as house keeping genes.

### ***DNA extraction and ARMS-PCR***

DNA was extracted with “Nucleospin Tissue Kit” (Macherel-Nagel) and was conserved at -80°C until transported to St. Paul hospital in Dublin Ireland where the polymorphism of IFN- $\gamma$  was carried out. The technique is based on the principle of allele-specific priming of PCR process, i.e. a specific primer will only permit amplification to take place when its 3' terminal nucleotide matches with its target sequence. The target DNA is amplified using a common primer and either of two allele specific primers; one complimentary for the mutation to be detected (IFN- $\gamma$  primer, (Pravica, Brogan et al. 2000) and the other complimentary to normal DNA sequence at the same position. The method provides a quick screening assay that does not require any form of labeling as the amplified products are visualized simply by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

### ***Statistical methods***

The non-parametric Mann-Whitney U-test was performed to compare quantitative variables. Within group comparisons were performed by using the 2-tailed Spearman's correlation

coefficient. P values less than 0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed by using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **Results**

### ***Basal expression levels of IFN- $\gamma$ in PBMCs and liver***

IFN- $\gamma$  transcripts were detected and quantified in PBMCs from all 45 HCV-infected patients, with values ranging from 2.4 to 5.6 log copies /  $10^6$  G3PDH copies. As shown in Figure 1, these values were significantly higher than that observed in healthy donors with on average a 36-fold change ( $p < 0.01$ ). These results at transcriptional level clearly indicate that IFN $\gamma$  is up-regulated in HCV-infected patients. Interestingly, IFN $\gamma$  gene expression in PBMCs was closely correlated to that found in liver ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.001$ ), suggesting a circulation of IFN $\gamma$ -producing cells from liver to periphery. In liver, IFN $\gamma$  gene expression was also strongly correlated to TNF $\alpha$  ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.001$ ) and to a lesser extent to CD3 $\epsilon$  ( $r = 0.32$ ,  $p < 0.02$ ), describing some sort of intra-hepatic immunostimulatory conditions in HCV-infected patients.

### ***Correlations between IFN- $\gamma$ gene expression and characteristics of patients***

Neither intra-hepatic nor peripheral IFN $\gamma$  gene expression was correlated to clinical, biochemical and histological factors including METAVIR activity and fibrosis. There was a trend towards a negative correlation between intra-hepatic IFN $\gamma$  gene expression and serum viral load but the result was not significant ( $r = 0.32$ , NS). By contrast, a significant relationship was found between liver and PBMCs IFN $\gamma$  and genotype. As indicated in Figure 2, expression levels were on average 12-fold higher in the 16 patients infected with genotype 2 or 3 comparing to the 23 patients infected with genotype 1 ( $p < 0.02$ ). These data indicate that an immunomodulatory genotype-dependant effect could be applied on host immune system.

### ***Relationship between IFN- $\gamma$ gene expression and the response to treatment***

In the next step, we explored a plausible relationship among the expressional levels of IFN- $\gamma$  and response to the treatment. We analyzed the expression level of IFN- $\gamma$  in patients who were classified as sustained virological responders (SVR) or non responders (NR) to treatment. We found that SVR group exhibited significant higher levels of IFN- $\gamma$  ( $p < 0.01$ )

than NR group (Fig. 5). After stratification on the genotype 3 versus genotype 1 parameter, we observed the same results but this comparison was not statistically significant due to the size of our cohort. Comparison between the expression levels of IFN- $\gamma$  in patients infected by genotype 1 and 3 showed a 10-fold increase in IFN- $\gamma$  mRNA ( $p < 0.05$ ) in genotype 3 infected patients than genotype 1. Considering the treatment outcome, regardless of genotypes, SVR was associated with higher pre-treatment gene expression levels of IFN- $\gamma$ .

### ***Relationship between genetic polymorphism of IFN- $\gamma$ and expression levels of IFN- $\gamma$***

In the normal population, the allelic repartition of IFN- $\gamma$  promoter is quite homogeneous: 25% homozygote AA, 55% heterozygote AT and 20% homozygote TT (Pravica, Asderakis et al. 1999). In order to know if the higher expressional levels of IFN- $\gamma$  in SVR patient were due to a particular polymorphism, we evaluated this repartition in 45 CHC patients. The repartition obtained in our cohort of patients was similar to those obtained in the normal population: 29% AA, 42% AT and 29% TT. As shown in Fig.6, the allelic variability of IFN- $\gamma$  did not correlate to its expressional levels in CHC patients. A similar picture was found in SVR and NR groups. In conclusion, we could say that IFN- $\gamma$  genotypes are not associated either with its gene expression or response to treatment.

### ***NKT cells population could be the main source of IFN- $\gamma$***

Finally, we aimed at identifying the cell population responsible for the IFN- $\gamma$  expression. As discussed before, NKT cells were the only ones in which we detected IFN- $\gamma$ . To strengthen this result, we separated CD56<sup>+</sup> cells from PBMCs by magnetic microbeads from 2 patients. Then, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were separated from the rest CD56<sup>-</sup> fraction as CD56<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> and CD56<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells fractions. The expressional levels of IFN- $\gamma$  were detected in the above three separated fractions by quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 2, a 10-fold increase in IFN- $\gamma$  transcripts was detected in CD56<sup>+</sup> cells fraction compared to CD56<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> and CD56<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells fractions.

To complete our analysis, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes were separated from PBMCs of another CHC patient. Then, CD56<sup>+</sup> cells were separated from the rest CD3<sup>-</sup> fraction as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells. Interestingly, we observed that the transcriptional levels of IFN- $\gamma$  were very high in CD3<sup>+</sup> cells fraction than CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells fraction where it was nearly undetectable. Taken

together, our results demonstrated that the main producers of IFN- $\gamma$  in CHC patients were mainly CD3<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> cells which were most probably the NKT lymphocytes.

### ***Intracellular detection of IFN- $\gamma$ in PBMCs***

Finally, we examined in five patients the presence of intra-cellular IFN- $\gamma$  among the main circulating mononuclear cells population (i.e. CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells) by using flow cytometry (Fig. 1A, B). In absence of stimulation, IFN- $\gamma$  was detected on average in 1% of cells in HCV-infected patients. Fine analysis of cell subpopulations showed that IFN- $\gamma$ , when detected, was mainly located in NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) but nearly never in NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) or in classical CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. In healthy controls, IFN $\gamma$  was detected in a fewer number of cells (on average 0.1%) and detection was again restricted to NKT cells. Despite these data must be taken with caution due they are close to the detection limit and not quantitative, they strengthen the fact that NKT cells are the main source of mobilisable IFN $\gamma$ .

## **Discussion**

In our study, as partially reported by others in the serum (Cacciarelli, Martinez et al. 1996; Amati, Caradonna et al. 2002), we found that the expressional levels of IFN- $\gamma$  are higher in the peripheral blood of CHC patients than healthy control. Moreover, our results showed no difference in the expressional levels of IFN- $\gamma$  between PBMCs and liver in the CHC patients. Interestingly, the expressional levels of IFN- $\gamma$  in the blood and liver are correlated positively to each other. These results indicate that IFN- $\gamma$  stimulates immune response against HCV which clear virus and may also cause liver damages (Leroy, Vigan et al. 2003). Furthermore, correlations between the expressional levels of this cytokine in PBMCs and liver support the hypothesis of recirculation of the intrahepatic lymphocytes between periphery and liver (Klugewitz, Adams et al. 2004).

We report that the pretreatment expression levels of IFN- $\gamma$  are significantly higher in PBMCs of the patients who achieve SVR after the treatment than those who were unable to achieve SVR or non-responders (NR) and could be a predictor of SVR in the patients with chronic HCV infection. As mentioned earlier, there are a lot of contradictory data about the predictors of treatment response. Among all of the candidates, no one really emerges as a predictor without any contradiction. IFN- $\gamma$  levels are linked with some of already described putative predictors. IFN- $\gamma$  can recruit HCV specific T cells and NK cells in the liver via IFN- $\gamma$  induced

chemokines and modulate the strength of immune response. Moreover, some chemokines have been described as predictors, for example, IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11) and Mig (CXCL3) expression seem to be correlated with treatment response. As they are all induced by IFN- $\gamma$ , apparently our data seem to be contradictory. Low pretreatment IP-10 levels are described as predictive of HCV outcome, like high levels of I-TAC and Mig (Zeremski, Markatou et al. 2007). As these three chemokines are all induced by IFN- $\gamma$  and bind the same receptor CXCR3, adding our data about IFN- $\gamma$  as a predictor is not an easy task. Our hypothesis to explain this fact is that higher levels of I-TAC and Mig, beneficial for treatment outcome, counterbalance the harmful impact of elevated IP10 levels. As HCV can induce IP10 expression by hepatocytes (Harvey, Post et al. 2003) and, through immune cells recruitment, participate to liver damages, Mig, as demonstrated in mouse model is not required to recruit virus specific T cells in the liver but it helps to contain inflammation (Kakimi, Lane et al. 2001). So it could be indirectly helpful by keeping the intrahepatic response out of anarchic reaction due to massive inflammation. So, Mig could be a good candidate to explain the pretreatment relationship between IFN- $\gamma$  levels and treatment outcome. Another option is that IFN- $\gamma$  levels only reflect the impact of BMI (body mass index), which is known to influence hepatitis C outcome. Recently, a possible explanation has been found; this is due to adiponectin. This factor is synthesized by adipocytes in 2 forms, low and high molecular weight (LMW/HMW). High BMI patients only synthesize LMW form, which can not induce IFN- $\gamma$  synthesis. The opposite happens in normal/low BMI patients, the others form, HMW, is predominantly synthesized, leading to IFN- $\gamma$  production by fixation on the receptor Adipo-1 on NK and T cells surface (Palmer, Hampartzoumian et al. 2008).

As reported previously, patients with HCV genotype 3 responds better to the IFN- $\alpha$ /ribavirin therapy while genotype 1 is a poor responder. Our data indicated that PBMCs levels of IFN- $\gamma$  in HCV genotype 3 infected patients were significantly higher than HCV genotype 1 infected patients, suggesting that the higher levels IFN- $\gamma$  in HCV genotype 3 infected patients might be responsible for better outcome of the treatment. We did not have the sufficient number of patient to verify the relationship among genotypes, IFN- $\gamma$  and SVR. These results agree with the fact that genotype 1 is the most difficult to treat. Results analysis requires us to take care about many parameters included in the general notion of genotype. Genotype-dependant sequence variations in viral proteins can drastically change its properties. For example, the inhibitory properties of NS5A on PKR depend of the genotype, genotype 1 ISDR sequence binds PKR more tightly (Gale, Korth et al. 1998), the genotype 1 viroporin p7 is far less

sensitive to inhibitory molecules such as amantadin than others p7 (Griffin, Stgelais et al. 2008) or E2 genotype 1 protein, which is able to inhibit PKR by binding it on its phosphorylation domain whereas genotype 3 E2 cannot (Taylor, Shi et al. 1999). As there is more IFN- $\gamma$  produced during genotype 3 CHC than genotype 1, it is hard to conclude that this is the only reason why genotype 3 infections are resolved much easier than 1. As nearly all HCV proteins interact with host cellular factors in a genotype-influenced way, this could be a part of the solution.

Polymorphism in the promoter regions of the genes of some cytokines and its association with SVR has already been published (Dai, Chuang et al. 2006). Our results showed that there is no difference in the polymorphic forms of IFN- $\gamma$  (at position 874 T/A) in CHC patients and all three types of polymorphism studied are similar to that found in healthy control supporting the findings by Dai et al (Dai, Chuang et al. 2005).

Normally, IFN- $\gamma$  is secreted by NK and NKT cells Th1, CTL, DC, (Schroder, Hertzog et al. 2004). Searching for the source of IFN- $\gamma$  in CHC patients, we demonstrated that the expressional levels of INF- $\gamma$  are much higher in CD3<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> cells as compared to CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells. These findings clearly demonstrate that the main INF- $\gamma$  producer cell population is CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells which are NKT cells in these patients.

NKT cells are a heterogenous group sharing T cells and NK cells properties (Schmidt, Murray et al. 1986). They are located at the interface between cellular and innate immunities. They can be activated by Fc fragments thanks to CD16, by lipids or glycolipids through NK receptor CD1d or by contact with antigen through TCR  $\alpha\beta$  pathway. While activated, they can produce rapidly a great variety of cytokines and chemokines like IFN- $\gamma$ , IL4, GM-CSF, IL2 or TNF- $\alpha$ . They are also cytotoxic thanks to their granzyme production. Their ability to react and kill very fast without prior clonal expansion and the great panel of cytokines secretion inducing Th1/Th2 responses make TNK cells very interesting in HCV clearance mechanisms (Doherty, Norris et al. 1999). Cocultured with hepatocytes infected by JFH-1 strain, NKT cells can stop HCV replication by soluble factors, mainly by IFN- $\gamma$  and the crosstalk between IFN- $\alpha$  and  $\beta$  (Ye, Wang et al. 2009). In the liver, they are very numerous as compared to blood, around 50% of liver-resident T cells versus 5% in blood (Doherty and O'Farrelly 2000). As they tend to be depleted during CHC (Kawarabayashi, Seki et al. 2000), there could be a link between this and the decrease of IFN- $\gamma$  observed during chronicity.

Impaired effector function of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells and DC in chronic hepatitis C virus infection has already been established. These impaired functions are mediated by the impairment in proliferation, activation or apoptosis in these cells (Wedemeyer, He et al. 2002; Miyatake, Kanto et al. 2007; Saito, Ait-Goughoulte et al. 2008). We and some other investigators confirm a significant reduction in NK cell frequency in chronic HCV patients (Golden-Mason, Madrigal-Estebas et al. 2008; Bonorino, Ramzan et al. 2009). Recently, it has been reported that increase dynamism of NK and NKT cells in the liver is associated with SVR (Yamagiwa, Matsuda et al. 2008), which could be the result of higher levels of IFN- $\gamma$ . Moreover, another recent report showed that the intact HCV particles do not modulate NK cell function (Yoon, Shiina et al. 2009) and perhaps the same with NKT cells.

Briefly, our findings demonstrate that pretreatment PBMCs levels of IFN- $\gamma$  could be an indicator of treatment outcome and may help in patient selection for better clinical outcome of treatment by the combination therapy of interferon alpha and ribavirin. Moreover, NKT cells could be a better prospect for future research and possible immunotherapy in the patients infected with hepatitis C virus.

## **Figure legends.**

**Fig. 1. INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in PBMCs of chronic HCV patients versus healthy control.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Fig. 2. Gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the PBMCs and liver of chronic HCV patients showing correlation between their expression levels in PBMCs and liver.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Fig. 3. INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  expressional levels different HCV genotypes in PBMCs of chronic HCV patients.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Fig. 4. INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  gene expression levels in PBMCs of sustained virological response (SVR) patients and with non-responder (NR) chronic HCV patients.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Fig. 5. Polymorphism in INF- $\gamma$  genes in PBMCs of chronic HCV patients.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Fig. 6. INF- $\gamma$  gene expression in different types of Immune cells in chronic HCV patients.** Results are expressed as  $\log 10^6 \times \text{CD3}$  of the gene expression of INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

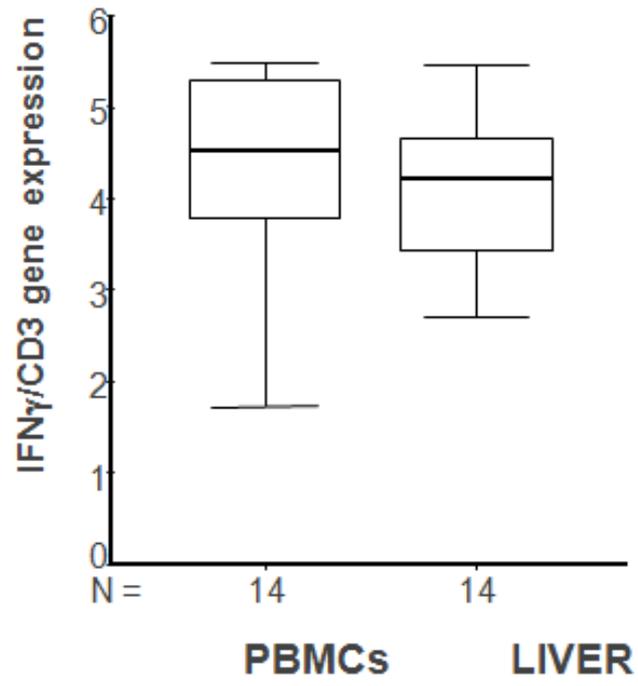
**Table 1 : Demographic and Clinical data**

	<b>HCV<sup>+</sup> Patients</b>
	(n=45)
<b>Age (y)</b>	44 ± 10,6
<b>Male (n,%)</b>	28 (62)
<b>Duration of infection (Years)</b>	18 ± 8
<b>Mode of transmission</b>	
IV Drug (n,%)	16 (35,6)
Transfusion (n,%)	11 (24,4)
Sporadic (n,%)	18 (40)
<b>Serum ALAT (ULN)</b>	2.5 ± 1.7
<b>Viral load (UI)</b>	630761± 868466
<b>Genotype (n,%)</b>	
1a	6 (13)
1b	17 (38)
2	5 (11)
3	9 (20)
4	5 (11)
<b>Knodell score</b>	8,6 ± 3,4
<b>Cirrhosis (n,%)</b>	6 (13%)
<b>Metavir Index</b>	
Activity	1,6 ± 0,7
Fibrosis	2,1 ± 1,1

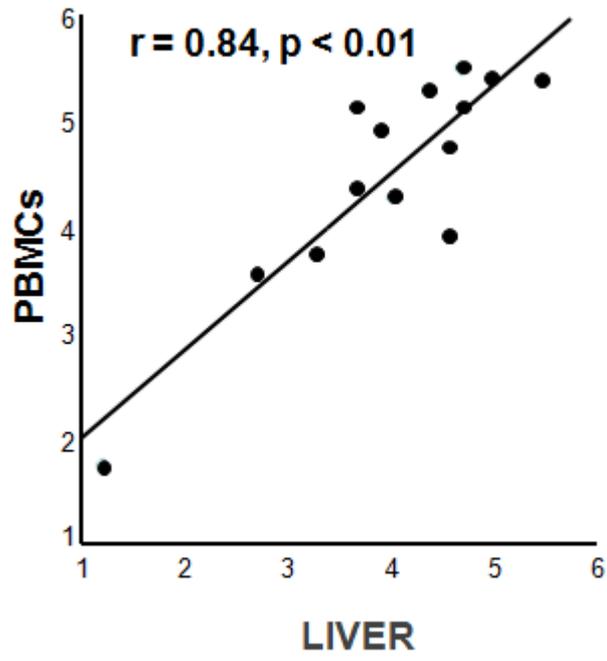
**Table 2 : Primer sequences used in real time quantitative RT-PCR assay.**

<b>Gene</b>	<b>Primers sequences</b>	<b>Product length (pb)</b>	<b>Annealing temperature (°C)</b>	<b>Elongation Time (sec)</b>
<b>CD3ε</b>	F : 5'-TGGGGGCAAGATGGTAATGAAGA-3' R : 5'-CCCCCAGTGATGCAGATGTCC-3'	371	59	10
<b>TNF-α</b>	F : 5'-AGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTT-3' R : 5'-ACGGCGATGCGGCTGATGGT-3'	409	69	12
<b>IFN-γ</b>	F : 5'-GCATCGTTTTGGGTTCCTTGGCTGTTAC-3' R : 5'-AGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAG-3'	427	65	8
<b>G3PDH</b>	F : 5'-AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC-3' R : 5'-CCGAGGGGCCATCCACAGTCT-3'	137	59	10

F = forward primer; R = reverse primer.



**Fig.1**



**Fig.2**

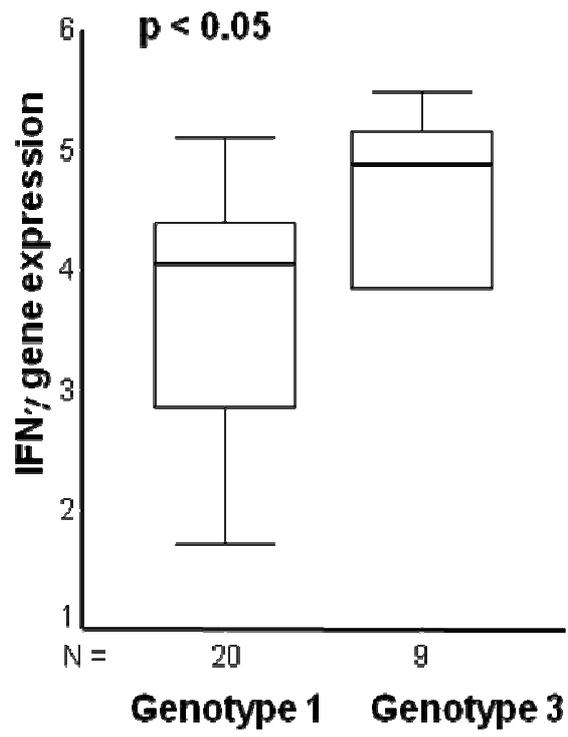
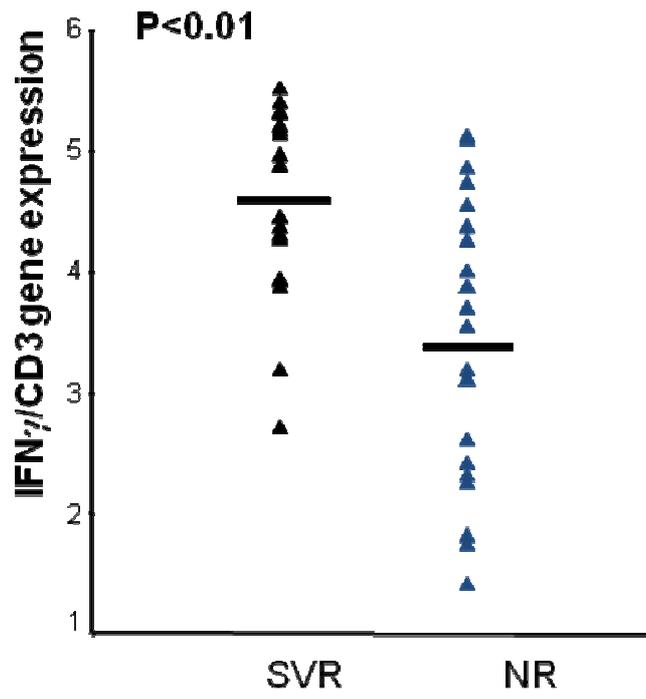
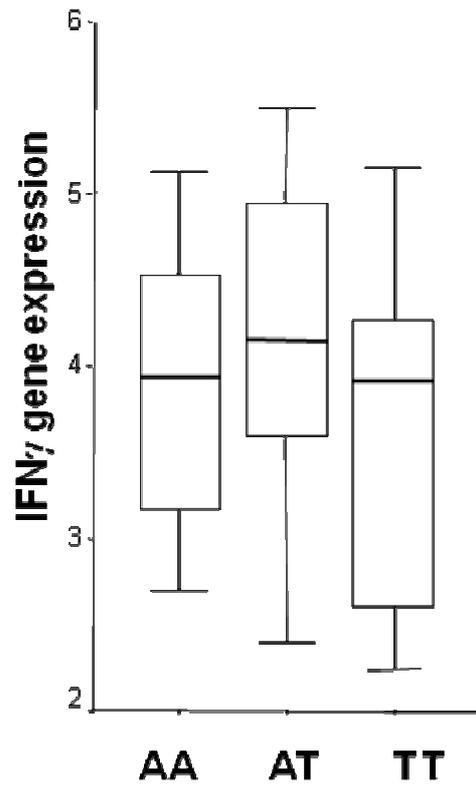


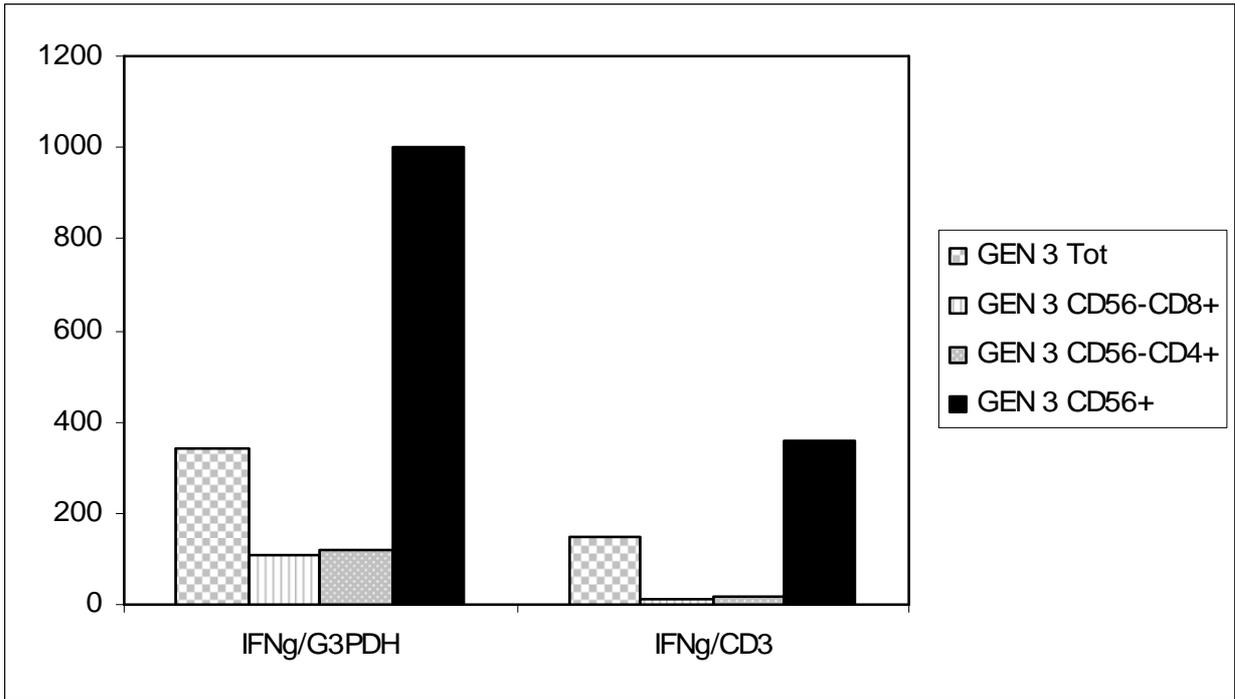
Fig.3



**Fig.4**



**Fig.5**



**Fig.6**

## References

- Abayli, B., A. Canataroglu, et al. (2003). "Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection." Turk J Gastroenterol **14**(1): 7-11.
- Amati, L., L. Caradonna, et al. (2002). "Modifications of the immune responsiveness in patients with hepatitis C virus infection following treatment with IFN-alpha/ribavirin." Curr Pharm Des **8**(11): 981-93.
- Badr, G., N. Bedard, et al. (2008). "Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells." J Virol **82**(20): 10017-31.
- Barnes, E., H. C. Gelderblom, et al. (2009). "Cellular Immune Responses during High-Dose Interferon-alpha Induction Therapy for Hepatitis C Virus Infection." J Infect Dis **199**(6): 819–828.
- Blackard, J. T., F. Komurian-Pradel, et al. (2006). "Intrahepatic cytokine expression is downregulated during HCV/HIV co-infection." J Med Virol **78**(2): 202-7.
- Bonorino, P., V. Leroy, et al. (2007). "Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C." Hepatology **46**(5): 1375-86.
- Bonorino, P., M. Ramzan, et al. (2009). "Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C." J Hepatol **51**(3): 458-67.
- Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, et al. (1996). "Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa." Hepatology **24**(1): 6-9.
- Chang, M. L., C. W. Hsu, et al. (2008). "Dense packing of portal lymphocytes predicts favorable treatment outcome in hepatitis C." Hepatogastroenterology **55**(86-87): 1716-20.

- Dai, C. Y., W. L. Chuang, et al. (2005). "Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon-alpha and ribavirin." Antiviral Res **67**(2): 93-7.
- Dai, C. Y., W. L. Chuang, et al. (2006). "Tumor necrosis factor- alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection." J Infect Dis **193**(1): 98-101.
- Diago, M., G. Castellano, et al. (2006). "Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C." Gut **55**(3): 374-9.
- Doherty, D. G., S. Norris, et al. (1999). "The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns." J Immunol **163**(4): 2314-21.
- Doherty, D. G. and C. O'Farrelly (2000). "Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver." Immunol Rev **174**: 5-20.
- Fujimoto, T., M. Tomimatsu, et al. (2008). "Changes in the Th1/Th2 ratio during a 24-week course of an interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C." J Gastroenterol Hepatol **23**(8 Pt 2): e432-7.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1998). "Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance." Clin Diagn Virol **10**(2-3): 157-62.
- Golden-Mason, L., L. Madrigal-Estebas, et al. (2008). "Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure." Gut.
- Griffin, S., C. Stgelais, et al. (2008). "Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel." Hepatology **48**(6): 1779-90.

- Itose, I., T. Kanto, et al. (2007). "Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients." J Med Virol **79**(5): 511-21.
- Kakimi, K., T. E. Lane, et al. (2001). "Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **194**(12): 1755-66.
- Kanto, T. and N. Hayashi (2006). "Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity." Intern Med **45**(4): 183-91.
- Kawarabayashi, N., S. Seki, et al. (2000). "Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma." Hepatology **32**(5): 962-9.
- Klugewitz, K., D. H. Adams, et al. (2004). "The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?" Trends Immunol **25**(11): 590-4.
- Leroy, V., I. Vigan, et al. (2003). "Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C." Hepatology **38**(4): 829-41.
- Lin, A. W., S. A. Gonzalez, et al. (2004). "CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **137**(2): 408-16.
- Miyatake, H., T. Kanto, et al. (2007). "Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection." J Viral Hepat **14**(6): 404-12.
- Palmer, C., T. Hampartzoumian, et al. (2008). "A novel role for adiponectin in regulating the immune responses in chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **48**(2): 374-84.
- Pernollet, M., E. Jouvin-Marche, et al. (2002). "Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions." Clin Exp Immunol **130**(3): 518-25.

