



**HAL**  
open science

# Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes intra-hépatiques dans l'hépatite chronique virale C et le carcinome hépatocellulaire

Nathalie Hossenlopp Sturm

► **To cite this version:**

Nathalie Hossenlopp Sturm. Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes intra-hépatiques dans l'hépatite chronique virale C et le carcinome hépatocellulaire. Biologie du développement. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV056 . tel-00649495

**HAL Id: tel-00649495**

**<https://theses.hal.science/tel-00649495>**

Submitted on 8 Dec 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Nathalie HOSSENLOPP épouse STURM**

Thèse dirigée par **Jean-Pierre Zarski** et  
codirigée par **Patrice Marche**

préparée au sein du **Laboratoire d'Immunologie Analytique des  
Pathologies chroniques**, INSERM-UJF U823, Institut Albert Bonniot  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes intra-hépatiques

**dans l'hépatite chronique virale C et le carcinome hépatocellulaire**

Thèse soutenue publiquement le **27 Octobre 2011**  
devant le jury composé de :

**Mr le Pr Bruno BONAZ**

PU-PH, CHU de Grenoble (Président)

**Mme le Pr Valérie PARADIS**

PU-PH, Hôpital Beaujon, Clichy (Rapporteur)

**Mr le Pr Yvon CALMUS**

PU-PH, Hôpital Saint Antoine, Paris (Rapporteur)

**Mr le Pr Francesco NEGRO**

Professeur, Hôpital Universitaire de Genève (Examineur)

**Mr le Dr Patrice MARCHE**

DR INSERM, Institut Albert Bonniot, Grenoble (Codirecteur)

**Mr le Pr Jean-Pierre ZARSKI**

PU-PH, CHU de Grenoble (Directeur)



**UNIVERSITE DE GRENOBLE**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité : **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Nathalie HOSSENLOPP épouse STURM**

Thèse dirigée par **Jean-Pierre Zarski** et  
codirigée par **Patrice Marche**

préparée au sein du **Laboratoire d'Immunologie Analytique des  
Pathologies chroniques**, INSERM-UJF U823, Institut Albert Bonniot  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# **Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes intra-hépatiques**

**dans l'hépatite chronique virale C et le carcinome hépatocellulaire**

Thèse soutenue publiquement le **27 Octobre 2011**  
devant le jury composé de :

**Mr le Pr Bruno BONAZ**

PU-PH, CHU de Grenoble (Président)

**Mme le Pr Valérie PARADIS**

PU-PH, Hôpital Beaujon, Clichy (Rapporteur)

**Mr le Pr Yvon CALMUS**

PU-PH, Hôpital Saint Antoine, Paris (Rapporteur)

**Mr le Pr Francesco NEGRO**

Professeur, Hôpital Universitaire de Genève (Examineur)

**Mr le Dr Patrice MARCHE**

DR INSERM, Institut Albert Bonniot, Grenoble (Codirecteur)

**Mr le Pr Jean-Pierre ZARSKI**

PU-PH, CHU de Grenoble (Directeur)

*A mes enfants,*

*A mes parents,*

*A mes proches,*

*Et un grand merci à tous ceux qui m'ont enseignée, orientée, soutenue et encouragée pour mener à bien ce travail de recherche.*

*Je pense tout particulièrement à **Jean-Pierre Zarski** qui a cru en moi et m'a soutenue pour le développement de l'anatomopathologie du foie au CHU de Grenoble, me permettant d'obtenir une expertise et une reconnaissance nationale,*

*Je pense aussi à **Patrice Marche**, qui m'a accueillie chaleureusement au sein de son laboratoire et m'a fait redécouvrir l'immunologie. Merci pour sa disponibilité et ses conseils avisés,*

*Je pense bien évidemment à **Muhammad Ramzan**, mon coéquipier de thèse, dont la gentillesse, la patience, le dévouement et la persévérance ont été pour moi un grand soutien et une aide précieuse,*

*Une pensée aussi pour **Vincent Leroy, Evelyne Jouvin-Marche, Marie-Ange Thélu et Christiane Guillermet** dont les compétences et les réflexions scientifiques ont fait progresser dans la bonne humeur ce travail qui est avant tout un travail d'équipe,*

*Un grand merci à **Marylène Lorinet** et à **Jean-Michel Lasserre** pour leur aide précieuse dans la touche finale, et merci à tous ceux qui dans les moments d'enthousiasme comme de découragement ont su trouver le temps de m'écouter...*

*Enfin, mes sincères remerciements aux **membres du jury** qui ont gentiment accepté de se déplacer, parfois de loin, et de consacrer du temps pour juger ce travail,*

# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b>	<b>6</b>
<b>Résumé</b>	<b>8</b>
<b>Objectifs du travail</b>	<b>10</b>
<b>Introduction bibliographique</b>	<b>14</b>
<b>Chapitre I : Virus de l'hépatite C (VHC)</b>	<b>15</b>
1 - Organisation génomique du virus	15
2 - Les protéines virales et leurs fonctions	15
Les protéines structurales	15
Les protéines non structurales	18
3 - Le cycle réplcatif du VHC	21
4 - La variation génomique: génotypes et quasi-espèces	23
<b>Chapitre II : Hépatite chronique virale C et cirrhose</b>	<b>25</b>
1 - Epidémiologie et transmission du VHC	25
2 - Histoire naturelle du VHC	26
Hépatite virale C aigüe	27
Hépatite virale C chronique	27
Complications : cirrhose et carcinome hépatocellulaire	28
3 - Les lésions histologiques de l'hépatite virale C	29
Lésions histologiques de l'hépatite chronique virale	30
Arguments histologiques en faveur de l'origine virale C	30
Scores de gravité de l'hépatite chronique virale C	30
Autres intérêts de la biopsie hépatique	31
<b>Chapitre III : Carcinome hépatocellulaire</b>	<b>34</b>
1 – Epidémiologie	34
2 – Hépatocarcinogenèse	37
Hépatocarcinogenèse virale	37
Hépatocarcinogenèse virale C	38
3 - Etats préneoplasiques: dysplasie à grandes cellules, dysplasie à petites cellules, macronodules dysplasiques	40
4 - Diagnostic anatomopathologique des macronodules dysplasiques et du carcinome hépatocellulaire	42
5 - Facteurs pronostiques de survie après résection chirurgicale	44

<b>Chapitre IV : Réponse immunitaire anti-virale intra-hépatique</b>	<b>46</b>
1 - <i>Micro-environnement hépatique et tolérance immunitaire</i>	46
2 - <i>Les acteurs de la réponse immunitaire innée hépatique</i>	49
Les cellules dendritiques (DC)	50
Les lymphocytes natural killer (NK)	52
Interactions entre les cellules NK-DC	53
Les lymphocytes T natural killer (TNK)	54
Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ )	56
3 - <i>Les acteurs de la réponse immunitaire adaptative hépatique</i>	56
Les lymphocytes T auxiliaires helpers CD4+ (TCD4, LTh)	58
Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (TCD8, CTL)	58
Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	60
<b>Chapitre V : Modulations de la réponse immunitaire et immunopathogénicité</b>	
<b>liées au VHC</b>	<b>60</b>
1 - <i>Défaillance dans la réponse cellulaire innée</i>	61
Les cellules dendritiques	61
Les lymphocytes NK	62
Les lymphocytes TNK	65
Les lymphocytes T $\gamma\delta$	65
2 - <i>Défaillance dans la réponse cellulaire adaptative</i>	66
Echec primaire ou dépassement de la réponse cellulaire T	66
Echappement aux réponses immunitaires cellulaires et humorales	68
Immunosuppression par les protéines virales	69
Rôle des lymphocytes T régulateurs	69
3 - <i>Défaillance dans la réponse humorale</i>	72
<b>Chapitre VI : Modulations de la réponse immunitaire et immunopathogénicité</b>	
<b>liées au carcinome hépatocellulaire</b>	<b>72</b>
Lymphocytes T helpers et cytotoxiques et cancer	73
Lymphocytes NK et cancer	74
Lymphocytes TNK et cancer	76
Cellules dendritiques et cancer	76
Lymphocytes T régulateurs et cancer	78
<b>Résultats</b>	<b>80</b>
<b>Article 1.</b> Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis	81
<b>Article 2.</b> Intra-hepatic lymphocytes in HCV-related cirrhosis and	

hepatocellular carcinoma	84
<b>Article 3.</b> Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C	87
<b>Article 4.</b> Natural cytotoxic functions of <i>in situ</i> intra-hepatic natural killer cells are not affected in chronic viral infections	90
<b>Travaux en cours.</b> Recherche de nouveaux marqueurs de progression de la cirrhose vers le CHC et d'évolution du CHC par analyse protéomique tissulaire	94
Etude de faisabilité	95
Etude de reproductibilité	99
Etude en cours	101
Projets à venir	105
<b>Discussion</b>	<b>107</b>
<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>118</b>
<b>Schéma récapitulatif du travail</b>	<b>122</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>123</b>



## Liste des abréviations

**AA** : acide aminé  
**Ac** : anticorps  
**ADCC**: antibody-dependent cellular cytotoxicity  
**ALAT** : alanin-amino-transférase  
**ARFp** : alternate reading frame protein  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ATP** : adenosine triphosphate  
**CARDIF / IPS-1** : CARD adaptor inducing IFN- $\beta$  / interféron- $\beta$  promoter stimulator 1  
**CF** : cytométrie de flux  
**CHC** : carcinome hépatocellulaire  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité  
**CMV** : cytomegalovirus  
**CTL** : lymphocyte T cytotoxique  
**DC** : dendritic cell (cellule dendritique)  
**DC-SIGN / L-SIGN** : dendritic cell-specific / liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecules (ICAM)-3 grabbing non-integrin  
**DGC** : dysplasie à grandes cellules  
**DPC** : dysplasie à petites cellules  
**EGF** : epidermal growth factor  
**ERK** : extracellular signal-regulated kinase  
**FoxP3** : forkhead transcription factor 3  
**GAG** : glycosaminoglycane  
**GITR** : glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family-related gene  
**GM-CSF** : granulocyte macrophage-colony stimulating factor  
**HAS** : haute autorité de santé  
**HPLC** : high pressure liquid chromatography  
**HSP** : heat shock protein  
**HVR** : région hypervariable  
**IFN** : interféron  
**IHC** : immunohistochimie  
**IL** : interleukine  
**IL-2R** : IL-2 receptor  
**IMS** : imagerie moléculaire par spectrophotométrie de masse  
**IP-10** : IFN-inducible protein-10  
**IRES** : internal ribosome entry site  
**IRF-3** : interferon regulatory factor 3  
**IRS-1** : insulin receptor substrate-1  
**ISG** : IFN-stimulated gene  
**ISRE** : IFN-stimulated response element  
**IV** : intra-veineuse  
**KIR** : killer cell immunoglobulin-like receptor  
**LAK** : lymphokine-activated killer  
**LB** : lymphocyte B  
**LC MALDI** : liquid chromatography matrix assisted laser desorption ionisation  
**LDL/LDLox** : low density lipoprotein/oxidized LDL  
**LIR1/ILT2** : leucocyte Ig-like receptor/Ig-like transcript 2  
**LPL** : lipoprotein lipase  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LT** : lymphocyte T  
**LTh** : lymphocyte T auxiliaire (helper)  
**MAGE-A**: melanoma antigen, family A  
**MAPK** : mitogen-activated protein kinase  
**MDC** : myeloid dendritic cell (cellule dendritique myéloïde)  
**MDM2** : murine double minute 2  
**MICA/B** : MHC class I related chain A/B

**MND** : macronodule dysplasique  
**MNDBG** : macronodule dysplasique de bas grade  
**MNDHG** : macronodule dysplasique de haut grade  
**MNR** : macronodule régénératif  
**Mo-DC** : monocyte-derived dendritic cell  
**MS** : mass spectrometry (spectrométrie de masse)  
**MS/MS** : spectrophotométrie de masse en tandem  
**MyD88** : myeloid differentiation factor-88  
**NAFLD** : non alcoholic fatty liver disease (stéatopathie non alcoolique)  
**NASH** : non alcoholic steato-hepatitis (stéato-hépatite non alcoolique)  
**NCR** : natural cytotoxicity receptor  
**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**NK**: natural killer  
**NKR** : récepteur des cellules NK  
**NOD** : nucleotide-binding oligomerization domain  
**OAS** : 2'-5' oligoadénylate synthétase  
**ORF** : open reading frame (cadre ouvert de lecture)  
**PAMP** : pathogen associated molecular pattern  
**PD-1** : programmed death -1  
**PDC** : plasmocytoid dendritic cell (cellule dendritique plasmocytoïde)  
**PD-L1** : programmed death - ligand 1  
**PI3K** : phosphatidyl inositol 3-kinase  
**PK**: protéine kinase  
**PLS-DA** : partial least squares - discrimination analysis  
**PNPLA3** : patatin-like phospholipase-3  
**PRR** : pathogen recognition receptor  
**RANTES** : regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**RIG-I** : retinoid acid inducible protein-I  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RT-PCR** : real time-polymerase chain reaction  
**SAA** : serum amyloid A apolipoprotein  
**SAP** : saponine  
**SB-R1** : récepteur scavenger de classe B type 1  
**SELDI-TOF** : surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight  
**SNP** : single-nucleotide polymorphism  
**SOCS** : suppressor of cytokine signaling  
**STAT** : signal transducer and activator of transcription  
**TAA** : tumor-associated antigen  
**TBK1** : TNF receptor-associated factor family member-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase 1  
**TCR** : T-cell receptor  
**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor- $\beta$   
**TLR** : toll-like receptor  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
**TRAIL** : TNF-receptor apoptosis-inducing ligand  
**Treg** : lymphocyte T régulateur  
**TRIF** : toll/IL-1 domain containing adaptor inducing or recruiting interferon- $\beta$   
**UTR** : untranslated region (région non traduite)  
**VEGF** : vascular endothelial growth factor  
**VHB** : virus de l'hépatite B  
**VHC** : virus de l'hépatite C  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine  
**VLDL** : very low density lipoprotein

## Résumé en français

**L'hépatite chronique virale C est associée à une défaillance du système immunitaire. Nous nous sommes intéressés aux cellules NK et aux lymphocytes Treg, partenaires de la réponse immunitaire innée.** Le nombre des NK, particulièrement les CD56<sup>dim</sup>, est significativement diminué chez les patients infectés, dans le foie plus que dans le sang, et s'accroît avec la fibrogenèse. Le nombre de CD3-CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> circulantes est corrélé à la sévérité de l'inflammation et de la fibrose et celui des CD3-CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> inversement corrélé à la charge virale. Les NK sont fonctionnelles, en capacité de produire de l'IFN- $\gamma$  et d'engager un processus de cytolyse. L'expression de CD158 est significativement diminuée à la surface des NK hépatiques mais conservée dans les NK circulantes. L'expression de NKG2A,C,D dans les NK circulantes et hépatiques est identique à celles de patients non infectés. Les Treg intra-hépatiques FoxP3<sup>+</sup> sont quasi-exclusivement de phénotype CD4<sup>+</sup>. En analyse multivariée, le nombre de FoxP3<sup>+</sup> est indépendamment associé à celui de CD8<sup>+</sup>, surtout dans les lésions nécrotico-inflammatoires et une corrélation forte est observée entre les transcrits CD8, FoxP3, IL-10 et TGF- $\beta$ , suggérant que les Treg bloquent l'expansion et la cytotoxicité des TCD8 par contact cellulaire ou par le biais de cytokines immunosuppressives. L'équilibre entre FoxP3 et CD8 est rompu dans les grades et stades Métavir A>2 et F>3, avec un effondrement du rapport FoxP3/CD8. **L'inflammation hépatique chronique s'accompagne de fibrose, aboutissant à la cirrhose, principale cause de CHC.** Dans les cirrhoses virales C avec ou sans CHC, les lymphocytes CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> sont plus nombreux dans la fibrose que dans le parenchyme. Le nombre de CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et l'expression d'IFN- $\gamma$  et RANTES sont plus élevés dans les cirrhoses qui développent un CHC. En analyse multivariée, CD8 est le seul facteur indépendamment associé à la récurrence tumorale et à une diminution de la survie sans récurrence à 5 ans. Les CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> sont significativement moins nombreux dans le CHC que dans la cirrhose. Mais les FoxP3<sup>+</sup> sont significativement plus nombreux et les CD56<sup>+</sup> moins nombreux dans le CHC que dans le nodule parenchymateux, sans modification des LT, conduisant à une augmentation du rapport FoxP3/CD8 dans la tumeur. Les CD56<sup>+</sup> diminuent de la cirrhose au CHC. Aucune corrélation n'est observée entre la densité intra-tumorale des lymphocytes étudiés et la récurrence carcinomateuse. **Conclusion. Un infiltrat inflammatoire dense au sein de la cirrhose C, particulièrement riche en CD8, favorise le développement et/ou la récurrence du CHC.**

**Mots-clés :** Virus de l'hépatite C (VHC). Fibrose hépatique. Inflammation. Lymphocytes T, natural killer (NK) et T régulateurs. Immunohistochimie. Protéomique.

## Titre de la thèse en anglais

Phenotypic and functional study of intrahepatic lymphocytic infiltrate in chronic viral C hepatitis and hepatocellular carcinoma

## Résumé en anglais

**Chronic hepatitis C is associated with the failure of the immune system. We were interested to NK cells and Treg cells, partners in the innate immune response.** The number of NK, particularly the CD56<sup>dim</sup>, is significantly reduced in infected patients, in the liver more than in the blood, and increases during the process of fibrogenesis. The number of circulating CD3-CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> correlates with the severity of inflammation and fibrosis and that of CD3-CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> inversely correlates with viral load. The NK functional capacity to produce IFN- $\gamma$  and initiate a process of cytolysis is maintained. The CD158 expression is significantly reduced on the surface of intrahepatic NK, whereas NKG2A,C,D expression in circulating and hepatic NK is identical to that of non-infected patients. The intrahepatic Treg FoxP3<sup>+</sup> are almost exclusively CD4<sup>+</sup> phenotype. In multivariate analysis, the number of FoxP3<sup>+</sup> is independently associated with that of CD8<sup>+</sup>, especially in necroinflammatory lesions and a strong correlation is observed between CD8, FoxP3, IL-10 and TGF- $\beta$ , suggesting that Treg could inhibit CD8 expansion and cytotoxicity by cell contact or through immunosuppressive cytokines. The balance between FoxP3 and CD8 is broken in the most severe stages of the disease (METAVIR A>2 and F>3), which results in a drop in the FoxP3/CD8 ratio. **Chronic inflammation is accompanied by liver fibrosis, leading to cirrhosis, the main cause of HCC.** In viral C cirrhosis with or without HCC, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes are more numerous in fibrosis than in parenchyma. The number of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> and the expression of IFN- $\gamma$  and RANTES were higher in cirrhosis developing HCC. In multivariate analysis, CD8 is the only independent predictor of tumor recurrence and is associated with a significant decrease in the 5 years disease free survival. The CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes were significantly lower than in distant cirrhosis. However, FoxP3<sup>+</sup> are significantly higher and CD56<sup>+</sup> significantly lower in HCC than in parenchymatous nodules, without LT changes, leading to an increase in the FoxP3/CD8 ratio into the tumor. The number of CD56<sup>+</sup> decreases from cirrhosis to HCC. No correlation was found between the density of studied tumor infiltrating lymphocytes and HCC recurrence. **Conclusion. A dense inflammatory infiltrate in viral C cirrhosis, particularly rich in CD8, promotes HCC development and/or recurrence.**

**Keywords :** Hepatitis C virus. Liver fibrosis. Inflammation. T lymphocytes. Natural killer cells (NK). Regulatory T lymphocytes. Immunohistochemistry. Proteomic analysis.

# **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

## **Introduction générale**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) se situe au 5ème rang des cancers les plus fréquents chez l'homme dans le monde, affectant environ un million de personnes par an, avec une incidence élevée en Asie du Sud Est et en Afrique et croissante en Europe, aux Etats-Unis et au Japon. Il se développe dans 80 à 90% des cas sur un foie atteint de cirrhose, stade ultime des hépatopathies chroniques fibrosantes, qu'elles soient virale, éthylique, métabolique ou génétique. **La principale cause d'hépatopathie chronique fibrosante dans les pays développés est l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC)**, suivie de l'intoxication éthylique chronique, plus récemment de la stéatopathie d'origine métabolique (NAFLD, pour non alcoholic fatty liver disease et NASH pour non alcoholic steato-hepatitis), plus rarement les maladies de surcharge (fer, cuivre,...) ou génétiques (déficit en  $\alpha 1$  anti-trypsin, ...). Alors que l'incidence de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) décroît dans les pays développés, l'hépatite chronique virale B représente toujours la principale cause de CHC dans le monde, largement prédominante dans les pays en voie de développement.

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de la pathogénicité, notamment de l'immunopathogénicité liée au VHC, et de son rôle sur l'évolution chronique fibrosante et sur le développement du cancer, mais ces résultats, souvent issus de manipulations *in vitro*, sont parcellaires et nécessitent des études complémentaires intra-tissulaires.

En effet, bien que de nombreux traitements (exérèse chirurgicale ou méthodes de destruction *in situ*) soient accessibles aux patients atteints de CHC, le pronostic reste mauvais en dehors de la transplantation hépatique, avec une survie globale de 10-20% à 5 ans. Le CHC s'avère également particulièrement résistant aux agents cytostatiques et les chimiothérapies sont décevantes.

De nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'immunothérapie pourraient s'avérer bénéfiques, tant dans la prévention que dans le traitement du CHC, et l'identification de populations lymphocytaires "à manipuler" constitue un challenge.

## **Objectifs du travail**

L'hépatite chronique virale C est une hépatopathie fibrosante s'accompagnant d'un infiltrat inflammatoire chronique mononucléé, infiltrant les espaces portes et les lobules, réalisant des lésions hépatocytaires nécrotico-inflammatoires et générant de la fibrose. Elle évolue vers la cirrhose et représente la première cause d'hépatopathie chronique fibrosante pouvant évoluer vers le carcinome hépatocellulaire dans les pays développés, juste derrière

l'hépatite chronique virale B dans les pays en voie de développement. Cet infiltrat inflammatoire chronique est constitué en grande majorité de lymphocytes T (LT), parmi lesquels les LT auxiliaires TCD4 et les LT cytotoxiques TCD8, mais d'autres populations cellulaires sont également présentes comme les lymphocytes T régulateurs (Treg), les lymphocytes NK (Natural Killer) et TNK, les lymphocytes B (LB) et les cellules dendritiques (DC). A ce jour, le rôle de la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus dans la physiopathologie de l'hépatite chronique virale C est mal connu, de même que son rôle dans le développement de la cirrhose et du cancer, ou dans la récurrence du CHC. **Il existe néanmoins de plus en plus d'évidence que ce processus inflammatoire chronique, médié par ces différentes cellules immunitaires et par un réseau cytokinique complexe, est associé à l'évolution vers la cirrhose et au développement du CHC.** La rareté des systèmes de culture et la difficulté d'obtenir des modèles animaux et de disposer de tissus hépatiques humains sains ou pathologiques, sont autant d'obstacles à la compréhension de ce qui se passe *in vivo* entre les cellules immunitaires de l'hôte et le VHC ou les cellules tumorales. Les travaux *in situ* concernant l'infiltrat inflammatoire intra-parenchymateux ou intra-tumoral sont rares et les données sont parcellaires, ayant intéressé principalement les populations lymphocytaires T majoritaires.

L'objectif principal de notre étude était de caractériser les cellules inflammatoires, et notamment les populations lymphocytaires présentes au sein du parenchyme hépatique tumoral ou non tumoral au cours de l'hépatite chronique virale C, sur le plan phénotypique mais également fonctionnel, en utilisant des méthodes *in situ*, c'est à dire appliquées au tissu hépatique, en condition *ex vivo*.

Le second objectif était la recherche de corrélations pronostiques entre ces données immunologiques et la progression de la fibrose vers la cirrhose, la survenue du CHC ou sa récurrence. Ces données étaient associées à des données cliniques, biologiques, virologiques et histologiques caractérisant le statut des patients face à la maladie.

Le troisième objectif était l'identification de nouveaux marqueurs immunitaires ou tumoraux au sein du tissu inflammatoire ou tumoral des patients atteints de CHC.

Le matériel et les méthodes d'étude mis à disposition pour répondre à ces objectifs étaient:

- **concernant la caractérisation phénotypique de l'infiltrat inflammatoire intra-hépatique** (tissu cirrhotique et carcinomateux) : l'immunohistochimie (IHC) sur coupes tissulaires congelées ou fixées et incluses en paraffine et la cytométrie de flux

(CF) à partir de lymphocytes extraits de fragments tissulaires frais, pour caractériser l'expression phénotypique des cellules et les quantifier

- **concernant la caractérisation fonctionnelle de cet infiltrat:** la RT-PCR quantitative (real time-polymerase chain reaction) sur fragments tissulaires congelés, pour réaliser l'étude des cytokines et des chimiokines associées à la réponse immunitaire cellulaire
- **concernant l'identification de nouveaux marqueurs tissulaires:** l'étude protéomique sur coupes de tissu congelé par SELDI-TOF MS (surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) et l'identification des protéines d'intérêt par LC MALDI-TOF (liquid chromatography matrix assisted laser desorption ionisation) MS/MS.



**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre I : Le virus de l'hépatite C**

## ***1 - Organisation génomique du virus***

Le VHC, seul membre du genre des Hépacivirus dans la famille des Flaviviridae, est un virus enveloppé possédant un génome ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,6 kb, cloné pour la première fois en 1989 par l'équipe du Dr Houghton [1]. Il comprend un unique cadre ouvert de lecture ORF (open reading frame) codant pour la polyprotéine virale, flanqué en 5' et 3' de régions non traduites (untranslated region, UTR) essentielles pour l'initiation de la traduction et la réplication.

La partie 5'UTR, hautement conservée, est composée de plusieurs structures secondaires en "tige-boucle" dont une grande partie forme un IRES (internal ribosome entry site) destiné à recruter directement la petite sous-unité 40S du ribosome initiant la traduction coiffe-indépendante des ARN viraux. Elle contient également deux sites de liaison en tandem d'un micro-ARN miR-122 spécifique du foie qui régule positivement la réplication et la traduction du VHC.

La partie 3'UTR est constituée de 3 domaines: une séquence variable, un domaine polyU/UC et une région X très structurée et hautement conservée. Elle joue un rôle dans l'initiation et la régulation de la réplication virale, et semble impliquée dans la synthèse d'ARN de polarité négative au cours de la réplication virale et dans la traduction IRES dépendante [2-4]. La traduction IRES dépendante de l'ORF génère une polyprotéine de 3000 acides aminés (AA) au niveau du réticulum endoplasmique (RE), clivée en 3 protéines structurales, 6 protéines non structurales et la protéine p7 (non classée) par l'action de protéases cellulaires et virales, donnant naissance aux particules virales ou au complexe de réplication (Figure 1)

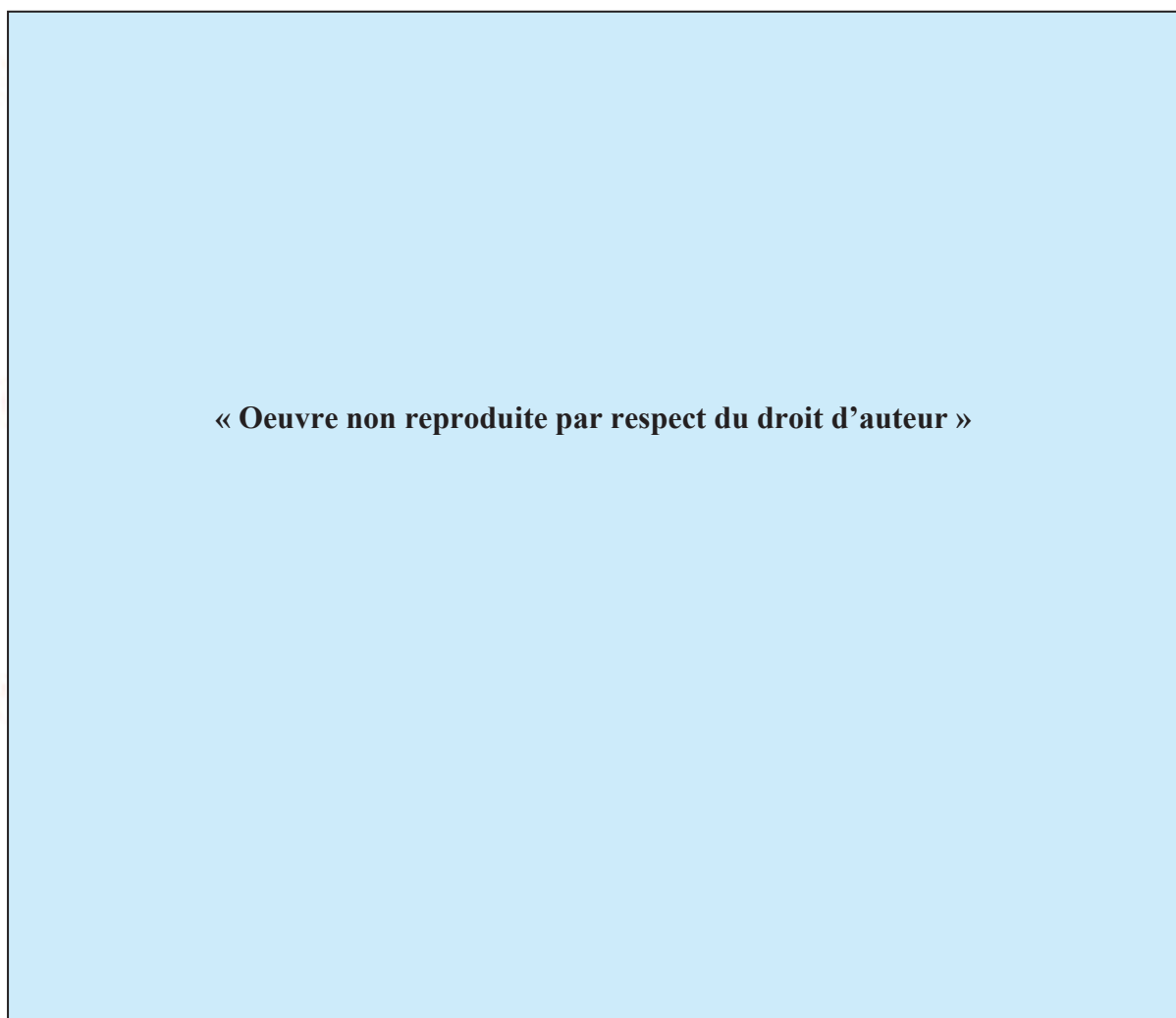
## ***2 - Les protéines virales et leurs fonctions***

La structure du virus, les interactions entre les protéines virales et les cellules de l'hôte, et les fonctions des protéines virales sont largement revues dans trois articles de synthèse [2, 5, 6].

### **- Les protéines structurales**

La signal peptidase présente dans le RE et la signal peptide peptidase cytoplasmique sont responsables des clivages de la région structurale générant la protéine Core et les glycoprotéines

d'enveloppe E1 et E2, constituants majeurs de la particule virale, et la protéine p7, peptide membranaire hydrophobe de la famille des viroportines.



**Figure 1. Organisation du génome du VHC.** (A) Le génome ARN simple brin code pour un long cadre ouvert de lecture (ORF, open reading frame) flanqué de deux régions non traduites (UTR, untranslated region) qui contiennent les signaux pour la synthèse de l'ARN et de la polyprotéine virale, et la coordination des deux processus. La traduction est initiée grâce à un IRES (internal ribosomal entry site) dans la région 5'UTR. (B) La polyprotéine traduite subit des modifications traductionnelles et post-traductionnelles par des protéases cellulaires et virales. Les nombres sous la polyprotéine indiquent la position de l'acide aminé au niveau du site de clivage. (C) Fonction des 10 protéines structurales et non structurales résultantes. Une protéine F est traduite à partir d'un court ARF (alternate reading frame) (Rehermann et al, J Clin Invest 2009) [7].

**La protéine Core**, première protéine traduite, est un constituant majeur de la nucléocapside virale. Cette phosphoprotéine de 23 kDa est d'abord libérée dans le RE, puis mature en une protéine de 21 kDa, ce qui lui permet d'être transportée vers les gouttelettes lipidiques, site d'assemblage des particules virales. Elle interagit avec les régions UTR de l'ARN viral, ce qui suggère une implication dans le contrôle de la réplication virale, de la traduction et de l'encapsidation. En plus de cette fonction structurale, la protéine Core peut moduler plusieurs processus cellulaires impliqués dans la pathogenèse virale en interagissant directement avec les

protéines cellulaires : apoptose, formation des gouttelettes lipidiques et de la stéatose, formation des ROS (reactive oxygen species), voies de signalisation, activation transcriptionnelle modifiant l'expression de certains gènes. La protéine Core (AA 49 et 131) serait ainsi impliquée dans l'activation de SOCS (suppressor of cytokine signaling) responsable d'une diminution de IRS-1 (insulin receptor substrate-1), à l'origine de l'insulino-résistance liée au virus (génotypes 1 à 4) [8]. Elle aurait une activité immunosuppressive en inhibant la prolifération des LT activés, via l'interaction avec leur récepteur du complément gC1qR [9, 10] et en induisant l'apoptose des LT via Fas-FasL [11], favorisant la chronicité de l'infection virale. La protéine Core serait reconnue par le TLR2 (toll-like receptor) [12] et capable d'activer *in vitro* les cellules inflammatoires du système immunitaire inné via TLR2 avec la coopération des TLR1 et TLR6, ce qui pourrait affecter les mécanismes de reconnaissance du virus [13] et s'accompagne d'une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et IL-10 (interleukine) susceptible de moduler la réponse immunitaire [14]. Elle augmenterait l'expression de TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) qui induit la fibrogenèse par les cellules étoilées du foie et jouerait ainsi un rôle dans la progression vers la cirrhose [15]. Elle participerait aussi à la transformation cellulaire et au processus de cancérisation induit par le VHC. Notamment, la protéine Core peut se lier à plusieurs protéines suppresseurs de tumeur telles p53 [16], p73 [17], pRb [18], moduler l'expression de la protéine p21/waf, kinase cycline-dépendante inhibitrice [19], activer la voie  $\beta$ -caténine [20] et réprimer l'expression transcriptionnelle de E-cadhérine [21], interagir avec Smad3 et bloquer l'activité anti-proliférative de TGF- $\beta$  [22], avec des conséquences sur la croissance tumorale.

**Les protéines d'enveloppe E1 (31 kDa) et E2 (70 kDa)** jouent un rôle important dans la morphogénèse et l'infectiosité des virions. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires à la surface du virion permettant l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires et la fusion des membranes cellulaires et virales lors de l'entrée du virus dans les cellules cibles. Notamment, la protéine E2 interagit avec CD81 et SR-B1, deux récepteurs du VHC identifiés sur la membrane des hépatocytes, mais aussi avec DC-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molecules (ICAM)-3 grabbing non-integrin) et L-SIGN (liver/lymphnode-specific ICAM-3 grabbing non-integrin). L'interaction de E2 avec CD81 inhibe *in vitro* l'activation des LT et des cellules NK [23, 24] mais E2 peut également inhiber *in vitro* la protéine kinase R (PKR), interférant ainsi sur les effets de l'interféron (IFN) [25]. Une région hypervariable (HVR-1) a été identifiée dans la protéine E2, avec des différences de séquences inter- et intra-génotypiques allant jusqu'à 80%, mais des propriétés physico-chimiques et une conformation générale cependant conservées parmi les génotypes, suggérant un rôle important de cette région dans le cycle viral. Cette région est également une des cibles des anticorps (Ac) neutralisants [26-28]. La

protéine E2 en interagissant avec CD81 ou les récepteurs des LDL (low density lipoprotein) à la surface des cellules active la voie de signalisation MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase), incluant le facteur de transcription ATF-2 et induit la prolifération et la survie cellulaire dans des lignées cellulaires [29, 30].

**La protéine p7** (7 kDa), intercalée entre les protéines structurales et non structurales, s'oligomérisse sous forme d'hexamères à la membrane du RE pour former des canaux ioniques. Elle semble essentielle à la production de virus infectieux puisqu'en augmentant la perméabilité membranaire, elle facilite l'assemblage et la libération des virions [31, 32].

### **- Les protéines non structurales**

Les clivages de la région non structurale sont induits par deux protéases virales: NS2-NS3 (responsable du clivage auto-catalytique de la jonction NS2 et NS3) et NS3-NS4A (responsable du clivage aux jonctions NS3 et NS4A, NS4A et NS4B, NS5A et NS5B). NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B forment le complexe de réplication virale. Elles ne sont pas associées à la particule virale dans les cellules infectées.

**La protéine NS2** est une protéine transmembranaire non glycosylée de 23 kDa, ancrée à la membrane du RE, qui forme avec le domaine amino-terminal de NS3 (NS2-NS3) une métalloprotéase zinc-dépendante qui auto-clive NS2 et NS3. NS2 perd ensuite son activité protéase, est phosphorylée par la kinase CK2 puis est dégradée par le protéasome. Comme p7, elle jouerait également un rôle dans l'infectiosité des particules virales [33].

**La protéine NS3** est une protéine de 70 kDa qui possède deux activités enzymatiques distinctes. Le tiers amino-terminal (AA 1-180) est une sérine protéase qui, avec l'aide de son cofacteur NS4A, clive les jonctions entre les protéines non structurales en aval de NS3 (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B) aboutissant au complexe de réplication virale actif. La région carboxy-terminale (AA 181-631) contient un domaine ARN hélicase/nucléoside triphosphate qui jouerait un rôle dans la réplication de l'ARN viral et dans les étapes précoces de l'assemblage des particules virales. L'activité protéase de NS3/NS4A joue un rôle important dans la modulation des réponses anti-virales innées. En clivant deux protéines cellulaires TRIF (protéine adaptatrice dans le pathway anti-viral TLR3) et CARDIF (ou IPS-1, protéine adaptatrice dans le pathway anti-viral RIG-I), elle inhibe la transduction du signal induisant la synthèse de l'IFN de type I via le facteur 3 de régulation de l'IFN (interferon regulatory factor 3, IRF-3), ce qui en fait une cible attractive pour la thérapie anti-VHC [34-36] (Figure 2A). En interagissant avec TLR2, elle peut activer les cellules du système immunitaire

inné et affecter les mécanismes de reconnaissance du virus [13]. NS3 interagit avec les sites catalytiques des protéines kinases PKA et PKC, inhibant leur activité kinase, ce qui empêche leur translocation dans d'autres compartiments et altère la phosphorylation des protéines cibles, conduisant à une modification de l'expression de gènes cellulaires [37]. Le domaine amino-terminal de NS3 pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse, en interagissant avec la protéine p53 suppresseur de tumeur et en inhibant sa liaison à l'ADN, bloquant l'activité transcriptionnelle p53-dépendante qui en résulte [38]. Une inhibition de l'activité du promoteur de p21/WAF1 par NS3 a également été décrite, synergique avec la protéine Core [39, 40]. Enfin, un court motif dans le domaine hélicase se lierait aux histones H2B et H4, induisant des changements conformationnels et modifiant leur interaction avec l'ADN et la formation des nucléosomes, permettant ainsi à des gènes inactifs d'être transcrits et dérégulant certaines fonctions biologiques [41].

**La protéine NS4A** (6 kDa) se comporte comme un co-facteur essentiel de NS3. Sa partie centrale active sa fonction protéase, sa partie carboxy-terminale aide l'hélicase à dérouler l'ARN en présence d'ATP, et sa partie amino-terminale ancre le complexe qu'elle forme avec NS3 à la membrane.

**La protéine NS4B** (27 kDa) est une protéine membranaire hydrophobe qui possède 4 domaines transmembranaires. Elle est étroitement associée aux membranes du RE et une de ses fonctions est d'induire un compartiment membranaire spécialisé appelé "membranous web" correspondant au site de réplication de l'ARN viral et de maturation de la polyprotéine. Comme NS4A, elle pourrait également être impliquée dans l'hyperphosphorylation de NS5A et dans l'inhibition des synthèses protéiques cellulaires. Par ailleurs, elle interagit avec NS3 et inhibe son activité ARN hélicase.

**La protéine NS5A** est une phosphoprotéine associée aux membranes intracellulaires du RE qui existe dans une forme basale de 56 kDa et dans une forme hyperphosphorylée de 58 kDa. Dans son état basal, elle interviendrait dans le processus de réplication de l'ARN viral en se liant aux extrémités 3' des ARNs viraux positifs ou négatifs, alors que la forme hyperphosphorylée serait davantage impliquée dans l'assemblage des virions [42]. Son interaction avec NS5B serait nécessaire à la réplication. Elle colocalise avec la protéine Core à la surface des gouttelettes lipidiques et elle est un facteur clé pour la formation des particules virales [43]. De multiples fonctions lui sont attribuées, notamment des actions sur l'apoptose, les voies de signalisation cellulaire et de régulation de la croissance cellulaire. Elle modulerait la réaction immunitaire anti-virale en interagissant avec MyD88, inhibant ainsi la signalisation via les TLR et réduisant

*in vitro* la production de cytokines [44]. Elle pourrait également induire l'expression de TLR4 dans les hépatocytes et les LB, entraînant une augmentation de la production d'IFN- $\beta$  et d'IL-6 susceptible de moduler la réponse immunitaire [45]. Elle jouerait un rôle dans la résistance à l'IFN, en inhibant la PKR dans la voie de l'IFN- $\alpha$  [46] ou en inhibant l'action anti-virale de l'IFN- $\alpha$  par le biais de l'induction de l'IL-8 [47] (Figure 2B). Elle pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse hépatique en interagissant avec la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [48] ou avec la PKR considérée comme un suppresseur de tumeur [49, 50], en favorisant la survie en promouvant la voie PI3K/Akt [51], en se liant à p53 et en inhibant la transcription de p21/WAF1 [52] ou l'apoptose p53-médiée [53], en inhibant l'apoptose TNF- $\alpha$ -médiée par blocage de l'activation de la caspase 3 [54] ou en activant la voie NF- $\kappa$ B [55].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 2. Mécanismes d'atténuation de la réponse immunitaire innée anti-virale par le VHC.** (A) les hépatocytes reconnaissent l'ARN viral via les PRRs (pattern-recognition receptor) RIG-I et TLR3. Ces récepteurs activent, via les molécules adaptatrices IPS-1 et TRIF, respectivement NF- $\kappa$ B et les kinases IKK $\Sigma$  et TBK1 (TNF receptor-associated factor family member-associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase 1). IKK $\Sigma$  et TBK1 phosphorylent le facteur de transcription IRF3, qui dimérise puis est transloqué dans le noyau et active la transcription du gène IFN- $\beta$ , en synergie avec NF- $\kappa$ B. NS3/4A clive TRIF et IPS-1 et bloque la signalisation TLR3 and RIG-I. (B) La liaison de l'IFN- $\beta$  aux récepteurs IFNAR-1 et -2 active la voie de signalisation JAK/STAT. De manière plus spécifique, l'activation des kinases TYK2 and JAK1 permet la phosphorylation et l'assemblage du facteur de transcription ISGF3 (constitué de l'hétérodimère STAT1-STAT2 et d'IRF9). Ce complexe trimérique est transloqué dans le noyau, se lie à ISRE (IFN-stimulated response element) et induit la transcription des ISGs (IFN stimulated genes) 2'-5' OAS, PKR et IRF7. La protéine Core interfère avec la voie JAK/STAT en induisant SOCS1/3, un inhibiteur de la voie JAK/STAT ou en inhibant directement la phosphorylation de STAT1. La polyprotéine virale induit PP2A (protein phosphatase 2A) qui interfère avec la méthylation de STAT1 et augmente son interaction avec PIAS (protein inhibitor of activated STAT1), ce qui a pour conséquence d'empêcher la liaison du complexe ISGF3 à ISRE et de bloquer la transcription des ISGs. Enfin, les protéines E2 et NS5A inhibent directement le fonctionnement de plusieurs ISGs (Rehermann, *J Clin Invest* 2009) [7].

**La protéine NS5B** est une protéine phosphorylée de 68 kDa identifiée comme l'ARN polymérase ARN dépendante du virus, qui assure la synthèse des brins d'ARN viraux positifs et négatifs. Enzyme clé de la réplication du virus, elle représente une cible majeure des thérapies anti-virales.

**Une onzième protéine “F”** (frameshift protein) ou **“ARFp”** (alternate reading frame protein) a été décrite, générée par un changement de cadre de lecture du ribosome dans la région amino-terminale de l'ORF codant la protéine Core. Sa fonction au cours du cycle viral reste indéterminée. Elle aurait des propriétés régulatrices sur l'oncogène c-myc et l'anti-oncogène p53 et pourrait être impliquée dans le processus de carcinogenèse [56].

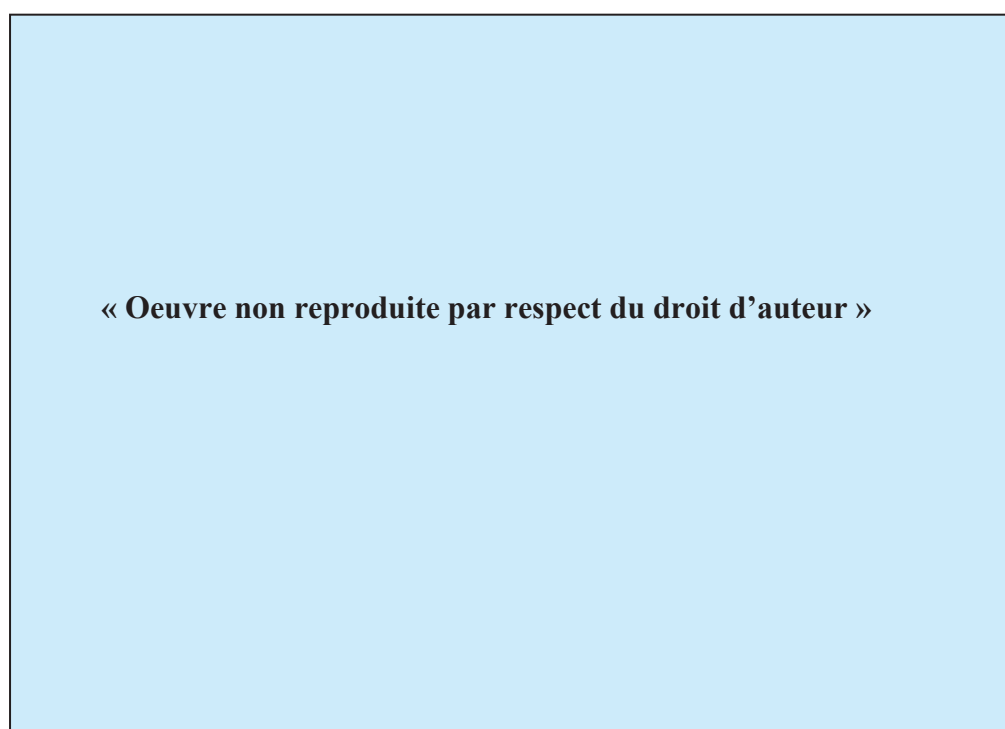
### ***3 - Le cycle répliatif du VHC***

Le développement de systèmes de réplication *in vitro* dans des lignées de cellules hépatocarcinomateuses (JFH1/HCVcc et HCVpp) ou plus récemment dans des hépatocytes humains [57] a permis d'élucider certaines étapes du cycle de réplication du VHC. In vivo, la principale cellule hôte est l'hépatocyte humain. L'entrée du virus dans la cellule nécessite des interactions spécifiques avec de nombreux récepteurs de surface cellulaire: l'adhésion du virus à la surface des cellules hôtes implique le récepteur des LDL et/ou les glycosaminoglycanes (GAGs, notamment heparan sulfate) (Figures 3 et 4). Puis la liaison spécifique entre les glycoprotéines d'enveloppe et les récepteurs d'entrée SB-R1 (récepteur scavenger de classe B type 1) et CD81 (tétraspanine) induit la translocation des complexes virus-récepteurs aux jonctions serrées au niveau desquelles le virus interagit avec les co-récepteurs claudine-1 et occludine [58, 59]. Les molécules DC-SIGN et L-SIGN permettraient aussi l'attachement du virus à la surface de la cellule cible [60, 61]. Le virus est ensuite internalisé par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant puis l'endosome subit une acidification. Le réarrangement de l'hétérodimère E1-E2 qui s'ensuit induit la fusion des membranes virales et endosomales et aboutit à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. La traduction de l'ARN viral dépend de la structure IRES présente dans sa région 5'UTR qui interagit avec la sous-unité ribosomale 40S. Elle peut débiter n'importe où mais la synthèse du peptide signal d'E1 déplace le complexe de traduction au niveau du RE. Elle génère une polyprotéine précurseur qui va être clivée par les protéases cellulaires et virales en protéines structurales et non structurales. Ces dernières sont ancrées à la membrane du RE (sauf NS3 qui est cependant reliée à NS4A) et vont former un complexe de réplication au niveau d'un réseau membranaire appelé “membranous web” riche en lipides facilitant la réplication et l'assemblage du virus et protégeant l'ARN viral



des PRRs (pathogen recognition receptor) cytoplasmiques impliqués dans la réponse immunitaire innée.

L'ARN polymérase ARN dépendante (NS5B) procède à la synthèse du brin d'ARN complémentaire de polarité négative à partir d'ARN<sup>+</sup>. L'ARN résultant double-brin, appelé intermédiaire de réplication, sera copié de multiples fois en molécules d'ARN génomique. Le brin d'ARN négatif va servir de matrice pour synthétiser de multiples copies d'ARN<sup>+</sup>. Certains facteurs cellulaires protéiques ou ribonucléiques sont indispensables à la réplication du virus en interagissant avec le génome viral ou les protéines virales, comme miARN-122 qui se fixerait à la région 5'UTR de l'ARN [62, 63], l'hélicase cellulaire p68 qui interagirait avec NS5B [64], la protéine cellulaire hVAP-33 impliquée dans la localisation de NS5B au niveau des radicaux lipidiques [65], la cyclophiline A qui interagirait avec NS2 [66] (Figure 4). Enfin, les ARN double brin sont localisés à la surface du RE auquel sont associées les protéines NS5A et Core, et à proximité des gouttelettes lipidiques suggérant l'implication des voies de biosynthèse des lipides dans la réplication virale [67]. Une fois associée aux gouttelettes lipidiques, la protéine Core interagirait avec la protéine NS5A qui recruterait les complexes de réplication à proximité des gouttelettes lipidiques et le virus utiliserait les voies d'assemblage et de sécrétion des VLDL (very low density lipoprotein) pour sortir de la cellule [68].



**Figure 3. Modèle d'entrée du VHC dans la cellule.** Les premières étapes de l'entrée du virus dans la cellule peuvent être modulées par des composants du sérum. L'infectiosité du VHC peut ainsi être favorisée par les HDL (high density lipoprotein) ou inhibée par les LPL (lipoprotein lipase), LDLox (oxidized LDL) et SAA (serum amyloid A apolipoprotein). La présence de EWI-2wint dans certains types cellulaires peut également bloquer l'interaction des particules virales avec CD81 et les protéger de l'infection par le VHC (Helle et Dubuisson, *Cell Mol Life Sci* 2008) [58].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 4. Interactions du VHC avec l'hôte pendant le cycle viral.** Les étapes supposées du cycle du VHC sont représentées et les co-facteurs de la cellule hôte impactant sur l'infection virale dans le système de culture sont mis en relation avec les étapes par des codes couleur : adhésion et entrée (brun), traduction et maturation (rouge), réplication (vert), assemblage et sortie (bleu), trafic (gris), réponse des protéines dépliées (rose) et cytosquelette (violet). Abréviations : LDLr, low-density lipoprotein receptor; PTBP1, polypyrimidine tract binding protein 1; DDX3, dead box RNA helicase; HSP70, heat shock protein 70; ATF6, activating transcription factor 6; ACTN1, actinin alpha 1; SR-BI, scavenger receptor BI; VAP-A/B, vesicle-associated membrane protein A and B; MTP, microsomal transfer protein; PI3K, phosphoinositide-3-kinase (Georgel et al, Trends Mol Med 2010) [3].

#### ***4 - La variation génomique: génotypes et quasi-espèces***

Le génome du VHC est très variable. Cette variabilité est due aux fréquentes erreurs de l'ARN polymérase virale, dont l'activité de réplication est importante ( $10^{12}$  particules produites par jour) mais qui est dépourvue d'activité de relecture et de correction. Elle génère donc de nombreuses mutations dans une souche donnée, dont la fixation dans le génome va dépendre de la valeur répliquative (fitness) du génome et des virus résultants qui portent ces mutations.

La variabilité du VHC au cours du temps et de l'évolution des populations humaines est responsable d'une diversification du génome en 6 génotypes (1 à 6) montrant 65-70% d'homologies de séquence et en sous-types génotypiques (a, b, c, ...) montrant 80-85% d'homologies de séquence. Elle n'est pas répartie de manière uniforme sur le génome et elle est plus fréquente sur les gènes structuraux que sur les gènes non structuraux ou non codants. La région E2 est connue comme étant la plus variable, les régions 3' et 5' non codantes les mieux conservées et les régions E1, Core et NS5B celles relativement conservées servant à l'établissement du génotype et du sous-type génotypique. Il existe aussi des différences de taille

du génome entre les différents génotypes, dues à des insertions/délétions, touchant essentiellement la région 3' non codante, les régions E2 et NS5, moins fréquemment E1. La répartition géographique des génotypes et des sous-types génotypiques n'est pas uniforme et est déterminée par l'ancienneté d'apparition de chaque génotype, les mouvements des populations et les voies de transmission. Par exemple, la diversification récente et rapide des sous-types 1a et 1b semble résulter de leur diffusion mondiale ces cent dernières années par le biais de la transfusion sanguine pour le 1b et de la toxicomanie intra-veineuse (IV) pour le 1a; celle du génotype 3a est encore plus récente, diffusée rapidement par le biais des usagers de drogues à partir des années 1960, ce qui explique que ces 10 dernières années, les génotypes 1a et 3a aient le plus progressé dans les pays industrialisés, notamment en France où la toxicomanie IV est aujourd'hui la première cause de transmission du VHC [69]. Les génotypes 1, 2, 3 sont retrouvés sur tous les continents, avec des prévalences différentes selon les pays et régions. Le génotype 1 prédomine au pourtour du bassin méditerranéen, notamment en France où le génotype 1b est significativement associé à une transmission par transfusion sanguine et à un âge > 50 ans, alors que les génotypes 1a et 3a sont associés à une transmission par toxicomanie IV et à un âge < 40 ans. Le génotype 3 prédomine en Inde et au Pakistan. Le génotype 4 est observé principalement au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, notamment en Egypte, le génotype 5 quasi exclusivement en Afrique du Sud et le génotype 6 en Asie du Sud-est et au Vietnam, alors que c'est le génotype 1 qui prédomine en Chine, Taiwan et dans les autres pays de l'Asie du Nord [70, 71].

D'autre part, à l'échelle de l'hôte infecté, le VHC est également présent sous la forme de plusieurs virus distincts mais très proches génétiquement les uns des autres car issus d'un même virus parental. Ce mélange de variants définit une quasi-espèce, avec une espèce majoritaire et un spectre d'espèces minoritaires. La quasi-espèce est en équilibre instable et subit des nombreuses variations à la fois quantitatives et qualitatives au cours de l'infection chronique.

Les différences génétiques observées entre types, sous-types ou variants d'une même quasi-espèce au sein d'un individu peuvent avoir des conséquences phénotypiques et influencer la biologie du virus, notamment affecter le taux de réplication, le tropisme cellulaire, la pathogénèse, les lésions histologiques associées ou encore la réponse au traitement [72, 73].

Les facteurs génétiques de l'hôte et du virus peuvent, de manière encore inexploitée, être associés. Par exemple, depuis la découverte de SNPs (single-nucleotide polymorphism) dans la région de l'IL28B (rs8099917, rs12979860, rs12980275) associés de manière indépendante à la clairance virale spontanée et à la réponse à la bithérapie Interféron  $\alpha$ -Ribavirine [74, 75], certaines études ont montré que le « bon » SNP rs12979860 CC était sous-exprimé chez les patients porteurs d'un génotype 1 ou 4 et sur-exprimé chez les porteurs de génotypes 2 et 3 dans une étude espagnole [76] et que le « bon » SNP rs8099917 TT était sur-exprimé chez les porteurs

de génotypes non 1 dans une large population asiatique [77]. Un autre type de relation très intéressante entre variabilité du génome humain et du génome viral a été démontré récemment par une équipe japonaise, celui de l'association du SNP rs8099917 TT avec la substitution de l'AA70 (arginine 70) dans la protéine Core du VHC [73], mutation connue pour être un facteur prédictif indépendant de bonne réponse au traitement anti-viral C [78, 79].

## **Chapitre II : Hépatite chronique virale C et cirrhose**

### ***1 - Epidémiologie et transmission du VHC***

L'hépatite C est la cause majeure d'hépatopathie chronique dans les pays développés, incluant les USA, l'Europe et le Japon. Le VHC est endémique dans la majeure partie du monde et en 1999, l'OMS estimait à 3% de la population mondiale le nombre de personnes infectées par le VHC, soit 170 millions de porteurs chroniques exposés aux complications (cirrhose et CHC). Des données plus récentes portent à 2% de la population mondiale le nombre de personnes chroniquement infectées [80]. La distribution géographique de l'infection est variable avec une prévalence élevée en Asie et en Afrique (10% de la population en moyenne, Egypte autour de 20% dont 5% en Haute-Egypte et 30% en Basse-Egypte), basse aux USA (1%) et intermédiaire en Inde et au Pakistan (4,7%) [71, 81, 82].

En Europe, il existe un gradient de prévalence Nord-Sud ( $\leq 0,5\%$  dans le Nord et 2% dans le pourtour méditerranéen). Une prévalence supérieure à 3% est observée en Roumanie, Russie, Grèce et Italie. En France, la prévalence est de 1,2% (0,8 à 1,3%) représentant 500 000 à 600 000 personnes. Dans les pays développés à prévalence basse, la toxicomanie IV représente le moyen de contamination privilégié. Dans ceux où elle reste élevée, les infections nosocomiales, notamment par le biais de seringues en verre, continuent à jouer un rôle important. Enfin, l'immigration en provenance de pays endémiques participe aux infections nouvelles, comme en Israël, Allemagne et Suisse où elle représente respectivement 70%, 37% et 33% des nouveaux cas [83].

L'incidence de l'infection est plus difficile à apprécier car elle est souvent asymptomatique et rarement détectée à la phase aiguë et que les tests de dépistage ne différencient pas les infections aiguës des infections chroniques ou guéries. Des modélisations réalisées aux USA montrent une incidence basse avant 1965 (0-44/100 000) et une augmentation

entre 1965 et 1980. L'incidence est culminante dans les années 1980 (100-200/100 000), puis décroît dans les années 1990, comme dans d'autres pays d'Europe (France, Italie) [81].

Historiquement, la contamination s'est faite via trois vagues de dissémination successives: les activités de soin par des aiguilles et seringues réutilisables non stérilisées, la transfusion sanguine puis la toxicomanie IV. Il a été montré que l'infection a commencé à sévir chez les adultes jeunes au Japon à la fin de la deuxième guerre mondiale, dans le sud de l'Europe vers 1940 et en Amérique vers 1960-1970, par utilisation d'aiguilles et de seringues non stérilisées, puis par le biais des transfusions sanguines jusqu'en 1990 [84, 85].

La contamination par le VHC se fait par voie parentérale, par contact direct avec du sang souillé. Depuis la mise en place d'un test de dépistage chez les donneurs de sang en 1991 dans la majorité des pays développés, le risque de transmission par transfusion sanguine est bas (0,03% par unité transfusée) et le facteur de risque majeur des nouvelles infections dans ces pays est la toxicomanie IV (environ 10% des personnes utilisatrices infectées par an en France, 6% à 39% par an en Europe, et 65% à 90% chez les utilisateurs de longue date aux USA). Dans les pays en voie de développement, les facteurs de risque principaux sont les transfusions et l'utilisation de matériel non stérile. L'utilisation de cocaïne par voie intra-nasale, scarifications, coupures, percings et tatouages représentent d'autres modes possibles de contamination. Contrairement au VHB, la transmission materno-foetale est rare, de même que la contamination par voie sexuelle, mais dans ces deux cas, l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) augmente le risque de contamination par le VHC.

## ***2 - Histoire naturelle du VHC***

L'histoire naturelle de la maladie du foie liée au VHC est confrontée à plusieurs obstacles : un début de maladie souvent asymptomatique et une date de contagion incertaine, l'absence de signes cliniques marquant le passage de l'hépatite aiguë à l'hépatite chronique, une évolution chronique à bas bruit responsable d'une prise en charge tardive de la maladie parfois au stade de cirrhose, une difficulté d'appréhender la vitesse d'évolution de la fibrose avec des co-facteurs nombreux susceptibles de modifier son histoire naturelle.

La contamination par le VHC entraîne une hépatite aiguë, le plus souvent inapparente. La majorité des sujets infectés vont devenir porteurs chroniques du virus et développer des lésions histologiques d'hépatite chronique. Certains vont évoluer jusqu'à la cirrhose, stade ultime de la maladie fibrosante, et développer des complications cliniques ou un CHC, indications principales de transplantation hépatique. Cette progression vers la cirrhose peut être asymptomatique et n'être découverte qu'au stade de décompensation [86].

## **- Hépatite virale C aigüe**

Elle représente 20% des hépatites aigües et est le plus souvent cliniquement inapparente. Elle ne peut être étudiée que dans les cas symptomatiques (asthénie, nausées, hépatalgies, ictère conduisant à réaliser un bilan biologique objectivant une élévation des transaminases) ou dans le cadre d'un suivi systématique de contamination accidentelle. Chronologiquement, 7 à 10 jours après la contamination, l'ARN viral devient détectable par PCR dans le sérum, pouvant atteindre rapidement  $10^5$  à  $10^7$  UI/ml. Ensuite, les transaminases augmentent dans un délai supérieur à 15 jours (jusqu'à 4 semaines après la contamination) avec un pic pouvant atteindre 10 fois la normale. L'augmentation des alanines amino-transférases (ALAT) est souvent moins importante que dans les hépatites virales aigües A ou B, et un ictère n'est observé que dans moins de 20% des cas. L'hépatite fulminante est rare en dehors de cofacteurs tels que la co-infection par le VHB [87]. Enfin, dans un délai de 20 à 150 jours (6 à 10 semaines), les Ac anti-VHC apparaissent dans le sérum. En présence d'une PCR-VHC positive, seule l'apparition d'Ac permet d'affirmer le caractère aigü de l'infection.

Dans 10 à 40% des cas, il existe une guérison spontanée de l'hépatite C aigüe. La guérison est définie par la disparition de l'ARN-VHC dans le sérum, contrôlée à deux reprises à 6 mois d'intervalle. Les transaminases se normalisent rapidement. Le titre des Ac anti-VHC diminue lentement mais les Ac persistent plus de 10 ans après la disparition de l'ARN. Le mode de contamination (jeunes usagers de drogues IV, patientes contaminées par des immunoglobulines anti-D), le caractère ictérique de l'hépatite, l'absence de co-infection par le VIH, un faible pic virémique, seraient des facteurs prédictifs positifs d'élimination spontanée du virus.

## **- Hépatite virale C chronique**

Elle est définie par la détection d'ARN viral dans le sang plus de 6 mois après la contamination. La phase chronique touche la majorité des sujets infectés (60-90%) et le risque de passage à la chronicité est plus élevé chez les sujets âgés, masculins, porteurs d'un déficit immunitaire ou présentant une PCR-VHC positive 3 mois après la contamination. L'infection reste le plus souvent asymptomatique, malgré l'activité et la progression de la fibrose, et les transaminases peuvent être normales ou fluctuantes.

La progression de la fibrose hépatique n'étant pas linéaire dans le temps. La caractérisation des facteurs influençant sa vitesse de progression est d'une grande importance, permettant de prédire le risque de survenue de la cirrhose et de ses complications et de proposer un traitement ou une surveillance adaptés (Figure 5). Chez les patients chroniquement infectés

par le VHC, les facteurs favorisant le développement de la fibrose sont davantage liés à l'hôte et aux facteurs environnementaux (âge élevé au moment de la contamination, sexe masculin, consommation d'alcool (>50g/j), obésité et insulino-résistance, co-infection par les virus VHB et VIH, immunodépression, surcharge en fer, stéatose) [88-90] qu'au virus (génotype, charge virale, quasi-espèce) [91]. Le tabagisme et la consommation de cannabis ont aussi été rapportés comme des facteurs influençant la progression de la fibrose. Récemment, des études génétiques ont mis en évidence chez l'hôte des polymorphismes génétiques susceptibles d'influencer l'évolution de la fibrose [92, 93]. Par exemple, le polymorphisme du TLR4 est susceptible de moduler le risque de fibrose hépatique chez les caucasiens chroniquement infectés par le VHC [94]. Le polymorphisme de PNPLA3 (patatin-like phospholipase-3) favoriserait également la progression de la fibrose [95]. Des associations de polymorphismes réalisant une « signature génétique » permettent de prédire le risque de cirrhose mais aussi de progression fibreuse d'une hépatite chronique virale C minime [96-98]. Par contre, le polymorphisme de l'IL28B ne semble pas avoir d'impact sur la progression de la fibrose [99].