- Pravica, V., A. Asderakis, et al. (1999). "In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene." Eur J Immunogenet **26**(1): 1-3.
- Pravica, V., I. J. Brogan, et al. (2000). "Rare polymorphisms in the promoter regions of the human interleukin-12 p35 and interleukin-12 p40 subunit genes." Eur J Immunogenet **27**(1): 35-6.
- Rosen, H. R., S. J. Weston, et al. (2007). "Selective decrease in hepatitis C virus-specific immunity among African Americans and outcome of antiviral therapy." Hepatology **46**(2): 350-8.
- Saito, K., M. Ait-Goughoulte, et al. (2008). "Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production." J Virol **82**(7): 3320-8.
- Schmidt, R. E., C. Murray, et al. (1986). "A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype." J Exp Med **164**(1): 351-6.
- Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." Adv Immunol **96**: 41-101.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-89.
- Shapiro, S., V. Gershtein, et al. (1998). "mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFN-alpha) treatment." Clin Exp Immunol **114**(1): 55-60.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, et al. (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, et al. (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." Science **285**(5424): 107-10.
- Tox, U., S. Schulte, et al. (2008). "Ribavirin priming in patients with chronic hepatitis C and normal ALT: a pilot study." Hepatogastroenterology **55**(86-87): 1666-70.

- Trapero, M., L. Garcia-Buey, et al. (2005). "Maintenance of T1 response as induced during PEG-IFNalpha plus ribavirin therapy controls viral replication in genotype-1 patients with chronic hepatitis C." Rev Esp Enferm Dig **97**(7): 481-90.
- Trepo, C. (2000). "Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C." J Viral Hepat **7**(4): 250-7.
- Wan, L., Y. J. Kung, et al. (2009). "Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 855-60.
- Wedemeyer, H., X. S. He, et al. (2002). "Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection." J Immunol **169**(6): 3447-58.
- Yamagiwa, S., Y. Matsuda, et al. (2008). "Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells." Hepatol Res **38**(7): 664-72.
- Ye, L., X. Wang, et al. (2009). "CD56+ T cells inhibit hepatitis C virus replication in human hepatocytes." Hepatology **49**(3): 753-62.
- Yoon, J. C., M. Shiina, et al. (2009). "Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions." Hepatology **49**(1): 12-21.
- Zeremski, M., M. Markatou, et al. (2007). "Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients." J Acquir Immune Defic Syndr **45**(3): 262-8.

### **Article 3: Hepatitis C treatment suppresses T cell response in vivo and enhances TNK cells IFN $\gamma$ secretion in vitro only during the first hours of culture**

L'impact du traitement de l'hépatite C sur le système immunitaire adaptatif est encore très largement méconnu. Si les effets antiviraux et immunomodulateurs de l'IFN $\alpha$  sont relativement bien connus, il en est tout autrement pour la ribavirine. Si cette dernière aurait potentiellement un effet inhibiteur sur les sécrétions de cytokines Th2 au profit du profil Th1, aucune étude récente n'a essayé de percer à jour ses mécanismes d'action. Quant à la combinaison des deux molécules, il est fort possible qu'elles aient ensemble des propriétés qu'elles n'ont pas seules. Il est également important de savoir sur quels types cellulaires agit le traitement afin de pouvoir mettre au point de futures thérapies plus efficaces.

Dans cette étude, nous avons suivi une cohorte de patients avant, pendant et 6 mois après leur thérapie par IFN $\alpha$  et ribavirine. Nous avons mesuré les impacts du traitement sur l'activation lymphocytaire spécifique du VHC par cytométrie de flux en mesurant l'expression de CD25 (IL-2R $\alpha$ ), l'expression des ISG par RT-PCR, l'expression d'IFN $\gamma$  spécifique de peptides du VHC par elispot et enfin la sécrétion de cytokine en réponse aux protéines virales Core et NS3 par CBA. Nous avons également mis au point un système *in vitro* de culture de cellules T en présence d'IFN $\alpha$  et de ribavirine permettant d'utiliser les techniques citées ci-dessus afin d'identifier les impacts spécifiques du traitement sur tous les populations cellulaires.

Nous avons pu montrer que le traitement avait un impact immunosuppresseur sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'ajout de ribavirine permet en effet d'inhiber la majorité des sécrétions de cytokines induites par l'IFN $\alpha$ , l'expression de CD25 induite par les antigènes viraux et l'expression de MxA, un gène antiviral induit par l'IFN $\alpha$ . De plus, le traitement n'améliore pas la sécrétion de cytokine en réponse à Core et NS3. Les analyses *in vitro* nous ont permis de montrer que les seules cellules répondant en terme de sécrétion de cytokines, en particulier l'IFN $\gamma$ , à la thérapie sont les cellules TNK, et ce, durant un temps très court puisqu'elles disparaissent très vite.

En conclusion, le contrôle du virus induit par le traitement passe par des mécanismes indépendants des cellules T conventionnelles. Les cellules TNK étant productrices d'IFN $\gamma$  en réponse au traitement, mais de manière transitoire, devraient devenir des cibles privilégiées des futures thérapies afin de les soutenir et de les maintenir en action le plus longtemps possible durant la maladie.

# **Hepatitis C treatment suppresses T cell response *in vivo* and enhances TNK cells IFN $\gamma$ secretion *in vitro* only during the first hours of culture**

Camous X.<sup>1,2</sup>, Dufeu-Duchesne T.<sup>1,2</sup>, Ramzan M.<sup>1,2</sup>, Pernollet M.<sup>1,2</sup>, Marche P. N.<sup>1,2</sup>, Leroy V.<sup>1,2</sup>

*1 INSERM, Unité 823, Grenoble, France.*

*2 Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut d'Oncologie et du Développement Albert Bonniot et Etablissement Français du sang, UMR-S823, Grenoble, France.*

**Keywords:** interferon alpha, ribavirine, response to treatment, hepatitis C outcome, TNK, lymphocytes, CD4, CD8

Hepatitis C has become these last years a worldwide major health problem. Hepatitis C virus (HCV) infects at least 3% of population and the infection is still expanding despite of preventions campaigns (Dienstag and McHutchison 2006). The common treatment, a bitherapy combining pegylated interferon alpha-2b (IFN $\alpha$ ) and ribavirin, only cures the half of the patients and has strong side effects like ischemia, depression or general fatigue syndrome. The lack of knowledge about its impact on immune cells populations greatly slows its improvements.

IFN $\alpha$  is a long time known very powerful antiviral cytokine (Isaacs and Lindenmann 1957; Isaacs, Lindenmann et al. 1957; Lindenmann, Burke et al. 1957). It is known to improve antigen presentation by improving HLA class I and II molecules expression (Heron, Hokland et al. 1978), inducing a dsRNA dependent kinase, PKR, which phosphorylates and inhibits eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) stopping the protein synthesis (Zilberstein, Kimchi et al. 1978; Su, Wang et al. 2007) or blocking viruses replication by activating a latent endoribonuclease, RNase L, through 2'-5'OAS and 2-5 A (Roberts, Hovanessian et al. 1976; Kerr and Brown 1978) and MxA, an antiviral GTPase which can trap vesicles containing viral material to prevent it to reach the nucleus (Kochs and Haller 1999). Interestingly, IFN $\alpha$  is also known to have an antiproliferative effect on T lymphocytes stimulated by IL-2 (Erickson, Sangfelt et al. 1999) so may reduce immune response. This fact is in opposition with the induction of a sustained antiviral response (SVR).

Contradictory data have been published about ribavirin and its roles are still unclear. It was thought to induce catastrophic errors on viral ARN polymerase leading to production of non-viable HCV particles (Hong 2003) but it has been reversed by another study (Chevaliez, Brillet et al. 2007). It could act like a GTP trap to delete a major material source for virus replication (Lau, Tam et al. 2002). It may also act in synergy with interferon alpha to boost its antiviral function (Martin, Navas et al. 1998) or switching T cells response from Th2 to TH1 profile (Tam, Pai et al. 1999).

The HCV develops several ways to switch off cellular autodefense, both innate and specific immunity and treatment effects. During acute hepatitis C, immunity's pressure on the virus promotes the emergence of escaping clones whose represent one of the first steps to chronicity (Tsai, Chen et al. 1998; Eckels, Zhou et al. 1999; Guglietta, Garbuglia et al. 2005). This fact is greatly supported by NS5b, the viral RNA polymerase, which make a lot of mistakes during replication due to the lack of a proofreading system (Bukh, Miller et al. 1995). It can potentially modify any of the targets used against the virus. It also possesses its

own weapons to counteract both immunity and treatment. The NS3/4a serine protease can inhibit IRF-3 (Binder, Kochs et al. 2007) and TLR-3 activation (Li, Foy et al. 2005), NS5a (Gale, Korth et al. 1997) and E2 (Taylor, Shi et al. 1999) can inhibit PKR activation, core inhibits STAT entry in the nucleus (Melen, Fagerlund et al. 2004) and interferes with the apoptosis induced by NF- $\kappa$ B through TNF- $\alpha$  by inhibiting Fas expression (Marusawa, Hijikata et al. 1999). Those are only examples of difficulties to find a cure bypassing all resistance mechanisms and probably plenty of them are still unknown.

Our knowledge about the impact of antiviral therapy upon the HCV is clearly greater than its effect upon immune cells subpopulations. The main goal of this study is to characterize the impact of interferon alpha and ribavirin on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes functions evolutions during chronic hepatitis C treatment. We also used an *in vitro* model of non-treated patients lymphocytes culture and stimulation with recombinant viral proteins, IFN $\alpha$  and RBV. We measured the evolution of CD25 and IFN $\gamma$  expression by flow cytometry, the cytokine secretion by cytometric beads array (CBA) and Elispot throughout the treatment and after 6 days for *in vitro* stimulation with recombinant HCV proteins, IFN $\alpha$  and ribavirin.

## **Material & methods**

### ***2-1. Patients and protocols***

→ Vincent

### ***2-2. PBL isolation***

Blood samples were collected in a heparinized vacutainer tubes. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were isolated by density centrifugation over Ficoll gradient washed in PBS 1X and resuspended in complete medium with 10% FCS (RPMI 1640 W/ Heps W/ Glutamax (Gibco) 1mM sodium pyruvate (Sigma), 100 UI/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin (Roche), 2-mercaptoethanol 50mM (Gibco), non-essentials amino acids (1X, Biowhiteker)) complemented with 10% FCS for further experiments.

### ***2-3. Lymphocytes culture and stimulation***

PBL were cultured in 96 round-bottom wells plate at a concentration of 10<sup>5</sup> cells per well in complete medium-10% FCS. Depending of the culture conditions wished, 100 UI/ml of

recombinant Interferon- $\alpha$  1b (Introna©, Shering-Plough, Kenilworth, USA), 1  $\mu$ g/ml of each recombinant Hepatitis C Virus (HCV) proteins (Core and NS3) (Mikrogen, Munich, Germany) or 125 ng/mL of tetanic anatoxin (EFSRA, La Tronche, France) were added in wells during 6 days. At the end of the culture, supernatants were gathered and frozen for cytometric beads array and cells were proceeded for immunostaining.

#### ***2-4. Immunostaining and flow cytometric analysis***

At days 0 and 6, cells were stained as previously described (Pernollet, Jouvin-Marche et al. 2002). Antibodies used were Human anti-CD3, Human anti-CD4, Human anti-CD8, Human anti-CD127 (all from Beckman-Coulter, Villepinte, France) and Human anti-CD25 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After washing, cells were resuspended in the residual volume of PBS 1X and incubated with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD25 or anti-CD127 for 30 minutes at 4°C in the dark. Staining was blocked by addition of cold PBS 1X 3% CSF then cells were washed and resuspended in the adequate volume of PBS 1X for flow cytometric analysis.

All the samples were analyzed with a FACScan cytometer (Becton-Dickinson) using CellQuest Pro Software for acquisition. Analysis was performed with FCS Express V3 (DeNovo Software). The percentage of specific CD25 positive cells is expressed as [%CD25 at day 6 with viral proteins or tetanic anatoxin - %CD25 positive cells alone at day 6].

#### ***2-5. Elispot assay***

Cytokine-specific monoclonal antibodies anti-IFN $\gamma$  were immobilized on a 96-well microtiter plate with a polyvinyl-difluoride (PVDF) membrane. The cells to be investigated were added to the wells in presence or absence of stimuli (PMA/Ionomycine, PHA, HCV peptides pool (1 $\mu$ g/ml of each)) and incubated for 18 hours to allow cytokine production. Secreted cytokines were captured and stained with anti-IFN $\gamma$  antibodies. The spots were revealed then counted with a BIOREADER by BIO-SYS GmbH and the frequency of positive cells registered.

#### ***2-6. Cytometric Beads Array (CBA)***

Supernatants were tested simultaneously for cytokines interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)-gamma, and tumor necrosis factor (TNF)-alpha using the Cytometric Bead

Array (CBA) human Th1/Th2 kit (BD Pharmingen, CA, USA) as described in the literature (Chen, Lowe et al. 1999).

Each sample was measured in duplicate by FACScan cytometer, according to kit's directions. Data were analyzed using CBA software (BD Pharmingen, San Diego, CA). The concentration of each cytokine in supernatants was determined by interpolation from the corresponding standard curve. When values were below the detection threshold, the minimum detectable level was assigned.

## **2-7. Statistical analysis**

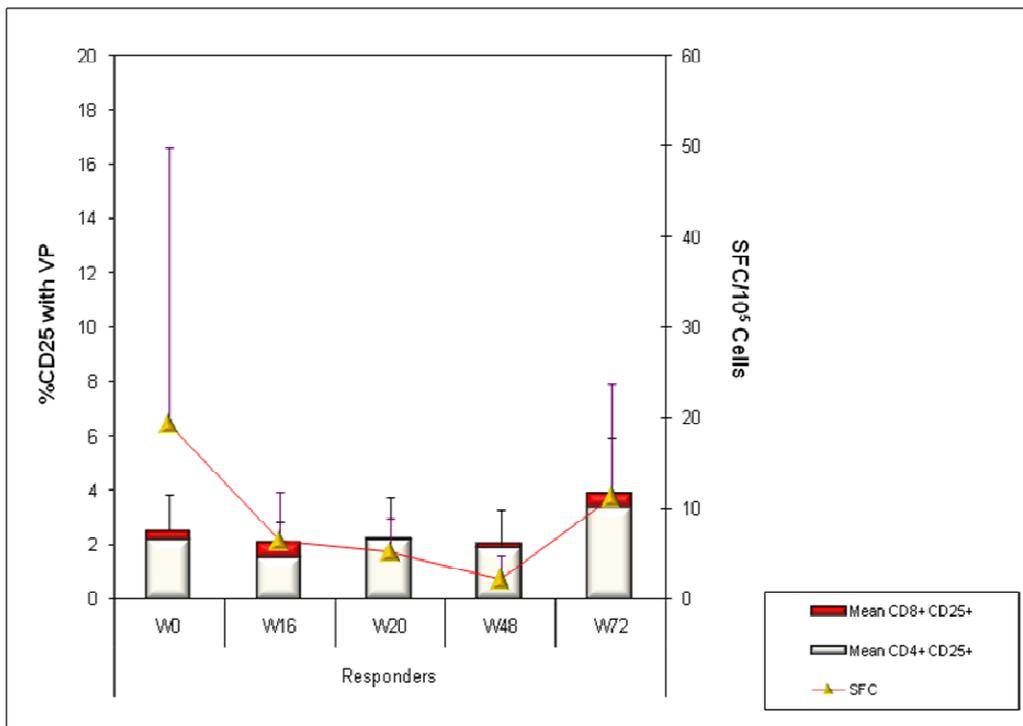
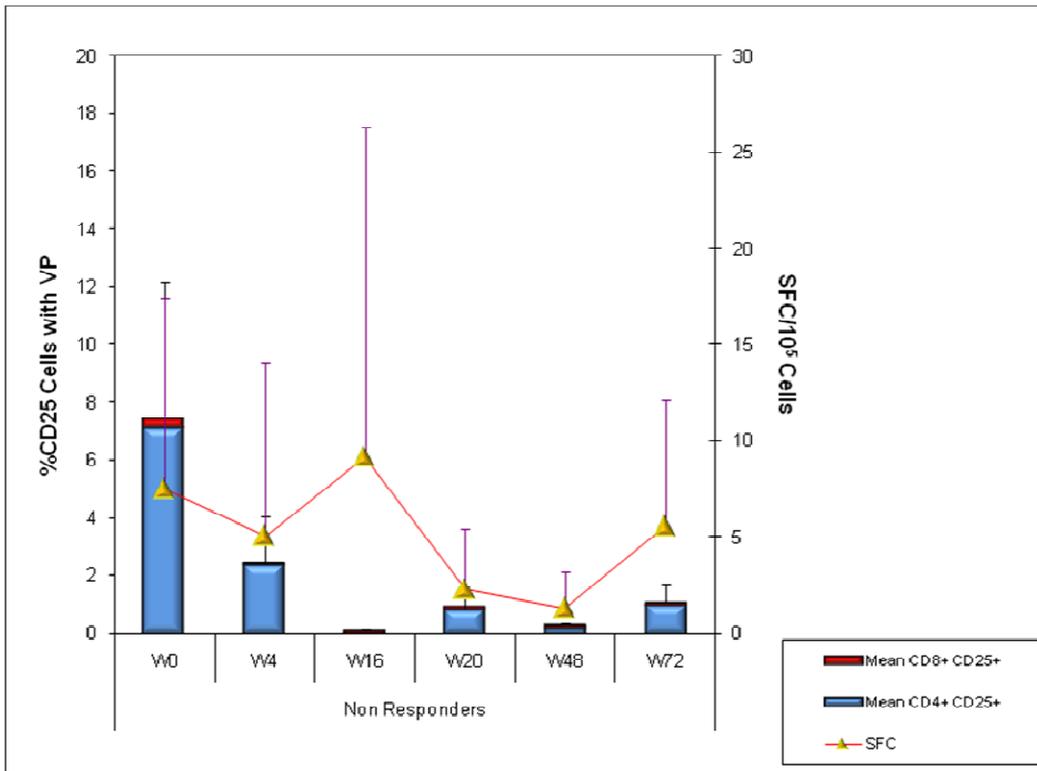
*Vincent*

### **Results:**

#### ***HCV specific T cells response before treatment.***

PBL taken from patients just before the beginning of their treatment were cultured during 6 days in presence of recombinant viral proteins Core and NS3. We measured the membranous expression of CD25 with flow cytometry and IFN $\gamma$  secretion with Elispot assay to define an activation baseline in responders (R) and non-responders patients (NR). CD3<sup>+</sup> cells were electronically isolated from total PBL using flow cytometry gating.

Mean CD25 expressions and SFC numbers in R and NR patients are depicted in fig.1A and 1B respectively. We measured a mean CD25 expression of 7.30% (0-34.37%) in NR patients and 10.90% (0.02-34.64%) in the whole CD3<sup>+</sup> population. We also noticed that the majority of CD25<sup>+</sup> cells are CD4<sup>+</sup> (data not shown). We didn't find any statistical difference between R and NR patients ( $p=0.361$ ) for CD25 expression before the treatment. The mean number of spot-forming cells (SFC) in NR patients is 7.42 for  $2.10^5$  cells (0-26) and 19.20 for  $2.10^5$  cells (0-74). Statistically, there is no difference between the 2 groups ( $p=0.518$ ). We also calculated Spearman's rho between Week 0 (W0) CD25 expression and the number of SFC. No significant correlation was found in NR patients ( $r=-0.279$   $p=0.577$ ) but a very strong one in R patients ( $r=1$   $p=0.01$ ). We also test the correlation between number of CD25<sup>+</sup> cells and SFC at W0 and the response. No correlation was found ( $r=0.204$   $p=0.547$  and  $r=0.289$   $p=0.389$  respectively). Taken together, these results indicate that there is no difference between R and NR lymphocytes before the beginning of the treatment.



***Immune system evolution during therapy.***

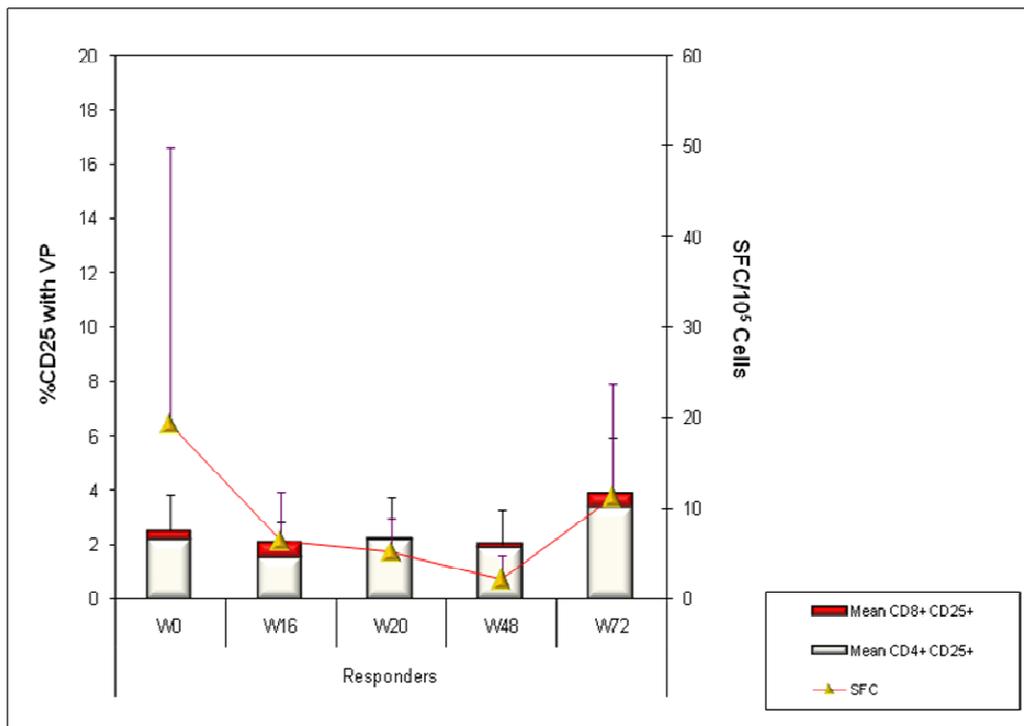
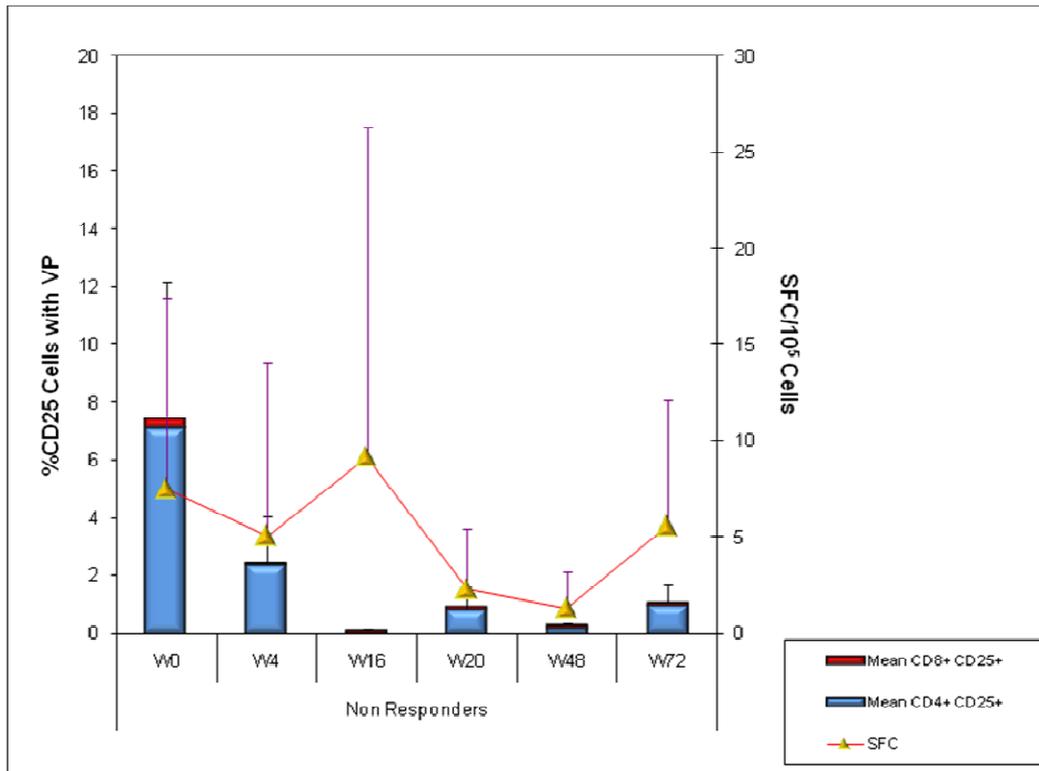
Following the same procedure as before, we monitored the immune response under the treatment, ie at weeks 16, 20 and 48 and as a mean value of these 3 time points. First, we compared the CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> number at each time point in the two groups (fig. 2A and 2B for NR and R group respectively). At W16, we obtained a mean CD25 expression among CD3<sup>+</sup> cells of 0.10% (0-0.57%) for NR patients and 1.79% (0-3.63%) for R. At W20, this

expression increases in NR group to 0.83% (0-3.73%  $p < 0.05$ ) and stays at the same level in R group (2.25%, 0.24-3.56%  $p > 0.05$ ). At W48,

In both groups, the CD25 expression doesn't change (0.28%, 0-0.70%  $p > 0.05$  for NR group, 2.01%, 0.84-3.65%  $p > 0.05$  for R group). The CD25 expression only increases between W16 and W20 only for non-responders patients and stay always the same in responders patients. If we compare the 2 groups for each point, the only statistical difference we obtained is at W48 where CD25 expression is greater in responders patients ( $p = 0.009$ ).

The difference between the 2 groups expressed as the mean value of CD25 expression during all of the treatment (fig.2B), N (4.06%) and NR (5.39%) are statistically different ( $p = 0.001$ ). This fact can be due to the very strong difference calculated at W48 and the nearly significant difference at W16 ( $p = 0.069$ ).

Concerning the interferon- $\gamma$  secretion, in R group, at W16 we obtained a mean of 6 spots (0-10 spots) for  $2.10^5$  lymphocytes, then 5 spots at W20 (1-9 spots) and a final decrease ( $p < 0.05$ ) to 2 spots (0-5 spots), maybe due to the absence of viruses. For the NR group, we observed 9.1 spots at W16 (0-44 spots), 2 (0-6spots) at W20 and 1 (0-6spots) at W48. The lack of significant decrease between W16 and W20 in NR group may be due to the great standard deviation at W16. If we compare the 2 groups at each time point, we don't see any statistical difference at any point ( $p > 0.05$  for each). If we look at the mean number of spots during the treatment (fig.2D), we calculated a mean of 4.2 spots for NR group and 4.5 for R group without significant difference ( $p = 0.143$ ). There is no difference in term of number of spot between the 2 groups but we can see a global decrease along the treatment. We searched for correlations between the number of spots and the expression of CD25 at each time point and all along the treatment for the two groups. We didn't find any one ( $p > 0.05$  for all), the 2 functions seem to be independents. Finally we searched for a correlation between the CD25 expression and the number of spots all along the treatment and the response, no correlation was found between the number of spots and the response ( $p = 0.157$ ) but a very strong positive one between the expression of CD25 and the response ( $r = 0.601$   $p < 0.001$ ). These data indicates that activated and regulatory lymphocytes during treatment may be very important but not through interferon- $\gamma$  secretion.