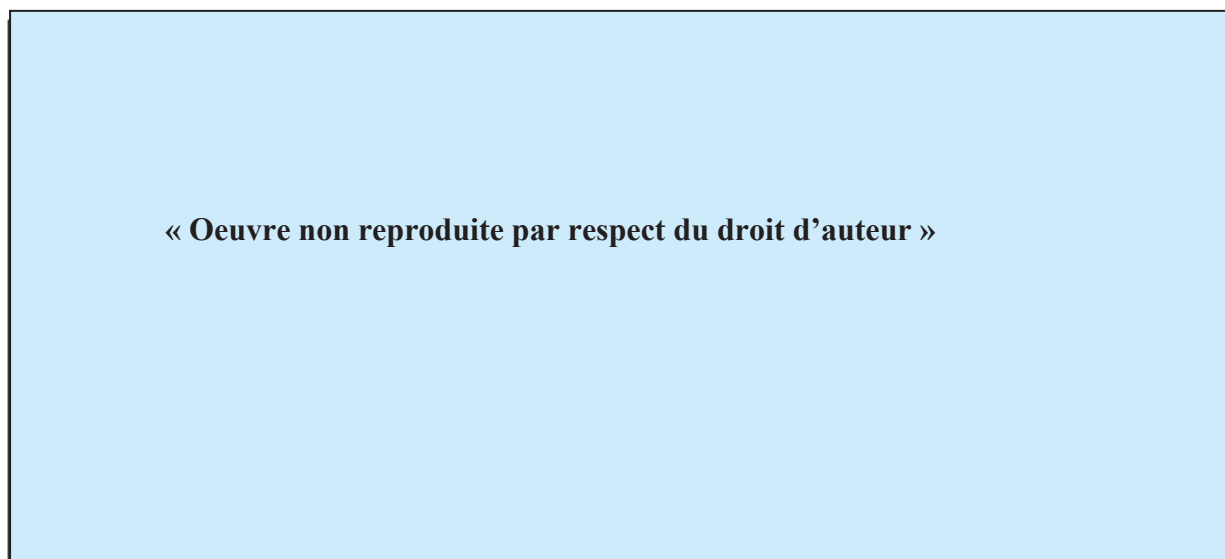
L'estimation de la progression "naturelle" de la fibrose est plus problématique en raison de la difficulté de disposer de biopsies hépatiques consécutives chez un même patient naïf de traitement et chez un grand nombre de patients. A partir d'études transversales, la vitesse médiane de progression de la fibrose a été estimée à 0,13 point de fibrose Métavir par an [100]. L'avènement des marqueurs non invasifs de fibrose, parfaitement validés dans les sous-populations de patients chroniquement infectés par le VHC et indemnes de co-morbidité, permettra probablement d'apporter certaines réponses.

### **- Complications : cirrhose et carcinome hépatocellulaire**

Il est estimé qu'une cirrhose se développe dans 15-30% des cas après 25-30 ans d'infection chronique par le VHC. Certaines études ont montré que la progression vers la cirrhose était directement liée à l'âge, au sexe, à la prise d'alcool et, au plan histologique, au stade de fibrose, au degré d'activité nécrotico-inflammatoire et à la présence d'une stéatose sur la première biopsie [101-104]. Le score de Child-Turcotte-Pugh, le plus utilisé pour évaluer la gravité de la maladie hépatique chronique et le pronostic de la cirrhose, repose sur 5 critères biologiques et cliniques (bilirubine totale, albumine, taux de prothrombine, ascite et encéphalopathie hépatique). La gravité de chacun est cotée de 1 à 3 et le score final A (5-6), B (7-9) ou C (10-15) définit le pourcentage de survie à 1 et 2 ans.

L'infection par le VHC augmente le risque de CHC par le biais du développement de la fibrose hépatique et éventuellement de la cirrhose. Un CHC se développe dans 1-3% des cas, après 25-30 ans d'infection chronique par le VHC. Une fois la cirrhose établie, le CHC se développe à un taux annuel de 1-4% (7% au Japon) [105] [86]. Des facteurs supplémentaires

comme l'origine ethnique noire, les taux de plaquettes et de phosphatase alcaline, le tabac et la présence de varices, sont associés à un risque accru de CHC chez les patients cirrhotiques.



**Figure 5. Histoire naturelle de l'infection par le VHC et ses variations évolutives.** L'évolution de l'infection varie largement selon les individus. Les facteurs qui diminuent le risque de progression vers les complications (cirrhose et CHC) sont le sexe féminin et le jeune âge au moment de l'infection. Les personnes avec ce profil de risque favorable n'ont souvent pas de maladie progressive avant 30 ans ou plus après l'infection. Les facteurs qui augmentent le risque de progression incluent la consommation d'alcool, un âge avancé au moment de l'infection, le sexe masculin et les co-infections virales (VHB, VIH). Les personnes avec ce profil de risque défavorable sont susceptibles de développer des complications dans les 20 ans voire moins après l'infection. Une fois la cirrhose développée, le risque de CHC est de 1 à 4% par an (**Lauer et Walker, NJEM 2001**) [86].

### ***3 - Les lésions histologiques de l'hépatite virale C***

Les lésions de l'hépatite virale C aiguë ne sont pas spécifiques du virus et il est exceptionnel que le pathologiste ait à examiner une biopsie hépatique dans ce contexte. Elles sont caractérisées par la présence de corps apoptotiques intra-lobulaires associés à un infiltrat inflammatoire mononucléé lymphocytaire sinusoidal et portal pouvant former des nodules lymphoïdes. La nécrose hépatocytaire massive confluyente ou en pont est exceptionnelle. Des lésions inflammatoires des canaux biliaires, une stéatose ou une cholestase histologique peuvent être notés [106].

Les lésions de l'hépatite chronique virale C comportent des lésions non spécifiques liées au caractère chronique de l'activité nécrotico-inflammatoire aboutissant au développement de la fibrose, et des arguments en faveur d'une origine virale C. Les mécanismes immunitaires jouent un rôle majeur dans la physiopathologie des lésions induites par le VHC et les lésions résultent d'une interaction complexe entre les facteurs liés au virus et ceux liés à l'hôte.



## **- Lésions histologiques de l'hépatite chronique virale**

L'hépatite chronique est caractérisée par une inflammation portale et par une destruction inflammatoire des hépatocytes réalisant une activité nécrotico-inflammatoire péri-portale et lobulaire, associée à la constitution progressive d'une fibrose [107, 108]. L'infiltrat portal est constitué essentiellement de lymphocytes qui peuvent former des agrégats nodulaires ayant parfois la structure de follicules lymphoïdes. Les polynucléaires sont rares. Les lésions de nécrose hépatocytaire sont constituées de corps apoptotiques et/ou d'amas inflammatoires lymphocytaires et/ou de cellules inflammatoires au contact d'hépatocytes nécrosés. Ces cellules inflammatoires correspondent en majorité à des lymphocytes T (TCD4 et TCD8) associés à quelques macrophages et à de rares plasmocytes. Les lésions nécrotico-inflammatoires détruisent la lame hépatocytaire bordant les espaces portes (nécrose parcellaire, ou péri-portale, ou hépatite d'interface, ou piecemeal necrosis) et les hépatocytes intra-lobulaires (nécrose lobulaire) (Figure 6). La fibrose est la conséquence évolutive de l'activité nécrotico-inflammatoire. Les espaces portes fibreux sont élargis, d'aspect étoilé, et l'accumulation progressive du collagène dans les espaces péri-sinusoidaux entraîne la formation de ponts fibreux (septa) entre deux espaces portes (EP) ou entre les espaces portes et les veines centro-lobulaires (VCL). La cirrhose est constituée quand cette fibrose devient annulaire, c'est à dire entoure complètement des nodules hépatocytaires (Figures 6 et 7).

## **- Arguments histologiques en faveur de l'origine virale C**

Certains arguments histologiques, comme la stéatose, les nodules lymphoïdes portaux et la cholangite, sont considérés comme caractéristiques, bien que non spécifiques [109, 110] (Figure 6). La stéatose est plus fréquente dans l'hépatite chronique virale C (50-70% des cas) que dans les autres hépatopathies chroniques [111]. Elle est plus fréquente au cours d'une infection par le génotype 3a (effet cytopathogène du virus) que dans les autres génotypes où elle serait liée à des facteurs métaboliques [112, 113] ou à certains polymorphismes génétiques, notamment des gènes IL28B et PNPLA3 [114, 115]. Des lésions de stéato-hépatite non alcoolique sont présentes dans 10% des cas, plus fréquentes dans le génotype 3, et sont associées à des lésions nécrotico-inflammatoires et fibrosantes significativement plus avancées [116]. Des granulomes épithélioïdes et une hépatosidérose peuvent aussi être observés.

## **- Scores de gravité de l'hépatite chronique virale C**

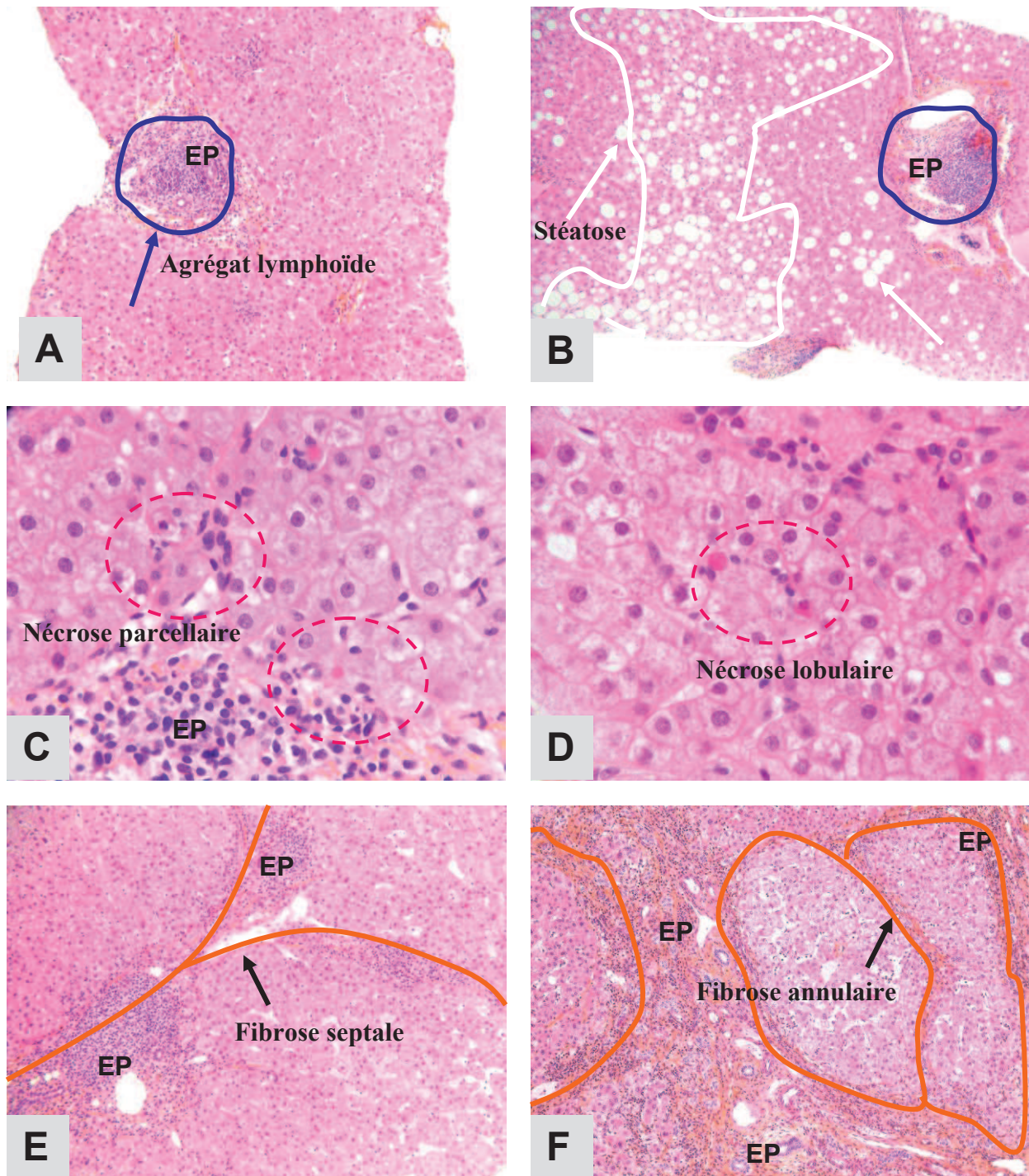
Un des intérêts majeurs de la biopsie hépatique reste l'évaluation de la gravité de l'hépatite chronique virale C, même si l'HAS (Haute Autorité de Santé) reconnaît aujourd'hui l'intérêt de certains marqueurs non invasifs (Fibrotest, Fibromètre, Hépascore et Fibroscan) et

autorise leur réalisation en première intention dans l'évaluation de la fibrose chez les patients non traités et sans co-morbidité. L'évaluation histologique repose sur des scores semi-quantitatifs utilisant des critères simples permettant une bonne reproductibilité intra- et inter-pathologistes. Le score de Knodell, le plus ancien, a servi de base à l'élaboration de scores plus reproductibles et les scores de Métavir et d'Ishak sont à l'heure actuelle les plus utilisés [117-119]. Les deux éléments pris en compte sont le degré d'activité nécrotico-inflammatoire (grade) et l'importance de la fibrose (stade). Dans le score Métavir utilisé en Europe et élaboré en 1996 par un groupe de pathologistes français, il existe 4 grades d'activité nécrotico-inflammatoire de A0 à A3 résultant d'un algorithme entre intensité de la nécrose péri-portale ou parcellaire (NP) et intensité de la nécrose lobulaire (NL) et 5 stades de fibrose (F0 à F4) (Figure 8). L'interprétation semi-quantitative de ces lésions est sujette à la variabilité intra- et inter-observateur des pathologistes [120]. De plus, la distribution de la fibrose étant hétérogène et la biopsie hépatique ne représentant que 1/50 000<sup>ème</sup> de la masse hépatique, les résultats de cet examen sont soumis à un biais d'échantillonnage manifeste. La biopsie hépatique reste néanmoins le "gold standard" et une taille d'au moins 20-25 mm de longueur et un nombre d'au moins 11 espaces portes sont considérés actuellement comme indispensables à une évaluation semi-quantitative optimale de la gravité de la maladie du foie [121-123].

### **- Autres intérêts de la biopsie hépatique**

Malgré son caractère invasif, la biopsie hépatique fournit des éléments diagnostiques complémentaires utiles à l'évaluation de la gravité de l'hépatite et de son évolution. Il peut s'agir :

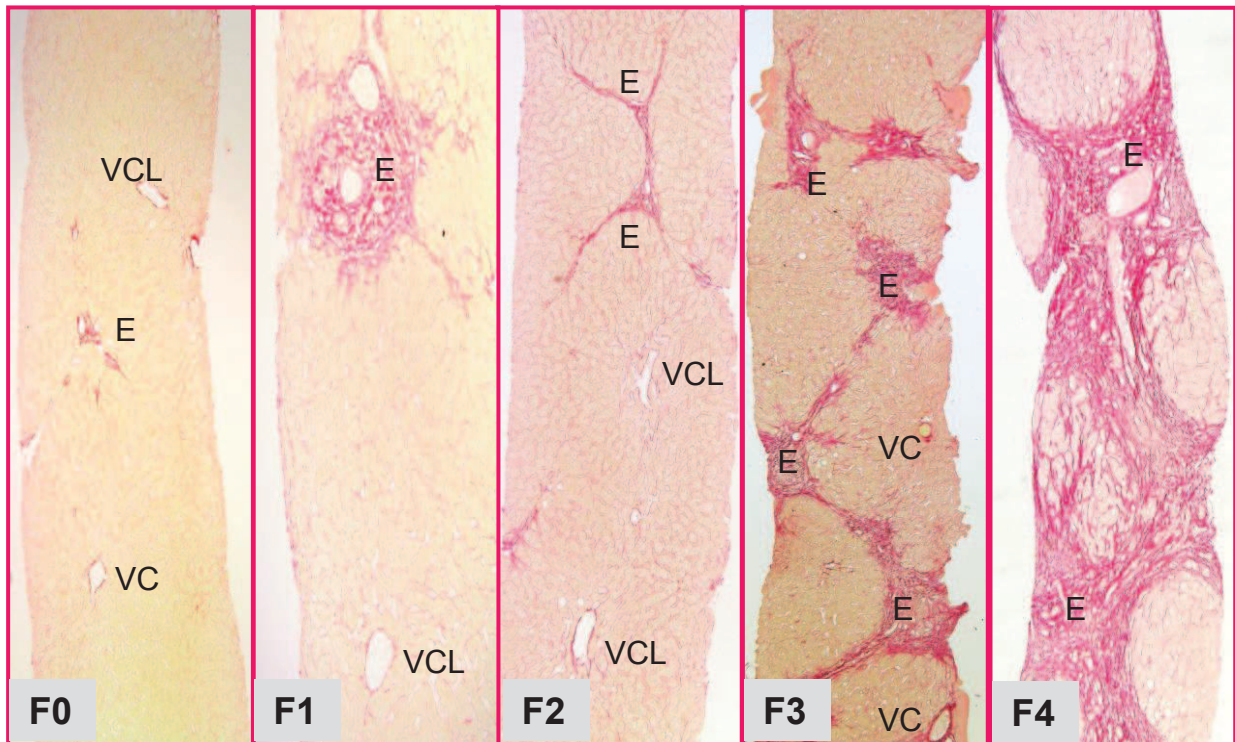
- de l'évaluation semi-quantitative des signes histologiques associés à l'hépatite chronique virale C pouvant être prédictifs de la progression de la fibrose ou de la réponse au traitement (stéatose et stéato-hépatite, surcharge en fer)
- de l'évaluation de signes histologiques en rapport avec une co-morbidité (éthylisme chronique, traitements au long cours, syndrome métabolique ...)
- de la recherche de pathologies associées pouvant avoir un rôle dans l'évolution de la maladie (co-infections, hépatopathies ou cholangiopathies auto-immunes, NASH)
- de la détection d'altérations cellulaires pouvant précéder la survenue d'un carcinome hépatocellulaire (dysplasie à grandes ou à petites cellules, foyers d'hépatocytes déplétés en fer...).



**Figure 6. Lésions histologiques de l'hépatite chronique virale C.** (A) Nodule ou agrégat lymphoïde disposé au sein d'un espace porte (EP). (B) Foyer de stéatose macrovacuolaire au sein d'un lobule hépatique centré par un EP. (C) Nécrose parcellaire, caractérisée par des foyers nécrotico-inflammatoires constitués de lymphocytes et/ou de corps apoptotiques en périphérie d'un EP, au contact de la lame bordante. (D) Nécrose lobulaire, caractérisée par des foyers nécrotico-inflammatoires au sein d'un lobule, à distance de la lame bordante. (E) Fibrose septale caractérisée par la présence de ponts fibro-inflammatoires reliant deux espaces portes. (F). Fibrose annulaire découpant des nodules hépatocytaires caractérisant la cirrhose (coloration hématoxyline éosine safran).

		Nécrose parcellaire (NP)				Fibrose (F)	
		NP0	NP1	NP2	NP3	F0	Absence de fibrose
Nécrose lobulaire (NL)	NL0	A0	A1	A2	A3	F1	Fibrose portale sans septa
	NL1	A1	A1	A2	A3	F2	Fibrose portale avec rares septa
	NL2	A2	A2	A3	A3	F3	Fibrose septale sans cirrhose
						F4	Cirrhose

**Figure 7. Score de Métavir.** **A gauche**, algorithme représentant les degrés de nécrose parcellaire (NP0: absente, NP1: minime, NP2: modérée, NP3: sévère) et de nécrose lobulaire (NL0 : absente, NL1: minime, NL2: sévère) permettant l'évaluation semi-quantitative de l'activité nécrotico-inflammatoire globale en 4 grades (A0: absente, A1: activité minime, A2: activité modérée, A3: activité sévère). **A droite**, modifications architecturales permettant l'évaluation semi-quantitative des 5 stades de fibrose (F0 à F4).



**Figure 8. Stades de fibrose selon Métavir.** Evaluation semi-quantitative du stade de fibrose sur des coupes histologiques colorées au rouge Sirius (permettant une meilleure visualisation en rouge des dépôts fibreux, sur fond jaune correspondant au secteur parenchymateux composé majoritairement d'hépatocytes) à partir de biopsies hépatiques à l'aiguille.

## Chapitre III : Le carcinome hépatocellulaire

### *1 - Epidémiologie*

Selon les dernières données épidémiologiques issues des bases GLOBOCAN 2008 de l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer, <http://www-dep.iarc.fr>.) et des registres de mortalité de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2008 (World Health Organization, <http://www.who.int/whosis>), le CHC représente actuellement la **cinquième cause de cancer dans le monde chez l'homme et la septième chez la femme**, avec 749 000 nouveaux cas par an en 2008, contre 626 000 en 2002, représentant 4% des nouveaux cancers diagnostiqués dans le monde [124, 125] (Figure 9) Le risque de CHC est 2 à 7 fois plus élevé chez l'homme que chez la femme. Le ratio M/F, le plus souvent compris entre 2:1 et 4:1, apparaît plus élevé en Europe, notamment en France et en Italie où il est de 5:1 [126].

Les variations d'incidence sont considérables dans le monde, reflétant l'hétérogénéité de répartition des facteurs de risque. Les incidences les plus élevées de CHC sont observées dans les pays où l'incidence des infections virales B et C est la plus élevée, expliquant le fait que  $\frac{3}{4}$  des CHC se développent chez des patients atteints d'hépatite chronique virale. Plus de 80% des CHC surviennent dans les pays en voie de développement, avec des taux d'incidence standardisés sur l'âge élevés supérieur à 20/100 000 (Asie du Sud-Est où l'infection par le virus B est endémique, Mongolie détenant le record de l'incidence la plus élevée avec 116,6 nouveaux cas/100 000 personnes chez l'homme et 74,8/100 000 chez la femme, Afrique sub-saharienne). La Chine a elle seule draine plus de 55% des CHC dans le monde, avec des incidences de 37,9 et 14,2 respectivement chez l'homme et la femme. A l'opposé, l'incidence est plus basse dans les pays développés comme l'Amérique, l'Europe, l'Australie et la Nouvelle Zélande (<6/100 000), à l'exception des régions méditerranéennes du sud de l'Europe où l'incidence se situe entre 10-15/100 000 chez l'homme (Italie en tête avec 15,9 et France avec 10,5 chez l'homme) et du Japon. L'incidence du CHC augmente globalement dans le monde, alors que celle des autres cancers tend à diminuer. De manière paradoxale, entre 1978 et 1992, elle a augmenté dans les pays développés alors qu'elle diminuait dans les pays en voie de développement, phénomène expliqué par l'augmentation de l'incidence de l'infection virale C et par l'immigration de personnes provenant des pays en voie de développement. Par exemple, aux Etats-Unis, elle a triplé de 1975 à 2005, passant de 1,6 à 4,9/100 000, avec 22 620 nouveaux cas en 2009 [127], parallèlement à une augmentation de l'incidence de l'infection par le VHC [105]. Une étude observationnelle récente conduite aux USA de 1996 à 2006 montre une augmentation du nombre

de patients infectés par le VHC, passant de 17 261 en 1996 à 106 242 en 2006, responsable d'une augmentation significative dans cette période de la prévalence de la cirrhose de 9% à 18,5% et du CHC de 0,07% à 1,3% [128]. Alors que la prévention des infections virales B et C devrait aboutir à une diminution de l'incidence du CHC, l'identification plus récente de la NAFLD en relation avec le syndrome métabolique pourrait constituer dans l'avenir un facteur de risque non négligeable dans les pays développés, toujours précédé par l'alcool qui constitue dans le monde un facteur de risque majeur après les hépatopathies virales.

Le CHC est la **troisième cause de décès par cancer dans le monde**, représentant 1% des décès par cancer, avec 694 000 décès par an en 2008 contre 598 000 en 2002, reflétant le mauvais pronostic de cette tumeur souvent asymptomatique et détectée à un stade avancé, chez des patients dont l'altération de la fonction hépatique est gravement altérée, avec des options thérapeutiques limitées pour les cancers détectés tardivement [124]. Le CHC reste un des cancers les plus agressifs, avec un ratio mortalité/incidence à 0,93 et un taux de survie global à 5 ans inférieur à 10%, même dans les pays développés (6,5% en Europe pour la période 1990-1999 et 8,3% aux USA pour la période 1995-2000) [129]. C'est la principale cause de décès chez les patients atteints de cirrhose. Aux Etats Unis, entre 1990 et 2005, le taux de décès est passé de 5,27 à 7,76 pour 100 000, et 18 160 décès ont été enregistrés en 2009 [130]. En Europe, les taux de décès les plus hauts sont enregistrés en France, en Italie et en Suisse (6,8 ; 6,7 ; 5,9 respectivement pour 100 000 chez l'homme) [131].

La survie médiane des CHC est inférieure à 1 an [132] et celle des CHC non éligibles à un traitement curatif est inférieure à 5 mois [133, 134], avec un taux de survie à 1 an de 20% et à 3 ans de 5,7% dans une série américaine basée sur des registres de CHC de 1992 à 1999 [135]. Concernant les CHC diagnostiqués à un stade précoce permettant un traitement curatif (résection ou transplantation), le pronostic est meilleur [135] atteignant 40-70% de survie à 5 ans [136]. Dans une étude japonaise de 2006 portant sur les CHC développés sur cirrhose virale C et traités par chirurgie de 1982 à 2003, le taux de survie à 5 ans passe de 33% avant 1992 à 64% après 1992 alors que le taux de survie sans récurrence varie peu (20% à 5 ans) [137]. Dans une série espagnole de CHC transplantés, le taux de récurrence est de 13% et les taux de survie à 1, 3 et 5 ans sont de 89%, 73% et 61% respectivement [138].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 9 A et B. Taux d'incidence standardisé sur l'âge des cancers primitifs du foie dans le monde (dont 90% sont des CHC) exprimé en nombre de cas / 100 000 (source: GLOBOCAN 2008, IARC) (Nordenstedt et al, Dig Liver Disease 2010) [125].**

## **2 - Hépatocarcinogénèse**

Le CHC est une tumeur hétérogène d'étiologies variées. L'hépatocarcinogénèse est donc un processus multi-étape complexe se développant, dans la majorité des cas, après des décennies d'hépatopathie chronique, induisant l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques (faisant intervenir des mécanismes multiples tels que activation d'oncogènes et/ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, activation de la télomérase, activation des voies de signalisation de la prolifération cellulaire ou expression de facteurs de croissance ou de facteurs angiogéniques) aboutissant à la transformation maligne d'un hépatocyte. La séquence des événements moléculaires conduisant à l'hépatocarcinogénèse a été largement détaillée par Llovet et Bruix qui proposent une classification moléculaire des CHC basée sur des corrélations entre les types d'altération génomique et la réponse thérapeutique [139].

### **- Hépatocarcinogénèse virale**

L'hépatocarcinogénèse virale touche plus particulièrement des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, tels la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, celle de p53 (incluant p14, MDM2 et p53), celle de pRb (incluant p16, CDK4, cyclin D1 et Rb1), celles de MAPK (incluant la cascade RAS, BRAF, MEK1/2, ERK1/2), JAK (janus kinase), STAT (signal transducer and activator of transcription) ou PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase) et celles des facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor) et TGF- $\beta$  [125, 140, 141] (Figure 10) Selon une hypothèse récente, la transformation maligne des hépatocytes serait favorisée par un turnover cellulaire accéléré induit par les lésions tissulaires chroniques et la régénération cellulaire permanente, dans un contexte d'inflammation chronique et de lésions oxydatives de l'ADN [142]. Ces mécanismes seraient responsables d'une érosion des télomères, d'anomalies chromosomiques et d'altérations du processus de réparation cellulaire contribuant à l'instabilité génomique fréquemment observée dans les CHC. Il existe de plus en plus d'évidence que le processus inflammatoire lui-même est intimement associé à l'hépatocarcinogénèse virale, notamment par le biais des cytokines [143]. Un des mécanismes évoqué est la production de cytokines cytotoxiques [144]. Notamment, les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$ , cytokines pro-inflammatoires membres de la famille du TNF exprimées à la surface des LT, des LB, des NK activés et des hépatocytes, ont été récemment impliquées dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les hépatocytes présents au sein des hépatites chroniques virales B et C et du CHC [145], voie qui serait impliquée dans la carcinogénèse hépatique [146, 147]. Notamment, la protéine Core du VHC pourrait interagir avec les récepteurs des lymphotoxines, LT $\beta$ R et TNFR1 et 2, et moduler leur signalisation impliquant la voie NF- $\kappa$ B [148, 149].



« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

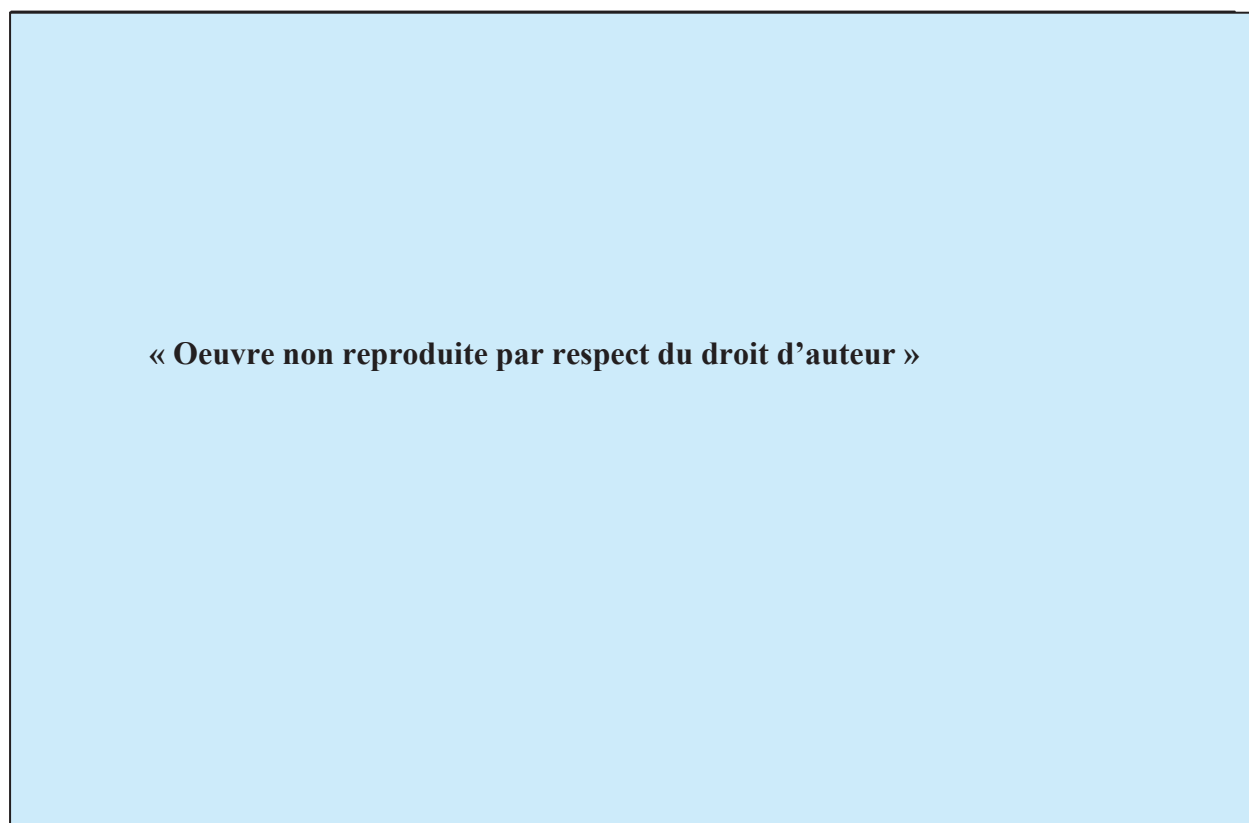
Figure 10. Modèle complexe d'hépatocarcinogénèse virale (Tsai et al, *Oncogene* 2010) [141].