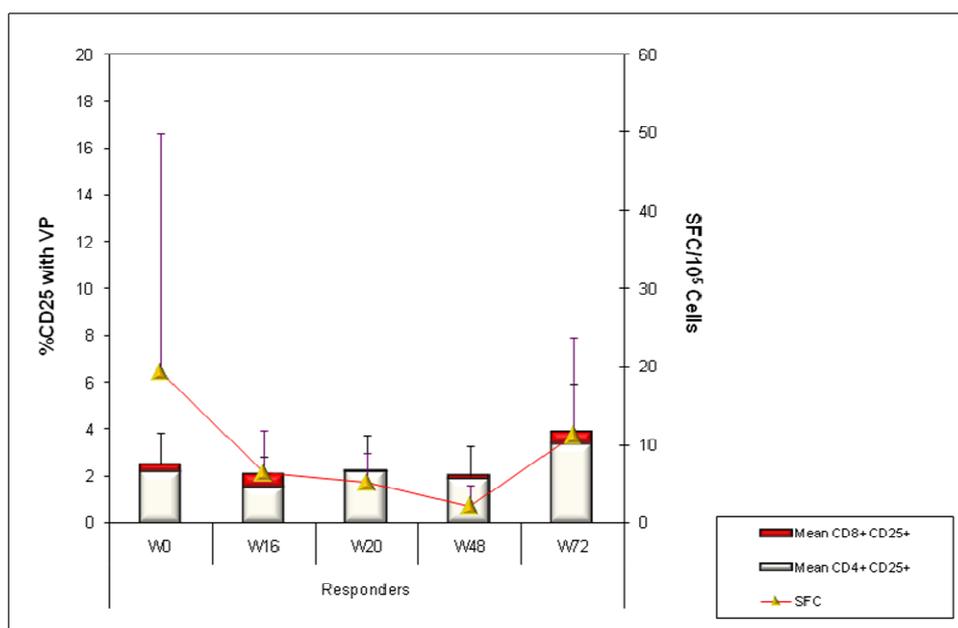
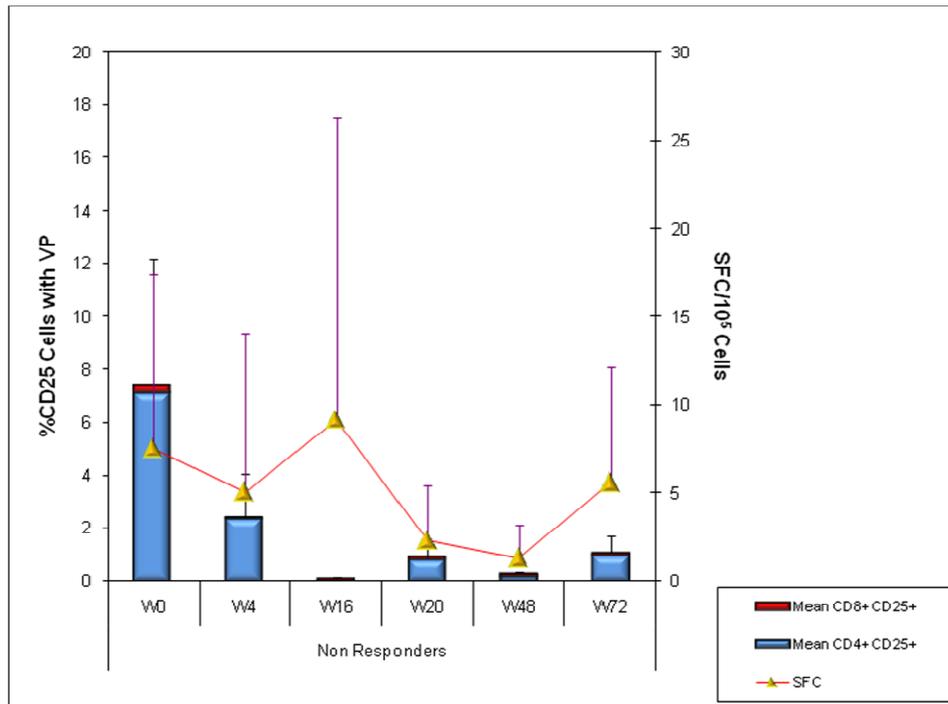
***Immune system activity 6 months after therapy.***

Finally we studied the immune response 6 months after the end of the treatment, at week 72 for NR and R groups (fig.3A and 3B respectively). We first studied CD25 expression among CD3<sup>+</sup> cells. We obtained a mean of 1.05% (0-3.76%) of CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in NR population and 3.89% (0.23-13.55%) in R population. We compared the two values and they didn't

appeared to be statistically different ( $p=0.175$ ) due to the great standard deviation we measured.

About the interferon- $\gamma$  secretion, we obtained a mean of 6 SFC ( $0-13$  SFC) in NR group and 11 SFC ( $0-24$  SFC) for R population. We didn't find any correlation between the percentage of  $CD25^+$  cells and the interferon- $\gamma$  secretion or with the response ( $p>0.05$ ).

If we look these results globally, it seems to have an increase of the immune potentiality in R patients but our cohort seems too little to smooth the standard deviation and confirm it.



### ***Non responders and responders patients immune system evolution during treatment.***

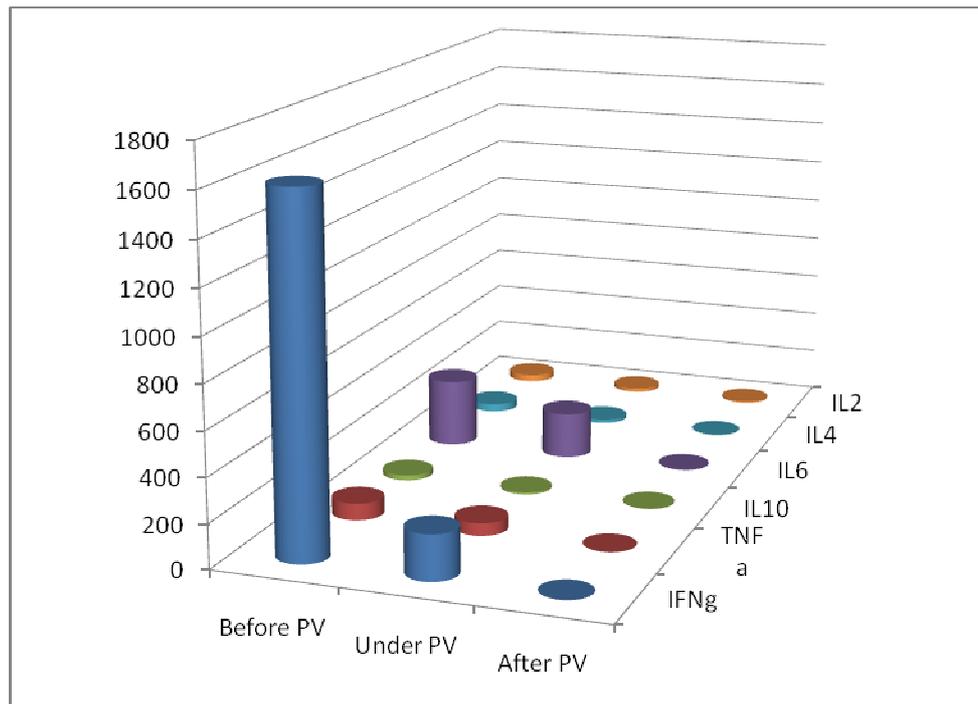
We pooled separately non responders and responders patients to compare their own evolution in the expression of CD25 in CD3<sup>+</sup> cells and secretion of interferon- $\gamma$ . First, we compared the two groups' CD25 expression along therapy. In responders group, no significant decrease was found in CD25 expression during the treatment, due to the great variations observed at W0 and W72. In non responders group, 2 significant decrease have been calculated, between W0 and W16 and W0 and W48 ( $p < 0.05$ ). After the treatment, a slight increase appears (W0 = W72,  $p > 0.05$ ). If we compared the two curves, only one time point is statistically different between the 2 groups, W48 ( $p < 0.05$ ). The others values are considered similar. The profiles obtained are the same in both groups, it's a value x before the treatment, a strong decrease of x during W16 to W48 and a slow increase to x pre treatment value.

Then, we interested ourselves the same way with the numbers of SFC. In both groups we didn't found statistically difference at each time point but a decrease between the SFC numbers at W20 and W48 for responders patients ( $p < 0.05$ ). No difference as measured between the 2 groups, so their profile is considered identical. The tendency is the same as CD25 expression, a decrease during treatment compared to pre treatment value then a slow increase. The lack of statistic evidence is due to the low number of patients in both groups and so, we assume that there is a decrease of T cells immune functions during treatment.

### ***Cytokines secretion during therapy in non responders patients.***

We studied the leukocytes secretion of 6 cytokines, IL2, IL4, IL6, IL10, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  after 6 days of culture in presence of recombinant viral proteins Core and NS3. Cells cultures were performed for each time point for each patient (fig.6). Before therapy, we obtained a mean secretion of 1337.12pg/ml (17.9–7426pg/ml) for IFN $\gamma$ , 64.77pg/ml (5.5-280pg/ml) for TNF $\alpha$ , 21.10pg/ml (8.3-88pg/ml) for IL10, 261.17pg/ml (5.7-1341pg/ml) for IL6, 31.75pg/ml (7.6-135pg/ml) for IL4 and 28.52pg/ml (7.2-109pg/ml) for IL2. Under therapy, ie at time point W4, W16, W20 and W48, the average secretion reaches 161.75pg/ml (0-1503pg/ml) for IFN $\gamma$ , 63.59pg/ml (0-592.88pg/ml) for TNF $\alpha$ , 8.06pg/ml (0-11.8pg/ml) for IL10, 228.07pg/ml (0-2100.12pg/ml) for IL6, 16.04pg/ml (0-135pg/ml) for IL4 and 17.62pg/ml (0-146pg/ml) for IL2. After the end of treatment, we obtained 14.46pg/ml (0-28.92pg/ml) for IFN $\gamma$ , 0pg/ml for TNF $\alpha$ , 212.29pg/ml (2.09-422.49pg/ml) for IL10, 2.05pg/ml (0-4.1pg/ml) for IL6, 262.41pg/ml (0-525.21pg/ml) for IL4 and 94.17pg/ml (7.44-180.9pg/ml) for IL2. We compared the three values for a given cytokines to analyse the evolution of this secretion. We

were not able to see a significant difference between before, under and after values for all the cytokines. We also tried to calculate differences using each time point for each cytokine (data not shown). Here too, no significant value appeared. Visually, there is a decrease of secretion during treatment but the low numbers of patients and the great deviations observed don't allow us to confirm our impressions. Taken together, these data allows us to think that the therapy doesn't modulate these cytokines.

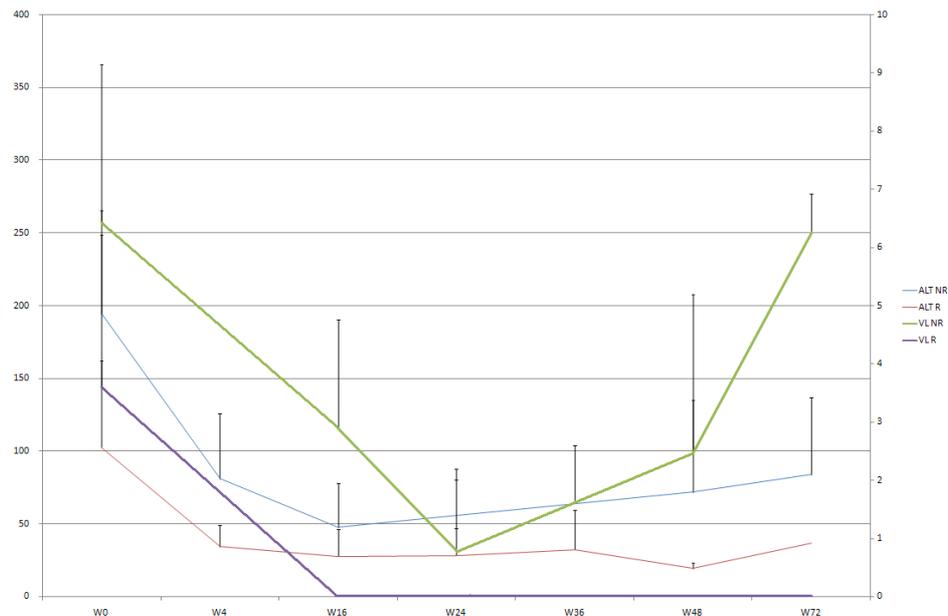


***Evolution of clinical parameters before, during and after therapy.***

We measured the ALT level and the viral load of each patient at the time points when the blood was taken. In R group, we measured a mean of 103 IU/ml (35-191IU/ml) before the treatment. At W4, we observed a rapid decrease to 35 IU/ml (18-53 IU/ml) at W4 which remains stable until W48 20UI/ml (14-23UI/ml). As we only have 1 ATL level at W72, 37UI/ml, we cannot conclude to continuity in stability, but this patient was the one with highest ALT levels during therapy. In NR group, basal ALT levels were higher (195UI/ml (95-485UI/ml) than those from R group. At the beginning of treatment, we observed a biphasic decrease of ALT levels. A rapid one from W0 to W4, 81UI/ml (29-135UI/ml), and a slow one from W4 to W16, 48UI/ml (21-87UI/ml). From W16 to W72, ALT levels slowly but continuously increased to reach 84UI/ml (38-141UI/ml) at W72.

Viral loads in responders group drops quickly from W0 (3.6(0.8-5.5)) to W16 (0) and remained undetectable during all of the treatment. In non-responders group, basal viral loads

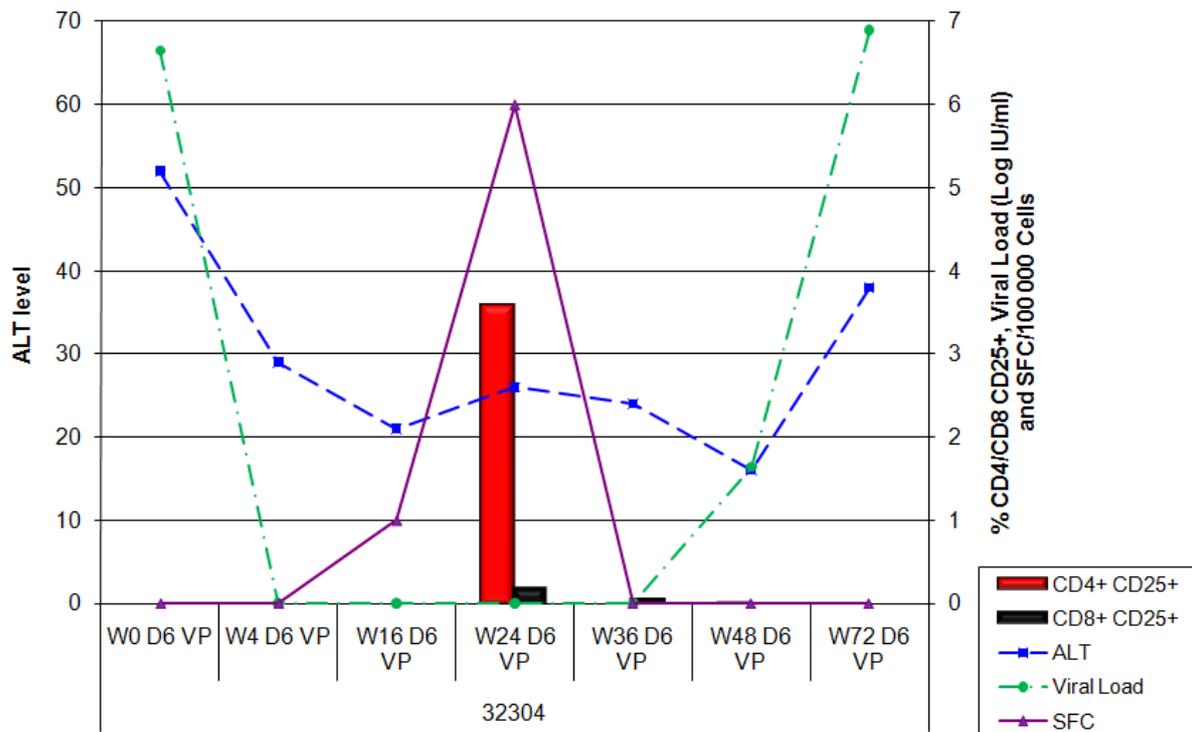
were higher (6.4(6.1-6.8)) and decreased the same way than those in R group until W24 (0.8(0-2.8)). At this point, we observed a biphasic increase of the viral load. A median one during the end of treatment (2.5(0-5.9) at W48) and a very rapid as soon as the treatment finished (6.3(5.5-7) at W72). In R group, the virus is controlled since the beginning of therapy, but in NR group, it is only contained and a viral load burst is observed as soon as you remove this constraint.



### ***INF $\gamma$ impact on immunity and clinical parameters when added to the therapy at week 16.***

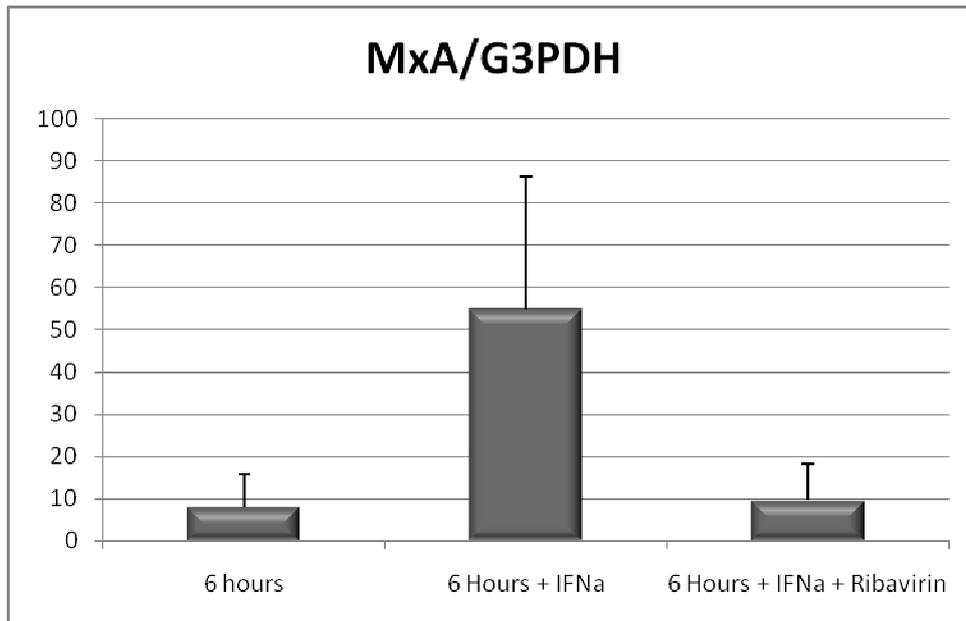
Due to the fact that IFN $\gamma$  injections were not well tolerated by patients, we only have data of IFN $\gamma$  addition to therapy for the first injected patient. From W0 to W4, under standard therapy, no CD25 expression was measured in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells populations neither IFN $\gamma$  secretion was detected in these cells. ALT levels decreased from 52IU/ml to 29IU/ml and viral load dropped from 6.7 Log IU/ml to become undetectable. IFN $\gamma$  injections started at week 16. Here, CD25 expression remained null but we observed a small increase of IFN $\gamma$  secretion with 1 SFC. ALT levels decreased to 21IU/ml and viral load was still undetectable. At W24, we observed an increased CD25 expression to 3.57% in CD4<sup>+</sup> and 0.16% in CD8<sup>+</sup> T cells. We detected 6 SFC/100.000 cells, ALT level slightly increased to 26 IU/ml and viral load didn't differ. At W36, we didn't detect any CD25 expression in CD4<sup>+</sup> T cells and only 0.04% of CD8<sup>+</sup> T cells were CD25<sup>+</sup>. We didn't detect any IFN $\gamma$  secretion and ALT levels remained unchanged, at 24IU/ml and viral load was still null. At W48, we detected neither CD25 expression nor SFC in T cells populations. ALT levels decreased to 16

UI/ml and viral load began to rise to 1.6 LogIU/ml. Six months after the end of the therapy, at W72, viral load returned to its pretherapeutic levels at 6.9 LogIU/ml, ALT increased to 38IU/ml and still no CD25 expression nor IFN $\gamma$  secretion in T cells. To conclude, IFN $\gamma$  injections seemed to promote liver damages and T cells CD25 expression in response to viral antigens. Its effect was long to come and disappeared very fast.

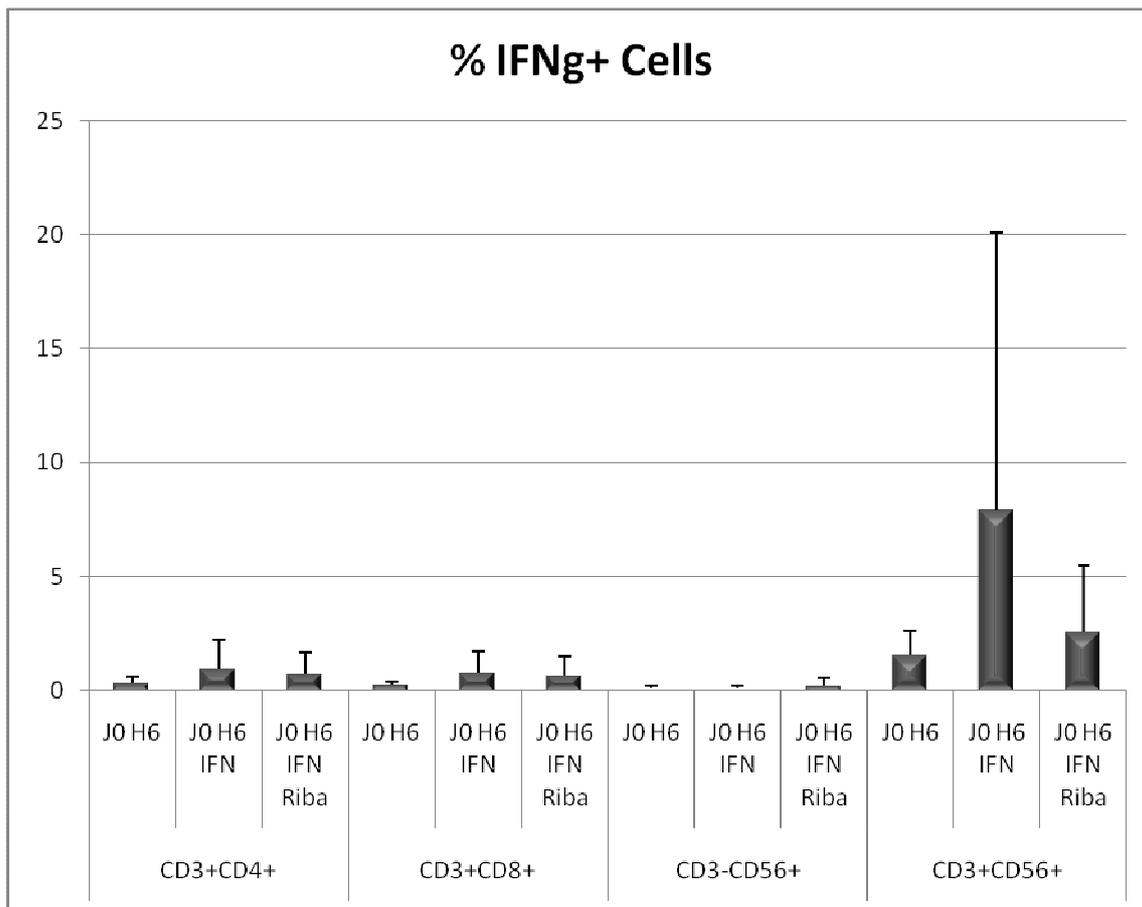


### ***IFN $\alpha$ and ribavirin general impact on immune cells in short-term culture***

We first cultured cells from chronic hepatitis C patients with or without IFN $\alpha$  and ribavirin for 6 hours. Then, we separated cells for flow cytometry and for PCR analysis. PCR analyses were performed on 2 ISG, OAS2 and MxA. We calculated the gene expression variations by the ratio of ISG mRNA copies/G3PDH mRNA copies. After 6 hours, no OAS2 mRNA were detected (data not shown) whereas we obtained data about MxA expression. Without any stimulation, the ratio between MxA and G3PDH expression was 8.1 (0.2-15.9). After IFN $\alpha$  stimulation, they reached 55 (26- 88.3). This result validates our culture and stimulation system. Interestingly, when we added ribavirin to IFN $\alpha$  for 6 hours stimulation, the ratio dramatically fell to 9.7 (0-15.5) and went back to the basal values. This particularly interesting result shows that ribavirin may interfere with IFN $\alpha$  pathway leading to an inhibition of MxA expression.



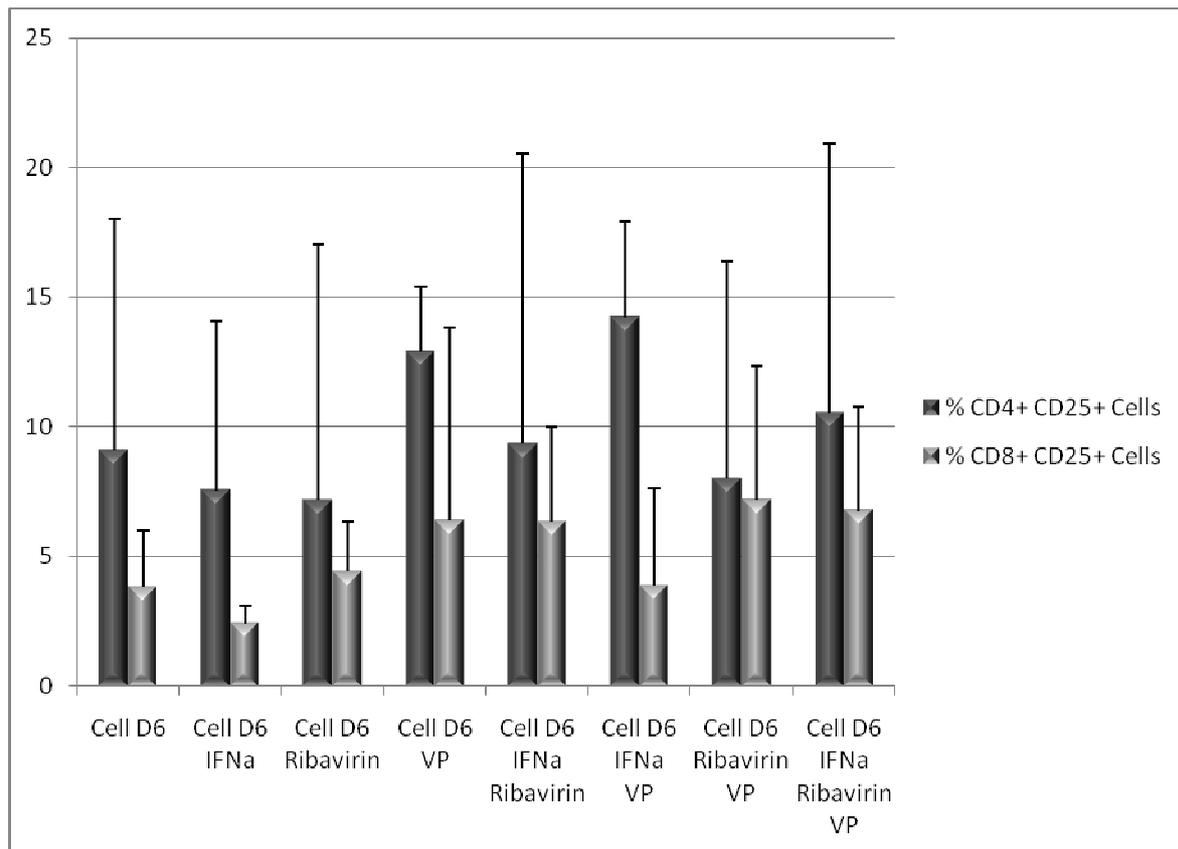
We also measured intracellular levels of perforin and IFN $\gamma$ , depending on the stimulation received, by flow cytometry. We electronically separated T4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), T8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) and NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) cells populations from total blood by adequate gating. After 6 hours of culture without stimulation, we reached 0.31% (0.1-0.65%) of IFN $\gamma$ -positive T4 cells, 0.26% (0.1-0.34%) of T8 cells, 0.09% (0-0.16%) of NK cells and 1.6% (0.63-2.68%) of NKT cells. Following 6 hours of IFN $\alpha$  stimulation, 0.96% (0.15-2.42%) of T4 cells were IFN $\gamma$ -positive, 0.77% (0.14-1.83%) of T8 cells, 0.09% (0-0.24%) of NK cells and 7.9% (0.48-22%) of NKT cells. Finally, after 6 hours of IFN $\alpha$  and ribavirin stimulation, we obtained 0.7% (0.07-1.8%) of T4 IFN $\gamma$ -positive cells, 0.65% (0.04-1.61%) of T8 cells, 0.21% (0-0.57%) of NK cells and 2.6% (0.59-5.94%) of NKT cells. We measured perforin levels in these cells under the 3 same conditions and there was absolutely no difference (data not shown). These results are very interesting because, as argued before with PCR, the addition of ribavirin seems to revert the IFN $\alpha$  impact on immune cells. The cross-talking between the 2 types of IFN may be jammed by ribavirin. The main source of IFN $\gamma$ , at least during the 6 first hours, seems to be NKT cells, and they are the only ones reacting positively to IFN $\alpha$  stimulation.



### ***IFN $\alpha$ and ribavirin impact on HCV specific responses during 6 days culture***

To reflect the activation state of T cells, we measured CD25 expression by flow cytometry after 6 days of stimulation with recombinant HCV Core and NS3 proteins (Viral Proteins VP) without or without IFN $\alpha$  and ribavirin. The basal expression of CD25 among T4 populations was 9.1% (0.1-17.88%) and 3.82% (1.56-5.86%) in T8 cells. When we stimulated cells with IFN $\alpha$  alone, we slightly decreased CD25 expression on T4 (7.5% (0-11.8%)) and T8 cells (2.4% (1.65-2.86%)). With ribavirin alone, CD25 expression on both cells type was decreased on T4 (7.2% (0-18.39%)) cells and slightly increased in T8 population (4.4% (2.28-6.14%)). With recombinant viral proteins alone, we increased CD25 expression on both T4 (12.9% (11.3-15.8%)) and T8 cells (6.4% (1.1-14.9%)). Combination of IFN $\alpha$  and ribavirin didn't showed any synergistic effect on CD25 expression in T4 (9.3% (3.3-21.9%)) and T8 cells (6.3% (2.1-9%)) as we were back to basal values. Using IFN $\alpha$  with an antigenic stimulation such as viral proteins, we increased activation of T4 (14.2% (12.6-18.4%)) cells without modifying that of T8 cells (3.8% (1.3-8.2%)). The opposite effect was observed when we added only ribavirin to viral proteins. CD25 expression on T4 cells remained unchanged (8% (1.8-17.5%)) whereas that of T8 cells increased (7.2% (1.4-11.5%)). We expected an increased

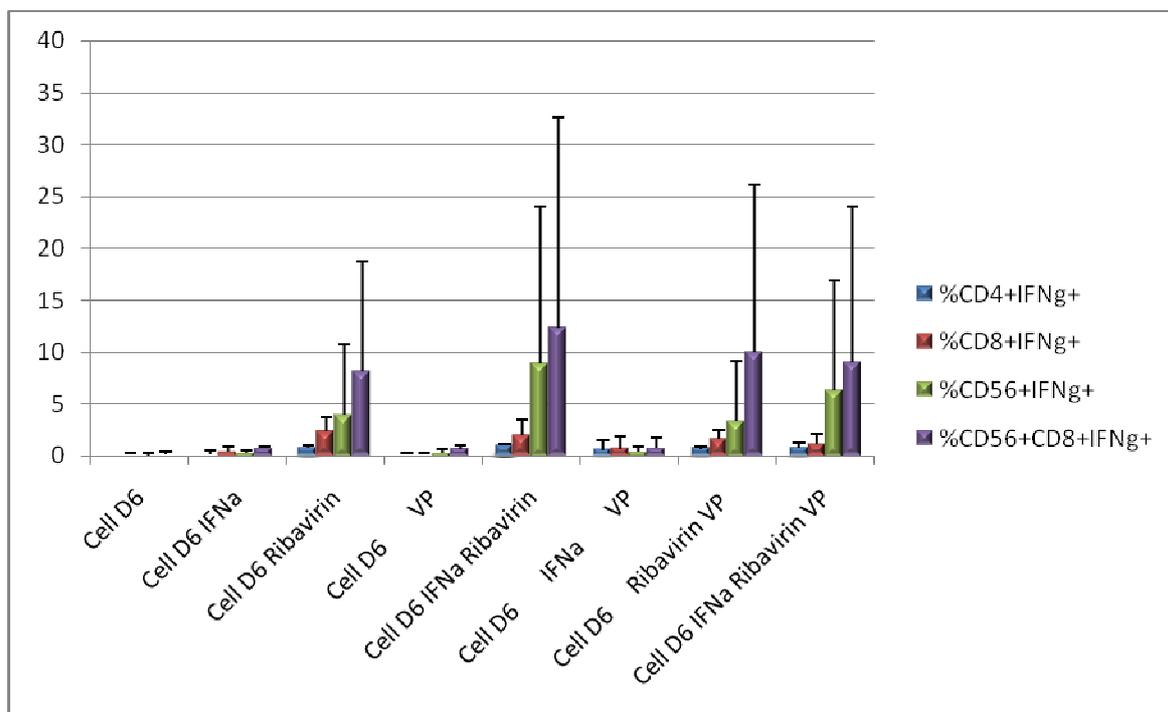
in CD25 expression in both cell type using combination of IFN $\alpha$  and ribavirin with viral proteins. CD25 expression in T4 cells reached an intermediate value between those obtained with each molecule alone (10.5% (2.2-22.2%)) and no increase in T8 cell CD25 expression (6.7% (2.2-9.6%)) compared to viral proteins alone was observed. We can see a slight negative impact on T4 cell CD25 expression and no change in T8 cells. The therapy didn't improve HCV specific immune response, no synergic effect was observed neither an improvement of the stimulation induced by viral proteins.



### ***IFN $\alpha$ and ribavirin impact on IFN $\gamma$ expression during 6 days culture***

Under the same conditions than for measuring CD25 expression, we measured this time IFN $\gamma$  expression. Without any stimulation, after 6 days of culture, IFN $\gamma$  levels were very low, 0.14% (0.12-0.17%) for T4 cells, 0.2% (0.12-0.34%) for T8 cells, 0.1% (0-0.3%) for cells and % (0-0.43%) for cells. Identical patterns were observed using IFN $\alpha$  or viral proteins alone. When we added ribavirin to cells, after 6 days, we observed a slight increase in IFN $\gamma$  expression in T4 cells (0.8% (0.5-1%)), a more important increase in T8 (2.4% (1.3-3.8%)) and cells (3.9% (0-11.76%)) and strong increase in CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells (8.2% (0-20%)). Adding IFN $\alpha$  and ribavirin didn't changes the T4 and T8 pattern compared to ribavirin alone, but the

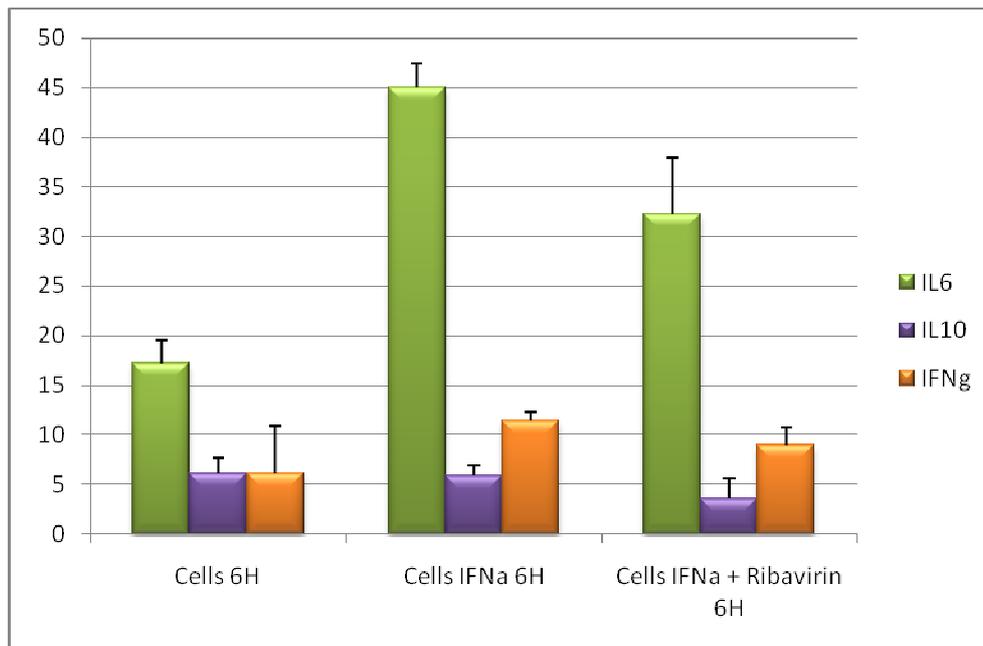
increases observed before were more important with both molecules (8.9% (0-26.3%) for CD56<sup>+</sup> and 12.4% (0-35.7%) for CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells). Adding IFN $\alpha$  to viral proteins didn't raised IFN $\gamma$  expression from basal levels in all cells populations. Ribavirin and viral proteins stimulation didn't modified IFN $\gamma$  expression from ribavirin-alone levels (0.7% (0.4-0.8%) for T4, 1.6% (0.9-2.5%) for T8, 3.3% (0-10%) for CD56<sup>+</sup> and 10% (0-28.6%) for CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells). Finally, when IFN $\alpha$  and ribavirin were added to viral proteins, IFN $\gamma$  levels were very close to ribavirin-alone levels too except for CD56<sup>+</sup> cells (6.31% (0-18.5%)). T4 and T8 sells seems to respond very weakly to ribavirin compared to CD56<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells. Even in these 2 populations, IFN $\gamma$  expression is not antigen-specific.



### ***IFN $\alpha$ and ribavirin impact on cytokines secretions profile during short term and 6 days long cultures***

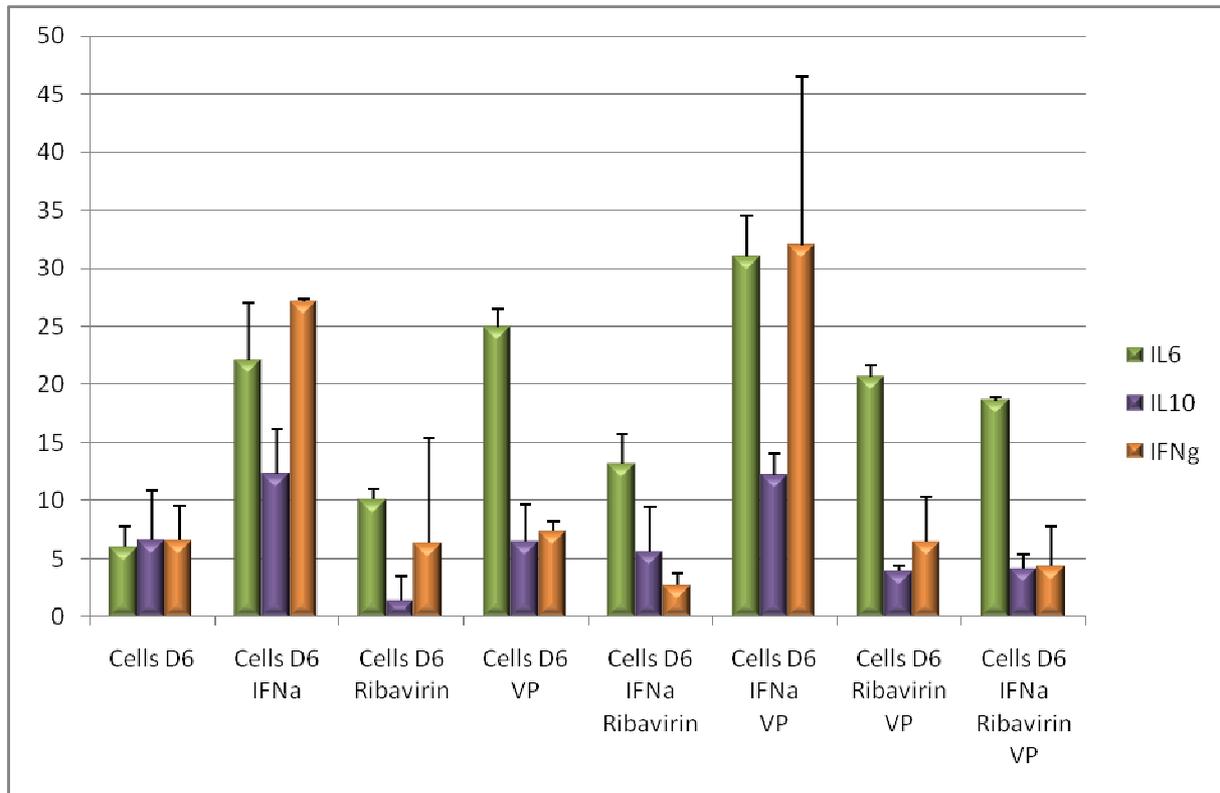
We followed the evolutions of 6 Th1 cytokines released in supernatant after 6 hours or 6 days in culture, with different stimulations. After 6 hours, under any stimulation, mean IL2 and IL4 levels (4.9, 3.6 and 3.7pg/ml and 3.1, 2.1 and 3.2pg/ml respectively for cells alone, with IFN $\alpha$  and with IFN $\alpha$  plus ribavirin for IL2 and IL4) remains constant (data not shown). Mean IL10 levels remains constant without stimulation and with IFN $\alpha$ , 6.1 and 5.9 and 3.6pg/ml respectively, and slightly decrease with IFN $\alpha$  plus ribavirin to reach 3.6pg/ml. Mean IL6 levels without stimulation rose to 17.2pg/ml and increase to 45.1pg/ml when cells were stimulated by IFN $\alpha$ . With both IFN $\alpha$  and ribavirin, IL6 levels decreased to 32.2pg/ml. Mean

TNF $\alpha$  levels was 12.1pg/ml without stimulation and slightly increased to 15.1pg/ml with IFN $\alpha$ . With both IFN $\alpha$  and ribavirin, it decreased under basal value to 9pg/ml (data not shown). Finally, mean IFN $\gamma$  levels without stimulation reached 6.1pg/ml, increased to 11.5pg/ml with IFN $\alpha$  and slightly decreased to 9pg/ml with IFN $\alpha$  and ribavirin. In early times, IFN $\alpha$  seems to increased inflammatory state via IL6, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ . This effect seems to be partially inhibited by ribavirin.



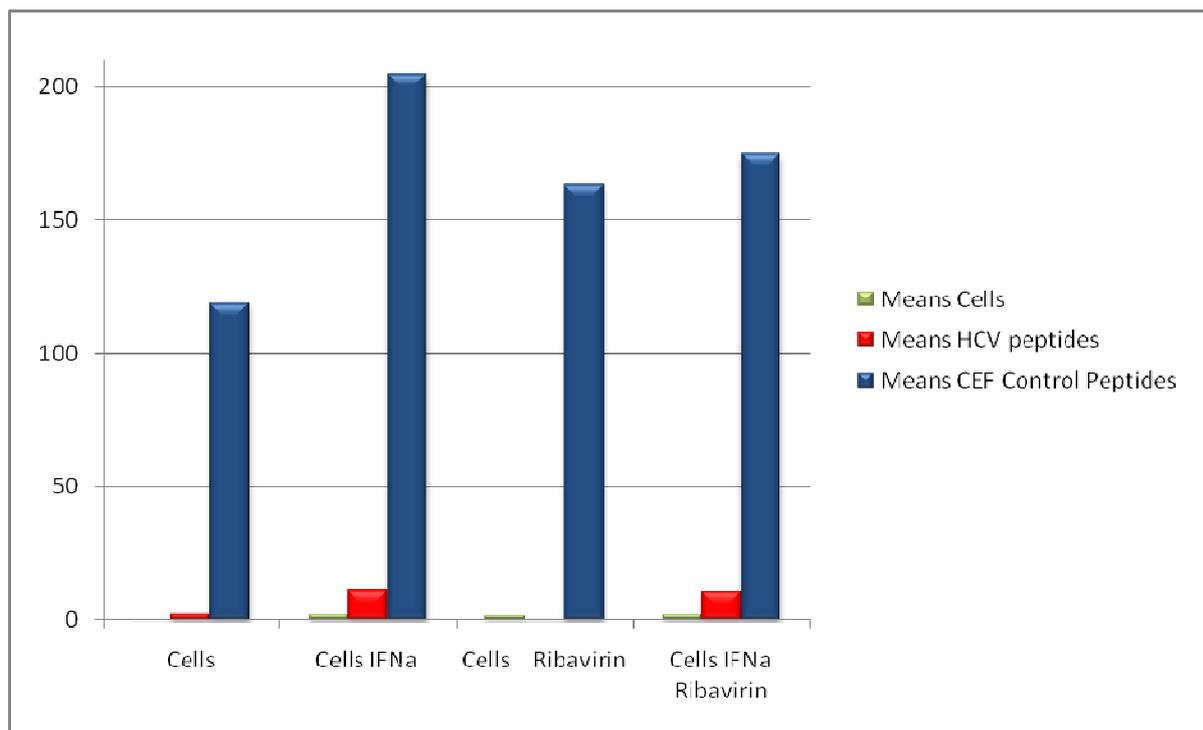
After 6 days of culture, without stimulation, IL6, IL10 and IFN $\gamma$  remains very low (6, 6.6 and 6.6pg/ml respectively). After IFN $\alpha$  stimulation, the 3 cytokines levels strongly increased to 22.1, 12.3 and 27.21pg/ml, respectively for IL6, IL10 and IFN $\gamma$ . Ribavirin stimulation lead to a slight increase of IL6 levels to 10.1pg/ml, a nearly total inhibition of IL10 secretion to 1.5pg/ml and a comparable level of IFN $\gamma$  without stimulation at 6.4pg/ml. Viral proteins increased IL6 levels to 25pg/ml, but didn't modify neither IL10 levels nor IFN $\gamma$  (5 and 7.3pg/ml respectively). Viral proteins and IFN $\alpha$  stimulation didn't change IL10 secretion, 12.2pg/ml, but enhanced IL6 and IFN $\gamma$  ones to 31 and 32pg/ml respectively. Ribavirin and viral proteins stimulation only increase IL6 levels to 20.7pg/ml and didn't modify IL10 and IFN $\gamma$  ones (4 and 6.5pg/ml respectively). IFN $\alpha$  and ribavirin stimulation totally inhibited IFN $\alpha$  effect previously obtained on IL10 and IFN $\gamma$  secretion (5.6 and 2.8pg/ml). Only a weak IL6 secretion increase remained (13.2pg/ml). Finally, when viral proteins, IFN $\alpha$  and ribavirin were added together, IL6 secretion remained lower than that with IFN $\alpha$  alone, 18.6pg/ml, and IL10 and IFN $\gamma$  levels were lower than those without stimulation (4.2 and 4.4pg/ml). These

results tend to show that ribavirin totally inhibits IFN $\alpha$  impact on cells at least 6 days after it was added to culture.



### ***Short term culture elispot assay***

After 6 hours of stimulation with nothing, IFN $\alpha$  at 3 concentrations or ribavirine, we performed an Elispot assay to measure IFN $\gamma$  secretion. We incubated our cells with 50U/ml or 100U/ml or 500U/ml of IFN $\alpha$ . As no difference or dose dependant IFN $\gamma$  secretion was observed (data not shown), IFN $\alpha$  results are expressed as the mean value of all doses. First, without peptidic stimulation, whatever the conditions are, we didn't detect IFN $\gamma$  secretion (1-2 SFC). With CEF (mix of peptides from cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and influenza virus), our positive control, we detected 119 SFC with cells alone, 205 SFC with IFN $\alpha$ , 164 SFC with ribavirin and 175 SFC with IFN $\alpha$  and ribavirin. With HCV peptides, we measured 3 SFC with cells alone, 11 SFC with IFN $\alpha$ , 1 SFC with ribavirin and 11 SFC with IFN $\alpha$  and ribavirin. Considering CEF results, ribavirin seems to partially inhibit T8 cells IFN $\gamma$  secretion and totally cancelled that with HCV peptides.



### ***Discussion***

In this present work, we didn't find any correlation between the HCV specific lymphocytes activation state and their capacity to release IFN $\gamma$  upon antigenic stimulation and the outcome of the disease. Pre-treatment T cells activity seems to not be predictive of the future response. For us, CD25 (IL2R $\alpha$ ) is a very good marker because it is at the beginning of response. It's a kind of response checkpoint, influencing all the events to come. Pre-treatment immunity in both groups is very close, so at least the 2 parameters studied don't have a major impact of disease outcome. A lot of studies worked on pre-treatment markers of disease outcome. Some of them found correlation between gene expression before treatment and outcome (Feld, Nanda et al. 2007) (Younossi, Baranova et al. 2009) but they never used a more proteomic approach. Here, we worked at the protein expression scale, why they are differences in gene/protein expression relationship and treatment outcome can only be hypothesized. As the virus block many immunological pathways, the protein expression may be too randomized to really impact on disease outcome at this point.

Studying CD25 expression on T cells during treatment showed us that there is statistically no difference between the responders and responders groups. CD25 expression was lower than pre-treatment value in both groups, indicating an immunosuppressive effect of the therapy. For IFN $\gamma$  secretion in response to HCV peptides, the same pattern was observed. No difference between the two groups and lower values than pre-treatment. Only one time point differs

between groups, W16. At this point, CD25 expression in NR group is null (0.1%), compared to R group (1.8%), but IFN $\gamma$  secreting cells are more numerous in NR group (9 SFC) than R group (6 SFC). This could be explained by the fact that at this time, in NR group, a “resistant to treatment HCV” was appearing either totally invisible to immune system or it is so exhausted that it didn’t respond anymore. Or the virus might have mutated on peptides which induce IFN $\gamma$  in vitro, making them disappeared or less immunogenic.

In both group, after the treatment stopped, immune system begun to revitalize itself, as CD25 expression and IFN $\gamma$  secretion raised to pre-treatment values. This unexpected fact told us that immune system need to be knocked out during treatment to clear virus. So, T cells have absolutely no, or very little, role in HCV resolution. In literature, peoples tried to match the natural resolution and the resolution induced by therapy. As the first is a very classical example of antiviral response, the second one is totally artificial and doesn’t use the same mechanisms and effectors.

Our in vitro studies showed that during the very first moment avec IFN $\alpha$  and ribavirin take, they only act on NKT cells. As the effect of therapy on viral load are usually depicted as a first strong decrease following the first treatment take then a smaller second one. NKT cells can explain these facts because they seem to be the cells stimulated by therapy and as they disappear very fast during chronic hepatitis C, as the time passes, it has lesser effect because of the smaller number of its target effectors.

The outcome of the treatment seems to be a very complex balance between ribavirin immunosuppressive effects and IFN $\alpha$  immunopromoting effects. As PCR results showed us, ribavirin tends to inhibit IFN $\alpha$  antiviral effect by shutting down MxA expression. These results agree with a study showing that the lower MxA pretreatment levels are, the better the outcome is (MacQuillan, de Boer et al. 2002).

A hypothesis has been made in order to explain all the data we collected. We think that lipid metabolism is absolutely crucial in HCV resolution. The virus recognizes CD81, SR-BI, occludin and claudin-1 on cell surface when they are inserted in a particular way on lipid rafts. An ISG, viperin, is known to disorganize lipid raft structure. So we hypothesize that by promoting IFN $\gamma$  secretion in NKT cells, the therapy induces viperin expression in hepatocytes. Here, there are 2 possibilities. The first one is that the virus cannot enter cells anymore and will be slowly cleared from the blood. The second one is that viperin doesn’t prevent the virus to enter but to exit cells. In this option, we can imagine necrosing hepatocytes fulfilled with virions unable to go out. If the immune system is suppressed by

therapy, these cells will be cleaned by resident macrophages, the hepatitis C is resolved. But if immune system is not knocked out enough, it will attack these dying cells, creating holes in the membrane and making them explode and releasing all of their viral contents. Here, the viral load will increase and the disease will go on. It seemed that it was what happened in IFN $\gamma$  injected patient.

In conclusion, in this present work we showed that the IFN $\alpha$  plus ribavirin therapy have negative effect on T cells except NKT cells where IFN $\gamma$  secretion is promoted. The success of treatment passes by suppressing T cells activation to let others effectors and mechanisms work.

## **References :**

- Binder, M., G. Kochs, et al. (2007). "Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy." Hepatology **46**(5): 1365-74.
- Bukh, J., R. H. Miller, et al. (1995). "Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus." Princess Takamatsu Symp **25**: 75-91.
- Chen, R., L. Lowe, et al. (1999). "Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology." Clin Chem **45**(9): 1693-1694.
- Chevaliez, S., R. Brillet, et al. (2007). "Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection." J Virol **81**(14): 7732-41.
- Dienstag, J. L. and J. G. McHutchison (2006). "American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C." Gastroenterology **130**(1): 231-64; quiz 214-7.
- Eckels, D. D., H. Zhou, et al. (1999). "Identification of antigenic escape variants in an immunodominant epitope of hepatitis C virus." Int Immunol **11**(4): 577-83.
- Erickson, S., O. Sangfelt, et al. (1999). "Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins." Cell Growth Differ **10**(8): 575-82.
- Feld, J. J., S. Nanda, et al. (2007). "Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response." Hepatology **46**(5): 1548-63.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." Virology **230**(2): 217-27.
- Guglietta, S., A. R. Garbuglia, et al. (2005). "Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection." Eur J Immunol **35**(9): 2627-37.
- Heron, I., M. Hokland, et al. (1978). "Enhanced expression of beta2-microglobulin and HLA antigens on human lymphoid cells by interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(12): 6215-9.
- Hong, Z. (2003). "The role of ribavirin-induced mutagenesis in HCV therapy: a concept or a fact?" Hepatology **38**(4): 807-10.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- Isaacs, A., J. Lindenmann, et al. (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 268-73.
- Kerr, I. M. and R. E. Brown (1978). "pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(1): 256-60.
- Kochs, G. and O. Haller (1999). "Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2082-6.
- Lau, J. Y., R. C. Tam, et al. (2002). "Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection." Hepatology **35**(5): 1002-9.
- Li, K., E. Foy, et al. (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2992-7.
- Lindenmann, J., D. C. Burke, et al. (1957). "Studies on the production, mode of action and properties of interferon." Br J Exp Pathol **38**(5): 551-62.

- MacQuillan, G. C., W. B. de Boer, et al. (2002). "Intrahepatic MxA and PKR protein expression in chronic hepatitis C virus infection." J Med Virol **68**(2): 197-205.
- Martin, J., S. Navas, et al. (1998). "Effects of the ribavirin-interferon alpha combination on cultured peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients." Cytokine **10**(8): 635-44.
- Marusawa, H., M. Hijikata, et al. (1999). "Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation." J Virol **73**(6): 4713-20.
- Melen, K., R. Fagerlund, et al. (2004). "Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs." J Med Virol **73**(4): 536-47.
- Pernollet, M., E. Jouvin-Marche, et al. (2002). "Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions." Clin Exp Immunol **130**(3): 518-25.
- Roberts, W. K., A. Hovanessian, et al. (1976). "Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis." Nature **264**(5585): 477-80.
- Su, Q., S. Wang, et al. (2007). "Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2." EMBO Rep **8**(3): 265-70.
- Tam, R. C., B. Pai, et al. (1999). "Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile." J Hepatol **30**(3): 376-82.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, et al. (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." Science **285**(5424): 107-10.
- Tsai, S. L., Y. M. Chen, et al. (1998). "Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity." Gastroenterology **115**(4): 954-65.
- Younossi, Z. M., A. Baranova, et al. (2009). "Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin." Hepatology **49**(3): 763-74.
- Zilberstein, A., A. Kimchi, et al. (1978). "Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4734-8.

#### **Article 4: Characterization and Role of Intra-Hepatic Regulatory T Cells in Chronic Hepatitis C Pathogenesis**

Les cellules T régulatrices (TReg) semblent être très importantes lors de toutes les phases de l'hépatite C, y compris après la formation d'un carcinome hépatocellulaire. En effet, lors d'une infection chronique, un plus grand nombre de Treg circulant a été observé, comparativement à une personne saine. Les biopsies hépatiques de patients VHC montrent une corrélation inverse entre le nombre de TReg en périphérie et le score inflammatoire histologique (Cabrera, Tu et al. 2004). Une déplétion des TRegs augmente de façon significative la prolifération et les réponses des T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques au VHC. Lorsque la pression des cellules TReg naturelles est supprimée, les fonctions effectrices des T CD8<sup>+</sup> sont restaurées et la charge virale diminue considérablement (Dittmer, He et al. 2004) ce qui suggère que ces cellules jouent un rôle critique dans la régulation immune hépatique et périphérique lors de l'infection par le VHC. La prolifération et la sécrétion d'IFN $\gamma$  peptide-spécifique des cellules T CD8<sup>+</sup> en réponse au VHC sont inhibées par les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> directement par contact cellule-cellule, indépendamment de l'IL10 et du TGF $\beta$  (Cabrera, Tu et al. 2004, Boettler, Spangenberg et al. 2005). Ceci indique un rôle significatif dans les dysfonctions des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VHC. L'étude de ces cellules est donc d'un intérêt crucial pour mieux comprendre et contourner les mécanismes de persistance virale.

Dans cet article, nous avons étudié les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> dans le foie et le sang de patients atteints d'hépatite C chronique. Les cellules FoxP3<sup>+</sup> dans les lésions nécro-inflammatoires sont toujours majoritairement associées aux cellules T CD8<sup>+</sup>. Nous avons également trouvé une corrélation positive entre l'expression de FoxP3 et le nombre de cellules FoxP3<sup>+</sup> et le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> et l'expression de CD8 dans le foie, ce qui indique que les TReg inhibent les cellules T CD8<sup>+</sup> au sein des lésions nécro-inflammatoires. De plus, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> est corrélé positivement avec les scores METAVIR de fibrose et d'activité alors que celui des cellules FoxP3<sup>+</sup> dans les lésions n'est corrélé qu'avec le score METAVIR de fibrose. Globalement, cet article met en lumière les interactions entre les cellules T CD8<sup>+</sup> et les TReg, ainsi que celles entre ces 2 types cellulaires et les sécrétions de cytokine pro- et anti-inflammatoire dans le foie des patients atteints d'hépatite virale C chronique.

# Characterization and Role of Intra-Hepatic Regulatory T Cells in Chronic Hepatitis C Pathogenesis

Nathalie Sturm<sup>1,2,3\*</sup>, Marie-Ange Thélou<sup>1,2\*</sup>, Xavier Camous<sup>1,2</sup>, Guéorgui Dimitrov<sup>1,2</sup>, Muhammad Ramzan<sup>1,2</sup>, Tania Dufeu-Duchesne<sup>1,2</sup>, Paula Bonorino<sup>1,2</sup>, Christiane Guillermet<sup>2,3</sup>, Philippe Arvers<sup>4</sup>, Martine Pernollet<sup>1,2</sup>, Vincent Leroy<sup>1,2</sup>, Jean-Pierre Zarski<sup>1,2</sup>, Patrice N.Marche<sup>1,2\*\*</sup> and Evelyne Jouvin-Marche<sup>1,2\*\*</sup>.

*1 INSERM, Unité 823, Grenoble, France.*

*2 Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut d'Oncologie et du Développement Albert Bonniot et Etablissement Français du sang, UMR-S823, Grenoble, France.*

*3 Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie, CHU A Michallon, 38043, Grenoble, France*

*4 Centre de recherche de Service de Santé des Armées, La Tronche, France*

*\* NS and MAT have contributed equally to this work*

*\*\*PNM and EJM have contributed equally to this work*

**Key words:** Regulatory T Lymphocytes, HCV, HBV, Liver

**Short title:** Regulatory T cells in chronic Hepatitis C.

## **Backgrounds & aims**

In chronic hepatitis C, HCV-specific T-cell responses are often dysfunctionnal. *In vitro* data point out that regulatory T cells (Tregs) are able to suppress HCV-specific lymphocytes proliferation and cytokines secretion but their implication in this pathology is still debated.

## **Methods**

In order to document this point, a total of 20 patients with chronic hepatitis C (HCV) infection were enrolled. Frequency and localization of FoxP3<sup>+</sup>Tregs in the liver was studied by Flow cytometric and Immunohistochemical analyses. Data were completed by studying the cytokine expression by RT/PCR in 47 HCV patients. Statistical analyses, using the SPSS 15.0 software, were performed to compare parameters.