### - Hépatocarcinogénèse virale C

Le VHC présente certaines caractéristiques clinico-biologiques et pathogéniques différentes du VHB, relevantes dans la compréhension de l'hépatocarcinogénèse virale C. Il est responsable d'une infection chronique dans 60-80% des cas (contre 10% avec le VHB) et induit une cirrhose dans 5-10% des cas au bout de 10 ans d'infection chronique (10-20 fois plus souvent que le VHB). Cependant, le VHC ne s'intègre pas au génome de l'hôte, ce qui constitue la différence majeure. Le CHC lié au VHC va donc être induit essentiellement par des mécanismes indirects, tels que l'inflammation chronique et les phénomènes de la mort cellulaire et de prolifération cellulaire qu'elle induit. L'hépatocarcinogénèse liée au VHC implique le système ROS, conséquence de l'inflammation chronique. En effet, l'infection chronique virale C s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif engendré principalement par les poussées inflammatoires responsables d'un dysfonctionnement mitochondrial et du stress du RE [150, 151]. En interférant avec différentes voies de signalisation (incluant MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K, p53, Wnt/ $\beta$ -caténine), ROS peut moduler l'expression des gènes et agir sur le métabolisme cellulaire, le cycle cellulaire ou la mort cellulaire. Par des mécanismes oxydatifs, ROS induit également des produits de peroxydation lipidique et des lésions de l'ADN responsables d'anomalies chromosomiques à l'origine de la transformation cellulaire [152]. Les protéines virales Core, NS3 et NS5A peuvent contribuer à la genèse des ROS. Certains facteurs volontiers associés à l'hépatite chronique virale C, tels que la stéatose et le fer impliqués dans la progression de la

fibrose, sont aussi capables d'induire une augmentation du stress oxydatif et des lésions de l'ADN (Figure 12).

Les protéines structurales et non structurales du VHC sont également très impliquées dans l'hépatocarcinogénèse, au devant desquelles la protéine Core, mais aussi E2, NS3 et NS5A [140]. Elles interagissent avec les cellules de l'hôte et affectent de nombreuses activités cellulaires et humorales, telles que signalisation cellulaire, modulation et régulation de l'activation transcriptionnelle, transformation cellulaire, apoptose, réarrangements membranaires, trafic vésiculaire lipidique ou production de cytokines et chimiokines. Les principales actions dans lesquelles elles sont impliquées sont résumées dans un chapitre précédent et détaillées dans une revue récente (Figure 11) [141].



**Figure 11. Génome du VHC comportant un large ORF (Open Reading Frame) codant pour les gènes structuraux et non structuraux, et deux régions non codantes en 5' et en 3'.** En plus de leur rôle dans le cycle viral, les protéines du VHC interagissent avec les facteurs de la cellule hôte et peuvent affecter un grand nombre d'activités cellulaires comme la signalisation, l'activité transcriptionnelle, la transformation cellulaire, l'apoptose, les réarrangements membranaires, le trafic vésiculaire, et la régulation de la traduction (Castello et al, *Clinical Immunology* 2010) [140].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 12. Modèle d'hépatocarcinogenèse virale C** centré sur les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la carcinogenèse liée à la protéine Core du VHC (Tsai et al, *Oncogene* 2010) [141].

### ***3 - Etats préneoplasiques : dysplasie à grandes cellules, dysplasie à petites cellules, macronodules dysplasiques***

L'idée générale est que les hépatopathies chroniques font le lit des lésions préneoplasiques et du CHC, par le biais de l'inflammation chronique et de la régénération cellulaire permanente à l'origine de lésions indirectes de l'ADN. Deux cellules cibles potentielles sont évoquées à l'origine de la carcinogenèse hépatique (1) l'arrêt de maturation des cellules progénitrices et (2) la dédifférenciation des hépatocytes matures, les premières cellules proliférant lorsque la capacité de prolifération des secondes est compromise. Ces hypothèses sont soutenues par une inhibition de l'activité répliquative des hépatocytes matures démontrée dans des foies atteints de pathologies inflammatoires chroniques éthyliques ou virales [153], associée à un raccourcissement des télomères et une sénescence des hépatocytes démontrés dans des cirrhoses d'étiologies diverses [154]. D'autre part, l'activation des cellules progénitrices (cellules ovales pluripotentes présentes au niveau des canaux de Hering) corrèle avec le stade de la maladie fibrosante dans des stéatopathies éthyliques ou dysmétaboliques [155] et avec le degré d'activité nécrotico-inflammatoire dans les hépatopathies chroniques virales [156]. Ces hypothèses ont été testées sur les lésions précoces de la carcinogenèse, les lésions "dysplasiques", considérées comme des lésions préneoplasiques. En effet, le CHC peut se développer directement à partir d'un foyer de dysplasie cellulaire dont la taille n'excède le plus

souvent pas 1 mm (identifiable uniquement sous le microscope), ou plus progressivement à partir de macronodules dysplasiques (MND).

**La dysplasie à grandes cellules (DGC)** correspond à un foyer d'hépatocytes de grande taille avec un large cytoplasme, un noyau volumineux et/ou pléiomorphe et un nucléole proéminent (Figure 13). Elle est constituée d'hépatocytes matures polyploïdes et non de cellules progénitrices et est considérée comme le témoin de la sénescence répliquative engendrée par l'activité nécrotico-inflammatoire et la régénération chroniques, plutôt que comme un précurseur direct du CHC. Elle constitue cependant, avec la cirrhose, un facteur indépendant de développement de CHC en analyse multivariée [157].

**La dysplasie à petites cellules (DPC)** est une lésion hautement proliférative qui partage certaines caractéristiques morphologiques avec le CHC, réalisant un continuum histologique. Elle correspond à un foyer de cellules au rapport N/C augmenté, au cytoplasme réduit et aux anomalies nucléaires discrètes (Figure 13). Elle comporte des anomalies génétiques retrouvées dans le CHC, mais pas dans la cirrhose, de voisinage, et est donc considérée comme une lésion précancéreuse [158]. Sa présence est hautement associée au degré d'inflammation du parenchyme hépatique [157, 159]. Les foyers de DPC sont composés de cellules progénitrices dans la moitié des cas, supportant un rôle pour ces cellules dans la carcinogenèse [160].

**Les macronodules dysplasiques** sont de taille supérieure et donc visibles macroscopiquement. Ils sont considérés comme un stade prénéoplasique plus avancé que les foyers dysplasiques, et s'accompagnent d'anomalies cytologiques et architecturales croissantes du macronodule dysplasique de bas grade (MNDBG) au macronodule dysplasique de haut grade (MNDHG). Contrairement au macronodule régénératif (MNR) qui n'est pas associé à un développement accru de CHC et est dépourvu d'anomalie cytologique, les macronodules dysplasiques sont associés à un risque de transformation maligne et le nombre d'anomalies génétiques augmente du MNR au MNDBG, du MNDBG au MNDHG et du MNDHG au CHC [161, 162]. Par étude du pattern d'inactivation du chromosome X, il a été démontré que plus de 50% des macronodules développés sur cirrhose (45% des MNR et MNDBG et 60% des MNDHG et CHC) était monoclonaux [163]. Par une nouvelle technique basée sur l'identification de mutations du gène du cytochrome c oxydase dans l'ADN mitochondrial, d'autres auteurs ont montré que 20% des MNR étaient monoclonaux et ont retrouvé des mutations identiques dans les cellules progénitrices de la réaction ductulaire et le MNR adjacent, signant une origine cellulaire commune [164].

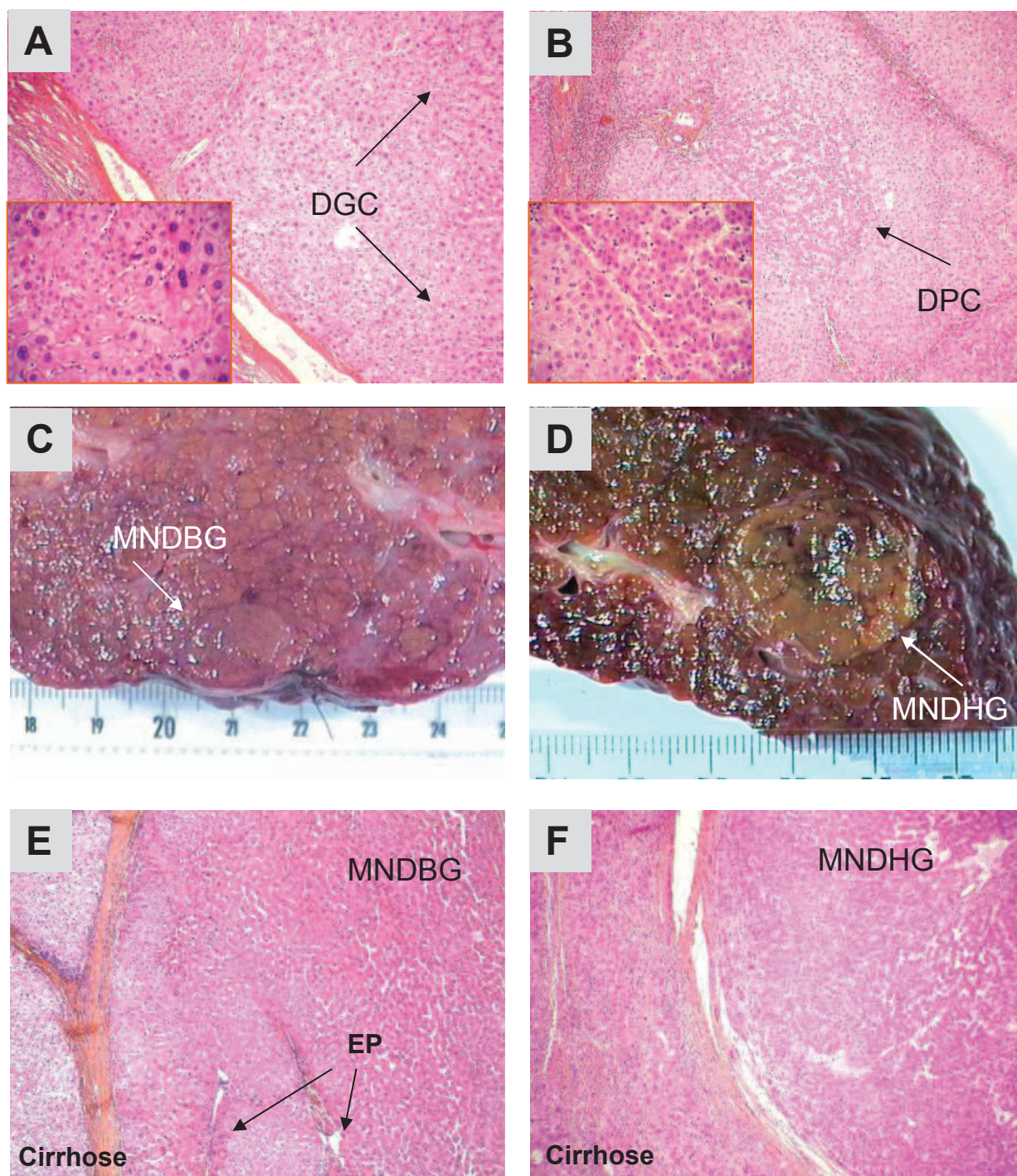
#### ***4 - Diagnostic anatomopathologique des macronodules dysplasiques et du CHC***

Dans le contexte d'hépatopathie chronique au stade de cirrhose, le challenge réside dans le diagnostic précoce du CHC, afin de proposer une thérapie curative associée à un meilleur pronostic. Ce diagnostic est basé sur la détection radiologique de macronodules de taille  $\geq 1$  cm, et des recommandations ont été publiées concernant la prise en charge diagnostique des nodules selon leur taille, incluant le dosage de l'alpha-foeto-protéine, les examens radiologiques et la biopsie hépatique [165]. Les recommandations les plus récentes remettent en cause l'utilité du dosage de l'alpha-foeto-protéine [166, 167]. L'AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) préconise la réalisation d'une biopsie hépatique pour les nodules de plus de 1 cm ne présentant pas les caractéristiques permettant d'établir le diagnostic de CHC sur deux examens radiologiques [166]. Cependant, dans le cas de petits nodules, si la spécificité et la valeur prédictive positive de la biopsie sont proches de 100%, sa sensibilité n'est pas optimale [168, 169]. Les risques de faux négatifs sont liés à un biais d'échantillonnage lié à la taille des lésions mais aussi aux difficultés du diagnostic histologique entre MND et CHC, et en particulier entre MNDHG et CHC très bien différencié, les anomalies cytonucléaires et architecturales s'accroissant de manière graduelle dans ce continuum lésionnel. Quelques études basées sur l'analyse du protéome ou du transcriptome ont tenté de mettre en évidence des biomarqueurs permettant d'identifier la transformation maligne d'un nodule au sein d'un parenchyme cirrhotique [170-174], sans application pratique pour l'instant. Clairement, il s'agit d'un challenge de la protéomique que de parvenir à identifier un profil protéique sérique ou tissulaire permettant le diagnostic précoce de CHC sur cirrhose, et les techniques de protéomique associée à l'imagerie tissulaire semblent prometteuses [175].

La terminologie des MNR, MND et CHC a été introduite en 1995 par un groupe de pathologistes "the International Working Party of the World Congress of Gastroenterology", de même que le concept de foyers dysplasiques ou foyers dépourvus de fer (de taille  $\leq 1$ mm) et de petit CHC (de taille  $\leq 2$  cm) [176]. Les termes de CHC précoce (early HCC) et CHC avancé (progressed HCC) ont été reconnus plus récemment par un groupe international incluant 34 pathologistes et 2 cliniciens de 13 pays "the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia" créée en 2002 pour tenter d'établir un diagnostic consensuel des néoplasies hépatocellulaires, dont les derniers critères ont été publiés en 2009 [177].

Brièvement, le MNDBG se rapproche du MNR par ses contours vaguement nodulaires, non encapsulés, et comporte une discrète augmentation de densité cellulaire, sans atypie cytonucléaire marquée ou anomalie architecturale. Il comporte encore quelques espaces portes et contient des foyers de DGC. Au contraire, le MNDHG apparaît plus distinctement nodulaire et comporte des atypies cytonucléaires et architecturales "dont l'intensité est insuffisante pour

porter un diagnostic de CHC” : densité cellulaire augmentée par rapport à celle du parenchyme cirrhotique, foyers de DPC, travées irrégulières mais fines, rares artérioles isolées ou pseudo-glandes (Figure 13).



**Figure 13. Lésions préneoplasiques développées sur cirrhose. (A et B).** Aspect histologique de la dysplasie à grandes cellules (DGC) et de la dysplasie à petites cellules (DPC), avec focus sur les anomalies cellulaires. **(C-E)** Aspect macroscopique (C et D) et histologique (E et F) des macronodules dysplasiques de bas grade renfermant encore quelques EP (MNDBG) et de haut grade (MNDHG) (coloration hématoxyline éosine safran).

Le CHC précoce présente un aspect macroscopique proche du MNDHG et est défini par les critères suivants diversement combinés (1) densité cellulaire supérieure à deux fois, augmentation du rapport N/C, travées irrégulières peu épaisses, (2) architecture pseudo-

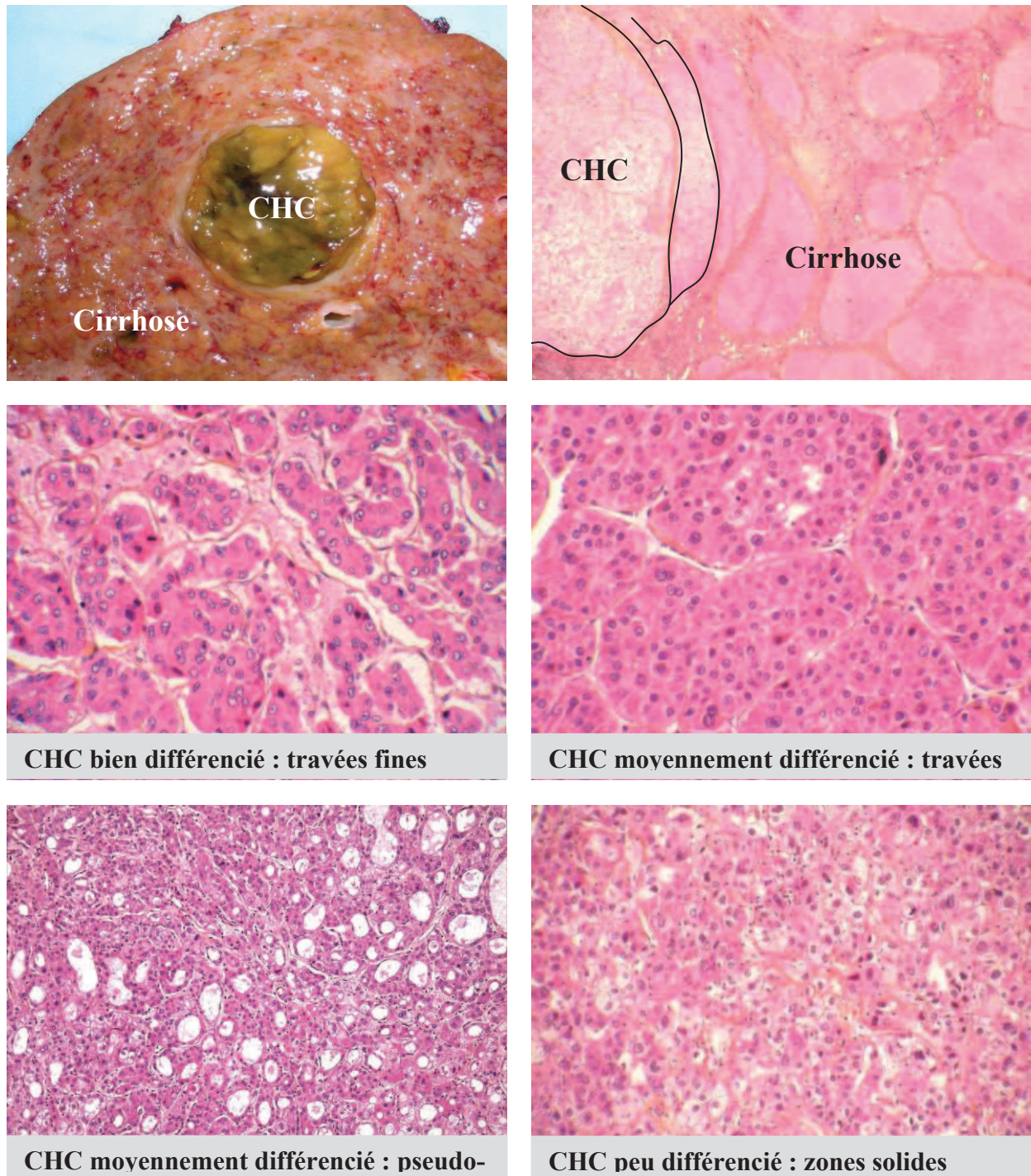
glandulaire, (3) nombre variable d'artérioles isolées, (4) possibilité de rares espaces portes encore trappés, (5) hépatocytes tumoraux stéatosiques. Ces anomalies peuvent occuper tout le nodule ou être focales au sein d'un MNDHG et réaliser un « nodule dans le nodule ».

Le CHC avancé correspond à une prolifération d'hépatocytes comportant des anomalies cytonucléaires et des anomalies architecturales nettes. Les cellules peuvent ressembler plus ou moins aux hépatocytes normaux ou présenter des variantes cytologiques (claire, oncocytaire, fusiforme ou pléiomorphe). Le degré d'anisocaryose et les irrégularités nucléaires sont variables. L'agencement cellulaire est bien différencié trabéculaire (ressemblant au foie normal avec des travées de plus de 2 hépatocytes d'épaisseur), moyennement différencié pseudo-glandulaire ou peu différencié en foyers compacts. Ces anomalies cytonucléaires et architecturales croissantes définissent les 4 grades histologiques d'Edmonson et de Steiner (1954) et les 3 grades de différenciation de l'OMS (Figure 14). Le CHC peut présenter plusieurs formes macroscopiques, quel que soit son degré de différenciation: expansive (encapsulée), infiltrante (non encapsulée, multinodulaire), mixte, ou diffuse (multifocale). Les critères macroscopiques et/ou microscopiques ayant une valeur prédictive de l'évolution après traitement chirurgical sont la taille du CHC, son caractère unique ou multiple, son grade histologique et son degré de différenciation, la présence de nécrose, la présence et l'état de la capsule tumorale, la présence de nodules satellites et d'invasion canalaire, vasculaire, nerveuse, de la capsule de Glisson ou des ganglions du hile et enfin, la qualité de la résection chirurgicale.

### ***5 - Facteurs pronostiques de survie après résection chirurgicale***

La récurrence se faisant par métastase tumorale intra-hépatique au sein du foie restant et/ou par développement tumoral multicentrique dû à la persistance de la pathologie sous-jacente, le contrôle des paramètres locaux est important. Les paramètres pronostiques clinico-biologiques et pathologiques standards restent à l'heure actuelle les plus utilisés pour prédire l'évolution des CHC, car ils sont simples, robustes, reproductibles et accessibles dans le monde. De nombreuses variables cliniques, biologiques et anatomopathologiques ont été corrélées à la survie sans récurrence et à la survie globale. Les facteurs pronostiques connus sont le taux d'albumine totale et d'alpha-foeto-protéine sériques, la taille et le nombre de tumeurs, le degré de différenciation de la tumeur, la présence de nodules satellites, d'une invasion vasculaire ou des canaux biliaires. Le stade tumoral TNM (AJCC 6<sup>th</sup>) reste le plus discriminant en matière de courbes de survie [178, 179]. Ces critères reflètent le caractère invasif de la tumeur et sont très efficaces pour prédire une récurrence précoce. Ils peuvent s'avérer moins utiles quand il s'agit de prédire le pronostic de tumeurs plus petites, découvertes à un stade précoce, dont la "récurrence" plus tardive résulte plus

probablement du développement d'une autre tumeur primitive au sein d'un parenchyme lésé que du développement à partir de cellules tumorales résiduelles. Dans cette hypothèse, des études récentes démontrent une signature moléculaire au sein du parenchyme péri-tumoral fortement corrélée à la survie [142] et la recherche actuelle s'intéresse à la découverte de biomarqueurs protéiques ou d'anomalies génomiques ou transcriptionnelles qui pourraient influencer le pronostic des patients, tant dans le tissu tumoral que dans le parenchyme fibreux ou cirrhotique adjacent [180-184].



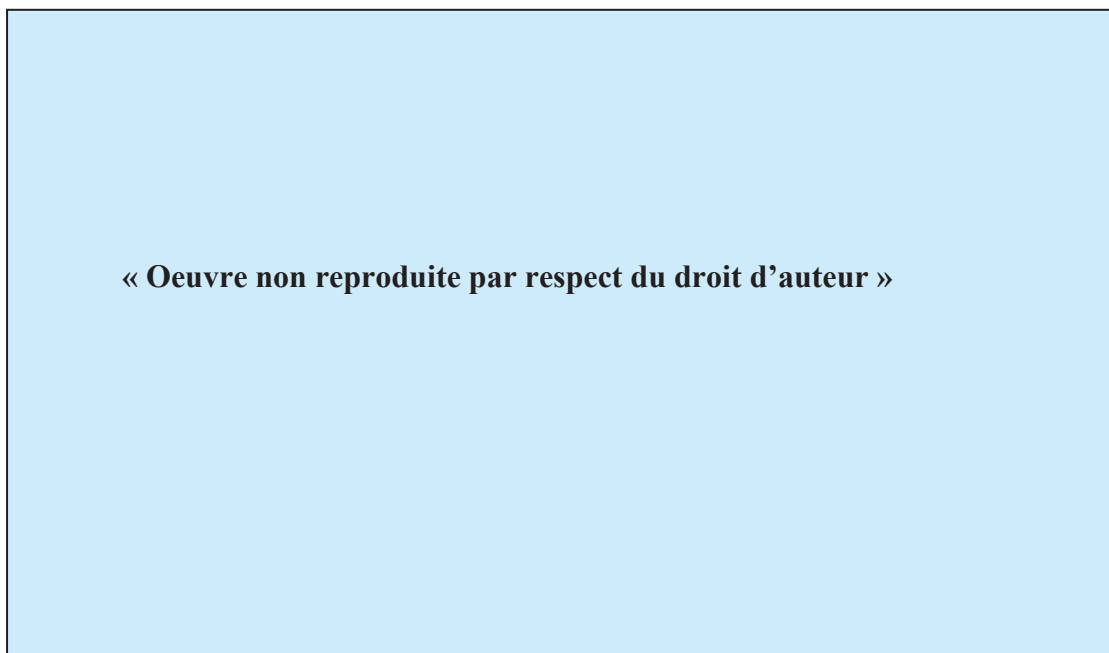
**Figure 14. Carcinome hépatocellulaire (CHC).** Aspect macroscopique et histologique d'un CHC développé sur cirrhose virale C. Grades de différenciation (bien, moyennement et peu différencié) du CHC selon l'OMS (coloration hématoxyline éosine safran).



## Chapitre IV : Réponse immunitaire anti-virale intra-hépatique

### *1 - Micro-environnement hépatique et tolérance immunitaire*

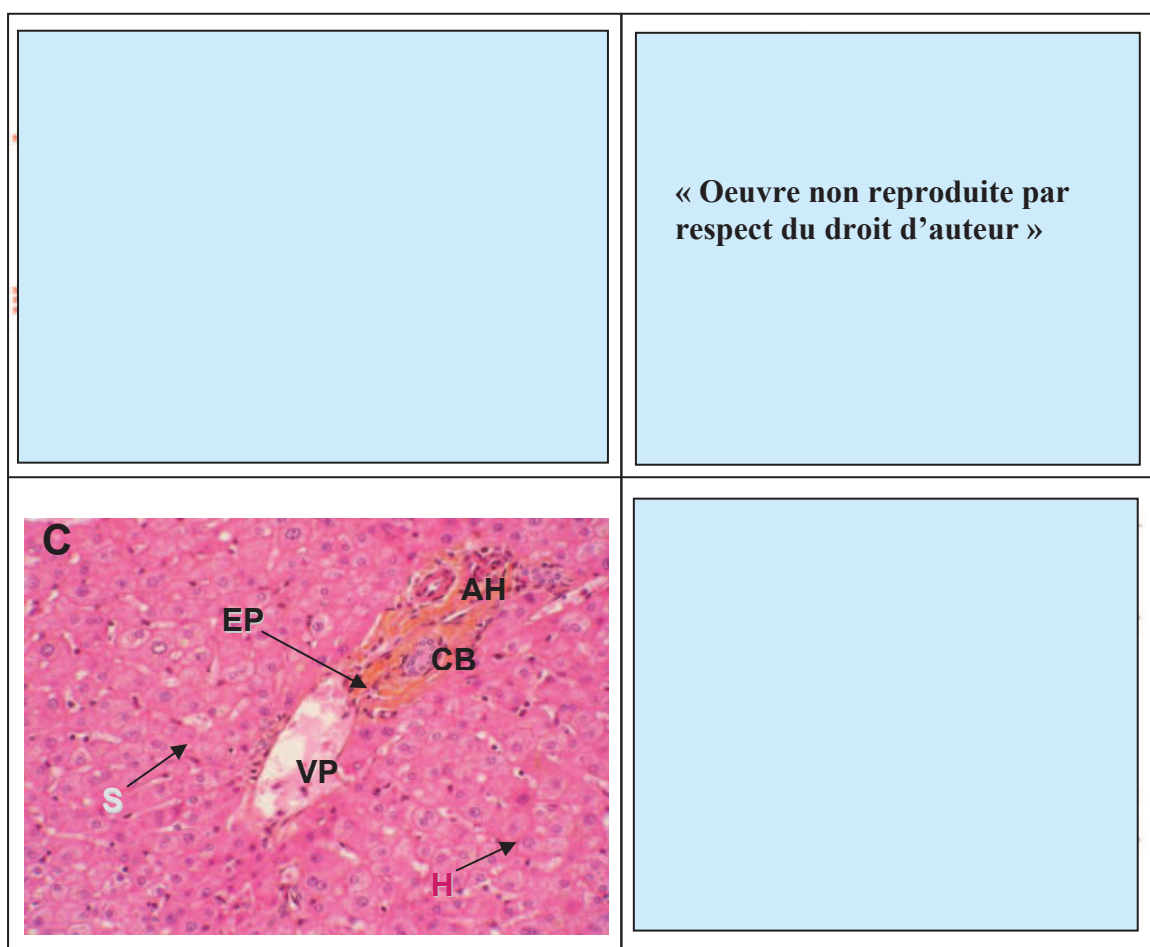
Le foie est un organe qui contient un grand nombre de cellules phagocytaires, de cellules présentatrices d'Ag et de lymphocytes. C'est aussi un site de production de cytokines et de chimiokines, de composants du complément et de protéines de l'inflammation, jouant un rôle dans la migration, le recrutement ou la compartimentalisation des cellules inflammatoires effectrices ou régulatrices de l'immunité (Figure 15) et dans la modulation des réactions immunitaires et inflammatoires au cours des pathologies hépatiques [185].



**Figure 15. Micro-environnement sinusoidal au sein du foie infecté par le VHC.** En réponse à l'infection virale, les hépatocytes produisent les IFN- $\alpha$  et  $\beta$ , qui induisent la production de CCL3 (monocyte inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP1- $\alpha$ ) par les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie. CCL3 stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK, ce qui a pour conséquence une production de CXCL9 (monokine induced by IFN- $\gamma$ , Mig) et CXCL10 (IFN-inducible protein-10, IP-10) par les cellules endothéliales sinusoidales (LSECs) et par les hépatocytes. Les lymphocytes T CD4 et CD8 sont attirés par CXCL9 et CXCL10, ce qui leur permet d'accéder aux hépatocytes, aux LSECs et aux cellules étoilées du foie. Les cellules de Kupffer, les LSECs et les cellules dendritiques hépatiques induisent une tolérance immunitaire plutôt qu'une pleine activation des lymphocytes T entrant dans le foie (**Kanto et Hayashi, Internal Medicine 2006**) [186].

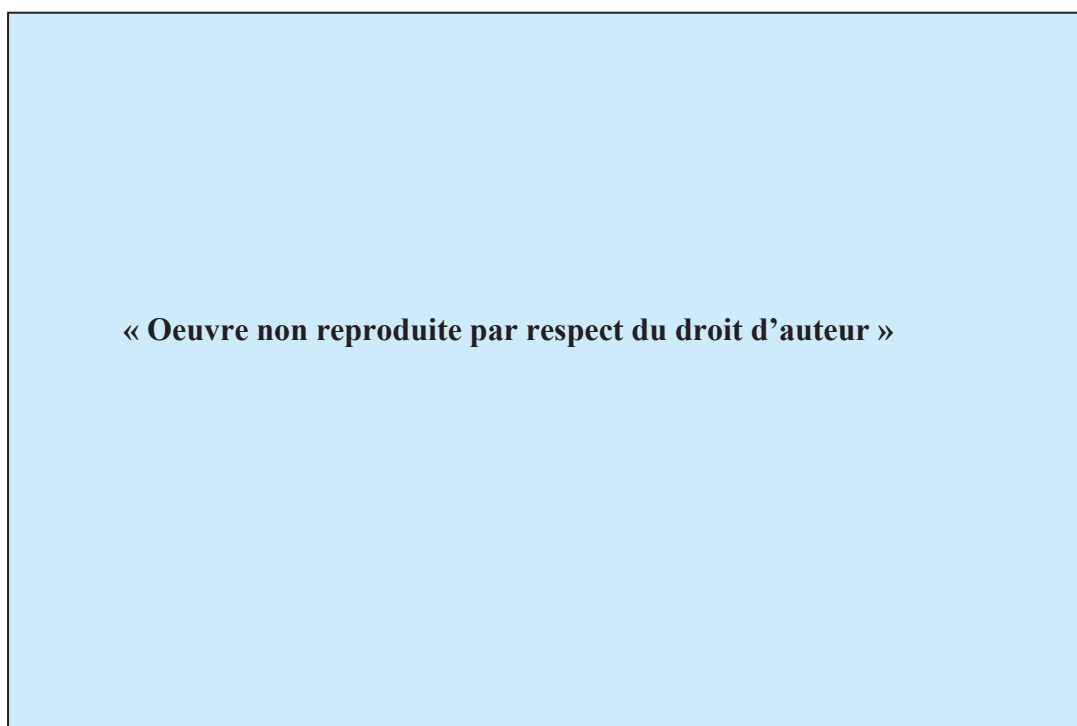
De par sa localisation et ses fonctions, il est continuellement exposé aux agents pathogènes, toxines, cellules tumorales et Ag divers. En effet, le foie, qui reçoit la circulation sanguine systémique via l'artère hépatique et celle en provenance de l'intestin via la veine porte, est en contact permanent avec les pathogènes, ce qui est susceptible de modifier localement la réaction immunitaire. Il en résulte un **micro-environnement immunitaire hépatique**

**particulièrement riche en cellules du système immunitaire inné**, comme les cellules NK et TNK et les cellules dendritiques. D'autres cellules non hématopoïétiques peuvent aussi jouer le rôle de cellules présentatrices d'Ag, telles les cellules de Kupffer qui sont des macrophages spécifiques du foie, les cellules endothéliales bordant les sinusoides hépatiques, les cellules étoilées de l'espace de Disse et les hépatocytes (Figure 16). Le foie est également riche en cytokines immunosuppressives, parmi lesquelles IL-10 et certains sous-types cellulaires expriment le ligand inhibiteur PD-L1 (programmed death-ligand 1) [187]. En conséquence, les cellules présentent l'Ag aux LT dans un contexte cytokinique immunosuppresseur, où l'expression de ligands inhibiteurs prédomine, ce qui induit un état de tolérance immunitaire que certains pathogènes comme le VHC peuvent exploiter pour établir leur persistance.