## **Results**

Immunohistochemical data show the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells in liver compartment while intra-hepatic CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells were scarce. Precise localization shows that these cells are present in necro-inflammatory areas in close contact with CD8<sup>+</sup> lymphocytes suggesting that Tregs-mediated inhibition of CD8<sup>+</sup>T cell proliferation requires direct cell-cell contact at the inflammatory site. Analyses of the cytokines expression show strong correlation between CD8, FoxP3 and IL-10 and four distinct gene clusters, CD8/FoxP3, CD8/IL-10, TGF- $\beta$ /IL-10 and TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ , while no correlation was found between serum viral load and any expression of immune markers. Interestingly the ratio of CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> cell remains similar in both moderate and mild fibrosis (Metavir F $\leq$ 2) while this ratio differs significantly in severe fibrosis (F $\geq$ 3).

## **Conclusions**

The link between FoxP3, CD8 and IL-10 allows establishing equilibrium between the host and virus, contributing to the viral persistence and preventing immunopathological liver tissue damages.

## 1. Introduction

In chronic Hepatitis C virus (HCV) infection, blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses have limited impact on disease course [1-3] but intra-hepatic T cells lymphocytes seem to control disease pathogenesis [2, 4-6]. Therefore, regulation of intra-hepatic T cell response in HCV patients may have important implication not only in determining spontaneous clearance but also in disease progression during persistence infection [7].

It is well known that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are activated by microbial infections and this leads to an overall increase of anti-inflammatory cytokines. The increase in these cytokines induce the suppressive functions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natural regulatory T cells (Tregs) [8-12] and could also promote the local survival or retention of natural Tregs cells [13]. Finally, infections disturb balance between natural Tregs cells and effector lymphocytes, thereby alter immune response and contribute to the progression of disease.

It has been shown that HCV patients have a higher number of Tregs cells in peripheral blood than healthy people [14, 15]. When the natural Tregs cells pressure is removed, the effector function of CD8<sup>+</sup> T cells is restored and viral load is reduced considerably [16]. Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells enhances antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T proliferation and response [9, 15, 17]. All these data demonstrated that Tregs played a key role in HCV disease.

Nowadays, Tregs cells, defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> are also characterized by the expression of the transcriptional factor Forkhead box Protein 3 (FoxP3) [18, 19]. Comparison of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs between infected and uninfected HCV patients has shown that they are phenotypically, functionally and genetically indistinguishable [20, 21]. Among HCV infected patients, HCV-specific FoxP3<sup>+</sup> Tregs were detected in the blood and had the capacity to suppress HCV-specific T cells [20].

Recent data point out the presence of Tregs expressing CD8 with regulatory ability [22-26]. Nevertheless, frequency and biological role of human CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells is less understood than their counterpart CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells. *In vitro* stimulation of PBMC with HCV peptides reveals the presence of both virus-specific CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells. CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells have proliferation capacity and display a cell-cell contact dependent suppressive activity [27].

In chronic hepatitis C, most of the studies are focused on peripheral Tregs cells which probably do not reflect the precise composition and functions of these cells in the liver. In order to examine the implication of intra-hepatic FoxP3<sup>+</sup>Tregs during different grades/stages of chronic hepatitis C disease, we studied first, the frequency of these cells by flow cytometry,

second, the precise histological localization of these cells by immunohistochemistry on liver tissue section and third, the expression levels of cytokines in liver biopsies by RT-PCR as compared to clinical, biochemical and histological parameters. This allows addressing the role of these Tregs cells, specifically in regard to CD8<sup>+</sup> T cell functions in chronic hepatitis C.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Patients**

Patients with chronic hepatitis C seen in the University Hospital, Grenoble were included in this study. Six liver biopsies and 8 blood samples were selected for flow cytometric analysis (**Table 1**). The number of patients was then extended up to 20 for Immunohistochemical studies, and up to 47 for cytokines quantification by RT/PCR. Their biological and physioclinical parameters were analysed as previously described [24]. Their main characteristics are shown in **Table 1**. This study was approved by the local ethics committee. All patients gave informed consent prior to liver biopsy.

### **2.2. Cell Preparation**

Fresh liver biopsies obtained by using 1.5 mm diameter disposable biopsy needle were divided into two parts, one for histo-pathological examination and other for immunological analysis. Biopsies were processed and experimented as described previously [24, 28, 29].

### **2.3. Immunostaining and flow cytometric analysis**

The monoclonal antibodies used for immunophenotyping were: Human anti-FoxP3-PE and rat IgG2a-PE antibodies, (*Human/Non Human Primate Regulatory T Cells Staining Kit -BD Biosciences, Pont de Claix, France*) and Human anti-CD4 APC, human anti-CD8 FITC and human anti-CD25 PC7 (*Beckman Coulter, Villepinte, France*). Immunostaining and flow cytometric analysis were done as described previously [24].

### **2.4. Immunohistochemical double labeling study**

Double immunoenzymatic labelling was performed manually (Sequenza station) on formalin-fixed, paraffin-embedded liver biopsies from 20 chronic HCV patients. Two methods of immunodetection were applied: streptavidin-biotin peroxidase (SBP) method with diaminobenzidine (DAB) as chromogen and streptavidin-biotin alkaline phosphatase (SBAP)

method with fast blue (FB) as chromogen. For CD8/FoxP3 double staining, the primary mouse monoclonal anti-CD8 antibody (CD8, clone C8/144B, 1/100, *Dako*) and the secondary biotinylated goat anti-mouse antibody (1/500, *Jackson ImmunoResearch*) were used, followed by detection with SBAP complex (1/50, *Dako*) and FB chromogen staining. For FoxP3 staining, mouse monoclonal primary antibody (FoxP3, 1/20, *Abcam*), and secondary biotinylated antibody (goat anti-mouse antibody, 1/500, *Jackson ImmunoResearch*) were used, then detection with SBP complex (1/200, *Dako*,) and DAB chromogen staining was performed.

For CD4/FoxP3 double staining, primary mouse monoclonal antibody (CD4 clone 4B12, 1/75, *Novocastra*), endogenous peroxidase inhibition, incubation with secondary biotinylated goat anti-mouse antibody, detection with SBP complex and DAB chromogen staining were performed. The second immunostaining for FoxP3 was performed with SBAP method and FB staining. All sections were stained in parallel with an unrelated primary antibody (mouse IgG, 2 µg/ml, *Jackson ImmunoResearch*) to provide a negative control. Immunopositive cells were counted in all consecutive fields along the whole section of liver biopsy on a computer screen with the help of automatic software LUCIA (*Laboratory Universal Computer Image Analysis, version 5.0, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic*). The cell counts were performed by a single liver pathologist (NS) on serial sections obtained from paraffin blocks. Several parameters were observed separately, including total number of CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells, localization of FoxP3<sup>+</sup> cells in the foci of piecemeal and lobular necrosis, their distribution in the fibrotic tissue (fibrous septa and portal tracts) and in the parenchymatous areas (lobules or nodules). The numbers of cells were expressed as per field observed at 20X magnification on the computer screen (1,002 mm<sup>2</sup>).

## **2.5. RT-PCR Analysis**

Total RNA was extracted from frozen liver biopsies (5-10mg) by homogenization of tissues in silica balls using MagnaLyser System (*Roche Diagnostics, Meylan, France*). The *Regulatory T cells in chronic Hepatitis C* mixture was filtered on a silica column and “digested” by DNase I. Single-stranded cDNA was synthesized by using the Superscript II Reverse Transcriptase (*Gibco BRL, Life Technologies*). Primer pairs and probes for quantification of CD4, CD8-, FoxP3, IL-10, IFN-γ, TGF-β, and TNF-α genes were designed with ProbeFinder Software for Human (version 2.35) (*Roche Diagnostics, Meylan, France*) **Table 2**. Quantification of transcripts from liver samples was performed with the LightCycler® 480

Real-Time PCR System (*Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) and target sequences were detected with UPL (Universal ProbeLibrary, *Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*). Data were analyzed with the LightCycler® 480 Software. The detection format was set to “Mono Colour Hydrolysis Probe” and the Second Derivative Maximum Method was used for absolute quantification. The household gene used for normalization of the values was the Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase gene (HPRT).

## 2.6. Statistical methods

Statistical analysis was performed by using SPSS 15.0 software (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). The non-parametric Wilcoxon and Mann-Whitney U-test were performed to compare quantitative variables. Within group comparisons were performed by using the 2-tailed Spearman’s correlation coefficient. Principal Component Analysis (PCA) and linear univariate and multivariate regression analyses were also performed. P values less than 0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Detection and quantification of intra-hepatic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells.

The flow cytometric gating strategy followed to characterize the different subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from fresh liver biopsies and blood are depicted in **Fig1A,B**. As expected [5], in the liver of the 6 HCV infected patients, the frequency of the CD8<sup>+</sup> T cells (32.5% ± 5.5%) was higher than the frequency of CD4<sup>+</sup> lymphocytes (17.4% ± 8.4%) (p<0.05). The frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes observed in the liver was 5.9% ± 1.1% and 3.4% ± 1.8% respectively (**Fig.1C**). In the blood of the 8 HCV infected patients, the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells was 8.4% ± 6.1% and 2.8% ± 1.6% respectively. These results underline that, among CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells of HCV infected patients, only about 50% express CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells in the liver (54.5 ± 22.7%) or in blood (45.9 ± 21.8%) (**Table 3**). It means that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells represent a larger cell population than that phenotyped as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs. Concerning CD8<sup>+</sup> subset, less than 0.1% of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells (0.03% ± 0.01%) were observed in the blood of the 8 patients and no cell expressing the 3 markers i.e. CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> was detected among the liver infiltrating lymphocytes. In conclusion, in the liver of HCV patients, the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells represent around 50% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, these later cells corresponding to 6% of

CD4<sup>+</sup> cells. As CD4<sup>+</sup> cells represent less than 20% of the lymphocytes (actually an average of 17.4%), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells stand for less than 0.6% of the lymphocyte pool. (**Table 3**).

### **3.2. Immunohistochemical analysis of intra-hepatic FoxP3<sup>+</sup> cells.**

To determine precisely the phenotype of the FoxP3 regulatory T cells, an immunohistochemical analysis was performed in a group of 20 HCV patients (**Table 1**) and a mean of 50 fields (20 to 105) were analyzed per liver biopsy at the magnification of 20X.

The procedure adopted for cell visualization and counting allowed to observe CD4, CD8 and FoxP3 single positive cells and CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> double positive cells. The double immunostaining CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> revealed that all FoxP3<sup>+</sup> cells, except five cells, were CD4<sup>+</sup>, with a characteristic blue nuclear staining with anti-FoxP3 antibody, circled by a brown cytoplasmic membrane staining with anti-CD4 antibody (**Fig 2A,B**). Double staining with anti-CD8<sup>+</sup> and anti-FoxP3<sup>+</sup> antibodies showed that FoxP3<sup>+</sup> cells, characterized with brown nuclear staining, were not circled by blue cytoplasmic membrane, indicating that these cells are not labelling with anti-CD8 antibody (**Fig 2C-F**). Nevertheless, among all the slides observed, we did detect less than five FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, with brown nuclear and blue cytoplasmic membrane (**Fig 2G,H**). This corroborated our results obtained by flow cytometric analysis, suggesting that CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells are very scarce cells in the liver and that FoxP3<sup>+</sup> cells co-expressed CD4.

### **3.3. Relationship between intra-hepatic FoxP3<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells in different histological areas.**

When lymphoid aggregates were present (**Fig 2D**), most of FoxP3<sup>+</sup> cells were observed in portal tracts and fibrous septa (**Fig 2C**). They were also observed in parenchymatous areas where they preferentially localized in necrotic areas in close contact with CD8<sup>+</sup> lymphocytes (**Fig 2E,F**). Because the FoxP3 cells are present in different intra-hepatic areas, statistical analysis were performed to determine the correlation between FoxP3 and classical CD4 or CD8 lymphocytes frequencies. As expected, a significant positive correlation was found between the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells and the total number of CD4<sup>+</sup> cells (**Fig.3A** -  $r=0.508$ - $p=0.022$ ) or the total number of CD8<sup>+</sup> cells (**Fig.3B**  $r=0.538$ - $p=0.014$ ). Therefore, we conducted a multivariate linear regression analysis and we observed that the correlation between total CD8/FoxP3 cells adjusted on the total CD4 cells ( $r=0.466$ - $p=0.039$ ) is stronger than the correlation between total CD4/FoxP3 cells adjusted on the total

CD8 cells ( $r=0.316$ - $p=0.175$ ). Positive correlation were also observed between the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells and the number of CD8<sup>+</sup> cells in fibrotic and parenchymatous areas ( $r= 0.505$ - $p=0.023$  and  $r= 0.555$ - $p=0.011$  respectively) (**Fig. 3C,D**). Moreover, the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells correlated positively with the number of FoxP3<sup>+</sup> cells in the fibrotic tissue ( $r=0.923$ - $p<0.001$ ) (**Fig. 3E**), in the parenchymatous areas ( $r=0.777$ - $p<0.001$ ) (**Fig. 3F**) and in the necro-inflammatory lesions ( $r=0.833$ - $p<0.001$ ) (**see Annex1**). Interestingly, there was a strong correlation between CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells in parenchymatous areas ( $r=0.511$ - $p=0.021$ ), especially inside the necro-inflammatory lesions ( $r=0.695$ - $p=0.001$ ) suggesting that FoxP3<sup>+</sup> cells were mostly associated with CD8<sup>+</sup> cells. To corroborate this observation, we found 22% of FoxP3<sup>+</sup> cells present in the necro-inflammatory foci were in contact with CD8<sup>+</sup> cells or apoptotic bodies.

### **3.4. Detection and quantification of intra-hepatic CD4, CD8, FoxP3 and IL-10 by quantitative RT-PCR.**

As mentioned above, the low number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs did not permit to measure cytokine productions by flow cytometry or ELISA analysis. To overcome this difficulty, we performed an analysis of CD4, CD8, FoxP3, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  transcripts by quantitative RT-PCR. For this, we extended our analysis up to 47 patients. All the results were expressed as ratio of the number of target amplicons/number of HPRT amplicons. A significant positive correlation was observed among the expression levels of different cellular immune markers and cytokines. Principal Component Analysis (PCA) allowed to determine the presence of gene clusters and only the most relevant correlations are depicted in **Fig.4**. Briefly, positive correlations were observed between CD8 and FoxP3 ( $r=0.564$ - $p=0.001$ ) (**Fig.4A**), CD8 with IL-10 ( $r=0.405$ - $p=0.022$ ) (**Fig.4B**), TNF- $\alpha$  with TGF- $\beta$  ( $r=0.652$ - $p=0.005$ ) (**Fig.4C**) and TGF- $\beta$  with IL-10 ( $r=0.688$ - $p<0.001$ ) (**Fig.4D**). Then, univariate and multivariate regression analysis were conducted for the correlated genes. Regression model [CD8 = 0.88.IL-10 - 0.01.FoxP3 + 0.04.IFN ( $r=0.810$  -  $p<10^{-6}$ )] revealed that i) when the expression levels of IL-10 increased by 1 unit, the expression levels of CD8 increased by 0.88 units keeping the expression levels of FoxP3 and IFN- $\gamma$  as constants ii) when the expression levels of FoxP3 increased by 1 unit, the expression levels of CD8 decreased by 0.01 units, keeping the expression levels of IL-10 and IFN- $\gamma$  as constants. In conclusion, regression analysis reveals that the expression levels of FoxP3 and IL-10 increase, accordingly to the expression levels of CD8, underlining that these 3 parameters are somehow linked together.

Moreover, pro-inflammatory (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (TGF- $\beta$  and IL-10) cytokines are closely correlated.

### 3.5. Relationship between histological parameters and immune markers.

We then analyzed the relationship between grade and stage according to the Metavir classification and immune markers. We found significant positive correlation between fibrosis stage and FoxP3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells in different histological areas of the liver. Most of significant correlations were between i) Metavir-F and FoxP3<sup>+</sup> cells in the necro-inflammatory lesions ( $r=0.469$ - $p=0.037$ ), and ii) Metavir-F and FoxP3<sup>+</sup> cells in the piecemeal necrosis, in contact with CD8<sup>+</sup> cells ( $r=0.510$ - $p=0.022$ ). Considering CD8, Metavir fibrosis stage was correlated, with the total number of CD8<sup>+</sup> cells ( $r=0.714$ - $p<0.001$ ), with CD8 cells in fibrotic areas ( $r=0.693$ - $p=0.001$ ), and finally with CD8 transcripts ( $r=0.481$ - $p=0.005$ ). As expected [5] Metavir activity grade was positively correlated with the expression levels of CD8 ( $r=0.547$ - $p=0.001$ ) and IL-10 ( $r=0.318$ - $p=0.040$ ). Analysis of the relationship between the frequency of FoxP3 cells and the gravity of the necro-inflammatory score revealed changes in term of number of FoxP3 cells (**Fig.5**). The numbers of FoxP3<sup>+</sup> cells were two fold higher in patients with Metavir  $\leq$  A2 (median range of number of FoxP3<sup>+</sup> cells: 2 vs 4), whereas they were slightly decreased in patients with Metavir  $\geq$  A2 (median range of number of FoxP3<sup>+</sup> cells: 4 vs 2)(**Fig.5A**). We confirmed, as already reported [5, 30], that CD8<sup>+</sup> cells increase with the progression of inflammation (A1 to A2, median range: 67 vs 111 and A2 to A3: 111 vs 123) (**Fig.5B**). On the other hand, we found a similar profile according to the Metavir stage with an increase of FoxP3<sup>+</sup> cells in patients with Metavir  $F\leq 3$  (F1 to F2, median range of number of FoxP3<sup>+</sup> cells: 1 vs 3 and F2 to F3: 3 vs 4) and, a decrease of FoxP3<sup>+</sup> cells in patients with Metavir  $F\geq 3$  (F3 to F4, median range of number of FoxP3<sup>+</sup> cells: 4 vs 2). Actually, the frequency of CD8<sup>+</sup> cells was highest in patients with cirrhosis (A2 to A3, median range of number of CD8<sup>+</sup> cells: 111 vs 123 and F3 to F4, median range: 121 vs 168) (**Fig.5C,D**). Interestingly the ratio of CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> cells, decreasing in severe Metavir activity grade (**Fig.5E**), remains similar in both moderate and mild fibrosis stages while this ratio differs significantly in severe stages of the disease (F3 to F4, median range of cells : 8.65% vs 2.96% -  $z=2.324$ ,  $p=0.024$ ) (**Fig.5 F**). It is worth to note that no correlation was found between the serum viral load and any immune marker included in our study at cellular and transcriptional levels.

## 4. Discussion

In chronic hepatitis C, HCV-specific T-cell responses are generally weak, narrowly focused and often dysfunctional. The current debate is to determine whether the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory cell population plays a decisive role in the immune dysfunction. Here, we focused our analysis on intra-hepatic Tregs with the aim to determine the frequency, the localization, and the role of these cells in chronic hepatitis C. For this, we performed an analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells on fresh liver biopsies by flow cytometry to detect presence and frequency of these two subsets. Then, we extended the analysis by immunohistochemistry in more patients to precise localization of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells and finally we completed this analysis by RT-PCR on frozen samples.

Previously, intra-hepatic Tregs were mostly defined by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes [9] which did not give true picture of natural Tregs defined by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells in HCV patients. Our flow cytometric data show that about 50% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> intra-hepatic T cells do not express FoxP3 marker, suggesting that the actual number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs is almost half of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Taken together, Tregs represented small fractions of T cells in HCV infected liver.

To date, Tregs of HCV patients were studied from PBMC samples, which were shown to be expanded *in vitro* after HCV peptides stimulation [27]. Here, we confirm the very low frequency of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the blood as already published [26, 27, 31-33]. We also report for the first time, their scarcity in the liver of chronic hepatitis C patients and show that CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells do not expand in the liver infected by HCV. This can be due to, either a weak level of stimulation by the presenting cells to induce FoxP3, or the lack of appropriate cytokines in the environmental tissue to permit the survival of these cells.

Immunohistochemical studies indicate that CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells infiltrate the hepatic lymphoid aggregates, portal or septal tracts and parenchymatous lobules or nodules, as already reported [34]. In addition, we show that FoxP3<sup>+</sup> cells are found in piecemeal necrosis and lobular necrosis, predominantly in contact with CD8<sup>+</sup> cells. It means that Tregs within HCV infected livers have the direct access required to inhibit T cell cytotoxicity at the site of action. Furthermore, since such cells are localized in portal tracts, antiviral and non-specifically activated lymphocytes entering the liver are likely to encounter a FoxP3<sup>+</sup> cell at an early stage in the inflammatory process. FoxP3<sup>+</sup> cells inside necro-inflammatory lesions also

correlate positively with CD8<sup>+</sup> cells, again confirming their plausible inhibitory role on the effector cells.

The next step was to determine whether, the presence/proliferation of Tregs and CD8 T cells was dependent on cytokines regulation. In our study, a significant positive correlation was found the expression levels of four cytokines: IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . All these cytokines are produced by different types of cells, but this technical approach does not allow determining what kind of cells produce cytokines. Secretion of TGF- $\beta$  in high concentration is an important factor for the local survival and function of natural Treg cells [9, 35] but might also contribute to induction of fibrosis. IL-10 expression is high in the liver of HCV-HIV co-infected patients [22]. *In vitro* studies demonstrated that both TGF- $\beta$  and IL-10 inhibited the proliferation, cytokine secretion and cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> cells [9, 36]. Extrapolating the results achieved in PBMCs, the positive correlation between the intra-hepatic cytokines TGF- $\beta$  and IL-10 may favor synergistic effects on each other, i.e. i) maintain the FoxP3 cells pool and ii) reduction of pro-inflammatory cytokine secretion. It is known that the intra-hepatic TNF- $\alpha$  production is induced and up-regulated in the liver by HCV NS3 [37]. TNF- $\alpha$  comes at an early stage of the cascade of events leading to liver damage [38] and is involved in the healing process including fibrogenesis [39]. As the majority of the patients included in our study have proven fibrosis (44/47), TNF- $\alpha$  expression might be induced and produced in the liver of the studied patients. It has been demonstrated that Tregs inhibit the *in vitro* production of IFN- $\gamma$  by core specific CD4<sup>+</sup> cells and HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cells [11, 40]. As in the liver, expression levels for TNF- $\alpha$  as well as for IFN- $\gamma$  display a correlation with those of IL-10 and of TGF- $\beta$ , one can argue that the infectious/inflammatory context favors both the production of anti-inflammatory (IL-10, TGF- $\beta$ ) and proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) cytokines. We hypothesize that Tregs inhibit partially the pool of intra-hepatic effector T cells and that some effectors cells produce IFN- $\gamma$ . That is supported by recent data showing that IFN- $\gamma$  is released rather by effector T cells in these infections [3, 5, 6]. Whatever the balance between the four cytokines, our regression analysis points out that the expression levels of FoxP3, CD8 and IL-10 are positively co-dependent upon each other. This means that together, FoxP3, CD8 and IL-10 allow establishing equilibrium beneficial both to the host and to the virus. The host gains benefit from FoxP3 which contains the expansion of CD8<sup>+</sup> cells, thus preventing liver tissue damages. The virus is preserved through the suppression of CD8<sup>+</sup> cells by Tregs.

It is important to note that the number of CD8<sup>+</sup> cells increases with the necro-inflammatory activity and fibrosis, whereas FoxP3<sup>+</sup> cells increase up to Metavir-A2 and Metavir-F3 but

decrease after this grade and stage. Interestingly, FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio is reduced significantly from stage F3 to F4. On the light of these observations, the most likely scenario is that, during the first step of the disease, FoxP3<sup>+</sup> cells modulate effector functions of lymphocytes whereas, during the severe stage when the tissue environments is altered, the co-dependency between FoxP3<sup>+</sup> cells and effector cells is broken. This implies that the co-dependency between Tregs and classical lymphocytes is crucial for maintain of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells frequency. It remains to be determined whether the loss of the FoxP3<sup>+</sup>CD8 interaction, beyond the stage A2/F3, results from an increase in the cytolytic functions of CD8<sup>+</sup> cells, thus impacting on the expansion of liver damages. Therefore, facing the immune response and the equilibrium FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, the stage/grade A2/F3 appears to be a turning point in the course of the disease.

In conclusion, this study provides new insights into the distribution of Tregs in the different histological areas within HCV infected liver, the regulation being essentially FoxP3-CD8 contact-dependent. More interestingly, during the course of the disease, no correlation was found between viral load and intra-hepatic Tregs (transcripts or cells) suggesting that the essential role of Tregs is to limit the CD8 cell pool to contain the damage of the liver. Thus, FoxP3<sup>+</sup> T cells often found in the lymph nodes that drain the effector organ, may play a more important role in those lymph nodes than in the effector organ itself [9, 41]. These findings are crucial for understanding the HCV immune pathogenesis and for immunotherapeutic treatments.

## **Acknowledgements**

We are grateful to the patients enrolled in this study for their cooperation. This work was supported by the institutional Grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida (ANRS) and in part by the Biotherapeutic program (R06002CC) of the “Pôle de Compétitivité Lyon Biopôle”. M.R. was supported by a fellowship from Higher Education Commission (HEC) of Pakistan; X.C. was supported by a fellowship from Région-Rhône Alpes actions in the “Clusters 10”; P.B. was supported by fellowships from French government and ANRS. We specifically thank Aurélie Dariz, Ingrid Esclozas and Alice Cheveau for technical assistance.

## Figures and Tables legends:

### Table1. Demographic, biochemical and clinical characteristics in Chronic Hepatitis C Patients

### Table 2. Primers and Universal Probe Library (UPL) sequences used in the Light Cycler® 480 Real-Time PCR System

#### Fig.1. CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> Gating Strategy.

(A) Intra-hepatic lymphocytes were analyzed in flow Cytometry among total cells and electronically separated in two subpopulations, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>. (B) On each CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> gate, the expression level of CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> was measured. (C) On both gates, the level of double positives CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> was determined to isolate T<sub>regs</sub>. (D) Average of each subpopulations CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> in the liver and in the blood.

### Table 3. Quantification of intra-Hepatic and Peripheral Lymphocytes of Hepatitis C Patients

#### Fig.2. CD4/FoxP3 or CD8/FoxP3 Double Immunohistochemical labelling

(A). Double CD4/FoxP3 immunohistochemical labelling showing CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells characterized by a blue nuclear FoxP3 staining and a brown cytoplasmic CD4 staining, in contact with foci of parcellar necrosis (PN, arrow) and lobular necrosis (LN, asterisk) in peri-portal (P) and lobular (L) areas (magnification x20). (B). High magnification (x40) of CD4/FoxP3 immunolabelling in a portal tract showing that all FoxP3 cells were CD4 positives lymphocytes, except one blue FoxP3 cell without cytoplasmic CD4 staining (arrow). (C). Double CD8/FoxP3 immunohistochemical labelling showing numerous separate brown FoxP3 cells and blue CD8 lymphocytes, in a fibrous portal tract (magnification x20). (D). FoxP3 cells were particularly numerous in fibrous portal areas when nodular lymphoid aggregates (LA) were present (magnification x10). (E). Brown FoxP3 cells in contact with parcellar necro-inflammatory lesions (PN, arrow) in peri-portal areas (magnification x20). (F). Brown FoxP3 cells in contact with lobular necro-inflammatory lesions (LN, asterisk) in lobular areas (magnification x20). (G-H). High magnifications (x40) showing two putative double labelled CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes in a fibrous portal area (G) and in contact with lobular necrosis ( LN, asterisk) in a lobule.

#### Fig.3.

(A-B) Relationship between intra-hepatic total FoxP3<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells in Fibrous Septa and in Parenchyma. (C-D) Relationship between intra-hepatic total FoxP3<sup>+</sup> cells and FoxP3<sup>+</sup> cells in

Fibrous Septa and in Parenchyma. **(E)** Relationship between intra-hepatic total FoxP3<sup>+</sup> cells and FoxP3<sup>+</sup> cells in necrosis areas.

**Fig.4. Expression levels of four cytokines clusters.**

Relationship between: **(A)** CD8 transcripts and FoxP3 transcripts and **(B)** CD8 transcripts and IL-10 transcripts; **(C)** TGF-transcripts and TNF-transcripts and **(D)** TGF-transcripts and IL-10 transcripts.

**Fig.5. Relationship between frequency of FoxP3<sup>+</sup> cells or CD8<sup>+</sup> cells and gravity of the disease:**

**(A)** FoxP3 cells or **(B)** CD8 cells and different stages of the Activity; **(C)** FoxP3 cells or **(D)** CD8 cells and different stages of the Fibrosis. **(E)** Ratio FoxP3/CD8 cells and different Activity or Fibrosis steps.

	<b>Hepatitis C Patients Studied by Histochemistry (n=20)</b>	<b>Hepatitis C Patients Studied by RT/PCR (Number of patients extended up to n=47)</b>
<b>Sex (male, n (%))</b>	15 (75%)	32 (68%)
<b>Age (Yrs)*</b>	44 (24-75)	43 (24-75)
<b>Plasma viral load (logIU/mL)</b>	6.1±6.1	6.1±6.2
<b>Serum ALT (IU/mL)</b>	172.6±105.5	130.1±98.8
<b>Liver Histology** Metavir ACTIVITY Score, n(%)</b>		
<b>0</b>	0	0
<b>1</b>	4 (20%)	20 (43%)
<b>2</b>	9 (45%)	18 (38%)
<b>3</b>	7 (35%)	9 (19%)
<b>Metavir FIBROSIS Score, n(%)</b>		
<b>0</b>	1 (5%)	7 (15%)
<b>1</b>	3 (15%)	12 (26%)
<b>2</b>	7 (35%)	14 (30%)
<b>3</b>	6 (30%)	10 (21%)
<b>4</b>	3 (15%)	4 (8%)

\* Median range

\*\* Number of cases / Total (%)

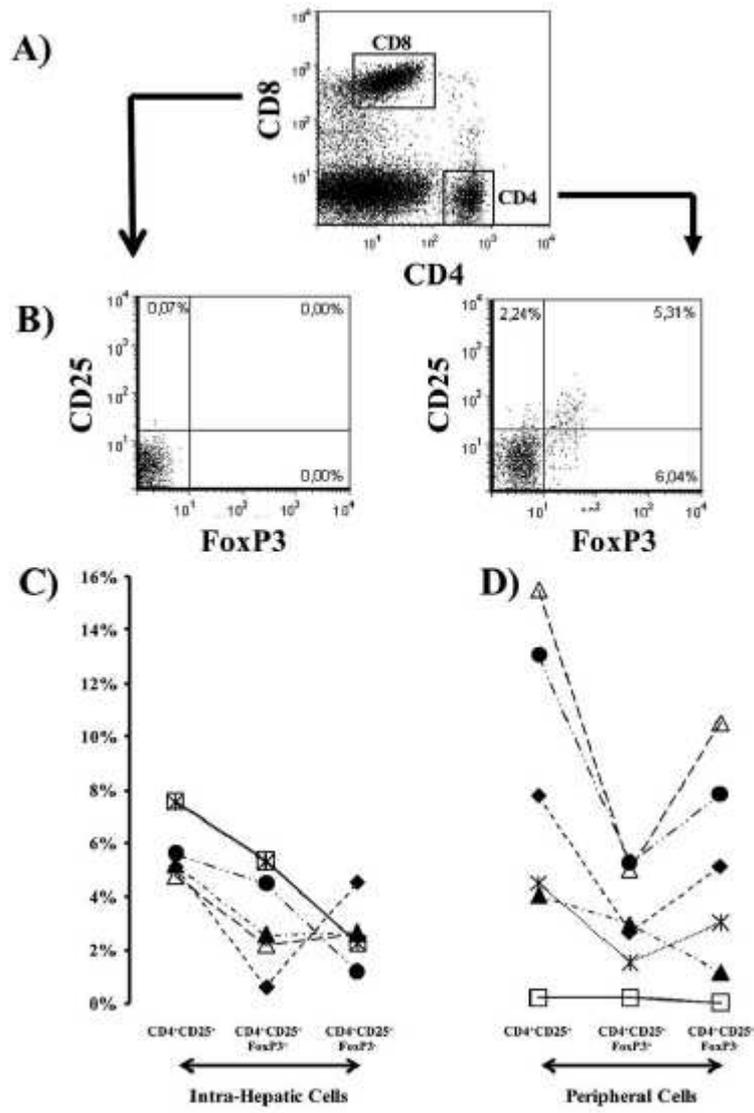
ALT: Alanine Amino Transferase

**Table 1**

<b>Genes</b>		<b>Primer Sequences</b>	<b>Product Length (nt)</b>	<b>UPL Sequences</b>
<b>CD4</b>	F	agcgaaaacaggaaagtgc	<b>72</b>	<b>tggtgatg</b>
	R	aaatcttctggagctgagtgg		
<b>CD8-β</b>	F	caggccagagaccagaa	<b>84</b>	<b>gcctgctg</b>
	R	gaaaccagcagaaccaggac		
<b>FoxP3</b>	F	acctacgccacgctcatc	<b>65</b>	<b>gctccaga</b>
	R	tcattgagtgtccgctgct		
<b>IL-10</b>	F	tgggggagaacctgaagac	<b>62</b>	<b>ggctgagg</b>
	R	acagggagaagaatc gatgaca		
<b>IFN-γ</b>	F	ggcattttgaagaattggaaag	<b>112</b>	<b>cagagcca</b>
	R	tttgatgctctggctcatctt		
<b>TGF-β</b>	F	gcagcacgtggagctgta	<b>64</b>	<b>ttctggc</b>
	R	cagccggttgctgaggta		
<b>TNF-α</b>	F	cagcctcttctccttctgat	<b>123</b>	<b>cttctgcc</b>
	R	gccagagggctgattagaga		
<b>HPRT</b>	F	gaccagtcaacaggggacat	<b>95</b>	<b>tggtggag</b>
	R	gtgtcaattatatctccacaatcaag		

F, Forward primer – R, Reverse primer

**Table 2**

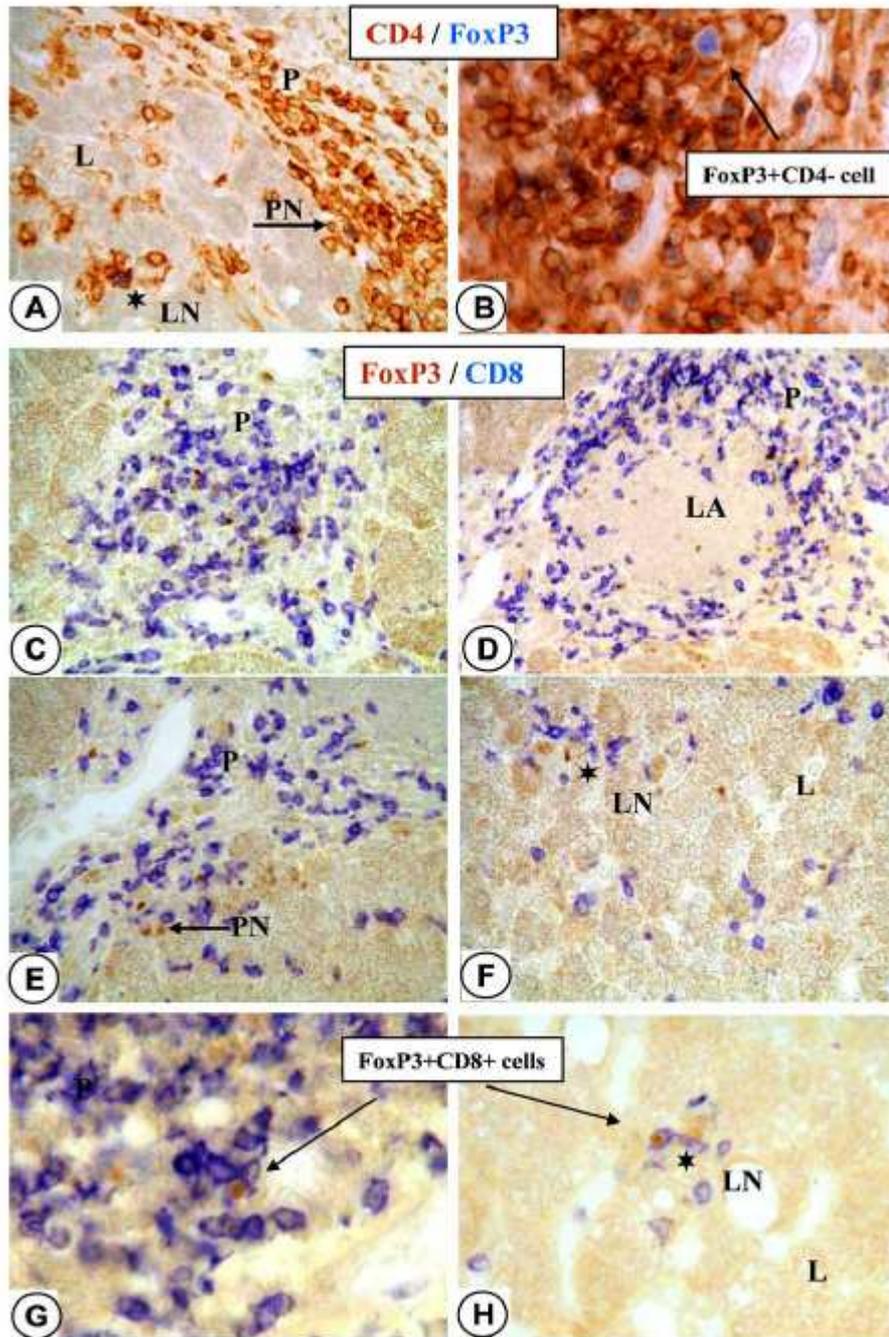


**Fig.1.**

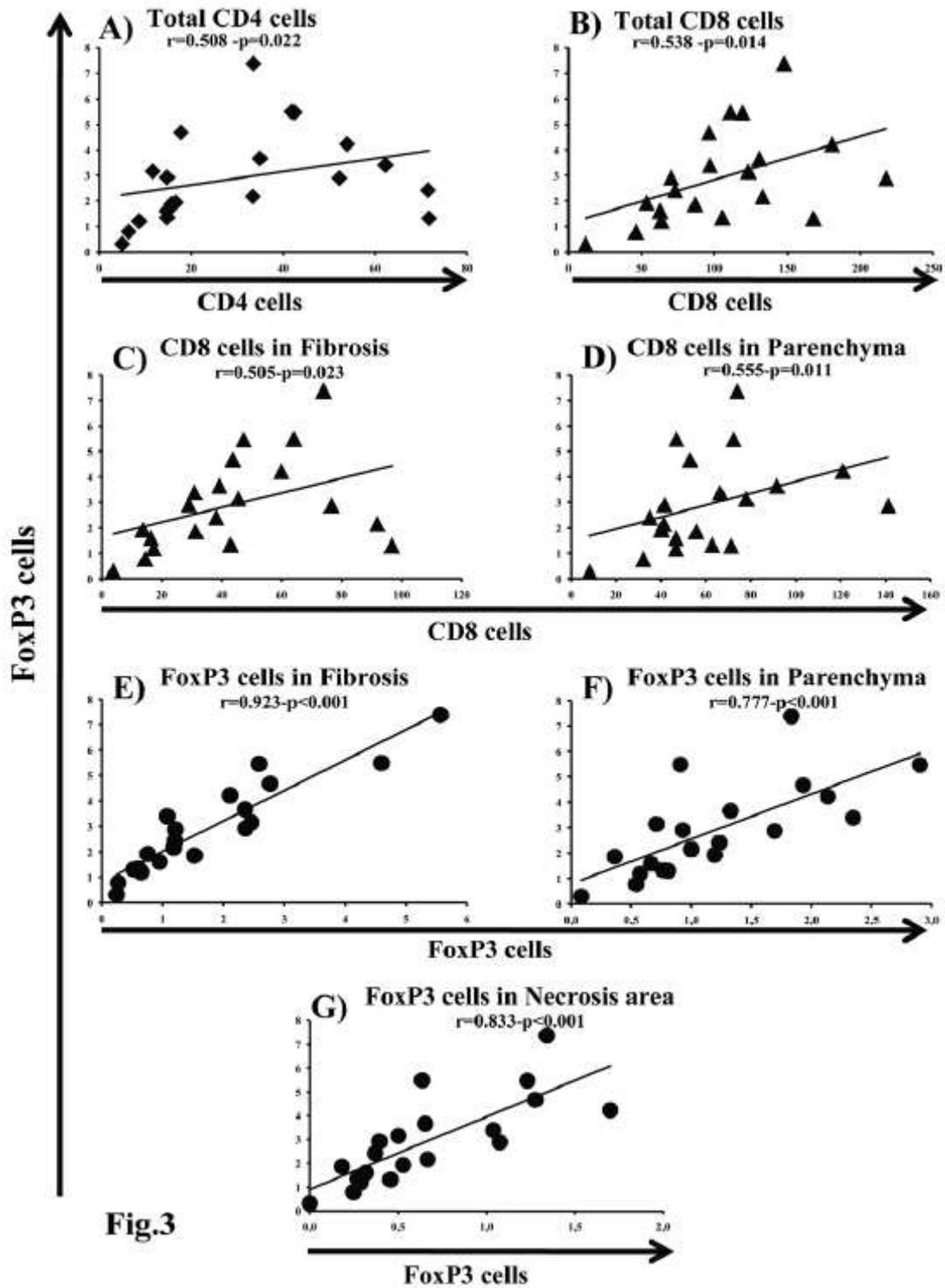
<b>Sub populations of Lymphocytes</b>	<b>Intra-Hepatic Lymphocytes* (%)</b>	<b>Peripheral Lymphocytes (%)</b>
<b>CD4<sup>+</sup> / Lymphocytes</b>	<b>17.4 ± 8.4</b>	<b>40.1 ± 14.9</b>
<b>CD8<sup>+</sup> / Lymphocytes</b>	<b>32.5 ± 5.5</b>	<b>25.6 ± 18.1</b>
<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup></b>	<b>5.9 ± 1.1</b>	<b>8.4 ± 6.1</b>
<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	<b>54.5 ± 22.7</b>	<b>45.9 ± 21.8</b>
<b>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> / Lymphocytes</b>	<b>0.6 ± 0.3</b>	<b>1.6 ± 0.8</b>

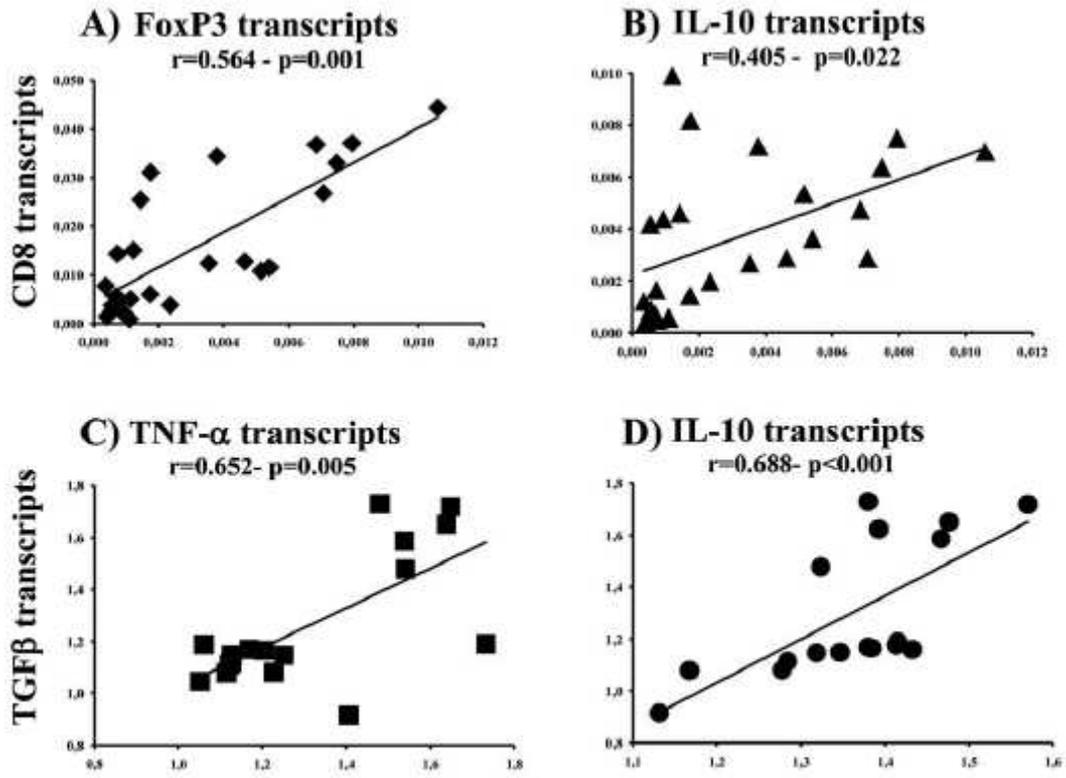
*\*Numbers indicate the % values of the mean ± standard deviation*

**Table 3**



**Fig.2**





**Fig.4.**

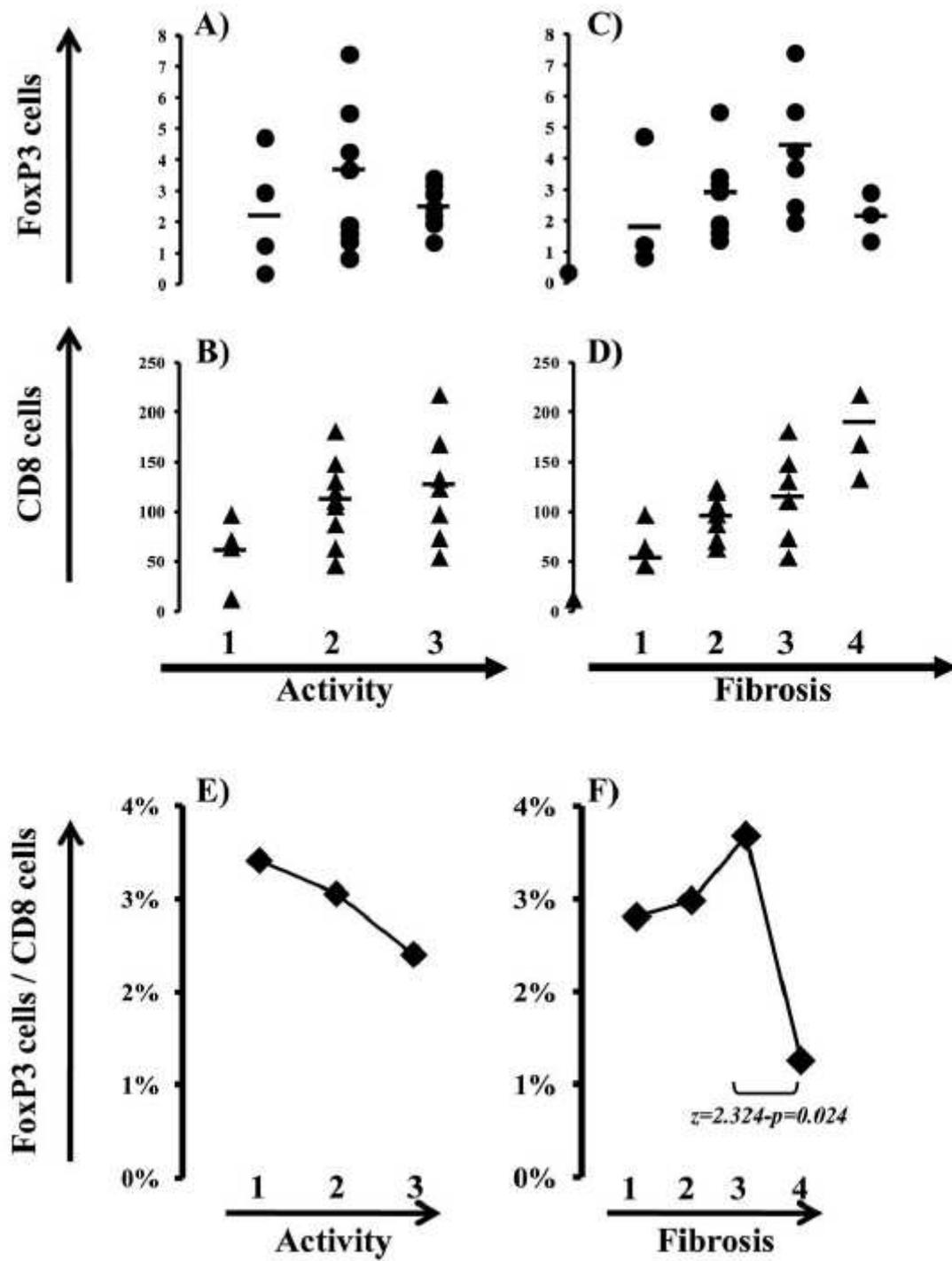


Fig.5.

## References

- [1] Barnes E, Harcourt G, Brown D, Lucas M, Phillips R, Dusheiko G, et al. The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:743-754.
- [2] He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5692-5697.
- [3] Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458.
- [4] Grabowska AM, Lechner F, Klenerman P, Tighe PJ, Ryder S, Ball JK, et al. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2388-2394.
- [5] Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-841.
- [6] Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, et al. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005;42:828-837.
- [7] Burton JR, Jr., Klarquist J, Im K, Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Castelblanco N, et al. Prospective analysis of effector and regulatory CD4+ T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy. *J Hepatol* 2008;49:329-338.
- [8] Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002;420:502-507.
- [9] Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-1071.
- [10] Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:3157-3166.
- [11] MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002;185:720-727.
- [12] McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* 2004;173:1224-1231.
- [13] Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-562.
- [14] Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
- [15] Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-1448.
- [16] Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, et al. Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 2004;20:293-303.
- [17] Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7852-7859.

- [18] Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006;212:86-98.
- [19] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-226.
- [20] Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008;82:5043-5053.
- [21] Li S, Gowans EJ, Chougnnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 2008;82:21-30.
- [22] Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-972.
- [23] Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B. Peripheral CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 2005;175:246-253.
- [24] Bonorino P, Leroy V, Dufeu-Duchesne T, Tongiani-Dashan S, Sturm N, Pernollet M, et al. Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;46:1375-1386.
- [25] Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6659-6664.
- [26] Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25:195-201.
- [27] Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3-effector memory and de novo-generated FoxP3<sup>+</sup> regulatory CD8<sup>+</sup> T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 2007;179:1039-1048.
- [28] Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol* 2002;130:518-525.
- [29] Vigan I, Jouvin-Marche E, Leroy V, Pernollet M, Tongiani-Dashan S, Borel E, et al. T lymphocytes infiltrating the liver during chronic hepatitis C infection express a broad range of T-cell receptor beta chain diversity. *J Hepatol* 2003;38:651-659.
- [30] Golden-Mason L, Kelly AM, Doherty DG, Traynor O, McEntee G, Kelly J, et al. Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development. *Clin Exp Immunol* 2004;138:94-101.
- [31] Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest* 2005;115:2904-2913.
- [32] Endharti AT, Rifa IMs, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, et al. Cutting edge: CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2005;175:7093-7097.
- [33] Noble A, Giorgini A, Leggat JA. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 2006;107:4475-4483.
- [34] Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, et al. Quantification and localisation of FOXP3<sup>+</sup> T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 2007;47:316-324.
- [35] Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006;144:188-196.

- [36] Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:708-716.
- [37] Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell Signal* 2007;19:301-311.
- [38] McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* 2000;46:260-269.
- [39] Migita K, Abiru S, Maeda Y, Daikoku M, Ohata K, Nakamura M, et al. Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2006;67:27-32.
- [40] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860-7867.
- [41] Stephens GL, Andersson J, Shevach EM. Distinct subsets of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells participate in the control of immune responses. *J Immunol* 2007;178:6901-6911.

# Discussion

La première étude présentée dans ce travail concernait les cellules NK intrahépatiques, leur phénotype et leur(s) rôle(s) au cours de la maladie. Via leur sécrétion potentielle d'IFN $\gamma$ , elles pourraient être des cellules majeures dans le contrôle immunitaire du virus lors des phases aiguës et chroniques de la maladie. Concernant cette dernière phase, un éclaircissement était nécessaire car elles pourraient en effet aussi bien contrôler le virus que promouvoir les lésions engendrées par les cellules T CD8<sup>+</sup>. Dans le cadre de l'hépatite C, nous avons trouvé une baisse générale du nombre de cellules NK, comme montré précédemment (Meier, Owen et al. 2005). Nos résultats de cytométrie ont montré une augmentation du ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> chez les patients infectés par le VHC. Les cellules CD56<sup>dim</sup>, la sous-population cytotoxique, est normalement présente à hauteur de 95% des cellules NK intrahépatiques totales. Chez les patients VHC, nous avons observé une diminution significative des cellules CD56<sup>dim</sup> à 90%. Ceci étant balancé par une augmentation du pourcentage de cellules sécrétrices de cytokines, CD56<sup>dim</sup>, à 10%. Les cellules NK cytotoxiques sont naturellement plus sensibles à l'apoptose que leur équivalent sécréteur dans une situation inflammatoire. Ceci permet d'empêcher une trop forte destruction des tissus mais aussi d'enrichir la population NK en cellules CD56<sup>bright</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> au cours de la réponse immunitaire (Schierloh, Yokobori et al. 2005). Ici, dans le cadre de l'hépatite B, aucune différence entre le nombre de cellules NK et la balance dim/bright n'a été observée ce qui signifie que ce n'est pas l'inflammation qui influence les NK mais le VHC lui-même.

Nous voudrions aussi souligner le fait que les cellules NK de patients VHC étaient plus riches en perforine que les cellules de témoin. Elles sont donc moins nombreuses mais plus cytotoxiques. La combinaison de facteurs agissant sur les NK, l'inhibition virale, les contacts cellulaires ou les cytokines sécrétées, pourraient empêcher les cellules CD56<sup>dim</sup> de se différencier en CD56<sup>bright</sup> et en conséquence, augmenter leur potentiel cytotoxique. Ces modifications pourraient à la fois avantager la destruction des cellules infectées tout comme la progression des lésions.

En s'intéressant à la densité et à la localisation des cellules NK dans le foie, nous avons pu confirmer visuellement qu'elles y étaient moins nombreuses que dans un foie sain ou un foie VHB. Dans les foies VHC, les cellules CD56<sup>+</sup> sont préférentiellement localisées dans les zones nécrotiques mais elles y sont plus nombreuses que dans un foie VHB.

L'analyse statistique nous a montré que les cellules NK CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> périphériques étaient positivement corrélées avec le score nécroinflammatoire. NKG2A est un récepteur

inhibiteur transmembranaire des NK formant un hétérodimère avec CD94, connu pour être associé à une forte résistance à l'apoptose. Autre résultat fort intéressant, nous avons trouvé une corrélation négative entre la fréquence des cellules NK CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> périphériques et la charge virale. Les cellules CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> représentant la moitié des cellules NK et le virus ayant tendance à les réprimer, la fréquence des NK CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> est très faible chez les patients ayant des charges virales élevées. Il semblerait donc que le virus cible en priorité les cellules NK CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup>, cellules capable de contrôler le virus, d'une manière encore inconnue.

Les rôles des cellules NK sont donc au moins double puisqu'une des sous-populations engendre des lésions et une autre tend à faire chuter la charge virale. Les cellules CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> lésant le foie étant plus cytotoxiques, elles doivent avoir également un pouvoir sur le contrôle du virus, même minime. Les interactions entre ces 2 populations sont donc cruciales à étudier pour pouvoir en tirer un profit thérapeutique.

Dans le deuxième article de ce travail, nous avons abordé un volet plus clinique de l'hépatite C. Nous avons voulu isoler les facteurs prétraitement capables de se montrer prédictifs de la future réponse à la thérapie. Le but était bien sur de ne cibler que les patients potentiellement répondeurs pour qui les lourds effets secondaires du traitement seront compensés par une clairance virale définitive.

Nous avons montré que le niveau d'expression d'IFN $\gamma$  dans les PBMC de malades était supérieur à celui des témoins. Ceci avait déjà été partiellement montré par la présence de la protéine dans le sérum (Amati, Caradonna et al. 2002). De plus, nous n'avons trouvé aucune différence d'expression de l'IFN $\gamma$  entre le foie et le sang des malades et de plus celles-ci corrélaient positivement entre elles. Ceci montre bien le double impact de cette cytokine sur l'immunité puisqu'elle promeut la réponse antivirale mais aussi les lésions hépatiques. L'hypothèse de recirculation des cellules T intrahépatiques (Klugewitz, Adams et al. 2004) dans la circulation périphérique s'en voit renforcée. Ceci est en effet contraire au dogme disant que le foie est un cimetière pour les cellules T activées car une fois entrées, elles meurent par apoptose induite par l'environnement hépatique.

Parmi les patients, le taux d'IFN $\gamma$  dans les PBMC était plus élevé chez ceux développant une réponse antivirale soutenue sous traitement par rapport à celui des patients non-répondeurs. Il pourrait ainsi s'avérer être un facteur prétraitement prédictif de la future réponse à la bithérapie. Comme indiqué dans l'article, il y a beaucoup de données contradictoires sur les putatifs facteurs immunitaires prédictifs d'une réponse soutenue. Parmi tous les candidats,

aucun n'émerge réellement et s'est révélé fiable à 100%. Le taux d'IFN $\gamma$  pourrait relier ensemble plusieurs de ces possibles facteurs déjà décrits comme le recrutement de cellules T et NK au niveau du foie et la force de leur réponse spécifique. Le recrutement de cellules se fait par des chémokines dont certaines, déjà identifiées comme prédatrices potentielles, sont induites par l'IFN $\gamma$ . Parmi elles, le niveau d'expression prétraitement d'IP-10 (ou CXCL10) a été montré comme inversement corrélé à une réponse antivirale soutenue sous traitement (Zeremski, Markatou et al. 2007). IP-10 peut recruter des cellules T, TNK et NK activées (Kanto and Hayashi 2006) (Yamagiwa, Matsuda et al. 2008) au niveau du foie et donc peut induire des lésions hépatiques tout comme l'élimination du virus. Sa régulation doit être très fine et si son expression est inversement corrélée à une réponse soutenue, c'est qu'il doit plutôt recruter des cellules participant aux lésions. Ceci peut paraître contradictoire avec nos résultats néanmoins il faut préciser que le récepteur d'IP-10, CXCR3, peut être induit par au moins 2 autres chémokines inductibles par l'IFN $\gamma$ , MIG (CXCL9) et I-TAC (CXCL11). Si l'expression d'I-TAC a aussi été montrée pour être inversement corrélée avec la réponse soutenue (Helbig, Ruszkiewicz et al. 2004), il a été montré que MIG, en revanche, n'était pas requis pour recruter des cellules spécifiques au virus dans le foie mais était associé au contrôle de l'inflammation (Kakimi, Lane et al. 2001). Si nous prenons ces 3 résultats de la littérature ensemble et que nous les ajoutons au notre, nous avons deux chémokines recrutant des cellules immunitaires et augmentant l'inflammation et une capable de la diminuer, toutes trois induites par l'IFN $\gamma$ , dont le taux est corrélé à la réponse au traitement. L'IFN $\gamma$  est donc capable d'induire en même temps une réponse inflammatoire intense pouvant causer d'importantes lésions hépatiques mais détruisant les cellules infectées et la suppression de cette inflammation pour contenir la réponse et éviter une réaction anarchique. L'équilibre entre ces trois chémokines pourrait donc être l'une des clés de l'induction d'une réponse antivirale rapide, forte et ne provoquant que de modestes lésions hépatiques.