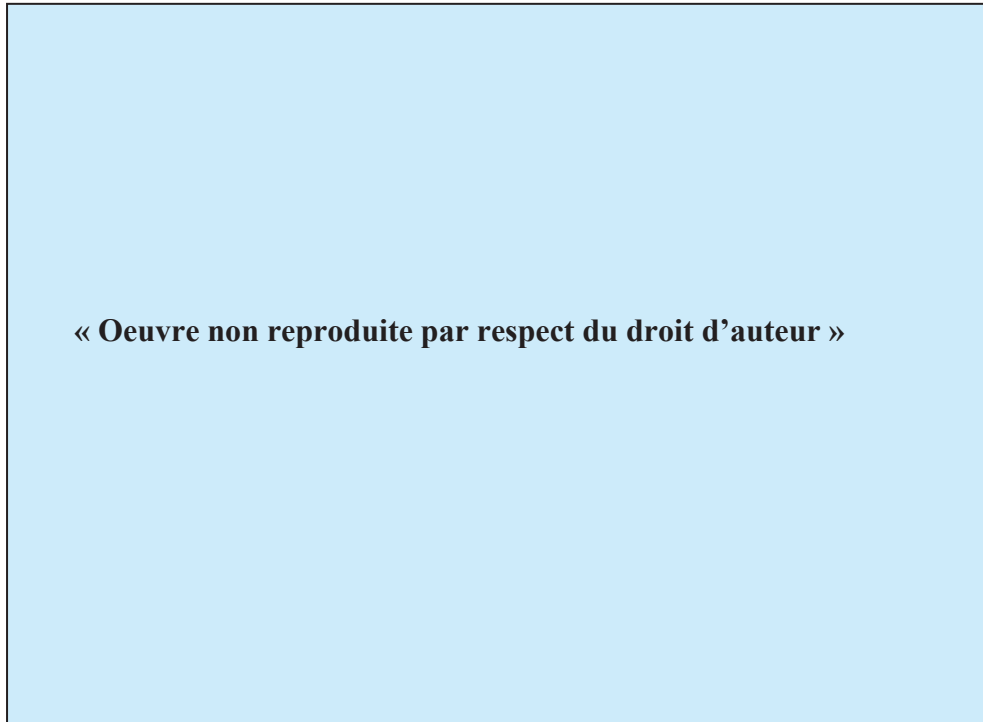
**Figure 16. Histologie du foie normal.** (A) Représentation schématique du lobule hépatique. (B) Circulation sanguine hépatique. Le sang provenant de la veine porte (2) et de l'artère hépatique (3) circule dans les sinusoides (4) pour rejoindre la veine centro-lobulaire (7) puis la veine sus-hépatique (6). La bile sécrétée dans les canalicules biliaires (5) est drainée vers le canal biliaire au sein de l'espace porte (1). (C) Microphotographie d'un lobule hépatique normal (coloration hématoxyline éosine safran). L'espace porte interlobulaire (EP) renfermant les branches de l'artère hépatique (AH), de la veine porte (VP) et du canal biliaire (CB), constituant la triade portale, est entouré par des travées hépatocytaires (H) fines et radiaires bordant les sinusoides (S). (D) Cellules présentatrices d'Ag dans les sinusoides hépatiques. Le foie contient de nombreuses cellules susceptibles de présenter les Ag, dont les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC) et myéloïdes (mDC), les cellules de Kupffer (KC) et d'autres populations cellulaires représentées par les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC), les cellules étoilées du foie (HSC) et les hépatocytes (Crispe, *Annu Rev Immunol* 2009) [187].

La surveillance immunitaire et la détection des agents infectieux se fait par le biais de motifs moléculaires conservés essentiels au cycle du pathogène, les PAMPs (pathogen associated molecular pattern), reconnus par les PRRs exprimés par les cellules du système immunitaire inné de l'hôte comme les macrophages et les DC. Il en résulte une production de cytokines inflammatoires, chimiokines et IFN de type I. Il existe différentes classes de PRRs susceptibles d'activer le système immunitaire inné : les TLR (TLR 1 à 10), les récepteurs RIG-I-like (RIG-I, MDA, ...), les récepteurs NOD-like et les récepteurs de l'ADN. Les principaux PRRs impliqués dans la détection des acides nucléiques viraux et notamment du VHC sont les TLR intracellulaires (TLR 3, 7, 8 et 9) et RIG-I, à l'origine de la production d'IFN de type I (Figure 17) [188]. Plus récemment, une activation du système immunitaire inné par les protéines Core et NS3 du VHC, via TLR2 et TLR4 exprimés à la surface des cellules inflammatoires, a été mise en évidence [12, 13, 189].



**Figure 17. Modèle expliquant l'impact du micro-environnement hépatique sur les PRRs (pattern recognition receptors).** La détection de LPS dans le sang veineux portal laisse suggérer que d'autres molécules dérivées d'agents microbiens en provenance de l'intestin soient également présents dans le sang portal. Ce modèle propose que, dans le foie, les protéines NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) et les sous-types de TLRs (toll-like receptors) reconnaissant les produits microbiens, notamment bactériens, soient constitutionnellement engagés, alors que les récepteurs reconnaissant les éléments viraux (TLR3, RIG-I, MDA-1) ne le seraient pas, en condition normale. Ceci implique des particularités hépatiques dans la balance entre les voies de signalisation dépendantes de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3, celle de NF- $\kappa$ B étant prédominante puisque les produits bactériens activent la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et les virus induisent celle de l'IRF-3 favorisant la production des IFN de type I. Dans ce schéma, les TLR hétérodimériques sont indiqués par TLR1/2 et TLR2/6 (Crispe, *Annu Rev Immunol* 2009) [187].

Le foie humain normal d'environ 1,5 kg possède en moyenne environ  $10^{10}$  lymphocytes [190]. Ils sont disposés préférentiellement dans les espaces portes mais dispersés également dans le parenchyme. Les populations lymphocytaires du foie diffèrent de celles du sang (Figure 18). Notamment, plus de 65% des lymphocytes intra-hépatiques sont des lymphocytes natural killer (NK et TNK) ou exprimant un TCR (T-cell receptor)  $\gamma\delta$  et les LT intra-hépatiques CD3+ sont en majorité des lymphocytes cytotoxiques CD8+ (72% dans le foie versus 38% dans le sang) [191, 192].



**Figure 18. Répartition des sous-populations lymphocytaires dans le foie et dans le sang (Norris et al, J Hepatol 1998) [190].**

## ***2 - Les acteurs de la réponse immunitaire innée hépatique***

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est non spécifique et fait intervenir les macrophages et cellules dendritiques, les cellules NK et TNK, le complément et des facteurs solubles tels les cytokines et les chimiokines.

Comme au cours d'autres infections virales, le VHC induit à la phase aiguë de l'infection des réponses immunes non spécifiques, initiées par la production des IFN de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) par les hépatocytes infectés et les cellules dendritiques plasmocytoïdes [193]. Ceci induit un état de résistance virale dans les autres cellules via les produits des gènes stimulés par l'IFN [194]. La production d'IFN de type I a pour but (1) d'inhiber la réplication virale au niveau de l'hépatocyte, en induisant l'expression de la 2'-5' OAS (oligoadénylate synthétase), (2) d'augmenter l'expression des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de

classe I à la surface des cellules présentatrices d'Ag, au premier plan desquelles les cellules dendritiques, pour initier la réponse cellulaire spécifique, (3) d'activer les cellules NK.



**Figure 19. Réponse immunitaire au cours de l'infection par le VHC.** A la phase initiale de l'infection, l'INF- $\alpha$ , produit par les PDC (plasmocytoid dendritic cell), active les cellules natural killer (NK), les LT helpers (LTh), les macrophages et les LT cytotoxiques (CTL). Les cellules NK activées par l'IFN de type I tuent les hépatocytes infectés par un mode d'action non spécifique, alors que les CTL le font de manière Ag-spécifique. La destruction des hépatocytes stimule les MDC (myeloid dendritic cell). Ces MDC secrètent une quantité importante d'IL-12, qui induit l'activation des cellules NK et des LTh de type 1. Les LTh1 activés soutiennent en retour la maturation des DC par interaction de CD40 et son ligand CD40L. Les plasmocytes, issus de la différenciation des LB sous l'influence d'IL-4 secrétée par des LTh de type 2, secrètent des immunoglobulines pour neutraliser le VHC circulant (**Hiroichi et al, Journal of Gastroenterology and Hepatology 2008**) [193].

### - Les cellules dendritiques (DC)

Les DC (dendritic cell), par le biais des PRRs, reconnaissent et internalisent l'Ag puis présentent l'épitope antigénique sous forme de peptides associés aux molécules du CMH aux LT. Elles sont présentes dans le sang et dans les organes à l'état immature (iDC), avec une expression basse des molécules du CMH de classes I et II et des molécules co-stimulatives. Une

fois activées, elles migrent dans les ganglions où elles interagissent avec les LT pour initier la réponse adaptative et maintenir une réponse cellulaire T et B efficace. Leurs fonctions sont donc de présenter l'Ag, de produire des cytokines et de réguler la réponse immunitaire par l'expression de molécules co-stimulatives classiques (CD80, CD83, CD86) et alternatives (CD273-PDL2, CD274-PDL1, CD277, ICOS-L). Il existe 2 sous-populations principales de DC, capables selon les stimuli antigéniques de polariser la réponse des LT vers une réponse Th1 dépendant principalement de la production d'IL-12, ou vers une réponse Th2 [195-197].

Les **cellules dendritiques plasmocytoides (PDC, Plasmocytoid-derived DC)** ressemblent à des plasmocytes, expriment CD123, BDCA-2 et produisent de l'IFN- $\alpha$  en grande quantité lors de la phase initiale de l'infection (ex-IFN producing cells). Elles n'expriment que certains TLRs. Les **cellules dendritiques myéloïdes (MDC, Monocyte-derived DC)** ressemblent à des monocytes et agissent comme des cellules présentatrices d'Ag. Après détection du pathogène par un large éventail de PRRs (TLR, RIG-I, ...), sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires ou par engagement dans le système CD40/CD40L, elles mûrissent (mDC), expriment CD1a, CD11c, CD13, CD14, CD33 et produisent des cytokines, parmi lesquelles IL-12, IL-10 et TNF- $\alpha$ , qui conditionnent la réponse cellulaire T [198].

Les MDC sont essentielles dans la réponse cellulaire innée anti-virale pour activer les cellules NK. La production d'IFN- $\alpha$  à la phase initiale de l'infection induit (1) l'expression de MICA/B (MHC class I related chain A/B) à la surface des MDC, ligand du récepteur activateur CD94/NKG2D des cellules NK et (2) la production de cytokines IL-12, IL-18 et IFN- $\alpha$  par les MDC. Ces deux processus permettent l'activation directe des NK. L'activation des NK par les MDC peut aussi s'exercer de manière indirecte par le biais de l'IL-2 produite par l'expansion des LT CD4 Ag-spécifiques. Les MDC matures produisent également de l'IL-15 qui promeut la survie et la différenciation des cellules NK [199].

Les MDC sont également essentielles dans la réponse cellulaire adaptative anti-virale à la phase initiale de l'infection (Figure 19). L'expression de TLR leur permet d'être stimulées directement par le VHC [200]. En réponse à certaines protéines virales activatrices rencontrées dans le foie, notamment la liaison de la protéine E2 du VHC aux TLR 7-9 [201], les MDC immatures sont activées, mûrissent, produisent IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  et IL-10 [202] et migrent dans les organes lymphoïdes. L'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II et d'autres molécules co-stimulantes (CD80 et CD86) à leur surface entraîne une augmentation de leur capacité à présenter l'Ag viral aux lymphocytes naïfs et leur permet d'activer les LT « helpers » CD4 et les LT cytotoxiques CD8 et les LB afin d'induire une réponse immunitaire anti-virale spécifique [203].

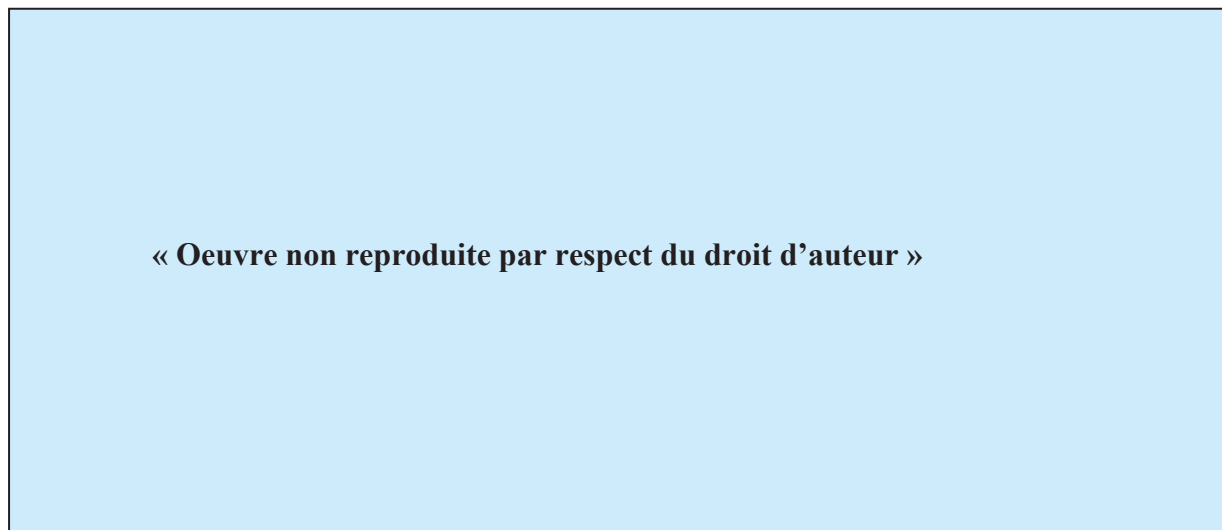
## - Les lymphocytes natural killer (NK)

Composant majeur de l'immunité innée, ces cellules représentent chez le sujet normal 31% et 13% des lymphocytes totaux respectivement dans le foie et dans le sang périphérique [190, 191] et constituent la première ligne de défense dans la réponse immunitaire anti-virale. Elles éliminent les cellules infectées par des mécanismes de cytotoxicité naturelle ou médiée par CD16, récepteur Fc des IgG et récepteur activateur des NK, responsable de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity), sans besoin de sensibilisation préalable. Elles se divisent en deux sous-types fonctionnellement distincts (Figure 20) : les CD56<sup>dim</sup> (90% chez le sujet normal) avec un niveau d'expression modéré de CD56, une forte expression des récepteurs KIR et CD16, un contenu important en perforine et un potentiel cytotoxique élevé et les CD56<sup>bright</sup> avec un niveau d'expression élevé de CD56 et CD94, KIR et ILT2 bas, CD16-, et une aptitude plus importante à produire des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , mais aussi IL-10 et IL-13 [204-206]. Les récepteurs des cellules NK (NKR) se divisent en deux groupes principaux : **les molécules de "type C lectine-like"**, avec CD94 dimérisant avec les molécules membre de la famille NKG2 pour former CD94/NKG2D récepteur activateur reconnaissant MICA/B, CD94/NKG2A récepteur inhibiteur hautement conservé et CD94/NKG2C récepteur activateur reconnaissant tous deux une molécule non classique du CMH (HLA-E) [207-210], **et le groupe des KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors)** comprenant les molécules activatrices (p50.1, p50.2, p50.3, p150) et inhibitrices (p40, p58.1/CD158a, p58.2/CD158b, p70/NKB1, p140), beaucoup plus polymorphes, reconnaissant les molécules classiques du CMH de classe I (HLA-A, B et C). D'autres classes de récepteurs ont été décrites [211], dont les récepteurs inhibiteurs LIR1/ILT2 (leucocyte Ig-like receptor/Ig-like transcript 2) [212] et CD161 dont l'activité est moins connue. En général, en raison d'une affinité plus grande aux ligands, les récepteurs inhibiteurs jouent un rôle prédominant dans la régulation des activités cytotoxiques des cellules NK vis-à-vis de leur entourage [213]. Les cytokines importantes pour l'activation des NK sont les IFN de type I, IL-12, IL-15 et IL-2 [214].

L'activation des cellules NK par une production élevée d'IFN- $\alpha$  à la phase aigüe de l'infection et par les MDC (liaison MICA/B et CD94/NKG2D et production d'IL-12) est responsable (1) d'une cytotoxicité directe par le biais de granules cytolytiques ou par induction de l'apoptose, via un répertoire de molécules (perforine, granzyme et molécules activatrices de caspase) conduisant à la lyse des hépatocytes infectés et au relargage de particules virales stimulant en retour les PDC, (2) de mécanismes indirects comme la production d'IFN- $\gamma$  capable de supprimer l'expression de l'ARN du VHC et d'entraîner une inhibition de la réplication du VHC [215], mais également d'autres cytokines régulatrices comme TNF- $\alpha$  créant un "état anti-

viral” [216, 217] et TGF- $\beta$ , ou encore la production de facteurs hématopoïétiques comme IL-3 et GM-CSF.

**Une fraction de NK (30-40%) ré-exprime le marqueur CD8 (CD3-CD56+CD8+)**, à un niveau plus faible que les TCD8, et aurait un potentiel cytotoxique supérieur à celui des cellules NK classiques (meilleure résistance à la mort cellulaire qui accompagne l’activité lytique).



**Figure 20. Schéma illustrant les propriétés des sous-types CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> des cellules NK.** Les CD56<sup>bright</sup> produisent des taux élevés de cytokines après stimulation. Ce sous-type exprime peu CD16 et présente une cytotoxicité naturelle ou ADCC-médiée faible mais une activité LAK (lymphokine-activated killer) importante. Il possède un niveau d’expression élevé de NKG2A-CD94, récepteur inhibiteur de type lectine, alors que le niveau d’expression des KIRs (killer Ig-like receptors) est bas. Il exprime de manière constitutionnelle des récepteurs de cytokines et de chimiokines, dont IL-2R $\alpha\beta\gamma$  (interleukin-2 receptor), c-kit et CCR7 (CC-chemokine receptor 7). La L-sélectine, molécule d’adhésion impliquée avec CCR7 dans le trafic vers les ganglions lymphatiques, est aussi fortement exprimée à la surface des CD56<sup>bright</sup>. Au contraire, les CD56<sup>dim</sup> produisent peu de cytokines, mais sont d’importants médiateurs de cytotoxicité ADCC-médiée ou naturelle et d’activité LAK. Ils présentent une morphologie plus granuleuse que les CD56<sup>bright</sup>. Ils expriment fortement les KIRs et présentent une expression particulière de la cytokine IL-2R $\beta\gamma$  et des chimiokines CXCR1 et CX3CR1. Ils n’expriment pas la L-sélectine mais expriment intensément PSGL-1 (PEN5–P-selectin glycoprotein ligand-1), une autre molécule d’adhésion. Abréviations:  $\gamma$ c, common  $\gamma$  chain; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; TNF, tumor necrosis factor (Cooper et al, *Trends in Immunol* 2001) [204].

### **- Interactions entre les cellules NK - DC**

Les interactions ou « cross-talk » entre les DC et les NK s’étendent d’une coopération stimulante entre les deux types de cellules à la lyse des DC médiée par les NK [218]. Les MDC sont indispensables pour activer les NK : les MDC immatures circulantes (iDC) entrent en contact avec le virus, sont activées et une fois matures sécrètent des cytokines particulièrement importantes (IFN de type I, IL-12, IL-15) agissant sur l’activation, la prolifération et la survie des NK. Les NK ainsi activées produisent également des cytokines (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) indispensables à l’activation et la maturation des MDC (mDC) capables de présenter l’Ag [219].



La maturation et l'activation de ces deux types cellulaires résultent d'une part d'une interaction directe par contact cellulaire et d'autre part de la sécrétion des différentes cytokines, leur permettant de mener à bien leurs principales fonctions [220]. Les NK activées ( $\alpha$ NK) exercent leur activité cytolytique envers les cellules infectées par le virus et les mDC activées participent au priming des LT naïfs et induisent la réaction inflammatoire TCD4 (Th1) et TCD8 (CTL) spécifique des Ag viraux. Ces lymphocytes Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2 et les NK activées par le biais de l'IL-2 lysent les iDC, limitant ainsi la réponse immunitaire.

### **- Les lymphocytes T natural killer (TNK)**

Ces lymphocytes expriment un TCR de répertoire plus restreint que les LT ainsi que les récepteurs activateur et inhibiteur des cellules NK. Ils sont très nombreux dans le foie normal où ils représentent environ 1/3 des LT, contre 2% dans le sang [191]. Empruntant aux LT et aux NK certains de leurs mécanismes de reconnaissance et de cytotoxicité ainsi que leur production de cytokines, **ces cellules représentent un pont entre l'immunité innée et adaptative**. Chez l'homme, la majorité d'entre elles, comme les NK, expriment CD8 (c'est l'inverse chez la souris) mais elles peuvent exprimer CD4 ou être double négatives CD8-CD4-. Elles peuvent co-exprimer le TCR  $\alpha\beta$  ou plus rarement  $\gamma\delta$  et des récepteurs variés des NK (CD16, CD56, CD69, CD161, KIR et/ou CD94) et on considère que **la co-expression CD3+ et CD56+ est celle qui les représente le plus largement**. Il s'agit d'une population cellulaire hétérogène constituée de TNK classiques de type 1 dits « invariants » (iTNK) exprimant un TCR invariant et de TNK non classiques de type 2 exprimant des TCR divers. Chez l'homme, un sous-type particulier exprime le TCR invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q, équivalent au TCR murin V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, mais il est peu représenté parmi les TNK humains intra-hépatiques et périphériques qui constituent une population hétérologue alors que cette population TNK1.1/V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 homologue chez la souris représente 40% des LT intra-hépatiques [192, 221]. Une majorité de TNK présente un phénotype de cellule mémoire activée (CD45RO+ CD45RA-, CD25+, CD69+ et CD56<sup>dim</sup>) et est sensible aux stimulations par les cytokines IL-2, IL-12 et IL-15. Ces cellules s'observent essentiellement dans les sinusoides où elles exercent une surveillance immunitaire intra-vasculaire [222]. Elles ont des propriétés immuno-modulatrices importantes, en relation avec leur capacité à produire de nombreuses cytokines, notamment celles des groupes Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-13), Th0 et Th17 (IL-17) et à exercer des fonctions effectrices cytotoxiques [223]. Le mode le plus classique de reconnaissance de l'Ag est dépendant de CD1d, molécule du CMH de classe I-like exprimée à la surface des DC (Figure 21). En effet, les TNK ne reconnaissent pas les complexes CMH/peptides mais des lipides et des glyco-lipides présentés par CD1d. Le ligand naturel des iTNK est  $\alpha$ Galcer ( $\alpha$ -galactosyl-ceramide). Les fonctions cytotoxiques des TNK activées font intervenir des mécanismes dépendants de la perforine et de FasL [224]. Les iTNK

peuvent être activées de manière directe via la reconnaissance TCR-Ag présenté par CD1d ou de manière indirecte via différentes cytokines (IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ) sécrétées par les DC suivant l'engagement des TLR intra ou extracellulaires (Figure 22) [225, 226]. Le mécanisme d'activation dépend des Ag et produits microbiens concernés, les virus empruntant préférentiellement la voie cytokinique, engageant les récepteurs cytokiniques à leur surface et conduisant à la production d'IFN- $\gamma$  [227].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 21. Phénotype, spécificité, fonctions et ligands des cellules iTNK.** Les iNKT expriment un TCR semi-invariant et des marqueurs de surface comme les molécules NK1.1 (CD161 chez l'homme) et Ly49 caractéristiques de la lignée cellulaire NK. La plupart des iNKT expriment aussi le co-récepteur CD4 (CD8 chez l'homme). Le TCR invariant des iNKT est spécifique des Ag lipidiques et glyco-lipidiques présentés à la surface des cellules présentatrices d'Ag par la molécule glyco-protéique CD1d. Les iTNK ainsi activées peuvent produire des cytokines Th1 et Th2 et des chimiokines, et adoptent un phénotype cytotoxique (expression de perforine et FasL) (**van Kaer et al, cell tissue res 2011**) [226].

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 22. Les deux mécanismes d'activation des iTNK.** (A) Dans la voie d'activation directe, les Ag microbiens lipidiques ou glyco-lipidiques qui atteignent le compartiment endosomal contenant CD1d sont chargés sur le CD1d avec l'aide de protéines impliquées dans le transfert des lipides comme les saposines (SAPs). Ces complexes sont ensuite distribués à la surface de la cellule présentatrice d'antigène pour être reconnus par le TCR invariant des iTNK. (B) Dans la voie d'activation indirecte, les produits microbiens engagent les TLR extracellulaires ou intracellulaires, qui induisent la production de cytokines comme IL-12, IL-18 et/ou les IFN de type I. Ces cytokines engagent ensuite les récepteurs des cytokines des iTNK, ce qui active les iTNK. Pour certains produits microbiens, ce mécanisme d'activation via les cytokines requiert également l'engagement du TCR invariant des iTNK via la liaison CD1d-Ag glyco-lipidiques endogènes (**Wu et al, Tissue Antigens 2009**) [225].

## - Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ )

Plus de 35% des intra-hépatiques LT (CD3+) expriment un TCR  $\gamma\delta$ , ce qui en fait la source principale dans le corps humain ; ils sont également nombreux dans l'épithélium de la muqueuse intestinale et dans la peau, mais représentent moins de 5% des LTCD3 dans le sang [190, 191]. La majorité des LT $\gamma\delta$  ont un phénotype CD8-CD4- mais certains expriment CD8. Ils expriment également certains marqueurs des cellules NK (CD16, CD161, KIR, CD94, NKG2D) et représentent à ce titre environ 60% de la population des cellules TNK [228]. Bien que leur rôle dans le foie ne soit pas encore élucidé, leur concentration dans cet organe indique une spécialisation dans la réponse immunitaire hépatique [229]. Leur phénotype particulier et leurs fonctions en font un **acteur supplémentaire dans l'arsenal des effecteurs du système immunitaire hépatique, considéré par certains comme un pont entre l'immunité innée et adaptative** [226]. Dans les muqueuses, ils font partie des lymphocytes intra-épithéliaux [230] et se concentrent au site de l'inflammation dans les infections virales où ils sont capables de produire des cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et Th2 (IL-4) et de lyser les cellules cibles via la production de perforine, granzyme et granulysine ou via les récepteurs de mort cellulaire [231, 232]. A la différence des LT $\alpha\beta$  conventionnels CD3+/CD4+ ou CD3+/CD8+ qui reconnaissent de manière restreinte les Ag peptidiques présentés par les molécules du CMH de classe I ou II, les LT $\gamma\delta$  possèdent un TCR oligoclonal ou invariant qui peut reconnaître une large variété d'Ag, notamment des Ag non peptidiques non conventionnels tels que des métabolites dérivés de produits microbiens (phospho-Ag ou Ag lipidiques), des alkylamines, mais aussi des ligands tels que MICA/B [233], CD1c [234], les protéines de stress ou les protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP) [235, 236], ouvrant des voies supplémentaires dans la réponse immunitaire innée anti-infectieuse et anti-tumorale [237, 238]. Notamment, le sous-type de LT $\gamma\delta$  majoritaire dans le sang, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, activé par les phospho-Ag exprimés à la surface des cellules infectées, stressées ou transformées, serait capable de lyser *in vitro* les cellules carcinomateuses d'origine hépatique, colique ou rénale [239-241].

### ***3 - Les acteurs de la réponse immunitaire adaptative hépatique***

La réponse immunitaire adaptative fait intervenir les DC, les LT et les LB. Les DC sont indispensables au « priming » des LT naïfs au niveau des ganglions, qui s'exerce par un phénomène de présentation croisée permettant la genèse de LT spécifiques du virus capables d'agir au niveau du foie (Figure 23). Les LT orchestrent ensuite la réponse immunitaire adaptative. La reconnaissance des Ag viraux couplés au CMH grâce à leur TCR spécifique induit

leur expansion clonale. Ils promeuvent la différenciation des LB en plasmocytes pour la production d'Ac, sécrètent des cytokines activant les autres composants cellulaires de la réponse immunitaire et tuent les cellules infectées. La prolifération de LT cytotoxiques spécifiques du virus et l'acquisition de leur phénotype activé constituent une phase essentielle nécessitant la présence des LT auxiliaires « helpers ».

« Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur »

**Figure 23. Mécanismes d'induction des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au cours de l'infection virale C.** Après la capture des antigènes viraux (HCV) dans le foie, les cellules dendritiques myéloïdes (DC) migrent dans un ganglion lymphatique. Les DC matures activent les lymphocytes T helpers (Th) via les molécules du CMH de classe II et les molécules co-stimulatrices (CD80 et CD86) et, en retour, ces derniers activent les DC par expression du ligand CD40 (CD40L) et par la sécrétion de TNF- $\alpha$ . IL-12 produite par les DC différencie les Th en Th1. IL-2 et IFN- $\gamma$  secrétées par les Th1 activés induisent l'activation et la prolifération des lymphocytes cytotoxiques (CTL) et natural killer (NK). Les CTL naïfs reconnaissent les antigènes viraux présentés par les DC via les molécules du CMH de classe I puis les CTL spécifiques du VHC migrent vers le foie et reconnaissent les hépatocytes infectés, qu'ils peuvent éradiquer. Abréviations: MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor (Hiroichi et al, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008) [193].

### **- Les lymphocytes T auxiliaires « helpers » CD4+ (TCD4, LTh)**

Les TCD4 sont les cellules clé de la réponse adaptative, activant les DC pour leur permettre le « priming » des TCD8, produisant les cytokines anti-virales et soutenant la différenciation des LB. Ils interagissent avec les cellules exprimant les molécules du CMH de classe II (DC, macrophages de Kupffer, cellules endothéliales sinusoïdales et LB). Les MDC matures présentent l'Ag viral aux LTh naïfs (LTh0) via l'expression des molécules du CMH de classe II et de molécules co-stimulantes CD80 et CD86. Les LTh stimulés et spécifiques du virus activent en retour les DC par expression du ligand de CD40 et sécrétion de TNF- $\alpha$ . Les DC activées (liaison CD40-CD40L) produisent de l'IL-12 qui induit la différenciation des LTh stimulés en LTh de type 1 (LTh1). Les LTh1 activés produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) qui activent et font proliférer les LT CD8 cytotoxiques et les NK.

Les LTh peuvent aussi, sous l'influence de certaines cytokines, se différencier en LTh de type 2 (LTh2) sécrétant IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et médiant la réponse humorale (transformation des LB en plasmocytes et production d'Ac spécifiques du VHC). A côté des différenciations « classiques » Th1 et Th2, de nombreux autres sous-types de TCD4 ont été décrits plus récemment (Tr1, Th3, Th17, ...) avec des fonctions régulatrices voire cytotoxiques, et sont caractérisés selon leur origine, leur mode d'activation, les cytokines qui dirigent leur développement ou les facteurs solubles sécrétés (Figure 24) [140, 242].