Très récemment, une autre option a été évoquée dans la littérature concernant l'IFN $\gamma$  et un autre facteur prédictif, l'indice de masse corporelle (BMI) (Palmer, Hampartzoumian et al. 2008). Le lien entre ces deux phénomènes serait l'adiponectine. Elle est synthétisée par les adipocytes sous 2 formes, LMW et HMW (faible/haut poids moléculaire). Les patients ayant un fort BMI ne synthétisent que la forme LMW. Les autres, principalement la forme HMW qui peut induire la production d'IFN $\gamma$  en se liant au récepteur Adipo-1 des cellules T, TNK et NK.

Logiquement, nous avons voulu découvrir quelles étaient les cellules exprimant l'IFN $\gamma$  chez les futurs répondeurs. Normalement, l'IFN $\gamma$  est sécrété par les cellules NK, TNK, T CD4<sup>+</sup> Th1, T CD8<sup>+</sup> et les cellules dendritiques (Schroder, Hertzog et al. 2004). Nous avons dans ce travail montré que, au niveau transcriptionnel, les cellules produisant de l'IFN $\gamma$  étaient les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, ou TNK. Leur taux d'IFN $\gamma$  était largement supérieur à celui mesuré dans les autres types cellulaires.

Les cellules TNK se partagent les propriétés des cellules T et NK et sont donc à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (Schmidt, Murray et al. 1986). Une fois activées, elles peuvent produire très rapidement une grande quantité de cytokines et chémokines comme l'IFN $\gamma$ , IL4, GM-CSF, IL2 ou TNF $\alpha$ . Elles sont aussi cytotoxiques et peuvent tuer très rapidement via le granzyme, le tout sans aucune expansion préalable. Elles sont donc extrêmement intéressantes pour leur potentiel anti-VHC (Doherty, Norris et al. 1999). Mises en co-culture avec des hépatocytes infectés par la souche JFH-1 du VHC, elles sont capables d'inhiber la réplication virale par des médiateurs solubles, principalement l'IFN $\gamma$  et le crosstalk entre les IFN $\alpha$  et  $\beta$  (Ye, Wang et al. 2009). Elles sont très nombreuses dans le foie, autour de 50% des cellules T résidentes contre 5% dans le sang (Doherty and O'Farrelly 2000), et tendent à être éliminées durant l'hépatite C chronique (Kawarabayashi, Seki et al. 2000). Elles pourraient donc être le lien expliquant la baisse d'IFN $\gamma$  mesurée au cours de la maladie. Récemment leur dynamisme, tout comme celui des cellules NK, a été corrélé positivement avec une réponse au traitement (Yamagiwa, Matsuda et al. 2008), qui pourrait passer par la production d'IFN $\gamma$  en plus grandes quantités.

En représentant tout ceci, le niveau prétraitement d'IFN $\gamma$  pourrait donc bien être prédictif de la réponse au traitement et ainsi permettre une sélection plus fine des malades à traiter. De plus, un ajout d'IFN $\gamma$  à la bithérapie pourrait engendrer de nombreux bénéfices aux patients. Enfin, les cellules TNK sont devenues une cible d'étude prioritaire pour la mise au point de futurs traitements.

La troisième et majeure partie de mon étude s'est attardée sur les changements de comportements des cellules T durant le traitement. Durant ma thèse, j'ai pu lire de très nombreuses publications traitant des possibles rôles de la bithérapie sur l'immunité anti-VHC. Avec le recul, je me rends compte que l'énorme majorité s'est basée sur la résolution naturelle de la maladie en phase aiguë pour la comparer à celle obtenue grâce au traitement en phase chronique. La résolution naturelle semble être un cas d'école d'immunité antivirale : capture

des virus par les cellules présentatrices d'antigène et présentation aux cellules T qui activent les cellules cytotoxiques, mécanisme très dépendant de l'IFN $\gamma$  (Wegert, La Monica et al. 2009). Le bémol que je me permettrais d'ajouter, est que la résolution induite par le traitement est probablement liée à des mécanismes différents. Elle est totalement artificielle et met certainement en jeu des événements qui ne se produisent nulle part ailleurs ou sous aucune autre condition.

Le principal résultat de mon étude sur les patients du protocole Gammatri est que l'immunité adaptative n'est pas activée ou améliorée par le traitement et qu'elle revient à son niveau prétraitement qu'au bout de 6 mois post-traitement. Ces résultats ont aussi été trouvés par d'autres (Burton, Klarquist et al. 2008) et de manière plus originale, l'IFN $\alpha$  a même été montré comme inhibant complètement la réponse T induite par un vaccin anti-VHC chez le singe vert Africain (Park, Lee et al. 2008). La ribavirine semble être la molécule suppressive du duo puisqu'elle inhibe le peu de cytokines induites par l'IFN $\alpha$  et même l'expression de gènes que ce dernier normalement induit comme MxA. Ceci, mis en parallèle avec un résultat précédent postulant que le taux de MxA était inversement corrélé avec une réponse soutenue (MacQuillan, de Boer et al. 2002), nous permet de peut être mettre en lumière un impact réel de la ribavirine. La principale difficulté lors de l'étude de l'impact de la ribavirine et de l'IFN $\alpha$  sur le système immunitaire est que ces 2 molécules ensemble semblent avoir des propriétés qu'elles n'ont pas séparément et qui sont encore inconnues.

Pris ensemble, nos résultats permettent de dégager 3 hypothèses. La première met en lumière le rôle capital des cellules TNK lors des tous premiers instants de la thérapie. En effet, celles-ci semblent être le premier et seul réservoir d'IFN $\gamma$  mobilisable lors des premières prises du traitement. *In vitro*, le traitement agit sur elles en stimulant leur production d'IFN $\gamma$  dès 6h de culture. Elles sont d'ailleurs les seules cellules à y répondre positivement, les autres étant plutôt anergisées. Elles pourraient expliquer la première chute de charge virale observée après injection d'IFN $\alpha$ . En effet, l'IFN $\gamma$  est capable de réduire l'expression de la claudine-1 au niveau des jonctions serrées des hépatocytes et ainsi empêcher le virus d'entrer (Tedelind, Ericson et al. 2003). Leur disparition très rapide (elles ont quasiment disparu après 6j de culture) pourrait expliquer plusieurs phénomènes observés. Le premier est que la deuxième chute de charge virale est plus faible que la première, et le deuxième est que les niveaux d'IFN $\gamma$  durant la phase chronique diminuent jusqu'à devenir indétectables. L'immunité antivirale étant dépendante des cytokines de profil Th1, notamment l'IFN $\gamma$ , la disparition des cellules productrices aura de très grandes conséquences en aval puisque tous les effecteurs

cellulaires ne seront plus mobilisés ou activés de manière adéquate et il en résultera une réponse immune totalement inefficace. La bithérapie agit uniquement lors des premières semaines de traitement, jusqu'à ce que le pool de cellules TNK se tarisse. Passé ce délai, il n'est d'aucun secours et la charge virale décolle à nouveau.

La 2<sup>ème</sup> hypothèse serait que les molécules du traitement agissent sur une multitude de mécanismes T indépendants et accessoirement stimulent les cellules TNK. L'activation de ces dernières ne serait donc pas l'évènement majeur participant à la clairance virale, mais pouvant néanmoins y participer. L'effet majeur du traitement pourrait être d'être immunosuppresseur. En empêchant les cellules T d'agir, il permettrait à d'autres mécanismes, peut être totalement T indépendant, de s'activer. De plus en plus d'études décrivent le rôle crucial des lipides dans le cycle du VHC au niveau de l'entrée, de la réplication et de l'excrétion. Un des ISG, la vipérine, pourrait jouer un rôle très important dans la pathologie et sa résolution (Wang, Hinson et al. 2007) (Helbig, Lau et al. 2005). Le VHC a besoin de lipides pour survivre et se multiplier, or ceux-ci doivent être disposés de manière très spécifique sur des radeaux lipidiques. La vipérine agirait à ce niveau là en perturbant la mise en place et l'organisation de ces radeaux. Se faisant, elle pourrait bloquer le virus lors de l'entrée en rendant CD81 inaccessible, en perturbant les radeaux de la membrane du réticulum endoplasmique et ainsi entraver l'activité du complexe de réplication ou enfin empêcher les virions de sortir de la cellule.

L'autre possibilité est que l'IFN $\alpha$  agisse sur les hépatocytes directement tandis que la ribavirine est immunosuppressive. Plus précisément, l'IFN $\alpha$  induirait la voie antivirale des hépatocytes, incluant l'augmentation de l'expression des molécules HLA à leur surface, en induisant MxA, OAS2 ou encore PKR (Hiraga, Imamura et al. 2009). En temps normal, il se peut que les cellules T tuent les cellules hépatiques avant que celles-ci n'aient pu mettre en place leur activité antivirale et ainsi promouvoir une immunité beaucoup moins spécifique et efficace. La ribavirine agirait à ce niveau-ci, en ralentissant considérablement l'immunité des cellules T, les cellules hépatiques auraient alors tout le temps nécessaire pour enclencher une réaction propre et présenter leurs antigènes de manière plus efficace et ainsi promouvoir une immunité plus fine et précise, minimisant les dommages hépatiques collatéraux.

Enfin, la dernière hypothèse serait un mélange des 2 premières. Par le biais des cellules TNK stimulées par l'IFN $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  permettrait d'induire simultanément la défense antivirale des hépatocytes, d'induire l'expression de vipérine ce qui pourrait contraindre les virions à rester enfermés dans les cellules hôtes. La ribavirine, en diminuant la réponse T empêcherait les

cellules T cytotoxiques de crever ses pépinières de virions et ainsi de libérer d'un seul coup de grandes quantités de virus dans le milieu extracellulaire. On peut facilement imaginer un nettoyage des hépatocytes contaminés par des macrophages stimulés par les  $IFN\alpha$  et  $\gamma$  et recrutés correctement par les hépatocytes qui auront eu le temps nécessaire de se signaler en tant que cellules infectées.

Enfin, la dernière partie de mon travail s'est attachée à vérifier l'hypothèse disant que la suppression induite par le traitement pouvait passer par une activation des cellules TReg. Premièrement, beaucoup d'études sur les TReg les ont identifiées comme étant  $CD3^+CD4^+CD25^+$  uniquement. Ceci ajoute un biais potentiel dans les résultats puisqu'il s'agit aussi du phénotype des cellules T  $CD4^+$  activées. Pour affiner leur détection, nous avons ajouté le marquage intracellulaire FoxP3 aux 3 précédents ce qui a réduit leur nombre de 50% dans le foie. De plus, contrairement à une étude précédente (Billerbeck, Nakamoto et al. 2009), nous n'avons pas pu identifier de cellules  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$  dans le sang ni dans le foie. Ceci en revanche pourrait confirmer leur rareté ou que FoxP3 dans ces cellules ne s'exprime que très peu de temps et que celles-ci sont *de facto* très dures à isoler en cytométrie ou simplement que l'environnement hépatique ne se prête pas à leur survie. Concernant leur localisation, nous confirmons une étude précédente les ayant trouvés dans les agrégats lymphoïdes hépatiques, le tractus portal et septal ainsi que dans les nodules et lobules parenchymateux (Ward, Fox et al. 2007). Ce que nous rajoutons à cette étude est que ces cellules TReg se retrouvent aussi dans les zones nécrotiques fragmentaires (« piecemeal ») et lobulaires et en majorité en contact direct avec les cellules T  $CD8^+$ . Ce dernier résultat donne aux TReg le potentiel d'inhiber directement les cellules T  $CD8^+$  au niveau du site de formation des lésions hépatiques. De plus, en étant situées dans le tractus portal, porte d'entrée du foie, les cellules T activées, non-activées, spécifiques du virus ou non ont de grandes chances d'entrer en contact avec elles avant d'arriver aux sites d'inflammation hépatiques.

Nous avons voulu ensuite savoir si la prolifération et la présence des cellules TReg et  $CD8^+$  était dirigée par la présence de cytokines dans leur microenvironnement direct. Nous avons plusieurs corrélations positives avec l'IL10, le  $TGF\beta$ , le  $TNF\alpha$  et l' $IFN\gamma$ . Techniquement, nous n'avons pas pu déterminer quel type de cellule produisait quoi. Le  $TGF\beta$  est connu pour promouvoir la survie et les fonctions des TReg mais aussi la mise en place de la fibrose (Gavin, Torgerson et al. 2006). En addition à l'IL10, ces molécules sont connues pour inhiber la prolifération et les fonctions des cellules T  $CD8^+$  (Uraushihara, Kanai et al. 2003). On peut décemment soutenir l'hypothèse que ces 2 molécules contribuent à garder un pool de TReg

suffisant au niveau du foie pour contenir la réponse T CD8<sup>+</sup> et l'inflammation. Les rôles du TNF $\alpha$  sont double. Il peut en même temps agir très tôt dans le processus de formation des lésions hépatiques mais est aussi impliqué dans le processus de guérison par fibrogénèse (Migita, Abiru et al. 2006). L'IFN $\gamma$  quant à lui, outre ses propriétés antivirales bien connues, peut être inhibé par les TReg quand il est produit par des effecteurs T CD4<sup>+</sup> spécifiques de la protéine core du virus ainsi que par les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques du virus. Ceci permet d'avancer l'hypothèse que les TReg ont un rôle bien précis, celui de limiter les lésions hépatiques, par contact direct avec les cellules T CD8<sup>+</sup>, mais que le virus les utilise pour inhiber les cellules qui lui sont spécifiques. Ce contrôle des dommages est néanmoins limité, car passé un certain grade de fibrose (Metavir-F3), si le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> infiltrant le foie continue d'augmenter, celui des TReg en revanche chute très rapidement. Ceci pourrait augmenter les capacités cytotoxiques des effecteurs T CD8<sup>+</sup> et ainsi expliquer l'accélération des lésions hépatiques vers la cirrhose. Enfin, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre le nombre de TReg et la charge virale ce qui tend à indiquer que les TReg ne jouent qu'un seul rôle dans le foie, celui de limiter l'expansion des lésions.

A mes yeux, l'avenir du traitement de l'hépatite C est de se diriger vers une multithérapie, à l'instar de celles utilisées pour traiter les infections par le VIH. Le virus mutant tellement rapidement, il est nécessaire de l'attaquer sur tous les fronts simultanément et notamment en plus par des anti-protéases et des anti-polymérase. Il y a évidemment un risque d'induire des souches multirésistantes mais, si l'on regarde ce qu'il se passe pour le VIH, à part de très rares cas, il est toujours possible de contenir le virus en variant les molécules employées. Parmi les questions restées en suspens, il y a celle de l'effet réel de la thérapie sur le virus. Est-ce une inhibition, comme la trithérapie et le VIH, ou une éradication complète ? Faut-il risquer de perdre du capital hépatique afin d'éliminer le virus ou au contraire préserver l'organe et seulement le maîtriser ? Comment obtenir les avantages des 2 options ?

## Conclusions générales et perspectives

Les objectifs de ce travail ont été d'étudier un panel varié de populations cellulaires périphériques et intrahépatiques au cours de l'hépatite C chronique afin notamment d'évaluer les impacts causés par le traitement. Nous avons étudié finement les populations de cellules NK qui sont connues pour avoir certainement un rôle important dans la pathologie ainsi que des propriétés antivirales. Nous avons aussi étudié des facteurs immunitaires avant traitement potentiellement capables de nous indiquer quels malades répondront favorablement à la thérapie et quelles cellules produisaient de l'IFN $\gamma$  en phase prétraitement. Nous avons étudié de nombreux paramètres immunologiques durant toutes les phases d'un traitement, avant, pendant et 6 mois après, afin de pouvoir conclure sur les effets immunologiques de la bithérapie IFN $\alpha$  plus ribavirine. Enfin nous avons voulu caractériser et élucider la localisation et les rôles exacts des cellules T régulatrices périphériques et intrahépatiques au cours de l'hépatite C.

Afin d'atteindre les buts que nous nous étions fixés, nous avons utilisé un panel de technologies différentes. Nous avons étudié les phénotypes des cellules par cytométrie de flux en 4 couleurs, mesuré l'expression d'une grande variété de gènes d'intérêt par RT-PCR, mesuré la sécrétion d'IFN $\gamma$  spécifique du virus par elispot et enfin la sécrétion d'un panel de 6 cytokines de profil Th1 par CBA. Nous avons travaillé en étroite collaboration avec le département d'hépatogastroentérologie du CHU de Grenoble qui nous a fourni les échantillons sanguins et les biopsies hépatiques dont nous avons besoin.

Nous avons tout d'abord étudié les populations NK intrahépatiques et périphériques ainsi que les corrélations entre leurs fréquences, leur phénotype et les paramètres cliniques. Cette étude a été réalisée sur des malades chroniques d'hépatite C, mais aussi des témoins sains et atteints d'hépatite B chronique afin d'en extraire les impacts virus-spécifiques. Nous avons trouvé une augmentation du ratio NK cytotoxiques/NK sécrétrices lors de l'hépatite virale C. Nous avons pu mettre en lumière 2 sous-population particulières de NK, l'une associée au contrôle du virus, CD3 $^-$ CD56 $^{dim}$ NKG2A $^+$ , et l'autre *a contrario* associée aux lésions hépatiques, CD3 $^-$ CD56 $^{bright}$ NKG23A $^+$ .

Notre étude sur les facteurs prétraitement prédictifs de la réponse thérapeutique a permis de déterminer que le taux basal d'expression de l'IFN $\gamma$  comme était corrélé positivement à la réponse au traitement. De plus, il est significativement plus élevé chez les malades chroniques

que chez les contrôles sains. Nous avons voulu ensuite savoir dans quel type cellulaire il était exprimé chez les futurs répondeurs. Nous en avons conclu que les cellules productrices d'IFN $\gamma$  avant thérapie étaient les lymphocytes TNK.

Nous avons ensuite suivi la réponse immunitaire T au cours du traitement contre l'hépatite C. Nous avons mesuré l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> via l'expression du récepteur CD25 (IL-2R $\alpha$ ), leur sécrétion d'IFN $\gamma$  en présence de peptides viraux par le biais de la technique de l'elispot, l'expression des gènes antiviraux induits par les IFNs par RT-PCR et les évolutions de leur phénotype, en plus de celui des cellules NK, par cytométrie en flux. Pour se faire, nous avons eu accès à une cohorte de malades issus d'un essai clinique financé par l'ANRS en collaboration avec le département d'hépatogastroentérologie du CHU de Grenoble, le projet Gammatri. Celui-ci consistait en l'évaluation de l'impact de l'ajout d'IFN $\gamma$  en injection pour des patients non-répondeurs à la thérapie classique. Nous avons pu avoir des prélèvements sanguins réguliers des malades avant, pendant les 48 semaines de traitement et après un suivi à la semaine 72, d'où nous avons extrait les cellules mononuclées. Nous avons déduit de cette étude que le traitement n'augmentait pas ni n'améliorait la réponse immunitaire spécifique au VHC. Au contraire, il semble l'annuler, certainement pour laisser le temps à d'éventuels mécanismes indépendants des cellules de l'immunité adaptative de se mettre en fonction. Nous avons également mis au point un système de culture de lymphocytes en présence de protéines virales permettant de mesurer l'impact direct de molécules sur la réponse spécifique au virus. Ce système a été utilisé sur des cellules de malades non traités, mises en présence d'IFN $\alpha$  et de ribavirine à des doses proches des doses reçues in vivo lors du traitement par les cellules intrahépatiques. Dans ce cadre là, les techniques de PCR, de cytométrie en flux et d'elispot nous ont permis d'observer les modifications cellulaires induites par les molécules ajoutées. En étudiant les effets de l'IFN $\alpha$  et de la ribavirine sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et les cellules NK et TNK. Nous avons pu montrer que le traitement régulait négativement toutes les populations cellulaires testées à l'exception des cellules TNK, et ce seulement au tout début de la culture.

Enfin, nous avons étudié les lymphocytes T régulateurs (TReg) pour déterminer leur localisation et leurs rôles durant la maladie. Il s'est avéré que les TReg n'influençaient pas la charge virale, donc à priori n'inhibaient pas les cellules effectrices spécifiques du virus. En revanche, ils sont colocalisés dans les infiltrats hépatiques CD8<sup>+</sup> et participent à la protection du foie des lésions en inhibant les cellules cytotoxiques par contact direct. Ceci ne dure

néanmoins pas très longtemps puisqu'au-delà d'un certain état de fibrose (>Metavir A2/F3), les TReg n'ont plus aucun contrôle sur les lésions hépatiques, ce qui pourrait être l'une des causes de l'apparition de la cirrhose.

Pour conclure, l'influence du virus sur l'immunité de son hôte est extrêmement complexe et fait intervenir un très grand nombre de facteurs. De notre étude, il en est ressorti que les cellules ayant le plus de potentiel dans le contrôle du virus, et donc qui devraient être prioritairement ciblées par les futures thérapies, sont les cellules NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup>, corrélées négativement avec la charge virale, et les lymphocytes TNK, étant les seuls à répondre positivement à la thérapie par une sécrétion d'IFN $\gamma$ . De plus, il serait nécessaire d'entretenir l'activité des cellules TReg intrahépatiques au-delà du stade A2/F3 pour empêcher la formation de lésions cirrhotiques menant au cancer du foie. Enfin, la mesure du taux d'expression de l'IFN $\gamma$  avant traitement pourrait être un bon prédicteur de la réponse thérapeutique et ainsi permettre de mieux prendre en charge les malades.

Au cours des prochaines études de notre équipe, il serait très intéressant de réaliser l'étude TReg que nous avons conduit en prenant comme variable le traitement. Nous pourrions répondre alors à une question restée en suspens, à savoir le rôle du traitement sur les TReg dans l'inhibition des cellules T. De plus, une étude très poussée des cellules TNK me semble nécessaire aux vues du potentiel de ces cellules à inhiber le VHC via leur sécrétion d'IFN $\gamma$ . Enfin, une étude par immunofluorescence de la vipérine dans les hépatocytes de patients infectés par le virus préincubés avec les molécules du traitement ou d'autres telle l'IFN $\gamma$ , associée à une mesure de la charge virale dans le surnageant, pourrait donner des résultats très intéressants. En réalisant un marquage simultané des radeaux lipidiques, des portes d'entrée du virus et de la vipérine, si une colocalisation est montrée ainsi qu'une détection très faible de virus dans le surnageant, nous auront, à mon humble avis, aider à comprendre l'impact du traitement dans l'éradication du VHC.

## Schéma récapitulatif de l'ensemble du travail

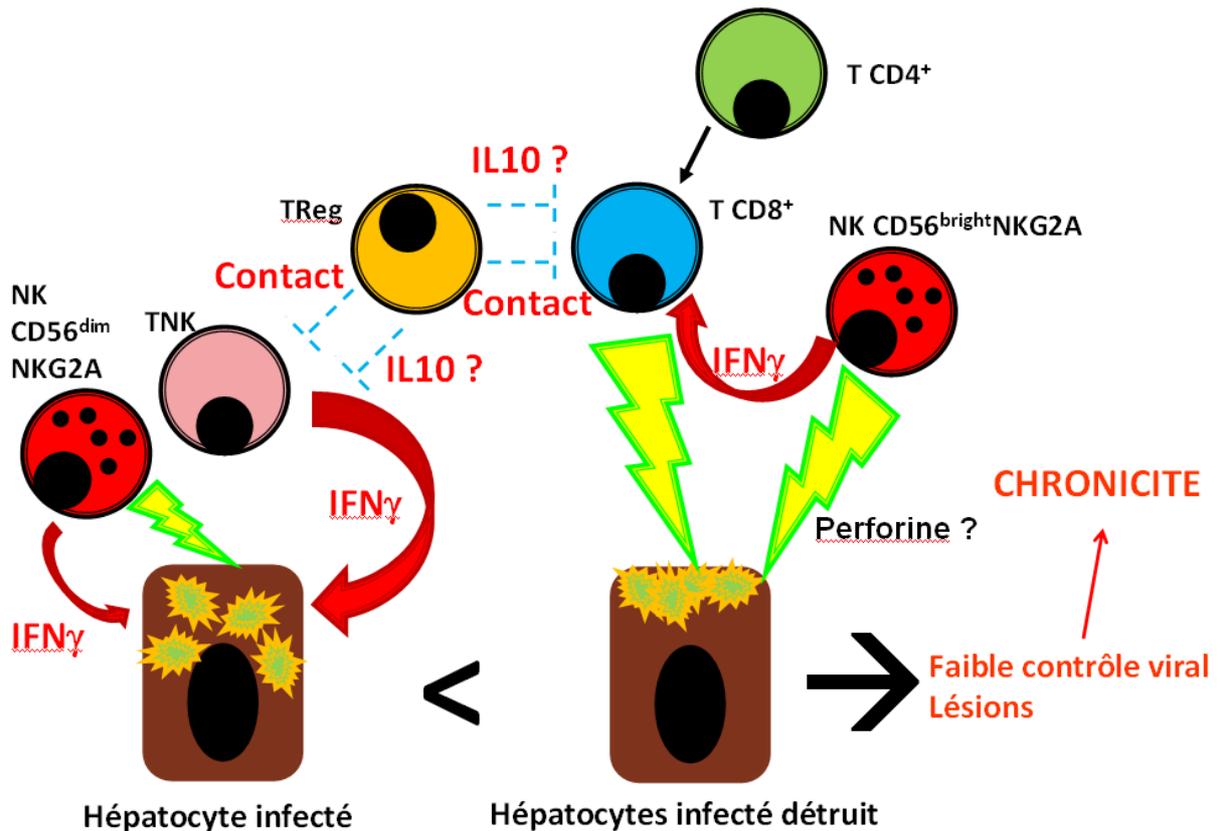


Fig.13 : Mécanisme proposé expliquant la chronicité

Nous postulons que la balance entre le contrôle viral par le système immunitaire via l'IFN $\gamma$  et les lésions hépatiques dues à la cytotoxicité serait une des clés de l'issue de la maladie. Lors de la phase chronique (fig.13), cette balance penche du côté cytotoxique puisque les principaux effecteurs du contrôle viral, les cellules NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A et les cellules TNK, vont être respectivement modulées et éliminées par le virus. En revanche, le côté cytotoxique lui, va être supporté par la présence de cellules T de moins en moins spécifiques du VHC, par l'inflammation constante ainsi que par la présence de cellules NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A. Les lymphocytes T régulateurs ont encore un rôle ambigu car ils pourraient très bien par contact direct et/ou sécrétion d'IL10 inhiber à la fois les TNK et les cellules T effectrices. Leur mode d'action doit peser relativement lourd dans l'équilibre de cette balance.

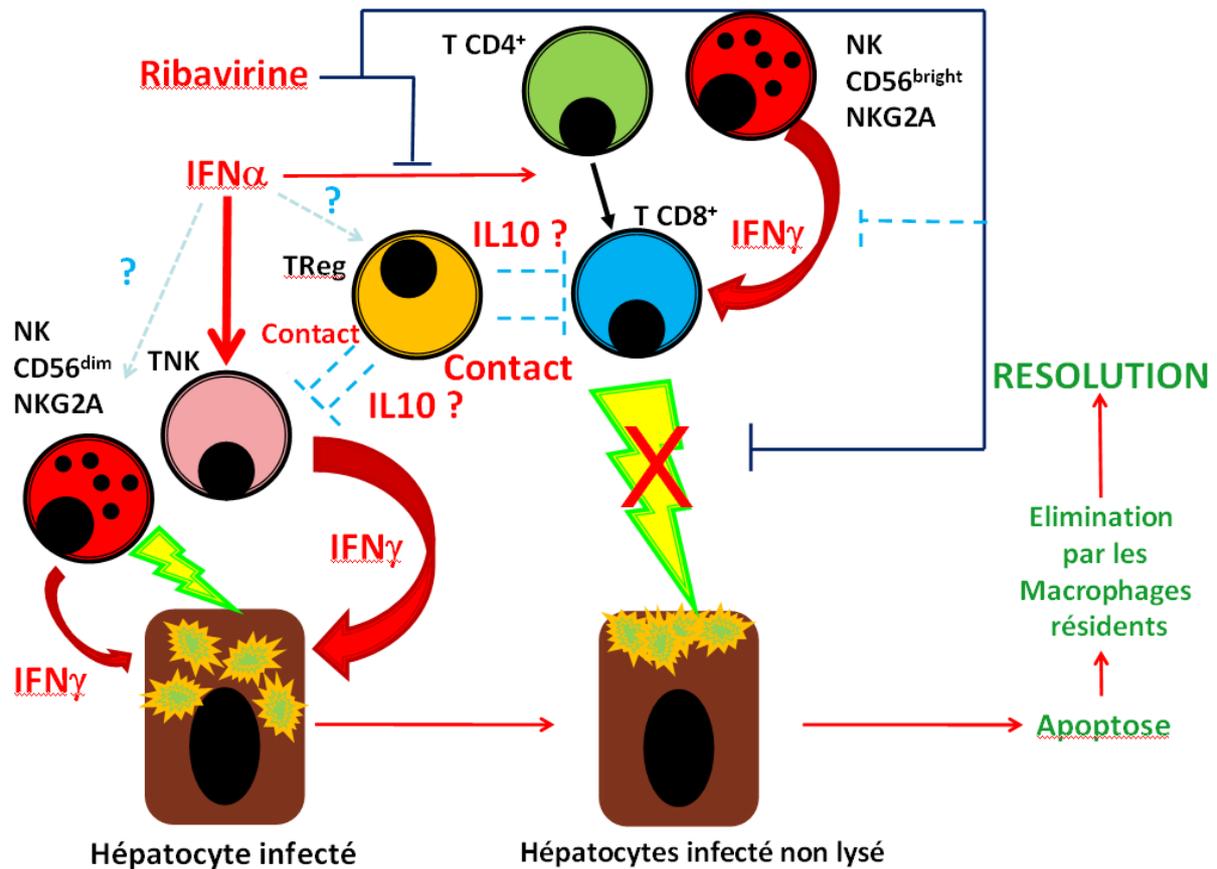


Fig.14 : Mécanisme proposé expliquant l'action du traitement

Lors de la prise du traitement (fig.14), l'IFN $\alpha$  va supporter la production d'IFN $\gamma$  des cellules TNK, et peut être aussi des cellules NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NGK2A, et ainsi améliorer le contrôle viral. Néanmoins, il pourrait aussi promouvoir les lésions hépatiques en agissant sur les cellules T effectrices et les NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NGK2A. A ce stade, la ribavirine entre en jeu puisqu'elle nous a paru être une molécule suppressive. Elles pourraient rendre les cellules T totalement anergiques ou non réceptives aux stimulations et ainsi protéger le foie des lésions. La balance pencherait donc cette fois du côté du contrôle du virus. Les hépatocytes infectés ne seraient plus lysés par cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> mais entreraient en apoptose et seraient alors éliminés proprement par les macrophages résidant dans le foie. Quant aux cellules T régulatrices et NK, l'impact du traitement sur celles-ci reste encore à élucider. La clé du succès thérapeutique serait donc d'empêcher la destruction directe des hépatocytes infectés et de promouvoir les voies innées d'élimination telles que les macrophages.