### **- Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (TCD8, CTL)**

Les TCD8 sont les principales cellules effectrices de la réponse adaptative et reconnaissent les molécules du CMH de classe I, exprimées sur la quasi-totalité des cellules. Les MDC matures présentent l'Ag viral aux TCD8 naïfs par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe I et de molécules co-stimulantes CD80 et CD86. Les TCD8 activés et spécifiques du VHC migrent vers le foie et reconnaissent les hépatocytes infectés qu'ils détruisent par liaison de leur TCR aux molécules du CMH de classe I exprimées à la surface des hépatocytes infectés. Ce mécanisme de cytolysse directe et spécifique s'exerce par libération de granzyme et de perforine ou par apoptose médiée par FasL, TRAIL et TNF- $\alpha$  [243]. Par des moyens non cytolytiques, les TCD8 spécifiques créent aussi des conditions « anti-virales » en produisant des cytokines (IFN- $\gamma$  ou IFN de type I, TNF- $\alpha$ ), stoppant la réplication virale dans les cellules infectées et rendant les cellules non infectées résistantes au virus [216]. Dans une situation d'hépatite sévère, il s'y associe un mécanisme de lyse non spécifique des hépatocytes non infectés autour des hépatocytes infectés, par augmentation de l'expression de récepteurs Fas et/ou TNF- $\alpha$  (TNFR1) à leur surface (hépatocyte « compromis » par rapport à des hépatocytes dans un foie normal).

« **Oeuvre non reproduite par respect du droit d'auteur** »

**Figure 24. Différenciation, régulation et activité des lymphocytes issus de la lignée TCD4.** La présentation de l'Ag aux lymphocytes T helpers naïfs peut induire le développement de trois sous-types d'effecteurs différents (Th1, Th2, Th17) et d'autres sous-types régulateurs (Treg) dont des Treg induits, des Tr1 (produisant de l'IL-10) et des Th3 (produisant du TGF- $\beta$ ), en fonction de l'environnement cytokinique. Les Th1 produisent IL-2, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  alors que les Th2 produisent IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. IL-12 active STAT1 ce qui entraîne l'expression de T-bet, principal régulateur de la différenciation Th1. Une signalisation différente via STAT6 régule l'expression de GATA3, principal régulateur de la différenciation Th2. Le développement des Th17 à partir de lymphocytes naïfs est inhibé par IFN- $\gamma$  et IL-4, alors que les Th17 engagés résistent à l'action suppressive des cytokines Th1 et Th2. La différenciation des Th17 à partir de lymphocytes naïfs est induite par IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17 A/F et IL-6 de manière indépendante de STAT1, T-bet, STAT4 et STAT6. Le maître régulateur du programme de différenciation Th17 est le récepteur nucléaire orphelin ROR $\gamma$ t. Le profil cytokinique de Th17 est IL-17 A/F, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 et GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor). En condition de polarisation Th1 ou Th2, respectivement par un anti-IL-4 ou un anti-IFN- $\gamma$ , le développement de Th17 dépend d'un signal de co-stimulation par ICOS. TGF- $\beta$  seul est suffisant pour promouvoir le développement de Th17 via l'expression du récepteur de l'IL-23 alors qu'IL-23 seule ne le provoque pas. TGF- $\beta$  induit aussi la différenciation d'une sous-population lymphocytaire T post-thymique en Treg exprimant FoxP3. IL-27, un membre de la famille IL-12/IL-23, serait un inhibiteur potentiel du développement des Th17, indépendant de l'IFN- $\gamma$ , et agirait par une voie dépendante de STAT1 et SOCS-3 (**Castello et al, Clinical Immunology 2010**) [140].

## - Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg ont la capacité de reconnaître des peptides présentés par le CMH de classe II, via leur TCR, et de supprimer ou de moduler les réponses immunitaires de l'hôte dans le cadre de pathologies infectieuses, auto-immunes, allergiques ou tumorales. Un nombre croissant d'études souligne le rôle potentiel des Treg dans le contrôle des réponses cellulaires TCD8 spécifiques au cours d'infections virales aiguës ou chroniques (VIH, CMV, VHC, VHB...). Il existe deux principales populations de Treg [244]. Les mieux connus sont les **Treg "naturels"** qui se développent dans le thymus au cours de la maturation des LT, à partir des lymphocytes TCD4. Ils représentent 5-10% des TCD4 circulants et expriment de manière constitutive CD25 (IL-2 receptor alpha-chain), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family-related gene), CTLA-4 et FoxP3 (forkhead transcription factor 3). Une sous-population de thymocytes régulateurs CD8+CD25+ a été décrite récemment [245]. L'expression de FoxP3 détermine leur phénotype régulateur caractérisé par une anergie, une incapacité à produire des cytokines pro-inflammatoires telles IFN- $\gamma$  et IL-2, et une fonction suppressive. **FoxP3 est actuellement considéré comme le meilleur marqueur phénotypique de cette population** (meilleur que CD25 qui est exprimé sur les cellules effectrices récemment activées) mais il peut être exprimé chez l'homme de manière transitoire par des TCD4 et TCD8 activés non régulateurs. Les seconds sont des **Treg "induits"** à partir de LT matures périphériques, principalement à partir de TCD4, sous différentes conditions de stimulation ou de production de cytokines, notamment TGF- $\beta$  [246] ou IL-10.

## Chapitre V : Modulations de la réponse immunitaire et immunopathogénicité liées au VHC

Le VHB et le VHC sont des virus hépatotropes mais ne sont pas directement cytopathiques pour les cellules infectées. Ils engendrent des lésions nécrotico-inflammatoires, causées par les cellules immunitaires de l'hôte, au devant desquelles les lymphocytes cytotoxiques et les cellules NK dont la finalité est de détruire les cellules infectées pour éradiquer le virus. Environ 15-20% des patients infectés par le VHC vont parvenir à éliminer le virus et guérir. Mais cette phase initiale de l'infection est peu étudiée car elle est souvent asymptomatique. La seule chose vraiment établie est que la clairance du virus à la phase aiguë de l'infection repose sur une réponse immunitaire Th1 vigoureuse et soutenue.

De nombreux mécanismes sont invoqués pour expliquer le passage à la chronicité de l'infection par le VHC, qui survient dans plus de 80% des cas. Dans cet organe immunotolérant

qu'est le foie, les stratégies développées par le VHC pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte sont détaillées dans de nombreuses revues consacrées au sujet [7, 247]. Le contrôle de l'infection virale résulte d'un équilibre entre les mécanismes immunitaires de l'hôte et les stratégies d'évasion virale face à ce système immunitaire.

## ***1 - Défaillance de la réponse cellulaire innée périphérique et hépatique***

Les cellules de la réponse immunitaire innée sont déterminantes dans l'évolution de la maladie, en contribuant à une réponse cytotoxique Th1 efficace à la phase aiguë de l'infection virale C. Leur défaillance à la phase initiale de l'infection peut favoriser le passage à la chronicité. Elles seraient moins impliquées mais probablement utiles aussi à la phase chronique.

### **- Les cellules dendritiques**

Les études s'intéressant aux DC au cours de l'infection virale C aiguë ou chronique sont le plus souvent réalisées *in vitro*, à partir de systèmes de dérivation des monocytes périphériques en DC (Mo-DC), et sont rassemblées dans une revue très récente par Dolganius et Szabo [197]. Globalement, un nombre réduit et/ou des troubles de stimulation des MDC seraient associés au développement d'une infection chronique, alors qu'une augmentation du nombre de PDC favoriserait l'élimination du virus [248-250].

Les PDC représentent, avec les hépatocytes infectés, une des principales sources de production des IFN de type I. Or, il a été démontré que leur nombre est réduit dans le sang des patients infectés par le VHC [251, 252]. Leur capacité à produire de l'IFN- $\alpha$  *in vitro* est également diminuée [253]. Une des explications pourrait être une action indirecte du VHC dont les protéines Core et NS3 activent les monocytes via TLR2 pour produire du TNF- $\alpha$ , ce dernier inhibant en retour la production d'IFN- $\alpha$  par les PDC en induisant leur apoptose [254]. Le VHC serait également capable *in vitro* d'inhiber directement la production d'IFN- $\alpha$  par les PDC, par simple interaction, sans que l'infection et la réplication dans ces cellules soient indispensables [255].

Un fonctionnement défectueux des MDC peut être responsable d'un « priming » insuffisant des LT et entraîner une atténuation de la réponse cellulaire T spécifique. Des troubles de maturation et de différenciation des MDC ont été démontrés *in vitro*, engendrant une diminution de la production d'IL-12 et une augmentation de la production d'IL-10 [256, 257]. Notamment, la protéine Core du VHC peut se lier au récepteur du complément C1q des macrophages et des MDC et réguler négativement la production d'IL-12 [258]. Il a été montré que le VHC, sous la forme de lipo-viroparticules circulantes en provenance de l'intestin, pouvait



interférer avec la signalisation TLR4 et entraîner des troubles fonctionnels des DC chez les patients chroniquement infectés, responsables d'une bascule de la réponse immunitaire vers un profil Th2, par défaut de production d'IL-12 par les DC et production insuffisante d'IFN- $\gamma$  par les LT [189]. Les DC dérivés *in vitro* de monocytes de patients chroniquement infectés par le VHC présentent une maturation défectueuse via TLR4 (qui n'est pas observée lorsqu'ils sont stimulés par les ligands des TLR1/2, TLR2/6 et TLR3) responsable d'une réponse Th1 défectueuse en relation avec une activation de la voie de signalisation MEK/ERK [259]. L'hypothèse d'un dysfonctionnement dans la capacité des MDC à présenter l'Ag est beaucoup plus controversée, certaines études décrivant une stimulation défectueuse des TCD4 à la phase chronique de l'infection en comparaison aux patients non infectés [252, 260-262], d'autres ne la retrouvant ni chez l'homme [263-266] ni chez le chimpanzé [267, 268]. Cette limitation de la prolifération des TCD4 pourrait s'exercer par une voie dépendante de l'IL-10 augmentée et de l'IL-2 diminuée, ou par une modification de l'expression des molécules co-stimulatrices à la surface des MDC (notamment une surexpression de PD-L1) et des TCD4 [269] par le VHC. Une surproduction de cytokine anti-inflammatoire IL-10 entraîne une régulation négative des fonctions des cellules présentatrices d'Ag et des LT, particulièrement en inhibant la production d'IFN- $\alpha$  et en entraînant une apoptose des PDC [254, 270]. Il a été démontré *in vitro* que l'Ag VHC-Core recombinant pouvait stimuler la production d'IL-10 par les monocytes de manière TLR2-spécifique [254] et des taux élevés d'IL-10 ont été relevés dans le sang de patients chroniquement infectés par le VHC [271, 272], avec comme conséquence une diminution de production d'IFN- $\alpha$  et une diminution du nombre des PDC chez les patients chroniquement infectés par le VHC [263, 273]. Cette production d'IL-10 pourrait également favoriser le recrutement de Treg. En effet, il a été récemment démontré que les MDC des patients infectés par le VHC peuvent induire *in vitro* l'expansion de Treg CD4+CD25+FoxP3+ pré-existants [269], une manière indirecte de contrôler l'activation des LT, et cette induction pourrait s'effectuer via IL-10.

Enfin, de manière indirecte, un dysfonctionnement des DC dans l'activation des NK pourrait aussi être impliqué dans la persistance virale. En effet, les DC des patients infectés par le VHC seraient incapables d'augmenter leur expression de MICA/B en réponse à IFN- $\alpha$  et échoueraient dans l'activation des cellules NK [274].

### **- Les lymphocytes NK**

Le rôle des NK dans la persistance virale est mal connu mais compte tenu de leur implication à la phase aiguë de l'infection, il est naturel de penser que toute altération de leurs fonctions ou diminution de leur activité cytotoxique puisse favoriser le passage à la chronicité [219].

Les études s'accordent toutes pour montrer que le nombre de NK est significativement diminué dans le sang des patients infectés par le VHC, et ceci aux dépens des CD56<sup>dim</sup> [275-277], chez les patients cirrhotiques ou non cirrhotiques [278], entraînant ainsi une modification des capacités de cytotoxicité et de production d'IFN- $\gamma$  du pool des NK périphériques. Elles sont également diminuées dans le foie [279].

Les études concernant l'existence d'altérations fonctionnelles des cellules NK au cours de l'hépatite chronique virale C sont controversées, réalisées le plus souvent *in vitro*, et les conclusions doivent être interprétées avec précaution. Certaines études rapportent des troubles de l'activité cytotoxique des cellules NK [280-282], d'autres ne les retrouvent pas [276, 277, 283], d'autres enfin trouvent des résultats différents entre les NK périphériques (cytotoxicité conservée) et celles issues du foie (cytotoxicité diminuée) [279]. La proportion de NK circulants CD56<sup>dim</sup> exprimant CD16 serait également diminuée au cours de l'hépatite chronique virale C [277, 284].

Certaines études réalisées *in vitro* ont montré que la protéine d'enveloppe VHC-E2 recombinante, via sa liaison avec CD81, était capable d'inhiber directement les fonctions cytotoxiques des NK, de même que leur production d'IFN- $\gamma$  [23, 24]. Ces résultats sont cependant remis en question par des études plus récentes utilisant un système de culture virale plus approprié produisant des particules virales infectieuses de génotype 1a et 2a, qui démontrent que cette protéine d'enveloppe n'a pas d'effet sur les fonctions des cellules NK et que seuls les anti-CD81 inhibent les fonctions cytotoxiques [255].

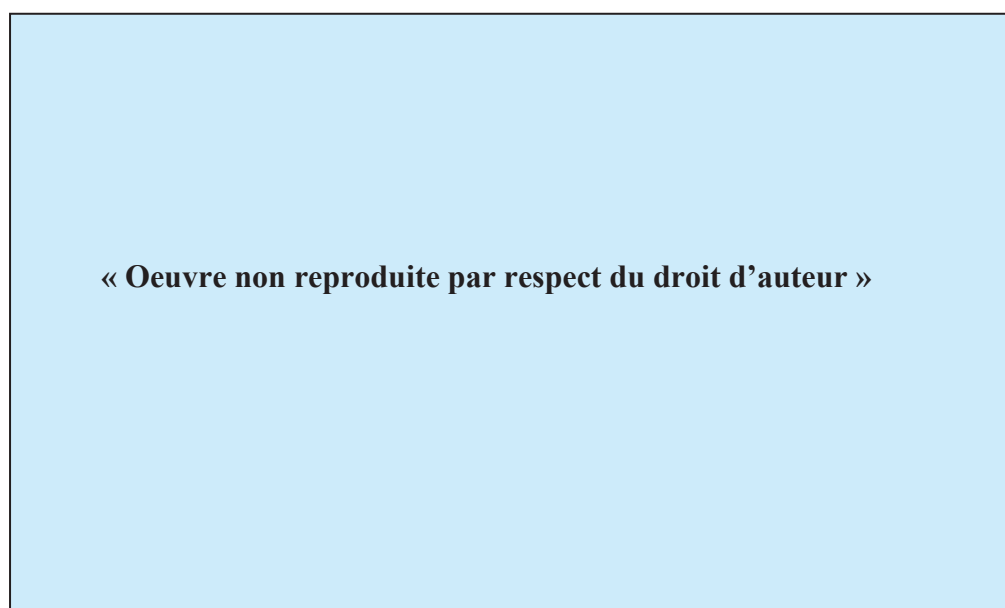
D'autres études suggèrent que les interactions via les récepteurs inhibiteurs ou activateurs des cellules NK seraient déterminantes pour l'immunité anti-virale et seraient impliquées dans l'éradication du VHC. La protéine Core induirait la stabilisation de l'expression des molécules classiques du CMH de classe I et de HLA-E. Notamment, la stabilisation de l'expression de HLA-E en réponse à la présentation d'un épitope viral classique des LT (VHC-Core 35-44) entraînerait *in vitro* une augmentation de l'expression de CD94/NKG2A qui inhiberait les fonctions des cellules NK chez les patients infectés par le VHC [285, 286]. En conséquence, les cellules NK secrèteraient des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  qui inhiberaient les DC [285]. La protéine recombinante NS5A du VHC entraînerait *in vitro*, via TLR4, une modification des cytokines sécrétées par les DC, au détriment d'IL-12 et au profit d'IL-10 et TGF- $\beta$ , avec pour conséquence une diminution de l'expression du récepteur activateur CD94/NKG2D constatée à la surface des NK circulantes des patients chroniquement infectés par le VHC et une diminution de leurs capacités de cytolyse et de production d'IFN- $\gamma$ ; l'administration d'IL-15 permettrait de prévenir ce dysfonctionnement [287]. Les KIR activateurs seraient rattachés à une évolution favorable de l'infection virale C [288-290]. Peu de données sont connues concernant les KIR inhibiteurs. Une étude rapporte une évolution

favorable de l'infection virale C liée à une diminution de l'action inhibitrice de KIR2DL3 et de son ligand HLA-C1, en cas d'exposition virale faible [291].

L'inhibition des voies de signalisation de l'IFN et de l'IRF-3 par certaines protéines du VHC impacte sur l'activation des cellules NK, très sensibles à l'IFN- $\alpha$  à la phase aiguë de l'infection, mais aussi sur la maturation des DC [35, 292].

Une diminution du taux sérique d'IL-15 est aussi rapportée chez les patients infectés, susceptible d'impacter sur la maturation et la survie des cellules NK [275]. La production d'IL-15 par les DC, médiée par l'IFN de type I, est diminuée. La diminution de cette cytokine, requise pour l'expression de MICA/B, entrainerait une réponse aberrante des DC à la stimulation par IFN- $\gamma$  : la diminution d'expression de MICA/B à la surface des DC entrainerait une diminution de l'activation des cellules NK par défaut de liaison à leur récepteur CD94/NKG2D [293]. L'administration exogène d'IL-15 pourrait restaurer certains dysfonctionnements des cellules NK, notamment l'expression des récepteurs NKG2D, et représenter un traitement anti-viral adjuvant intéressant [287].

Enfin, l'inhibition des cellules NK peut indirectement altérer la coopération avec les DC, leur « priming » et l'induction de la réponse Th1 et de la prolifération des TCD8 [214, 219].



**Figure 25. Mécanismes d'inhibition des cellules NK induits par le VHC.** Un certain nombre d'observations démontre que l'infection par le VHC peut impacter sur l'activité des NK, et notamment sur la balance des signaux activateurs ou inhibiteurs qui contrôle les fonctions des cellules NK. La liaison de la protéine d'enveloppe E2 du VHC au récepteur CD81 inhibe l'activité des NK. La protéine Core du VHC stabilise l'expression des molécules classiques du CMH de type I et de HLA-E, altérant l'activité cytolytique des NK. L'expression de MICA/B à la surface des DC est diminuée au cours de l'infection par le VHC. Les cytokines IFN- $\alpha$  et IL-15 jouent un rôle important dans le cross-talk entre les DC et les cellules NK. L'inhibition par le VHC de la voie de signalisation de l'IFN impacte sur l'activation des cellules NK, très sensibles l'IFN- $\alpha$ . Une production insuffisante d'IL-15 contribue aussi à inhiber l'activation des NK. Les conséquences ces différents mécanismes d'inhibition sont une réponse cellulaire T sous-optimale, via une altération de la coopération NK-DC (**Golden Mason et Rosen, Liver Transplantation 2006**) [219].

Au total, les multiples stratégies développées par le virus pour contourner l'immunité innée montrent que l'altération du fonctionnement des cellules NK peut contribuer à l'échec de la clairance virale (Figure 25). A la phase chronique, la diminution et/ou le fonctionnement défectueux des cellules NK pourrait favoriser le développement de la fibrose hépatique. Des études chez des modèles animaux soutiennent le concept d'un rôle protecteur des cellules NK sur le développement de la fibrose, d'une part par la production d'IFN- $\gamma$ , et d'autre part par l'induction de l'apoptose des cellules étoilées du foie [224, 294]. L'implication des cellules NK semble également importante au cours du traitement anti-viral par IFN- $\alpha$  Ribavirine car il a été démontré une réaugmentation significative du nombre des cellules NK intra-hépatiques (et non périphériques) chez les patients développant une réponse soutenue [295].

### **- Les lymphocytes TNK**

Le pourcentage des lymphocytes TNK CD3+CD56+ est diminué dans le foie des patients atteints d'hépatite chronique ou de cirrhose virale C, par rapport à des foies non infectés [276, 279]. Il reste significativement plus élevé que dans le sang mais il n'est retrouvé aucune corrélation avec les paramètres biochimiques ou histologiques [296]. Le sous-type V $\alpha$ 24 est bas dans le sang des patients VHC comme dans celui des contrôles non infectés, dont on connaissait déjà la faible représentativité [296, 297]. L'existence d'un enrichissement de ce sous-type dans le foie des patients VHC est controversé, certains l'observant [298], d'autres pas [296]. La présence de TNK CD1d-réactifs Th1-like produisant de l'IFN- $\gamma$  est décrite au niveau du foie de patients chroniquement infectés par le VHC [299], en nombre augmenté par rapport au foie normal [300], suggérant comme dans le VHB un rôle dans l'activité inflammatoire anti-virale [301]. D'autres études ont montré *in vitro* que les iTNK circulants des patients infectés par le VHC produisent plus de cytokines Th2, dont IL-13 au pouvoir pro-fibrosant, que ceux des sujets contrôle, modulant ainsi la réponse immunitaire [302].

### **- Les lymphocytes T $\gamma\delta$**

Le rôle des LT $\gamma\delta$  dans l'hépatite chronique virale C est controversé. Certaines études retrouvent une augmentation de ces cellules dans le sang [303] et dans le foie [304] des patients chroniquement infectés par le VHC par rapport à des patients non infectés. Ils seraient fonctionnels et une voie d'activation serait la liaison de la protéine E2 du VHC à CD81 [304] ; leur nombre dans le foie corrèlerait avec l'activité nécrotico-inflammatoire [305, 306], suggérant un rôle dans les lésions inflammatoires chroniques immuno-médiées. Cependant, ces résultats ne sont pas observés par tous [278] et certains montrent même une diminution de ces lymphocytes dans le foie des patients VHC [307]. Ces cellules auraient même plutôt un rôle protecteur sur les

lésions tissulaires au cours des pathologies inflammatoires chroniques dans certaines études menées sur des modèles murins [308].

## ***2 - Défaillance de la réponse cellulaire adaptative périphérique ou hépatique***

La présence de TCD4 et de TCD8 spécifiques du VHC est détectée tant dans le sang que dans le foie. La clairance virale au cours de l'infection aiguë liée au VHC et la guérison sont liées à une réponse cellulaire T spécifique vigoureuse, polyclonale et durable [309-311]. A la phase aiguë de l'infection, la réponse cellulaire TCD4 et TCD8 spécifique du VHC et la co-expression d'IFN- $\gamma$  coïncident avec une décroissance de la quantité de virus [312]. Les TCD4 sont indispensables au développement d'une réponse TCD8 efficace, intervenant notamment dans le contrôle des mécanismes d'évasion immunitaire [313]. Une réponse cellulaire Th1 spécifique du VHC plus forte avec un "scope" plus large est corrélée à la guérison [314].

Cette réponse cellulaire T est globalement altérée à la phase chronique de la maladie, réduite quantitativement et sur le plan fonctionnel, et inversement corrélée à la charge virale [314]. Plusieurs raisons sont invoquées pour expliquer le dysfonctionnement de la réponse cellulaire T [315] : **(1)** échec primaire ou dépassement de la réponse cellulaire T par délétion, dysfonctionnement ou trouble de maturation des LT spécifiques helpers et cytotoxiques, **(2)** émergence de mutations virales "échappatoires" avec apparition de variants VHC présentant des épitopes multiples ou altérés **(3)** immunosuppression par les protéines virales, **(4)** induction d'une anergie par des niveaux très élevés de virus, comme décrit dans le modèle murin de chorioméningite lymphocytaire virale hépatotrope [316], **(5)** rôle suppressif des T régulateurs.

### **- Echec primaire ou dépassement de la réponse cellulaire T**

**De la réponse TCD4.** A la phase aiguë, une réponse TCD4 de type Th1 vigoureuse et multi-épitope est observée dans les cas qui résolvent l'infection [309, 317]. Au contraire, cette réponse est faible, courte et trop sélective dans les cas qui évoluent vers la chronicité [317]. Parmi les patients qui évoluent vers la chronicité, certains ne développent aucune réponse T spécifique au cours de l'infection aiguë, soutenant l'hypothèse d'un échec primaire de la réponse cellulaire T adaptative [309]. D'autres développent une réponse TCD4 spécifique non maintenue dans le temps, suivie d'une réapparition du virus, soutenant l'hypothèse d'un épuisement ou d'un dépassement des capacités de réponse [309, 318]. Ces phénomènes pourraient être consécutifs à un défaut de présentation de l'Ag par les DC ou à une délétion des LT spécifiques du virus.

A la phase chronique, les TCD4 spécifiques du VHC sont fonctionnellement altérés et leur activité n'est pas maintenue, contrairement à ceux des patients guéris. Une perte

préférentielle des TCD4 qui sécrètent de l'IL-2 est observée par rapport aux patients qui guérissent, susceptible de retentir sur la production d'IFN- $\gamma$  [319]. Des TCD4 sécrétant de l'IL-10 (Tr1) plutôt que de l'IFN- $\gamma$  sont également décrits, traduisant un dysfonctionnement de la réponse cellulaire T, avec une bascule de la réponse adaptative Th1 vers une réponse Tr1 [320, 321].

**De la réponse TCD8.** La production de TCD8 spécifiques du VHC est un des mécanismes majeurs de défense de l'hôte contre le virus. Elle est directement impliquée dans la clairance virale à la phase aiguë de l'infection, où une résolution de l'infection est associée à une réponse cellulaire TCD8 spécifique du VHC vigoureuse, précoce et multi-spécifique [322] alors qu'une réponse faible ou inadaptée est associée à l'évolution vers la chronicité [323, 324].

A la phase aiguë, la fréquence des TCD8 spécifiques du VHC est élevée et décroît à la phase chronique, passant de 2-8% à 0,01-1,2% des TCD8 [325, 326]. Malgré ce nombre élevé et leur état activé (CD38+, CD69+) à la phase aiguë, il a été montré que certains de ces TCD8 sont incapables de proliférer en réponse aux Ag viraux ou de produire de l'IFN- $\gamma$  (phénotype TCD8 "stunned") et que la résolution de l'infection était associée à la présence de TCD8 périphériques moins activés mais produisant plus d'IFN- $\gamma$  [309, 327], ce qui souligne le rôle double de ces cellules exerçant leurs fonctions anti-virales par des mécanismes cytotoxiques et cytokiniques, et la nécessité d'une réponse TCD8 efficace pour éliminer le virus [314, 328, 329].

A la phase chronique, le rôle des TCD8 spécifiques a été suggéré dans le contrôle de la réplication virale, certains travaux ayant montré une réponse TCD8 périphérique spécifique corrélée aux lésions tissulaires et inversement corrélée à la charge virale [330], d'autres non. Dans le foie, le nombre de TCD8 en immunohistochimie et en cytométrie de flux et l'expression des transcrits CD8 $\beta$  et TCR $\alpha$  en PCR sont corrélés aux lésions tissulaires, et notamment à l'activité nécrotico-inflammatoire selon Métavir ou Knodell [296, 307, 331]. Les fonctions de ces cellules sont altérées puisqu'elles prolifèrent moins et produisent moins d'IFN- $\gamma$  en réponse aux Ag viraux [332]. La voie de signalisation PD-1 (programmed death 1) a également été identifiée comme mécanisme d'inhibition des TCD8 spécifiques du VHC. Ce récepteur inhibiteur peut être exprimé sur les LT, les LB et les cellules myéloïdes et son ligand PD-L1 est exprimé constitutionnellement sur les cellules présentatrices d'Ag et surexprimé sur les cellules infectées, de manière IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  dépendante. L'interaction provoque une inhibition des cellules effectrices puis leur apoptose. Dans l'hépatite C aiguë, PD-1 est surexprimé sur les TCD8 spécifiques et son expression décline quand l'infection est résolue [333]. Dans l'infection chronique, son expression persiste à des taux élevés et des troubles fonctionnels des TCD8 PD-1+ ont été mis en évidence, plus fréquentes dans le foie que dans le sang [334].

Enfin, les TCD8 spécifiques du VHC seraient moins différenciés (CD28+ et/ou CD27+) que par exemple les TCD8 spécifiques du CMV ou du VIH (CD28- et CD27-), et présentent un phénotype dit « immature » ou de type mémoire « centrale » [335]. De manière intéressante, au cours de l'infection chronique virale C, les TCD8 spécifiques du VHC, comme ceux spécifiques du CMV, présentent un phénotype moins mature, soutenant l'hypothèse d'un effet direct du VHC sur la différenciation des LT [336]. Cependant, les TCD8 matures spécifiques du VHC seraient plus cytotoxiques et produiraient plus d'IFN- $\gamma$  que les moins matures [332]. Ces données soutiennent l'hypothèse d'une différenciation des TCD8 au cours de l'infection chronique virale C différente de celle observée au cours d'autres infections, possiblement due à l'environnement cellulaire et cytokinique hépatique.

En cas d'inflammation chronique, certains TCD8+ mémoires spécifiques d'Ag peuvent exprimer à leur surface des NKR [337]. Dans l'infection chronique par le VHC, des TCD8+NKR+ sont détectés dans le sang et dans le foie mais représentent une population minoritaire et leur contenu en perforine est bas. Notamment, les TCD8+CD161+ ne sont présents qu'au cours des infections virales C et B, mais pas dans les infections à CMV, VIH ou virus influenza ; ils sont plus fréquents dans le foie que dans le sang et l'expression de CD161 est associée à celle de CXCR6, chimiokine jouant un rôle majeur dans le « homing » hépatique [338]. Ce sous-type lymphocytaire présente des capacités de production cytokinique IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  conservées mais un pouvoir prolifératif et cytolytique diminué, et ce trait de différenciation particulier des TCD8 dans le foie des patients atteints d'hépatite virale C pourrait être impliqué dans les mécanismes de persistance virale. *Ex vivo*, l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que NKG2A serait capable de réguler négativement leurs fonctions effectrices. Les NKG2A+CD8+ seraient moins différenciés que les KIR+CD8+ et le nombre des NKG2A+CD8+ intra-hépatiques serait corrélé à l'activité nécrotico-inflammatoire [339].

### **- Echappement aux réponses immunitaires cellulaires et humorales**

Il a été démontré récemment que le VHC échappe en permanence aux Ac neutralisants et aux réponses cellulaires T au cours de la phase chronique [340]. La survenue de mutations virales peut être envisagée comme une cause ou comme une conséquence de l'échappement du virus au système immunitaire et le VHC se caractérise par la présence de quasi-espèces entraînant rapidement une « diversification » du virus. Une mutation de l'ordre d'un AA dans une région immunogène entraîne une ignorance de la part des Ac et des TCD8 spécifiques du VHC et une tolérance vis à vis des TCD8.

Les mutations principales se situent dans la région hypervariable HVR-1 de la protéine virale E2. Des réponses cellulaires TCD4 et TCD8 spécifiques de cette région sont associées à une évolution favorable de l'infection virale C [341, 342]. Globalement, l'évolution des quasi-

espèces virales pour cette séquence peut conditionner le devenir de l'hépatite aigüe, une relative stabilité de la population des quasi-espèces étant associée à la résolution de l'hépatite aigüe, alors qu'une grande variabilité des séquences favoriserait le passage à la chronicité [343].

Des mutations dans les régions épitopes des molécules du CMH de classes I et II restreintes aux LT peuvent perturber la reconnaissance des cellules infectées, en affectant le processing intracellulaire des épitopes des LT [344, 345], leur liaison aux molécules d'histocompatibilité et la stimulation des LT [342, 346]. Une mutation d'un AA dans l'épitope de la région virale NS3 reconnu par les LTh conduit à une modification du profil de sécrétion des cytokines avec bascule d'une réponse Th1 vers Th2, responsable d'une atténuation des réponses cellulaires anti-virales [347]. Une mutation dans une région épitope des TCD8 entraîne une reconnaissance par les TCD8 de l'épitope viral parent mais pas des variants viraux qui ne pourront pas développer une réponse TCD8 efficace contre toutes les quasi-espèces [348].