# Bibliographie

- Abayli, B., A. Canataroglu, et al. (2003). "Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection." Turk J Gastroenterol **14**(1): 7-11.
- Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12766-71.
- Aizaki, H., K. J. Lee, et al. (2004). "Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts." Virology **324**(2): 450-61.
- Ali, N., G. J. Pruijn, et al. (2000). "Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation." J Biol Chem **275**(36): 27531-40.
- Amati, L., L. Caradonna, et al. (2002). "Modifications of the immune responsiveness in patients with hepatitis C virus infection following treatment with IFN-alpha/ribavirin." Curr Pharm Des **8**(11): 981-93.
- Andre, P., G. Perlemuter, et al. (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." Semin Liver Dis **25**(1): 93-104.
- Anwar, A., N. Ali, et al. (2000). "Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation." J Biol Chem **275**(44): 34231-5.
- Badr, G., N. Bedard, et al. (2008). "Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells." J Virol **82**(20): 10017-31.
- Barba, G., F. Harper, et al. (1997). "Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1200-5.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." Nature **439**(7077): 682-7.
- Barnes, E., H. C. Gelderblom, et al. (2009). "Cellular Immune Responses during High-Dose Interferon-alpha Induction Therapy for Hepatitis C Virus Infection." J Infect Dis.
- Barnes, E., H. C. Gelderblom, et al. (2009). "Cellular Immune Responses during High-Dose Interferon-alpha Induction Therapy for Hepatitis C Virus Infection." J Infect Dis **199**(6): 819-828.
- Barnes, E., M. Salio, et al. (2004). "Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic cells." Antimicrob Agents Chemother **48**(9): 3382-9.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, et al. (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." J Virol **68**(8): 5045-55.
- Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res **63**: 71-180.
- Barth, H., C. Schafer, et al. (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." J Biol Chem **278**(42): 41003-12.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, et al. (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.
- Behrens, S. E., L. Tomei, et al. (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." EMBO J **15**(1): 12-22.
- Belz, G. T., J. D. Altman, et al. (1998). "Characteristics of virus-specific CD8(+) T cells in the liver during the control and resolution phases of influenza pneumonia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13812-7.
- Billerbeck, E., H. E. Blum, et al. (2007). "Parallel expansion of human virus-specific FoxP3-effector memory and de novo-generated FoxP3+ regulatory CD8+ T cells upon antigen recognition in vitro." J Immunol **179**(2): 1039-48.

- Billerbeck, E., N. Nakamoto, et al. (2009). "Determinants of in vitro expansion of different human virus-specific FoxP3+ regulatory CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection." *J Gen Virol* **90**(Pt 7): 1692-701.
- Binder, M., G. Kochs, et al. (2007). "Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy." *Hepatology* **46**(5): 1365-74.
- Blackard, J. T., F. Komurian-Pradel, et al. (2006). "Intrahepatic cytokine expression is downregulated during HCV/HIV co-infection." *J Med Virol* **78**(2): 202-7.
- Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." *J Virol* **80**(14): 6964-72.
- Bono, P., M. Salmi, et al. (1998). "Cloning and characterization of mouse vascular adhesion protein-1 reveals a novel molecule with enzymatic activity." *J Immunol* **160**(11): 5563-71.
- Bonorino, P., V. Leroy, et al. (2007). "Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C." *Hepatology* **46**(5): 1375-86.
- Bonorino, P., M. Ramzan, et al. (2009). "Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C." *J Hepatol* **51**(3): 458-67.
- Branch, A. D., D. D. Stump, et al. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin Liver Dis* **25**(1): 105-17.
- Brown, J. A., D. M. Dorfman, et al. (2003). "Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production." *J Immunol* **170**(3): 1257-66.
- Bukh, J., R. H. Miller, et al. (1995). "Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus." *Princess Takamatsu Symp* **25**: 75-91.
- Burton, J. R., Jr., J. Klarquist, et al. (2008). "Prospective analysis of effector and regulatory CD4+ T cells in chronic HCV patients undergoing combination antiviral therapy." *J Hepatol* **49**(3): 329-38.
- Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, et al. (1996). "Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa." *Hepatology* **24**(1): 6-9.
- Castelain, S., D. Bonte, et al. (2007). "Hepatitis C Virus p7 membrane protein quasispecies variability in chronically infected patients treated with interferon and ribavirin, with or without amantadine." *J Med Virol* **79**(2): 144-54.
- Castillo, I., E. Rodriguez-Inigo, et al. (2005). "Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection." *Gut* **54**(5): 682-5.
- Catanese, M. T., R. Graziani, et al. (2007). "High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein." *J Virol* **81**(15): 8063-71.
- Chang, K. S., J. Jiang, et al. (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." *J Virol* **81**(24): 13783-93.
- Chang, M. L., C. W. Hsu, et al. (2008). "Dense packing of portal lymphocytes predicts favorable treatment outcome in hepatitis C." *Hepatology* **55**(86-87): 1716-20.
- Chen, R., L. Lowe, et al. (1999). "Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology." *Clin Chem* **45**(9): 1693-1694.

- Chen, X. M. (2009). "MicroRNA signatures in liver diseases." World J Gastroenterol **15**(14): 1665-72.
- Chevaliez, S., R. Brillet, et al. (2007). "Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection." J Virol **81**(14): 7732-41.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-62.
- Cocquerel, L., A. Op de Beeck, et al. (2002). "Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins." EMBO J **21**(12): 2893-902.
- Connelly, M. A. and D. L. Williams (2004). "Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids." Curr Opin Lipidol **15**(3): 287-95.
- Coquillard, G. and B. K. Patterson (2009). "Determination of hepatitis C virus-infected, monocyte lineage reservoirs in individuals with or without HIV coinfection." J Infect Dis **200**(6): 947-54.
- Crispe, I. N. (1994). "Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells." Immunity **1**(5): 347-9.
- Crispe, I. N. and L. Huang (1994). "Neonatal, moribund and undead T cells: the role of the liver in T cell development." Semin Immunol **6**(1): 39-41.
- Dai, C. Y., W. L. Chuang, et al. (2005). "Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon-alpha and ribavirin." Antiviral Res **67**(2): 93-7.
- Dai, C. Y., W. L. Chuang, et al. (2006). "Tumor necrosis factor- alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection." J Infect Dis **193**(1): 98-101.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, et al. (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." J Virol **71**(1): 697-704.
- Della Bella, S., A. Crosignani, et al. (2007). "Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection." Immunology **121**(2): 283-92.
- Deng, L., M. Nagano-Fujii, et al. (2006). "NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner." J Gen Virol **87**(Pt 6): 1703-13.
- Diago, M., G. Castellano, et al. (2006). "Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C." Gut **55**(3): 374-9.
- Dienstag, J. L. and J. G. McHutchison (2006). "American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C." Gastroenterology **130**(1): 231-64; quiz 214-7.
- Doherty, D. G., S. Norris, et al. (1999). "The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns." J Immunol **163**(4): 2314-21.
- Doherty, D. G. and C. O'Farrelly (2000). "Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver." Immunol Rev **174**: 5-20.
- Drummer, H. E., I. Boo, et al. (2006). "A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry." J Virol **80**(16): 7844-53.
- Dubuisson, J. (2007). "Hepatitis C virus proteins." World J Gastroenterol **13**(17): 2406-15.
- Dubuisson, J., F. Penin, et al. (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." Trends Cell Biol **12**(11): 517-23.

- Duong, F. H., M. Filipowicz, et al. (2004). "Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A." *Gastroenterology* **126**(1): 263-77.
- Duvet, S., L. Cocquerel, et al. (1998). "Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval." *J Biol Chem* **273**(48): 32088-95.
- Ebinuma, H., N. Nakamoto, et al. (2008). "Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection." *J Virol* **82**(10): 5043-53.
- Eckels, D. D., H. Zhou, et al. (1999). "Identification of antigenic escape variants in an immunodominant epitope of hepatitis C virus." *Int Immunol* **11**(4): 577-83.
- Egger, D., B. Wolk, et al. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-84.
- Eisen-Vandervelde, A. L., S. N. Waggoner, et al. (2004). "Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation." *J Biol Chem* **279**(42): 43479-86.
- El-Shamy, A., M. Nagano-Fujii, et al. (2008). "Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy." *Hepatology* **48**(1): 38-47.
- Erdtmann, L., N. Franck, et al. (2003). "The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis." *J Biol Chem* **278**(20): 18256-64.
- Erickson, S., O. Sangfelt, et al. (1999). "Interferon-alpha inhibits proliferation in human T lymphocytes by abrogation of interleukin 2-induced changes in cell cycle-regulatory proteins." *Cell Growth Differ* **10**(8): 575-82.
- Evans, M. J., T. von Hahn, et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* **446**(7137): 801-5.
- Failla, C., L. Tomei, et al. (1995). "An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A." *J Virol* **69**(3): 1769-77.
- Feld, J. J., S. Nanda, et al. (2007). "Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response." *Hepatology* **46**(5): 1548-63.
- Ferrari, C., S. Urbani, et al. (1999). "Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection." *J Hepatol* **31 Suppl 1**: 31-8.
- Fujimoto, T., M. Tomimatsu, et al. (2008). "Changes in the Th1/Th2 ratio during a 24-week course of an interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C." *J Gastroenterol Hepatol* **23**(8 Pt 2): e432-7.
- Fukushi, S., M. Okada, et al. (2001). "Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome." *Virus Res* **73**(1): 67-79.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1998). "Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance." *Clin Diagn Virol* **10**(2-3): 157-62.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." *Virology* **230**(2): 217-27.
- Gavin, M. A., T. R. Torgerson, et al. (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6659-64.
- Goffard, A. and J. Dubuisson (2003). "Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins." *Biochimie* **85**(3-4): 295-301.

- Golden-Mason, L., L. Madrigal-Estebas, et al. (2008). "Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure." Gut.
- Gong, G. Z., L. Y. Lai, et al. (2003). "HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy." World J Gastroenterol **9**(2): 291-4.
- Griffin, S., C. Stgelais, et al. (2008). "Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel." Hepatology **48**(6): 1779-90.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." FEBS Lett **535**(1-3): 34-8.
- Griffin, S. D., R. Harvey, et al. (2004). "A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria." J Gen Virol **85**(Pt 2): 451-61.
- Gruener, N. H., F. Lechner, et al. (2001). "Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus." J Virol **75**(12): 5550-8.
- Guglietta, S., A. R. Garbuglia, et al. (2005). "Positive selection of cytotoxic T lymphocyte escape variants during acute hepatitis C virus infection." Eur J Immunol **35**(9): 2627-37.
- Hahm, B., Y. K. Kim, et al. (1998). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." J Virol **72**(11): 8782-8.
- Helbig, K. J., D. T. Lau, et al. (2005). "Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector." Hepatology **42**(3): 702-10.
- Helbig, K. J., A. Ruzkiewicz, et al. (2004). "Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation." Hepatology **39**(5): 1220-9.
- Heron, I., M. Hokland, et al. (1978). "Enhanced expression of beta2-microglobulin and HLA antigens on human lymphoid cells by interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(12): 6215-9.
- Hiraga, N., M. Imamura, et al. (2009). "Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice." J Hepatol.
- Honda, M., M. R. Beard, et al. (1999). "A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation." J Virol **73**(2): 1165-74.
- Hong, Z. (2003). "The role of ribavirin-induced mutagenesis in HCV therapy: a concept or a fact?" Hepatology **38**(4): 807-10.
- Huang, H., F. Sun, et al. (2007). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5848-53.
- Hussy, P., H. Langen, et al. (1996). "Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase." Virology **224**(1): 93-104.
- Iigo, Y., M. Suematsu, et al. (1997). "Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): H138-47.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- Isaacs, A., J. Lindenmann, et al. (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 268-73.

- Itose, I., T. Kanto, et al. (2007). "Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients." *J Med Virol* **79**(5): 511-21.
- Jeong, W. I., O. Park, et al. (2008). "Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis." *Gastroenterology* **134**(1): 248-58.
- Jubin, R. (2001). "Hepatitis C IRES: translating translation into a therapeutic target." *Curr Opin Mol Ther* **3**(3): 278-87.
- Kakimi, K., T. E. Lane, et al. (2001). "Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **194**(12): 1755-66.
- Kanto, T. and N. Hayashi (2006). "Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity." *Intern Med* **45**(4): 183-91.
- Kapadia, S. B., H. Barth, et al. (2007). "Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I." *J Virol* **81**(1): 374-83.
- Kaplan, D. E., F. Ikeda, et al. (2008). "Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis." *J Hepatol* **48**(6): 903-13.
- Kaplan, D. E., K. Sugimoto, et al. (2005). "T-cell response relative to genotype and ethnicity during antiviral therapy for chronic hepatitis C." *Hepatology* **41**(6): 1365-75.
- Kato, N. (2000). "Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation." *Microb Comp Genomics* **5**(3): 129-51.
- Kawarabayashi, N., S. Seki, et al. (2000). "Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **32**(5): 962-9.
- Kerr, I. M. and R. E. Brown (1978). "pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 256-60.
- Khu, Y. L., Y. J. Tan, et al. (2004). "Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity." *Biochem J* **384**(Pt 2): 401-9.
- Kim, K. M., S. N. Kwon, et al. (2007). "Hepatitis C virus NS2 protein activates cellular cyclic AMP-dependent pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **356**(4): 948-54.
- Klugewitz, K., D. H. Adams, et al. (2004). "The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?" *Trends Immunol* **25**(11): 590-4.
- Kochs, G. and O. Haller (1999). "Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2082-6.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, et al. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *J Virol* **80**(11): 5308-20.
- Kuo, G., Q. L. Choo, et al. (1989). "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis." *Science* **244**(4902): 362-4.
- Lan, K. H., K. L. Lan, et al. (2007). "HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines." *J Hepatol* **46**(5): 759-67.
- Larrubia, J. R., M. Calvino, et al. (2007). "The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection." *J Hepatol* **47**(5): 632-41.

- Lau, A. H. and A. W. Thomson (2003). "Dendritic cells and immune regulation in the liver." Gut **52**(2): 307-14.
- Lau, J. Y., R. C. Tam, et al. (2002). "Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection." Hepatology **35**(5): 1002-9.
- Leroy, V., I. Vigan, et al. (2003). "Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C." Hepatology **38**(4): 829-41.
- Li, H., B. J. McMahon, et al. (2008). "Hepatitis C virus envelope glycoprotein co-evolutionary dynamics during chronic hepatitis C." Virology **375**(2): 580-91.
- Li, K., E. Foy, et al. (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2992-7.
- Li, X. D., L. Sun, et al. (2005). "Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17717-22.
- Lin, A. W., S. A. Gonzalez, et al. (2004). "CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **137**(2): 408-16.
- Lin, C., B. M. Pragai, et al. (1994). "Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics." J Virol **68**(12): 8147-57.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." Nature **436**(7053): 933-8.
- Lindenmann, J., D. C. Burke, et al. (1957). "Studies on the production, mode of action and properties of interferon." Br J Exp Pathol **38**(5): 551-62.
- MacQuillan, G. C., W. B. de Boer, et al. (2002). "Intrahepatic MxA and PKR protein expression in chronic hepatitis C virus infection." J Med Virol **68**(2): 197-205.
- Manns, M. P., G. R. Foster, et al. (2007). "The way forward in HCV treatment--finding the right path." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 991-1000.
- Mars, L. T., V. Laloux, et al. (2002). "Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice." J Immunol **168**(12): 6007-11.
- Martin, J., S. Navas, et al. (1998). "Effects of the ribavirin-interferon alpha combination on cultured peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients." Cytokine **10**(8): 635-44.
- Marusawa, H., M. Hijikata, et al. (1999). "Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation." J Virol **73**(6): 4713-20.
- Masaki, T., R. Suzuki, et al. (2008). "Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles." J Virol **82**(16): 7964-76.
- Matsumura, S., K. Yamamoto, et al. (2001). "High frequency of circulating HBcAg-specific CD8 T cells in hepatitis B infection: a flow cytometric analysis." Clin Exp Immunol **124**(3): 435-44.
- McKiernan, S. M., R. Hagan, et al. (2004). "Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source." Hepatology **40**(1): 108-14.
- McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." J Viral Hepat **7**(1): 2-14.
- McNab, G., J. L. Reeves, et al. (1996). "Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium." Gastroenterology **110**(2): 522-8.

- Meier, U. C., R. E. Owen, et al. (2005). "Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections." *J Virol* **79**(19): 12365-74.
- Melen, K., R. Fagerlund, et al. (2004). "Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs." *J Med Virol* **73**(4): 536-47.
- Migita, K., S. Abiru, et al. (2006). "Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection." *Hum Immunol* **67**(1-2): 27-32.
- Miyatake, H., T. Kanto, et al. (2007). "Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection." *J Viral Hepat* **14**(6): 404-12.
- Moonka, D., K. A. Milkovich, et al. (2008). "Hepatitis C virus-specific T-cell gamma interferon and proliferative responses are more common in perihepatic lymph nodes than in peripheral blood or liver." *J Virol* **82**(23): 11742-8.
- Morgan, T. R., R. W. Lambrecht, et al. (2008). "DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: results from the HALT-C trial." *J Hepatol* **49**(4): 548-56.
- Morishima, C., D. M. Paschal, et al. (2006). "Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing." *Hepatology* **43**(3): 573-80.
- Morita, M., Y. Watanabe, et al. (1994). "Inflammatory cytokines up-regulate intercellular adhesion molecule-1 expression on primary cultured mouse hepatocytes and T-lymphocyte adhesion." *Hepatology* **19**(2): 426-31.
- Murakami, K., K. Ishii, et al. (2006). "Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b." *Virology* **351**(2): 381-92.
- Neumann-Haefelin, C., J. Timm, et al. (2008). "Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **47**(6): 1824-36.
- Nowak, M., F. Kopp, et al. (2006). "Oral nickel tolerance: Fas ligand-expressing invariant NK T cells promote tolerance induction by eliciting apoptotic death of antigen-carrying, effete B cells." *J Immunol* **176**(8): 4581-9.
- Otto, G. A. and J. D. Puglisi (2004). "The Pathway of HCV IRES-Mediated Translation Initiation." *Cell* **119**(3): 369-380.
- Pallaoro, M., A. Lahm, et al. (2001). "Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein." *J Virol* **75**(20): 9939-46.
- Palmer, C., T. Hampartzoumian, et al. (2008). "A novel role for adiponectin in regulating the immune responses in chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **48**(2): 374-84.
- Pandiyani, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Park, S. H., S. R. Lee, et al. (2008). "Codelivery of PEG-IFN-alpha inhibits HCV DNA vaccine-induced T cell responses but not humoral responses in African green monkeys." *Vaccine* **26**(32): 3978-83.
- Pawlotsky, J. M., H. Dahari, et al. (2004). "Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C." *Gastroenterology* **126**(3): 703-14.
- Penna, A., M. Pilli, et al. (2007). "Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **45**(3): 588-601.
- Perez-Berna, A. J., M. R. Moreno, et al. (2006). "The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins." *Biochemistry* **45**(11): 3755-68.

- Pernollet, M., E. Jouvin-Marche, et al. (2002). "Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions." *Clin Exp Immunol* **130**(3): 518-25.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* **282**(5390): 938-41.
- Pilli, M., A. Zerbini, et al. (2007). "HCV-specific T-cell response in relation to viral kinetics and treatment outcome (DITTO-HCV project)." *Gastroenterology* **133**(4): 1132-43.
- Piodi, A., P. Chouteau, et al. (2008). "Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis." *Hepatology* **48**(1): 16-27.
- Ploss, A., M. J. Evans, et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." *Nature* **457**(7231): 882-6.
- Pravica, V., A. Asderakis, et al. (1999). "In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene." *Eur J Immunogenet* **26**(1): 1-3.
- Pravica, V., I. J. Brogan, et al. (2000). "Rare polymorphisms in the promoter regions of the human interleukin-12 p35 and interleukin-12 p40 subunit genes." *Eur J Immunogenet* **27**(1): 35-6.
- Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, et al. (2007). "Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression." *J Virol* **81**(6): 2545-53.
- Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, et al. (2008). "Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection." *J Virol* **82**(20): 9808-22.
- Rehermann, B., K. M. Chang, et al. (1996). "Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients." *J Virol* **70**(10): 7092-102.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, et al. (1995). "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation." *FEBS Lett* **365**(2-3): 115-9.
- Roberts, W. K., A. Hovanessian, et al. (1976). "Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis." *Nature* **264**(5585): 477-80.
- Rosen, H. R., S. J. Weston, et al. (2007). "Selective decrease in hepatitis C virus-specific immunity among African Americans and outcome of antiviral therapy." *Hepatology* **46**(2): 350-8.
- Sacco, R., T. Tsutsumi, et al. (2003). "Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase." *Virology* **317**(1): 24-35.
- Saito, K., M. Ait-Goughoulte, et al. (2008). "Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production." *J Virol* **82**(7): 3320-8.
- Sakai, A., M. S. Claire, et al. (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11646-51.
- Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *EMBO J* **21**(19): 5017-25.

- Schierloh, P., N. Yokobori, et al. (2005). "Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy." *J Immunol* **175**(10): 6852-60.
- Schmidt, R. E., C. Murray, et al. (1986). "A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype." *J Exp Med* **164**(1): 351-6.
- Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." *Adv Immunol* **96**: 41-101.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-89.
- Serafino, A., M. B. Valli, et al. (2003). "Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro." *J Med Virol* **70**(1): 31-41.
- Shapiro, S., V. Gershtein, et al. (1998). "mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFN-alpha) treatment." *Clin Exp Immunol* **114**(1): 55-60.
- Shi, S. T., S. J. Polyak, et al. (2002). "Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins." *Virology* **292**(2): 198-210.
- Shirakawa, H., A. Matsumoto, et al. (2008). "Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors." *Hepatology* **48**(6): 1753-60.
- Sriram, U., C. Biswas, et al. (2007). "IL-4 Suppresses Dendritic Cell Response to Type I Interferons." *J Immunol* **179**(10): 6446-55.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, et al. (1998). "How cells respond to interferons." *Annu Rev Biochem* **67**: 227-64.
- Su, Q., S. Wang, et al. (2007). "Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2." *EMBO Rep* **8**(3): 265-70.
- Tam, R. C., B. Pai, et al. (1999). "Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile." *J Hepatol* **30**(3): 376-82.
- Tanaka, M., M. Nagano-Fujii, et al. (2006). "Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(3): 792-9.
- Tanji, Y., M. Hijikata, et al. (1994). "Hepatitis C virus polyprotein processing: kinetics and mutagenic analysis of serine proteinase-dependent cleavage." *J Virol* **68**(12): 8418-22.
- Taylor, D. R., S. T. Shi, et al. (1999). "Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein." *Science* **285**(5424): 107-10.
- Tedelind, S., L. E. Ericson, et al. (2003). "Interferon-gamma down-regulates claudin-1 and impairs the epithelial barrier function in primary cultured human thyrocytes." *Eur J Endocrinol* **149**(3): 215-21.
- Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss, et al. (2008). "Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000032.
- Tellinghuisen, T. L. and C. M. Rice (2002). "Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors." *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 419-27.
- Thimme, R., D. Oldach, et al. (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." *J Exp Med* **194**(10): 1395-406.
- Tox, U., S. Schulte, et al. (2008). "Ribavirin priming in patients with chronic hepatitis C and normal ALT: a pilot study." *Hepatogastroenterology* **55**(86-87): 1666-70.
- Trapero, M., L. Garcia-Buey, et al. (2005). "Maintenance of T1 response as induced during PEG-IFNalpha plus ribavirin therapy controls viral replication in genotype-1 patients with chronic hepatitis C." *Rev Esp Enferm Dig* **97**(7): 481-90.

- Trepo, C. (2000). "Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C." J Viral Hepat **7**(4): 250-7.
- Trop, S., D. Samsonov, et al. (1999). "Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model." Hepatology **29**(3): 746-55.
- Tsai, S. L., Y. M. Chen, et al. (1998). "Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity." Gastroenterology **115**(4): 954-65.
- Tsai, Y. H., W. F. Kuang, et al. (2008). "The non-structural 5A protein of hepatitis C virus exhibits genotypic differences in interferon antagonism." J Hepatol **49**(6): 899-907.
- Tseng, C.-T. K. and G. R. Klimpel (2001). "Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions." J. Exp. Med. **195**(1): 43-50.
- Tupin, E., Y. Kinjo, et al. (2007). "The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms." Nat Rev Microbiol **5**(6): 405-17.
- Uraushihara, K., T. Kanai, et al. (2003). "Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells." J Immunol **171**(2): 708-16.
- Urbani, S., B. Amadei, et al. (2006). "PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion." J Virol **80**(22): 11398-403.
- Vigan, I., E. Jouvin-Marche, et al. (2003). "T lymphocytes infiltrating the liver during chronic hepatitis C infection express a broad range of T-cell receptor beta chain diversity." J Hepatol **38**(5): 651-9.
- Voisset, C., M. Lavie, et al. (2008). "Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry." Cell Microbiol **10**(3): 606-17.
- Wack, A., P. Corbella, et al. (1997). "Multiple sites of post-activation CD8+ T cell disposal." Eur J Immunol **27**(3): 577-83.
- Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med **11**(7): 791-6.
- Wan, L., Y. J. Kung, et al. (2009). "Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 855-60.
- Wang, C., P. Sarnow, et al. (1993). "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." J Virol **67**(6): 3338-44.
- Wang, X., E. R. Hinson, et al. (2007). "The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts." Cell Host Microbe **2**(2): 96-105.
- Ward, S. M., B. C. Fox, et al. (2007). "Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection." J Hepatol **47**(3): 316-24.
- Wedemeyer, H., X. S. He, et al. (2002). "Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection." J Immunol **169**(6): 3447-58.
- Wegert, M., N. La Monica, et al. (2009). "Impaired interferon type I signalling in the liver modulates the hepatic acute phase response in hepatitis C virus transgenic mice." J Hepatol **51**(2): 271-8.
- Wei, X., Z. S. Jia, et al. (2009). "Inhibition of Hepatitis C Virus Infection by Interferon-gamma Through Downregulating Claudin-1." J Interferon Cytokine Res.

- Wiegard, C., P. Wolint, et al. (2007). "Defective T Helper Response of Hepatocyte-Stimulated CD4 T Cells Impairs Antiviral CD8 Response and Viral Clearance." Gastroenterology.
- Willberg, C. B., S. M. Ward, et al. (2007). "Protection of hepatocytes from cytotoxic T cell mediated killing by interferon-alpha." PLoS ONE **2**(8): e791.
- Wolk, B., D. Sansonno, et al. (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." J Virol **74**(5): 2293-304.
- Wong, J., B. Johnston, et al. (1997). "A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature." J Clin Invest **99**(11): 2782-90.
- Wu, W. B., S. W. Shao, et al. (2007). "Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells." Intervirology **50**(5): 341-6.
- Yamagiwa, S., Y. Matsuda, et al. (2008). "Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells." Hepatol Res **38**(7): 664-72.
- Yan, B. S., M. H. Tam, et al. (1998). "Self-association of the C-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein." Eur J Biochem **258**(1): 100-6.
- Yang, X. J., J. Liu, et al. (2006). "HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression." Virus Res **121**(2): 134-43.
- Ye, L., X. Wang, et al. (2009). "CD56+ T cells inhibit hepatitis C virus replication in human hepatocytes." Hepatology **49**(3): 753-62.
- Yi, M. and S. M. Lemon (2003). "Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication." RNA **9**(3): 331-45.
- Yoo, B. J., R. R. Spaete, et al. (1992). "5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region." Virology **191**(2): 889-99.
- Yoon, J. C., M. Shiina, et al. (2009). "Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions." Hepatology **49**(1): 12-21.
- Young, K. C., K. L. Lindsay, et al. (2003). "Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy." Hepatology **38**(4): 869-78.
- Younossi, Z. M., A. Baranova, et al. (2009). "Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin." Hepatology **49**(3): 763-74.
- Zarife, M. A., E. A. Reis, et al. (2009). "Increased frequency of CD56Bright NK-cells, CD3-CD16+CD56- NK-cells and activated CD4+T-cells or B-cells in parallel with CD4+CD25High T-cells control potentially viremia in blood donors with HCV." J Med Virol **81**(1): 49-59.
- Zeremski, M., M. Markatou, et al. (2007). "Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients." J Acquir Immune Defic Syndr **45**(3): 262-8.
- Zhang, L. and Y. Zhao (2007). "The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road." J Cell Physiol **211**(3): 590-7.
- Zhang, Z., D. Harris, et al. (2008). "The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus." J Virol **82**(12): 5761-73.
- Zilberstein, A., A. Kimchi, et al. (1978). "Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4734-8.