### **- Immunosuppression par les protéines virales**

Les protéines virales, notamment E2, peuvent avoir une action différente selon le type de cellules ciblées [349]. La glycoprotéine E2, en se fixant à CD81, récepteur viral ligand majeur, déclenche des signaux de stimulation vers les autres cellules. Cette interaction très spécifique est sujette à des mutations dans les régions hypervariables HVR-1 et HVR-2 de la protéine E2 et les variants HVR-1 agissent comme des antagonistes du TCR des TCD4 et TCD8 spécifiques du virus et de HVR-1, induisant une inhibition de la prolifération de ces cellules et de la production de cytokines. Alors que la fixation d'E2 aux DC induit leur maturation, et qu'elle présente une action inductive également pour les LT et LB, les hépatocytes ou les cellules étoilées, sa fixation aux cellules NK inhibe leurs fonctions. Ce n'est pas le cas des autres protéines virales, dont l'action est essentiellement suppressive sur les cellules cibles. Notamment les protéines Core, NS3, NS5 inhibent les fonctions des DC [350, 351].

### **- Rôle des lymphocytes T régulateurs**

Plusieurs équipes rapportent une augmentation du nombre de Treg "naturels" CD4+CD25+ dans le sang des patients porteurs d'une hépatite chronique virale C, par rapport aux patients guéris ou sains [314, 352-355]. Les Treg des patients infectés sont capables *in vitro* de supprimer la prolifération, la production de cytokines et l'activité cytolytique de TCD4 et TCD8 naïfs ou spécifiques du VHC [314], plus particulièrement la prolifération des TCD8 spécifiques par contact cellulaire direct [354] ou par production d'IL-10 et TGF- $\beta$  [353], l'expression en perforine des TCD8 [355] et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des TCD4 [353]. *In vitro*, la déplétion du sang en Treg CD4+CD25+ entraîne une augmentation des réponses cellulaires T



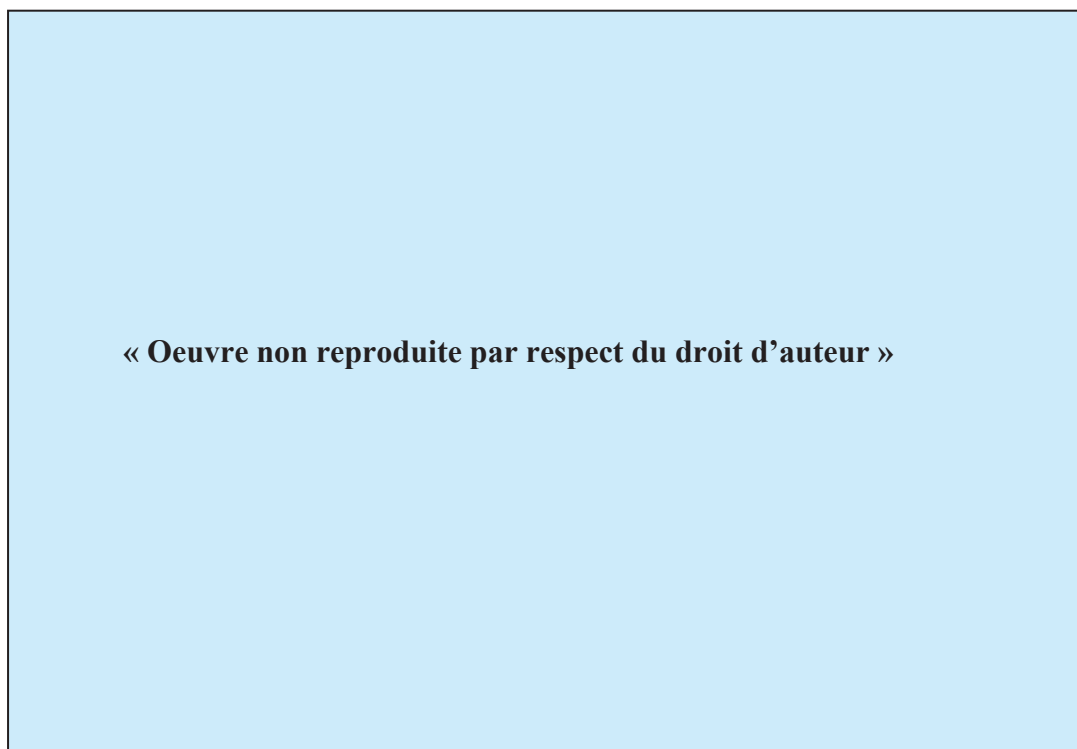
spécifiques [353-355], en restaurant la prolifération des TCD8 [354, 355] et des TCD4 [353]. Des corrélations positives entre le nombre de Treg CD4+CD25+ et le titre d'ARN viral, mais négatives avec le degré d'inflammation hépatique, ont également été mises en évidence, suggérant un rôle dans le contrôle de la réplication virale [353]. Les Treg induits de manière spécifique (TCR dépendante) au cours de l'infection chronique par le VHC sont capables, une fois activés, d'exercer une inhibition "bystander" non spécifique sur les TCD8 spécifiques d'autres Ag, par exemple du CMV ou de l'EBV [355]. Les Treg de patients guéris de leur infection virale C seraient "moins suppressifs" sur ces autres populations TCD8 [354]. Ces constatations ont ces dernières années amené à penser que les Treg pouvaient jouer un rôle crucial mais ambigu dans le contrôle de la réponse immunitaire spécifique du VHC. En effet, tout en limitant les lésions tissulaires dues aux cellules effectrices hépatiques, ils favoriseraient la persistance virale et le passage à la chronicité. Des Treg sont présents dans le foie des patients infectés par le VHC, détectés en immunohistochimie avec un Ac anti-FoxP3 [356] et les doubles marquages montrent qu'il s'agit de CD4+FoxP3+, avec un ratio CD4+/FoxP3+ non négligeable de 2:1 [357]. Les patients chroniquement infectés par le VHC avec des ALAT normales ont un nombre de Treg CD4+CD25+ circulants produisant du TGF- $\beta$  significativement plus élevé, mais une réponse TCD4 spécifique moins élevée et des lésions inflammatoires moins marquées que des patients avec des ALAT élevées [358]. Le rôle des Treg dans la progression de la maladie reste à définir. Aucune relation n'a été démontrée avec le stade de fibrose, mais on pourrait suspecter que les Treg produisant du TGF- $\beta$  puissent favoriser le développement de la fibrose.

Les premiers Treg induits par les Ag du VHC sont décrits dans une étude retrouvant dans le sang de patients infectés des TCD4 spécifiques du VHC produisant de l'IL-10 (Tr1), reconnaissant les mêmes épitopes que les Th1 produisant de l'IFN- $\gamma$  [321]; ces Tr1 sont particulièrement nombreux chez les patients transplantés pour cirrhose virale C développant une récurrence virale sévère sur le greffon, et leur présence, associée à des taux élevés d'IL-10 à 1 an, serait prédictive de récurrence sévère [359]. Des TCD4+CD25+ périphériques produisant du TGF- $\beta$  ont ensuite été décrits, inversement corrélés à l'inflammation [358]. Plus récemment, des lymphocytes TCD8 ayant des fonctions régulatrices sur les réponses immunitaires dirigées contre le VHC ont été décrits. Des cellules régulatrices TCD8 spécifiques du VHC produisant de l'IL-10 ont été identifiées dans le foie de patients infectés, capables de supprimer la prolifération des TCD4 spécifiques, la réponse TCD8 spécifique dirigée sur le même épitope et la production d'IFN- $\gamma$  [360]. Des marquages en immunofluorescence montrent que ces cellules régulatrices induites dans le foie se situent préférentiellement dans des zones de faible apoptose hépatocytaire et de fibrose minime, suggérant un rôle protecteur sur les lésions tissulaires [361]. On ne sait pas si ces cellules régulatrices TCD8 exprimaient FoxP3. Cependant, la stimulation de PBMC issus de patients infectés par le VHC ou pas, par des Ag du VHC, montre qu'il est possible d'induire

une population TCD8+FoxP3+ spécifique, parallèlement à une population de TCD8+FoxP3- [362]. Enfin, des cellules régulatrices TCD8+CD25- spécifiques du VHC et sécrétant du TGF- $\beta$  ont été induites par stimulation *in vitro* à partir de sang de patients chroniquement infectés. Elles suppriment les réponses cellulaires TCD4 et TCD8 spécifiques et la production d'IFN- $\gamma$ , et le blocage de TGF- $\beta$  permet de restaurer la sécrétion d'IFN- $\gamma$  [363].

Les Treg étendent leur fonction suppressive aux acteurs de la réponse immunitaire innée puisqu'il a été démontré *in vitro* que les CD4+CD25+ inhibent la prolifération et la production de cytokines des TNK [364], inhibent les fonctions des NK via un contact cellulaire direct ou par la production de cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  [365-367] et restreignent la maturation et la fonction présentatrice d'Ag des DC [368].

Ces données montrent qu'il existe différentes sous-populations de Treg dans le sang et dans le foie de patients chroniquement infectés, contribuant à un dysfonctionnement de la réponse cellulaire T spécifique du virus au cours de l'hépatite chronique virale C, mais également probablement aussi à un dysfonctionnement de la réponse innée aux phases aiguë et chronique de la maladie.



**Figure 26. Coordination des réponses cellulaires innées et adaptatives pour la résolution de l'infection virale.** Les cellules NK agissent principalement à la phase aiguë de l'infection, comme le premier effecteur de la réponse anti-virale innée qui, en coopération avec les DC, induit le "priming" des TCD4 naïfs vers une réponse Th1 prédominante et vers la réponse TCD8 cytotoxique. Les TNK et les  $\gamma\delta$  peuvent également être impliqués dans la réponse cellulaire adaptative à la phase chronique de l'infection, de même que la production d'Ac par les LB activés dans le cadre d'une réponse Th2 plus tardive et moins intense que Th1. Les Treg interviennent dans la phase de résolution de l'infection virale et favorisent la clairance virale (**Golden Mason et al, Liver Transplant 2006**) [219].

En résumé, il existe de plus en plus d'évidence que **l'interaction entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif peut jouer un rôle déterminant dans la qualité des réponses cellulaires anti-virales** (Figure 26). Le système immunitaire inné doit être activé correctement pour transmettre aux DC les « bons » signaux d'activation, qui pourront générer une réponse adaptative TCD4 de qualité et promouvoir ainsi des réponses effectrices TCD8 efficaces.

### ***3 - Défaillance de la réponse humorale***

Les études suggèrent que la réponse cellulaire serait plus importante dans le contrôle du virus [322] et plus durable en matière de protection [369, 370] que la réponse humorale. En effet, les Ac apparaissent après la phase de réponse cellulaire, avec un délai tardif de 7 à 8 semaines. De plus, la capacité des LB à produire une réponse humorale efficace est incertaine, une réponse protectrice via des Ac n'ayant pas pu être identifiée chez les patients exposés au VHC [371], à l'inverse de rares études chez le chimpanzé [372]. Enfin, les Ac anti-VHC ne protègent pas d'une réinfection virale C, probablement en raison d'un échappement viral secondaire aux rapides mutations dans la région hypervariable HVR-1 d'E2 [373], cible principale des Ac neutralisants [372, 374]. Il est démontré qu'une grande variabilité des séquences dans cette région, définissant l'hétérogénéité du génome viral et les quasi-espèces, peut conditionner l'évolution de l'hépatite aigüe et favoriser le passage à la chronicité [343, 375].

## **Chapitre VI : Modulations de la réponse immunitaire et immunopathogénicité liées au carcinome hépatocellulaire**

Les mécanismes immunologiques sont importants dans la surveillance du développement tumoral et dans le contrôle de la croissance tumorale. Une étude déjà ancienne rapporte que les patients porteurs d'un CHC riche en cellules inflammatoires, particulièrement en LT, présentent un taux de récurrence significativement réduit et une meilleure survie après résection chirurgicale [376], résultats confirmés plus récemment [377]. Dans d'autres cancers également, notamment d'origine colorectale, mammaire ou pulmonaire, la nature de la réaction inflammatoire au site tumoral primitif (type de cellules, densité et localisation de l'infiltrat inflammatoire) et la présence d'un stroma riche en cellules inflammatoires, conditionne une évolution plus favorable [378-380]. Une étude plus récente constate que la réponse immunitaire dans le micro-environnement hépatique péri-tumoral constitue la signature unique de l'évolution du CHC en

matière de métastase veineuse, de récurrence et de pronostic, une réponse prédominante Th1 retardant l'apparition de métastase de CHC et un switch vers Th2 favorisant leur survenue [381].

Cependant, cet infiltrat inflammatoire intra-tumoral ne permet pas souvent d'éradiquer la tumeur, ce qui suggère que la réponse immunitaire anti-tumorale développée n'est pas suffisamment efficace pour détruire la tumeur ou stopper sa croissance [382]. Les raisons invoquées sont multiples : faible immunogénicité des Ag tumoraux ou masquage antigénique partiel, échec du « processing » antigénique, co-stimulation inadéquate, suppression directe ou dysfonctionnement des cellules cytotoxiques effectrices. Les cellules de l'immunité innée et adaptative exercent une immunité anti-tumorale. Des données récentes montrent que les cellules cytotoxiques effectrices de l'immunité anti-tumorale, les TCD8 et les cellules NK principalement, mais également les LTh présentes au sein des tumeurs sont incomplètement activées ou fonctionnellement défectueuses et qu'il existe au sein du tissu tumoral des sous-populations T régulatrices suppressives de la réponse anti-tumorale.

Ces données suggèrent qu'un inventaire précis des populations de cellules immunitaires impliquées au site tumoral, concernant leur localisation intra- ou péri-tumorale, leur densité, mais aussi l'étude de leur état fonctionnel et de leurs interactions, soient plus utiles qu'une évaluation globale pour prédire le pronostic tumoral. Des données récentes, hélas jamais exclusivement centrées sur l'infection virale C, tendent à montrer que le micro-environnement immunitaire intra-tumoral serait globalement plus "inerte" que celui du tissu cirrhotique péri-tumoral, renfermant un nombre significativement inférieur de lymphocytes intra-tumoraux dont l'état d'activation est également diminué [383]. La majorité des lymphocytes dans les CHC seraient quiescents et moins de 10% des TCD8 exprimeraient perforine ou granzyme B [384, 385].

### ***- Lymphocytes T « helpers » et cytotoxiques et cancer***

Dans le CHC au sein duquel les lymphocytes intra-tumoraux sont majoritairement des lymphocytes TCD3, il a été rapporté tantôt une prédominance des TCD8 [376], tantôt une prédominance des TCD4 [386].

Les TCD4 jouent un rôle central dans l'initiation et le maintien de la réponse immunitaire anti-tumorale. Une étude intéressante sur les carcinomes malpighiens de la région tête et cou rapporte que le stade tumoral et une proportion élevée de TCD4 activés CD69+ au sein de la tumeur sont deux facteurs pronostiques indépendants de survie globale [387]. Dans une étude sur le CHC transplanté, un rapport TCD4/TCD8 >1 est associé à un taux de récurrence moins élevé, soulignant l'importance des LT helpers dans le rejet tumoral TCD8 médié [377]. Le sous-type TCD4 Th1

est considéré comme le plus important pour le rejet tumoral, en raison de son importante capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  et à orchestrer les réponses innées et adaptatives.

Les lymphocytes Th17, un autre sous-type de TCD4, sont des cellules pro-inflammatoires caractérisées par leur capacité à produire IL-17 mais aussi IL-21, IL-22, IL-6, qui jouent un rôle important dans l'inflammation et l'auto-immunité [388-391]. Ils ont été aussi observés dans des cancers de la prostate [392] et des lymphomes T cutanés [393]. Leur présence est induite dans le micro-environnement de tumeurs humaines ou murines, sous l'influence de cytokines diverses, accompagnée de TCD8 et de Treg : IL-2 régulerait de manière dynamique la balance entre Th17 et Treg en réduisant le nombre de Th17 et en augmentant celui des Treg [394]. L'effet suppressif d'IL-2 serait supplanté par IL-1, cytokine connue pour induire la formation des Th17, médiée par IL-6 et TGF- $\beta$  [395]. Leur rôle dans l'immunité anti-tumorale reste à élucider. Des propriétés anti-tumorales médiées par IFN- $\gamma$  leur sont attribuées par certains, notamment dans un modèle de mélanome murin [396, 397] qui seraient supérieures à celles des Th1, faisant de Th17 un candidat pour l'immunothérapie. Cependant, IL-17 peut aussi favoriser la croissance tumorale en augmentant l'angiogenèse chez la souris [398, 399] et une augmentation des Th17 a été observée dans le sang et dans les tumeurs de patients à un stade tumoral avancé [394]. Enfin, IL-23, cytokine importante induisant et supportant la réponse Th17 *in vivo*, est aussi connue pour induire et influencer la croissance tumorale [400]. Dans une étude récente sur des CHC d'origine virale B, les Th17 sont plus nombreux au sein de la tumeur que dans le parenchyme cirrhotique et leur nombre dans la tumeur est corrélé à la densité vasculaire et à une survie significativement diminuée [401].

Les TCD8 sont significativement plus nombreux dans le parenchyme hépatique non tumoral que dans le CHC. Cependant, ils représentent, avec les NK, les principales cellules prolifératives de l'infiltrat tumoral dans les CHC de meilleur pronostic, et leur densité intra-tumorale est positivement corrélée à l'apoptose des cellules tumorales et négativement corrélée à la capacité proliférative des cellules tumorales [402]. Leur nombre serait corrélé à celui des cellules myéloïdes [383]. La majorité des TCD8 intra-tumoraux seraient déficients en molécules cytolytiques (granzyme B et perforine) [384]. La présence de TCD8 spécifiques d'Ag tumoraux (MAGE-A1 et MAGE-A3) a été démontrée dans les CHC, mais seulement 10% de ces TCD8 exprimaient la perforine dans la tumeur [385].

### ***- Lymphocytes NK et cancer***

Les cellules NK sont aussi des effecteurs importants de la réponse immunitaire anti-tumorale, dont les mécanismes d'action et leur applicabilité à l'immunothérapie sont largement

détaillés dans une revue récente de Subleski et collaborateurs [403]. Elles tuent les cellules tumorales par deux mécanismes principaux qui sont la cytotoxicité médiée par la sécrétion de molécules effectrices (perforine et granzyme B) et l'expression de ligands inducteurs de mort cellulaire, FasL et TRAIL. Un autre mécanisme perforine-dépendant est l'expression de NKG2D, inducteur de cytotoxicité après liaison aux ligands de NKG2D exprimés par les cellules tumorales. Enfin, l'activation des cellules NK par IL-12 entraîne la production d'IFN- $\gamma$ , cytokine permettant le développement d'une réponse anti-tumorale Th1.

Certaines études ont montré que les cellules NK intra-hépatiques étaient plus cytotoxiques envers les cellules tumorales que celles provenant de la rate ou du sang [404]. Chez l'homme, il a été montré *in vitro* que les cellules NK intra-hépatiques provenant de foies normaux (perfusats lors de transplantation donneur vivant) étaient plus cytotoxiques que les NK périphériques des donneurs normaux et des receveurs (cirrhose +/- CHC) et que les NK intra-hépatiques de ces receveurs étaient les moins cytotoxiques de toutes [405]. Les NK intra-hépatiques exprimant TRAIL seraient plus cytotoxiques que les NK TRAIL- et diminuent après hépatectomie partielle, favorisant la récurrence tumorale [406]. De plus, les NK périphériques ont un pouvoir cytotoxique réduit chez des patients atteints de cancer en comparaison à des patients non cancéreux [407, 408]. Cela se vérifie pour les patients atteints de CHC, chez qui le nombre de cellules NK périphériques est réduit, parallèlement à une redistribution des sous-types (augmentation des CD56<sup>bright</sup> et diminution des CD56<sup>dim</sup>) et à une réduction de leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  ou à lyser les cellules K562 *in vitro* [409].

Les cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16+ sont également en nombre réduit au sein du CHC par rapport au tissu non tumoral adjacent, avec la même diminution de cytotoxicité et de production d'IFN- $\gamma$ , ce qui traduit une altération des réponses anti-tumorales périphériques et au site de la tumeur [410]. La diminution des NK CD16+ circulantes et intra-tumorales contribuerait donc à la réduction de l'activité cytotoxique ADCC-médiée.

L'expression de certains récepteurs KIR inhibiteurs (CD94 et p58.1) est diminuée à la surface des NK intra-tumorales, par rapport aux NK hépatiques de contrôles sans CHC, alors que l'expression de ces récepteurs n'est pas différente entre les NK périphériques des patients CHC ou contrôles [411]. Ces modifications pourraient traduire un phénomène anti-tumoral adaptatif et bénéfique dans le micro-environnement du CHC. De plus, bien que le micro-environnement immunitaire tumoral soit globalement plus "inerte" que le tissu non tumoral adjacent, les CHC présentant une meilleure survie contiennent plus de cellules prolifératives, dont des NK et des LT, dans des zones où les hépatocytes ne prolifèrent pas et leur densité est négativement corrélée à la prolifération tumorale [383].

### ***- Lymphocytes TNK et cancer***

Comme les NK, les TNK sont impliquées dans l'immunosurveillance et les réponses anti-tumorales et peuvent éradiquer directement les cellules cibles en largant des granules de perforine ou en exprimant des ligands inducteurs de mort cellulaire, FasL et TRAIL. Elles peuvent également être activées par IL-18 et possèdent de manière constitutive le récepteur de l'IL-12, ces deux cytokines anti-tumorales polarisant la réponse immunitaire Th1 et induisant la production de l'IFN- $\gamma$  indispensable à une réponse anti-tumorale efficace. Utilisant trois types de modèles expérimentaux de rejet tumoral (IL-12 médié,  $\alpha$ -Galcer/Cd1d médié ou "naturel") [412], certaines études ont démontré chez la souris un rôle anti-tumoral des TNK [413-417]. Enfin, il a été émis l'hypothèse que certains sous-types de TNK, par le biais de la production d'IL-13 empruntant la voie de signalisation IL-4R-STAT6, puissent être responsables d'une diminution de l'immunosurveillance anti-tumorale [418].

### ***- Cellules dendritiques et cancer***

Les DC spécialisées dans la présentation d'Ag sont indispensables pour initier la réponse cellulaire T dirigée contre les Ag tumoraux TAA (tumor-associated Ag), en activant aussi bien les TCD4 que les TCD8 [419]. *In vitro*, ces DC-TAA sont capables de stimuler les TCD8 pour lyser des cellules hépatocarcinomeuses [420, 421] et ces propriétés sont utilisées dans des protocoles d'immunothérapie du CHC [422]. Tout dysfonctionnement des DC est donc susceptible de retentir sur le développement tumoral, comme cela a été démontré dans le CHC, au niveau périphérique [423, 424] ou au sein de la tumeur [425, 426].

Une diminution significative du nombre de DC circulantes et une diminution significative de production d'IL-12 (cytokine anti-tumorale) par les DC intra-tumorales sont rapportées chez les patients atteints de CHC, en comparaison d'un groupe contrôle sain [425]. Cette diminution des DC périphériques associée à une immaturité des DC avait déjà été rapportée dans les CHC, en relation avec une augmentation du taux d'IL-10 périphérique [427].

Une absence de DC activées CD83+ dans les CHC développés sur cirrhoses virales B et C est également démontrée (alors qu'elles sont présentes dans le tissu cirrhotique adjacent en nombre significativement moins important que dans les cirrhoses virales C sans cancer), suggérant une sélection de DC immatures au site tumoral susceptible d'entraîner un défaut de production de lymphocytes spécifiques des Ag tumoraux et d'entraver la survie des lymphocytes activés, notamment des TCD8 spécifiques de la tumeur [426]. D'autres études suggèrent que l'environnement tumoral induit un phénotype myéloïde immature en supprimant la

différenciation et/ou les fonctions des DC [428, 429], par exemple par le biais de la sécrétion de facteurs solubles de l'environnement tumoral comme VEGF, IL-10 ou TGF- $\beta$  [430]. Dans certains modèles murins de cancers coliques et de mélanome, la prolifération tumorale pourrait aussi induire des MDC immatures sécrétant TGF- $\beta$  capables de promouvoir la prolifération de Treg CD4+CD25+FoxP3+, une autre manière de supprimer l'immunité anti-tumorale [431].

Une hypothèse plus récente est celle d'une augmentation de cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes macrophagiques, granulocytaires et autres (MDSC) capables d'inhiber *in vitro* la réponse immune anti-tumorale [432, 433]. Ces cellules induisent une tolérance immunitaire vis-à-vis des Ag tumoraux [434] en supprimant la réponse cellulaire T, notamment en bloquant l'activation des TCD4 et des TCD8 [435], en bloquant la cytotoxicité des NK [436] et la maturation des DC [437] et en induisant les Treg [438]. Ces cellules favorisent également l'angiogenèse et donc la croissance tumorale par le biais des métastases [439]. Dans le CHC, une inhibition de la cytotoxicité des NK et de la production de cytokines par les MDSC [440] a aussi été décrite *in vitro*, de même qu'une augmentation dans le sang et le tissu tumoral d'un sous-type de MDSC exprimant CD14 et induisant une population Treg CD4+CD25+FoxP3+ [441]. Ces cellules conservent un phénotype immature même quand elles sont exposées à un environnement pro-inflammatoire et contribuent à une réponse immune pro-tumorigène de type Th2 en produisant de l'IL-10 et en bloquant la production de IL-12 par les DC [442]. Ce « cross-talk » MDSC-DC est aussi observé dans un modèle de CHC murin, où la suppression directe des LT par les MDSC s'accompagne d'une production d'IL-10 responsable d'une diminution de production d'IL-12 par les DC et d'une diminution de leur activité stimulatrice sur les LT [443]. Par conséquent, de manière indirecte, les MDSC diminuent également l'activité anti-tumorale des NK médiée par IL-12 [444].

Peu de données sont disponibles sur l'implication des PDC dans l'évolution des CHC. Leur présence est décrite dans le stroma de certaines tumeurs (mélanomes, métastases ganglionnaires, cancers primitifs mammaires) et leur densité seraient corrélée à un pronostic moins bon [445]. Différents mécanismes non exclusifs pourraient en être responsables : (1) la production de facteurs angiogéniques ou de protéases pouvant modifier le micro-environnement tumoral [446], (2) des interférences avec la réponse immunitaire entraînant une tolérance immunitaire, soit en induisant des cellules régulatrices TCD4 sécrétant de l'IL-10 [447] ou des cellules régulatrices TCD8 [448] spécifiques de la tumeur déviant la réponse anti-tumorale T spécifique vers un profil Th2 moins efficace contre la croissance tumorale, soit en produisant de l'IFN- $\gamma$  et en inhibant la différenciation des monocytes en MDC, altérant ainsi la présentation des Ag TAA aux LT [449].



## ***- Lymphocytes Treg et cancer***

Les Treg interviennent également dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale, essentiellement en supprimant les fonctions cytotoxiques anti-tumorales médiées par les TCD8, et jouent donc probablement un rôle dans la survenue et dans la progression du cancer. Dans des modèles murins de cancers, les Treg sont les principaux régulateurs de l'immunité anti-tumorale concomitante en supprimant le rejet tumoral médié par les TCD8 [450], via la suppression de la prolifération et du pouvoir cytotoxique des TCD8 [451]. Ils sont nombreux dans les tumeurs de stade avancé et leur déplétion relance l'immunité anti-tumorale [452, 453]. Pour la première fois en 2004, une étude intéressante des carcinomes ovariens a démontré que les Treg intra-tumoraux inhibaient l'immunité anti-tumorale T spécifique médiée par les TCD8 TAA spécifiques [454].

La prévalence des Treg est augmentée dans le sang de patients atteints de carcinomes d'origine variée (pulmonaire, mammaire, colorectal, pancréatique, ORL, ovarien, vésical, gastro-oesophagien ou cervical) [455, 456] ou de mélanomes [457], par rapport à des sujets normaux. Ils sont également présents en nombre important dans le micro-environnement tumoral de certains carcinomes [454] [458, 459]. Ils peuvent sécréter du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 et, en coculture avec des TCD8 et des TCD4 activés, supprimer leur prolifération et leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  [455, 458-460]. En coculture avec des cellules NK, les TCD4+CD25+ de patients atteints de ces cancers peuvent aussi inhiber la cytotoxicité médiée par ces cellules [455]. Leur impact sur la progression tumorale ou la survie est débattue et semble différente selon les types de cancers et leurs stades. Pour certains, ils peuvent contribuer à favoriser la croissance tumorale et sont associés au stade tumoral et à la récurrence tumorale après résection chirurgicale [461] ou à une réduction de la survie [454, 461]. Pour d'autres, ils seraient associés à un pronostic meilleur [387, 462].

La prévalence des Treg, notamment la population TGF- $\beta$ , est également augmentée dans le sang de patients atteints de CHC avec des propriétés suppressives sur la prolifération et la sécrétion cytokinique des TCD4+CD25- [463]. Leur présence est corrélée au stade tumoral, notamment à la présence d'une dissémination vasculaire [377] ou de métastase carcinomateuse [463] et à un pronostic plus mauvais [464]. Ils sont nombreux au sein de l'infiltrat inflammatoire tumoral et dans le liquide d'ascite, suggérant une suppression de l'activation du système immunitaire au site de la tumeur [465] et leur densité intra-tumorale est inversement et indépendamment corrélée à la survie sans récurrence [466]. Les Treg sont significativement plus nombreux dans la tumeur (environ 10% des LT) que dans le foie cirrhotique à distance et ceux issus des prélèvements tumoraux suppriment la prolifération des lymphocytes circulants TCD4 et des TCD8 et l'expression de perforine [384]. Ils sont aussi plus nombreux dans le foie péri-tumoral que dans le foie cirrhotique à distance, inversement proportionnel au nombre de TCD8

péri-tumoraux, suggérant une action dans la progression tumorale [467]. Des expériences de coculture de Treg périphériques avec des lignées hépatocytaires tumorales suggèrent que des facteurs tumoraux solubles induisent mais également augmentent le pouvoir immunosuppresseur des Treg, ce qui pourrait expliquer que leur présence et surtout leur nombre soit corrélé à la progression tumorale [463].

En somme, il semble que ces cellules agissent au niveau périphérique mais aussi au site de la tumeur en exerçant une action suppressive sur les cellules effectrices cytotoxiques de la réponse anti-tumorale, principalement les TCD8 et les NK, mais aussi sur les TCD4 qui soutiennent ces réponses immunes. Ces effets, contact-dépendants ou médiés par la sécrétion de TGF- $\beta$  et IL-10, aboutissent à favoriser la croissance tumorale.

# RESULTATS

**Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis**

**J hepatol 2010; 53: 25-35**

Auteurs : N Sturm, MA Thélu, X Camous, G Dimitrov, M Ramzan, T Dufeu-Duchesne, P Bonorino, C Guillermet, E Brambilla, P Arvers, M Pernollet, V Leroy, JP Zarski, PN Marche, E Jouvin-Marche

**But**

Les réponses cellulaires T adaptatives sont affaiblies au cours de l'infection chronique par le VHC et une des hypothèses implique les lymphocytes Treg dans ce dysfonctionnement. La plupart des études conduites dans l'hépatite chronique virale C concernent les Treg périphériques et ont montré leur augmentation dans le sang, la présence de phénotypes TCD4+CD25+FoxP3+ mais aussi TCD8+FoxP3+ et une capacité suppressive sur la prolifération et les fonctions effectrices des TCD4 et TCD8 spécifiques du VHC. Le but de notre étude était de déterminer la fréquence, le phénotype et la localisation des lymphocytes Treg au sein des tissus hépatiques chroniquement infectés par le VHC obtenus *ex vivo* et d'étudier leur implication physio-pathologique dans la maladie en confrontant les résultats au statut du patient, notamment virologique et histologique.

**Matériel et méthodes**

**Patients et matériel** : le matériel biopsique provenait de 55 patients atteints d'hépatite chronique virale C (sérologie et PCR positives), naïfs de tout traitement anti-viral, sans comorbidité ou autre cause d'hépatopathie chronique, et disposant d'un fragment tissulaire congelé. Les données biochimiques, virologiques et histologiques de chaque patient étaient disponibles.

**Méthodes**: le matériel biopsique était partagé: une partie fixée pour étude histologique conventionnelle et étude immunohistochimique (IHC) et une partie congelée pour étude en RT-PCR ou fraîche pour étude en cytométrie de flux (CF).

**Analyse histologique**: le grade et le stade de l'hépatite chronique pour chacun des 55 patients étaient évalués selon Métavir par un anatomopathologiste expert, à partir de colorations HES et Rouge Sirius.

**Analyse immunohistochimique** : il s'agissait de doubles marquages CD8/FoxP3 et CD4/FoxP3 réalisés de manière rétrospective sur les biopsies hépatiques de 20 patients, fixées en formol et déparaffinées, avec une immunodétection en trois couches (technique manuelle, station

Sequenza). Les comptages cellulaires étaient réalisés sur une station de morphométrie (LUCIA, Nikon) dans les zones de fibrose, au sein du parenchyme et au sein des lésions nécrotico-inflammatoires, et étaient exprimés en nombre de cellules par champ (X20).

**Analyse en RT-PCR** : il s'agissait de la quantification des transcrits CD4, CD8 $\beta$ , FoxP3, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  et TNF- $\alpha$ , réalisée de manière rétrospective sur Light Cycler 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) à partir d'ARN totaux issus de fragments tissulaires congelés de 47 patients (20 provenant des patients dont les biopsies étaient examinées en IHC et 27 supplémentaires).

**Analyse en CF**: il s'agissait de l'immunophénotypage des lymphocytes totaux issus des PBMC et de fragments tissulaires frais, réalisé de manière prospective sur 8 autres patients, en les séparant sur la base de leur expression CD8 ou CD4 puis CD25 et FoxP3.

## **Résultats**

En CF, les Treg intra-hépatiques étaient de phénotype classique CD4+CD25+Foxp3+ et représentaient moins de 0,5% du pool des lymphocytes intra-hépatiques. On ne détectait pas de Treg CD8+CD25+FoxP3+ intra-hépatiques et ces derniers étaient rarement détectés dans le sang.

En IHC, les doubles immunomarquages montraient que la quasi totalité des cellules FoxP3+ exprimaient CD4 (>99,5%). De très rares cellules FoxP3+ n'exprimaient pas CD4 et d'exceptionnelles cellules FoxP3+ co-exprimaient CD8 de manière convaincante (moins de 5 sur les 20 biopsies examinées). Le nombre total de cellules FoxP3+ était corrélé au nombre total de cellules CD4+ et au nombre total de cellules CD8+ en analyse univariée, mais seule la corrélation entre FoxP3 et CD8 était significative en analyse multivariée ( $r=0,466$ ,  $p=0,039$ ). Elle était retrouvée dans les zones de fibrose ainsi que dans le parenchyme et la corrélation la plus forte était observée au sein des lésions nécrotico-inflammatoires ( $p<0,001$ ).

En RT-PCR quantitative, l'analyse en composante principale mettait en évidence 4 clusters de transcrits fortement corrélés: CD8/FoxP3, CD8/IL-10, TGF- $\beta$ /IL-10 et TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$ . L'analyse en régression linéaire uni et multivariée révélait que CD8, FoxP3 et IL-10 était 3 paramètres fortement corrélés ( $r=0,810$ ,  $p<10^6$ ) : le niveau d'expression de FoxP3 et de l'IL-10 croissait parallèlement au niveau d'expression de CD8.

Le nombre total de cellules CD8+ augmentait avec le degré d'activité (A selon Métavir) et le stade de fibrose (F selon Métavir) de la maladie, alors que le nombre de cellules FoxP3+ augmentait jusqu'au grade A2 et au stade F3 puis décroissait chez les A3 et F4. Le rapport FoxP3/CD8 diminuait chez les grades A3 et s'effondrait de manière significative au stade ultime de la maladie (F4).

## Commentaires

1- Cette étude documente la population des lymphocytes Treg intra-hépatiques au cours de l'hépatite chronique virale C, en s'appuyant sur des données histologiques et immunohistochimiques détaillées. Ces cellules sont majoritairement de phénotype CD4<sup>+</sup> ; les cellules FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, rares dans le sang, ne sont pas détectables dans le foie en CF, de même que les cellules FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ne sont qu'exceptionnellement visualisées dans le parenchyme hépatique en IHC, démontrant l'extrême rareté de cette population Treg CD8<sup>+</sup>foxP3<sup>+</sup> dans le foie au cours de cette pathologie. Les Treg sont observés dans les zones de fibrose comme au sein du parenchyme, toujours en relation étroite avec les CD8, et l'expansion de ces deux populations évolue longtemps de pair. Cette corrélation est encore plus fortement démontrée dans les lésions nécrotico-inflammatoires (nécrose parcellaire et nécrose lobulaire), suggérant que les Treg Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> contiennent l'expansion des CD8 cytotoxiques essentiellement par un mode de contact cellulaire direct. Nous démontrons également au niveau transcriptionnel une corrélation entre CD8 et FoxP3, CD8 et IL-10 et TGF- $\beta$  et IL-10, traduisant probablement le fait que la production des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  constitue un autre mode d'action inhibitrice des Treg sur la cytotoxicité des CD8 et sur leur production de cytokines pro-inflammatoires.

2- Cette relation étroite entre les Treg, IL-10 et les CD8 réalise un équilibre bénéfique entre l'hôte et le virus dans les premiers stades de la maladie; elle témoigne toutefois du rôle ambigu des Treg qui, tout en limitant les lésions tissulaires, contribuent à une réponse TCD8 inefficace et favorisent la persistance virale. Cet équilibre entre les deux populations, se traduisant par une chute du rapport FoxP3/CD8, est rompu aux stades les plus graves de la maladie, au delà du stade F3. Cette étape pourrait représenter un tournant dans l'évolution de la maladie où la diminution du nombre des Treg pourrait entraîner une perte de contrôle des TCD8. Il reste à déterminer dans cette hypothèse si cette perte d'interaction au delà du stade F3 s'accompagne d'une augmentation des fonctions effectrices des CD8 cytotoxiques et d'une aggravation des lésions histologiques, sur un plus grand nombre de patients.

## Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis

Nathalie Sturm<sup>1,2,3,†</sup>, Marie-Ange Thélu<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>, Elisabeth Brambilla<sup>1,2,3</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>, Evelyne Jouvin-Marche<sup>1,2,‡</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Unité 823, Grenoble, France; <sup>2</sup>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; <sup>3</sup>Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie, CHU A Michallon, 38043 Grenoble, France; <sup>4</sup>Centre de recherche de Service de Santé des Armées, La Tronche, France

**Background & Aims:** In chronic hepatitis C (CHC), HCV-specific T-cell responses are often dysfunctionnal. *In vitro* data point out that regulatory T cells (Treg) are able to suppress HCV-specific lymphocyte proliferation and cytokine secretion but their implication in this pathology is still debated.

**Methods:** Three complementary approaches were performed to investigate phenotype, frequency or localization of intra-hepatic Treg in treatment naïve CHC patients. Double immunohistochemical analysis was performed in 20 formalin-fixed biopsies with CD8/FoxP3 and CD4/FoxP3 antibodies. Cellular markers and cytokines were investigated by quantitative RT-PCR in 27 additional frozen biopsies. Eight other fresh liver biopsies were selected for complementary analysis of immunophenotyping and frequency of intra-hepatic Treg.

**Results:** Immunohistochemical analyses showed the presence of intra-hepatic CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells while CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells were very scarce. CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells were located in necro-inflammatory areas in contact with CD8<sup>+</sup>T cells, suggesting that Treg-mediated inhibition of CD8<sup>+</sup>T cell proliferation may occur by cell–cell contact. RT-PCR analyses showed strong correlations between CD8, FoxP3, and IL-10 with emergence of four distinct gene clusters, CD8–FoxP3, CD8–IL-10, TGF-β–IL-10, and TNF-α–TGF-β. No correlation was found between serum viral load and any immune markers. Interestingly, the FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells ratio significantly decreased in severe fibrosis ( $F > 3$ ) due to the dramatic decline of FoxP3 cells.

**Conclusions:** This study provides new insights into the histological localization of Treg within HCV-infected liver, with a special accumulation of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg cells in necro-inflammatory

areas, in contact with CD8<sup>+</sup>T cells. Our results suggest a link between Treg, CD8, and IL-10 which altogether could balance immune responses against the virus to avoid immunopathogenesis.

© 2010 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

In chronic hepatitis C (CHC), blood CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cell responses have limited impact on disease course [1–3] but intra-hepatic T lymphocytes seem to control disease pathogenesis [4–6]. Therefore, regulation of intra-hepatic T cell responses in hepatitis C virus (HCV) patients may have important implication not only in determining spontaneous clearance but also in disease progression during chronic infection [7–9].

It is well known that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells are activated by microbial infections, leading to an overall increase of anti-inflammatory cytokines. The increase in these cytokines induces the suppressive functions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> natural regulatory T cells (Treg) [10–14] and could promote their local survival or retention [15]. Finally, infections disturb balance between natural Treg and effector lymphocytes, thereby alter immune response and may contribute to disease progression.

It has been shown that HCV patients have a higher number of Treg in peripheral blood than healthy patients [16–18]. When the natural Treg pressure is removed, the effector function of CD8<sup>+</sup>T cells is restored and viral load is considerably reduced [19]. Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells enhances antigen-specific CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T proliferation and response [11,18,20]. All these data have demonstrated that Treg play a key role in HCV disease.

Nowadays, Treg defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> are also characterized by expression of the transcriptional factor Forkhead box Protein 3 (FoxP3) [21,22]. Comparisons of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg between infected and uninfected-HCV patients show that they are phenotypically, functionally, and genetically indistinguishable [23,24]. Among HCV-infected patients, HCV-specific FoxP3<sup>+</sup>Treg are detected in the blood and have the capacity to suppress HCV-specific T cells [23].

**Keywords:** Hepatitis C virus (HCV), Regulatory T cells; FoxP3; Immunohistochemistry; T lymphocytes; Liver.

Received 28 September 2009; received in revised form 4 February 2010; accepted 23 February 2010; available online 20 April 2010

\* Corresponding author at: Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche INSERM-UJF U823, Equipe Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques, UJF Site Santé BP 170, Grenoble 38042, Cedex 9, France. Tel.: +33 (0) 476 54 94 95; fax: +33 (0) 476 54 94 54.

E-mail address: Marie-Ange.Thelu@ujf-grenoble.fr (M.-A. Thélu).

† N.S. and M.A.T. have contributed equally to this work.

‡ P.N.M. and E.J.M. have contributed equally to this work.



ELSEVIER

## Research Article

Previous *in vitro* data point out the presence of Treg expressing CD8 with regulatory ability [25–27]. Nevertheless, frequency and biological role of human CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T cells is less understood than their CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T counterparts. Stimulation of peripheral blood mononuclear cells (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 proliferative capacity and display a cell–cell contact-dependent suppressive activity [28].

In HCV infection, most studies are focused on peripheral Treg which probably do not reflect the precise composition and functions of these cells in the liver. In order to examine the physiological implication of intra-hepatic Treg during CHC, we evaluated their *ex vivo* phenotype, frequency, and histological localization by immunohistochemistry and flow cytometry, and quantified intra-hepatic cytokines by RT-PCR, in relation to virological and histological parameters.

### Patients and methods

#### Patients and material

Liver biopsies from chronically HCV-infected patients seen in Grenoble Hospital were selected from 2003 to 2005. Each patient had serological markers of HCV infection and presence of HCV RNA in serum. They were naïve of current or past immunomodulatory or antiviral treatment and had a frozen liver sample available. Fresh liver biopsies obtained by using 1.5 mm diameter disposable needle biopsy were divided into one part for histopathological examination (activity grading and fibrosis staging according to Metavir scoring system assessed by an experienced liver pathologist) and another part for immunological analyses. Blood samples from patients were collected at time of biopsy in heparinized vacutainer tubes. In practice, 47 frozen liver samples were retrospectively available for quantitative RT-PCR analyses and immunohistochemical analyses were performed in a sub-group of 20 formalin-fixed biopsies. Eight additional liver biopsies were prospectively included for exclusive flow cytometry analysis which needed fresh tissue samples and larger amount of cells for phenotyping (Table 1). Criteria for exclusion were: age under 18 years, presence of AgHBs or anti-HIV antibodies, other causes of chronic liver disease, and alcohol consumption higher than 30 g/day. The study was in agreement with the recommendations of the local ethics committee and all patients gave written informed consent.

#### Double immunohistochemical analysis

Double immunohistochemical labeling was performed manually (Sequenza station) on 20 formalin-fixed, paraffin-embedded liver biopsies. Two methods of immunodetection were applied: streptavidin–biotin–peroxydase (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, primary mouse anti-CD8 antibody (CD8, clone C8/144B, 1/100, Dako, Carpinteria, USA) and secondary biotinylated goat anti-mouse antibody (1/500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) were used, followed by detection with SBAP complex (1/50, Dako) and FB chromogen staining. For FoxP3 staining, primary mouse antibody (FoxP3, 1/20, Abcam, Cambridge, UK) and secondary biotinylated goat anti-mouse antibody (1/500, Jackson ImmunoResearch) were used, and detection was performed with SBP complex (1/200, Dako) and DAB chromogen staining.

For CD4/FoxP3 double staining, primary mouse antibody (CD4, clone 4B12, 1/75, Novocastra, Newcastle, UK), endogenous peroxydase inhibition, incubation with secondary biotinylated goat anti-mouse antibody, detection with SBP complex and DAB chromogen staining were performed. The second immunostaining with FoxP3 was performed as above with SBAP method and FB staining. Staining with an unrelated primary antibody (mouse IgG, 2 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) provided a negative control for each reaction.

Positive cells were counted on a computer screen in consecutive fields along the whole section of the biopsy as described previously [29], with the help of automatic software LUCIA (Laboratory Universal Computer Image Analysis, version 5.0, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Cell counts were per-

**Table 1. Demographic, biochemical, and histological characteristics in chronic hepatitis C (CHC) patients.**

	CHC patients groups <sup>a</sup>		
	Studied by RT/PCR (n = 47)	Studied by histochemistry (n = 20)	Studied by flow cytometry (n = 8)
Male, n (%)	32 (68%)	15 (75%)	4 (50%)
Age (y)**	43 (24–75)	44 (24–75)	53 (32–75)
Plasma Viral Load (log IU/ml)	6.1 ± 6.2	6.1 ± 6.1	6.0 ± 0.6
Serum ALT (IU/ml)	130.1 ± 98.8	172.6 ± 105.5	118.6 ± 95.8
<b>Histology</b>			
<b>Metavir Activity, n (%)</b>			
0	0	0	0
1	20 (43%)	4 (20%)	2 (25%)
2	18 (38%)	9 (45%)	5 (63%)
3	9 (19%)	7 (35%)	1 (13%)
<b>Metavir Fibrosis, n (%)</b>			
0	7 (15%)	1 (5%)	0
1	12 (26%)	3 (15%)	3 (38%)
2	14 (30%)	7 (35%)	4 (50%)
3	10 (21%)	6 (30%)	0
4	4 (8%)	3 (15%)	1 (13%)

ALT, alanine aminotransferase.

<sup>a</sup> Mann et Whitney statistical analysis does not reveal any difference in term of demographic, biochemical, and histological characteristics among the three groups of patients.

\*\* Median (Range).

formed by a single liver pathologist (NS) on serial sections obtained from paraffin blocks. Recorded parameters included total number of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells, and distribution of FoxP3<sup>+</sup> cells in fibrotic tissue (fibrous septa and portal tracts), in parenchymatous areas (lobules or nodules) and in foci of piecemeal or lobular necrosis. Results were expressed as number of cells per field, at magnification 20× (1.002 mm<sup>2</sup>).

#### RT-PCR analysis

Total RNA (5–10 mg) was extracted from 47 frozen liver biopsies, by homogenization of tissues in silica balls using MagnaLyser System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The mixture was filtered on a silica column and “digested” by DNase I. Single-stranded cDNA was synthesized from 5 to 10 µg of total RNA by using the Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies, Bethesda, USA). Primer pairs and probes for quantification of CD4, CD8-β, FoxP3, IL-10, IFN-γ, TGF-β, and TNF-α genes (Table 2) were designed with ProbeFinder Software for Human (version 2.35, Roche Diagnostics). Quantification of transcripts was performed with the LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics) and target sequences were detected with UPL (Universal Probelibrary, Roche Diagnostics). Data were analyzed with the LightCycler<sup>®</sup> 480 Software. The detection format was set to “Mono Colour Hydrolysis Probe” and the Second Derivative Maximum Method was used for absolute quantification. The housekeeping gene used for normalization of the values was the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene (HPRT).

#### Immunostaining and flow cytometry analysis

Immunophenotyping was performed on 8 paired PBMC and liver samples with mouse monoclonal anti-FoxP3-PE (Human/Non-Human Primate Regulatory T Cells Staining Kit -BD Biosciences, Pont de Claix, France), anti-human CD4-APC, anti-human CD8-FITC, and anti-human CD25-PC7 (Beckman Coulter, Villepinte, France) antibodies. PBMC were isolated by density centrifugation over Ficoll gradients. Fresh tissues were washed and disrupted mechanically. Immunostaining and flow cytometry analyses were done as previously described [30–32]. Briefly, we selected total viable lymphocytes (1) by excluding dead cells after propidium iodide staining and (2) by gating PBMC and intra-hepatic cells on the basis of the forward and side scattering, after checking their anti-human CD45 expression (Beckman Coulter, Villepinte, France). Total lymphocytes were then gated on basis of their CD4 or CD8 expression and each sub-population was gated on CD25 and FoxP3 expression.



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

Genes	Primer Sequences	Product Length (nt)	UPL Sequences
CD4	F agcgaaacaggaagtgc	72	tggtgatg
	R aaattttctggagctgagtg		
CD8-β	F caggccagagaccagaa	84	gcctgctg
	R gaaaccagcagaaccaggac		
FoxP3	F acctacgccagctcatc	65	gctccaga
	R tcattgagtgtccgctgt		
IL-10	F tgggggagaaactgaagac	62	ggctgagg
	R acagggagaagaatcgatgaca		
IFN-γ	F ggcattttgaagaattggaaag	112	cagagcca
	R tttggatcctctgtcatctt		
TGF-β	F gcagcagctggagctgta	64	ttctgggc
	R cagccggttctgaggta		
TNF-α	F cagcctctctctctctgat	123	cttctgcc
	R gccagagggctgattagaga		
HPRT	F gaccagctcaacaggggacat	95	tggtggag
	R gtgtcaattatatctccacaatcaag		

F, forward primer; R, reverse primer.

#### Statistical methods

Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were compared with non-parametric Wilcoxon test and Mann-Whitney *U*-test. The 2-tailed Spearman's correlation coefficient was used for comparisons within group. Principal component analysis (PCA) and linear univariate and multivariate regression analyses were also performed. *p* Values less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Immunohistochemical analysis of intra-hepatic CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells

Analysis was performed in a sub-group of 20 patients who had similar characteristics than those of the whole population (Table 1). This procedure was adopted to visualize CD4, CD8, and FoxP3 single positive cells and CD4FoxP3 or CD8FoxP3 double positive cells (Fig. 1). CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> co-stained cells were identified by a blue nuclear staining for FoxP3 expression surrounded by a brown cytoplasmic membrane staining for CD-4 expression. CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> co-stained cells were characterized by brown nuclear staining for FoxP3 expression, surrounded by a blue cytoplasmic membrane staining for CD-8. More than 99.5% of FoxP3<sup>+</sup> cells were CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 1A and B). Nevertheless, among slides from 20 patients, we only detected two convincing CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells (Fig. 1G and H). This suggests that CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells are very scarce in the liver and that the majority of FoxP3<sup>+</sup> cells co-express CD4. A considerable amount of FoxP3<sup>+</sup> cells were observed in portal tracts and fibrous septa (Fig. 1C), particularly when lymphoid aggregates were present (Fig. 1D). They were also observed in parenchymatous areas where they preferentially localized in necrotic areas in close contact with CD8<sup>+</sup>T lymphocytes (Fig. 1E and F), suggesting contact-dependent inhibition of the effector functions of CD8<sup>+</sup>T cells by FoxP3<sup>+</sup> cells.

### Histological relationship between intra-hepatic FoxP3<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells

Correlations between frequency and localization of FoxP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> lymphocytes were studied. Cells were counted on

an average of 50 fields (20–105) per liver biopsy. A significant correlation was found between the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells and the total number of CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 2A,  $r = 0.508$ ,  $p = 0.022$ ) or the total number of CD8<sup>+</sup> cells (Fig. 2B,  $r = 0.538$ ,  $p = 0.014$ ). By multivariate linear regression analysis, only the correlation between total CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells remained significant ( $r = 0.466$ ,  $p = 0.039$ ). Correlations 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. 2C and D). Moreover, the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells correlated with the number of FoxP3<sup>+</sup> cells in the fibrotic tissue ( $r = 0.923$ ,  $p < 0.001$ ), the parenchymatous areas ( $r = 0.777$ ,  $p < 0.001$ ) and the necro-inflammatory lesions ( $r = 0.833$ ,  $p < 0.001$ ). Interestingly, a strong correlation was observed between CD8<sup>+</sup> lymphocytes and FoxP3<sup>+</sup> cells in parenchymatous areas ( $r = 0.511$ ,  $p = 0.021$ , Fig. 2E), especially inside the necro-inflammatory lesions ( $r = 0.630$ ,  $p = 0.003$ , Fig. 2F), suggesting that FoxP3<sup>+</sup> cells are mostly associated to CD8<sup>+</sup> cells. Corroborating this point, 22% of FoxP3<sup>+</sup> cells were present in the necro-inflammatory foci in contact with CD8<sup>+</sup> cells or apoptotic bodies.

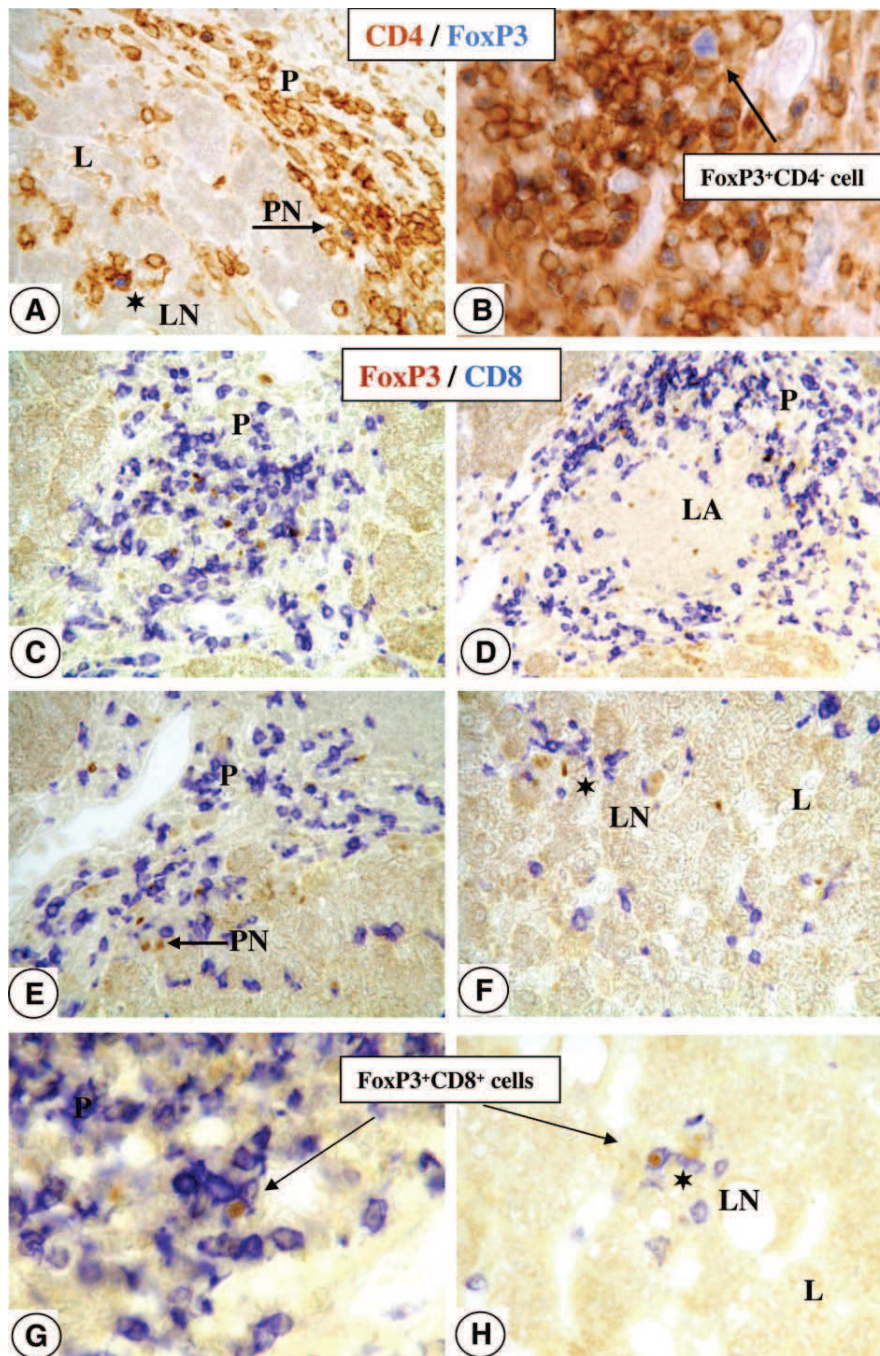
### Quantitative RT-PCR analysis of intra-hepatic CD4, CD8, FoxP3, and IL-10

To extend our analysis, RT-PCR was performed on 47 liver biopsy samples for the quantification of CD4, CD8, FoxP3, IL-10, TGF-β, IFN-γ, and TNF-α transcripts. Results were expressed as a ratio between the number of amplicons from the target gene and from HPRT gene. PCA determined the presence of gene clusters (Fig. 3). The most relevant correlations were observed between CD8 and FoxP3 ( $r = 0.564$ ,  $p = 0.001$ , Fig. 3A), CD8 and IL-10 ( $r = 0.405$ ,  $p = 0.022$ , Fig. 3B), TNF-α and TGF-β ( $r = 0.652$ ,  $p = 0.005$ , Fig. 3C) and TGF-β and IL-10 ( $r = 0.688$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 3D). Moreover, pro-inflammatory cytokines TNF-α and IFN-γ were also closely correlated to each other ( $r = 0.496$ ,  $p = 0.004$ ). Univariate and multivariate regression analyses were conducted for the correlated genes, with CD8 as the dependent variable and IL10, FoxP3, IFN-γ, and TNF-α as independent variables. A regression model was thus deduced [ $CD8 = 0.88 \cdot IL-10 - 0.01 \cdot FoxP3 + 0.04 \cdot IFN\gamma$  ( $R^2 = 0.810$ ,  $p < 10^{-6}$ )] and suggested that (i) when IL-10 expression increased by 1 U, CD8 expression increased by 0.88 U, keeping the expression of FoxP3 and IFN-γ as constant (ii) when FoxP3 expression increased by 1 U, CD8 expression decreased by 0.01 U, keeping the expression of IL-10 and IFN-γ as constant. Therefore, CD8, FoxP3, and IL-10 were linked together in the correlation circle of the PCA (Fig. 3E and F).

### Flow cytometry 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

To further characterise the phenotype and the frequency of CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg observed by immunohistochemistry, flow cytometry analysis (Fig. 4A and B) was performed on paired fresh liver tissues and PBMC providing from the 8 additional CHC patients, whose characteristics did not differ from those of the 47 other CHC patients (Table 1). Among intra-hepatic CD4<sup>+</sup> lymphocytes, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes represented 6.0% ± 1.0% and 3.3% ± 1.5%, respectively (Fig. 4C), underlining that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes represented about 50% of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes. Thus, intra-hepatic

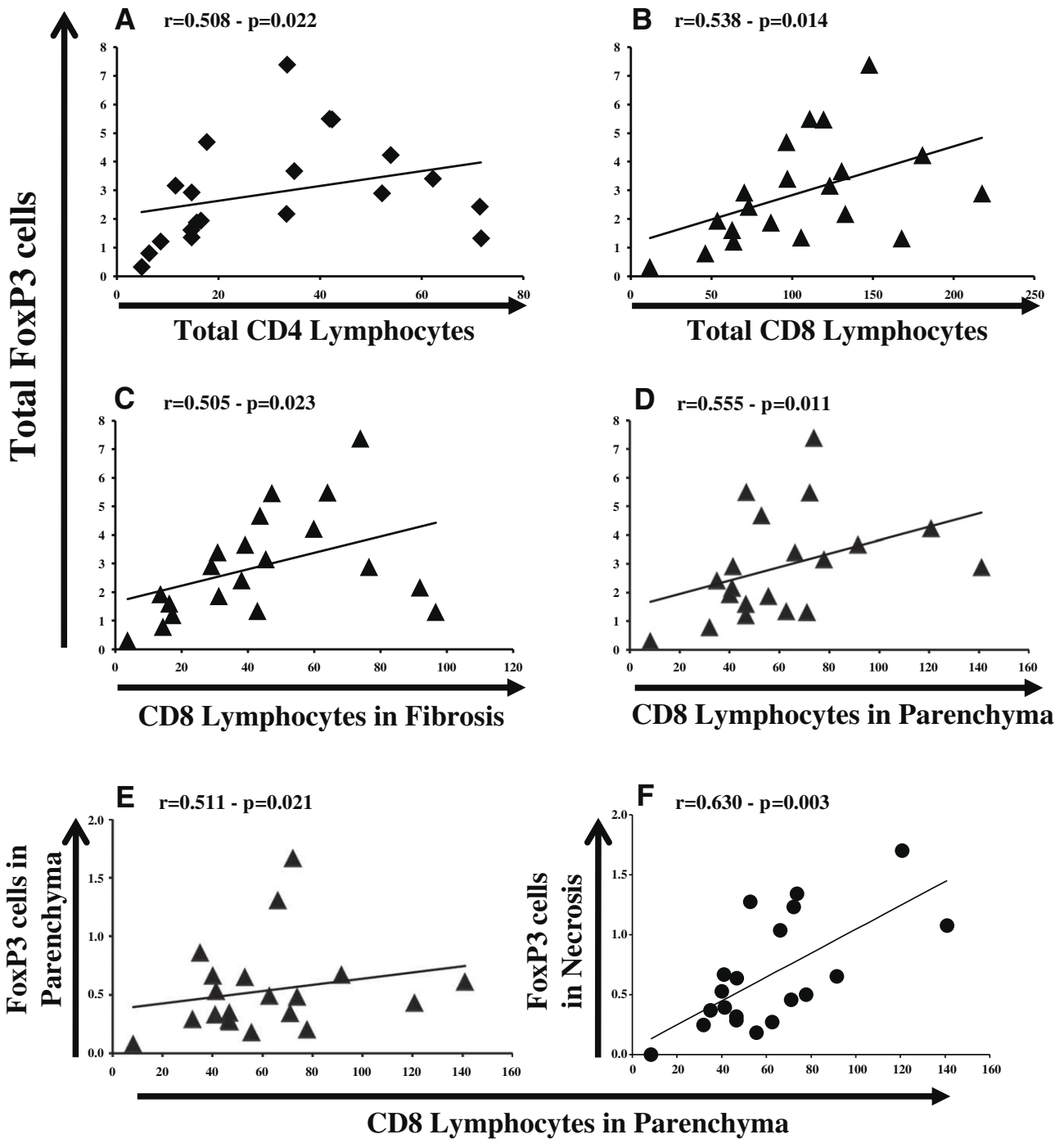
## Research Article



**Fig. 1. CD4/Foxp3 or CD8/Foxp3 double immunohistochemical labeling.** (A) Double CD4/FoxP3 immunohistochemical labeling 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 20 $\times$ ). (B) High magnification (40 $\times$ ) of CD4/FoxP3 immunolabeling in a portal tract showing that all FoxP3 cells are CD4 positive lymphocytes, except one blue FoxP3 cell without cytoplasmic CD4 staining (arrow). (C) Double CD8/FoxP3 immunohistochemical labeling showing numerous separate brown FoxP3 cells and blue CD8 lymphocytes, in a fibrous portal tract (magnification 20 $\times$ ). (D) FoxP3 cells are particularly numerous in fibrous portal areas when nodular lymphoid aggregates (LA) are present (magnification 10 $\times$ ). (E) Brown FoxP3 cells in contact with parcellar necro-inflammatory lesions (PN, arrow) in peri-portal areas (magnification 20 $\times$ ). (F) Brown FoxP3 cells in contact with lobular necro-inflammatory lesions (LN, asterisk) in lobular areas (magnification 20 $\times$ ). (G,H) High magnifications (40 $\times$ ) showing two putative double labeled CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes in a fibrous portal area (G) and in contact with lobular necrosis (LN, asterisk) in a lobule (H).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes stood for less than 0.5% of the total intra-hepatic lymphocyte pool while no cell expressing

CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, and FoxP3<sup>+</sup> was detected in the liver. Frequencies for peripheral lymphocyte subsets are shown in Table 3; of note,



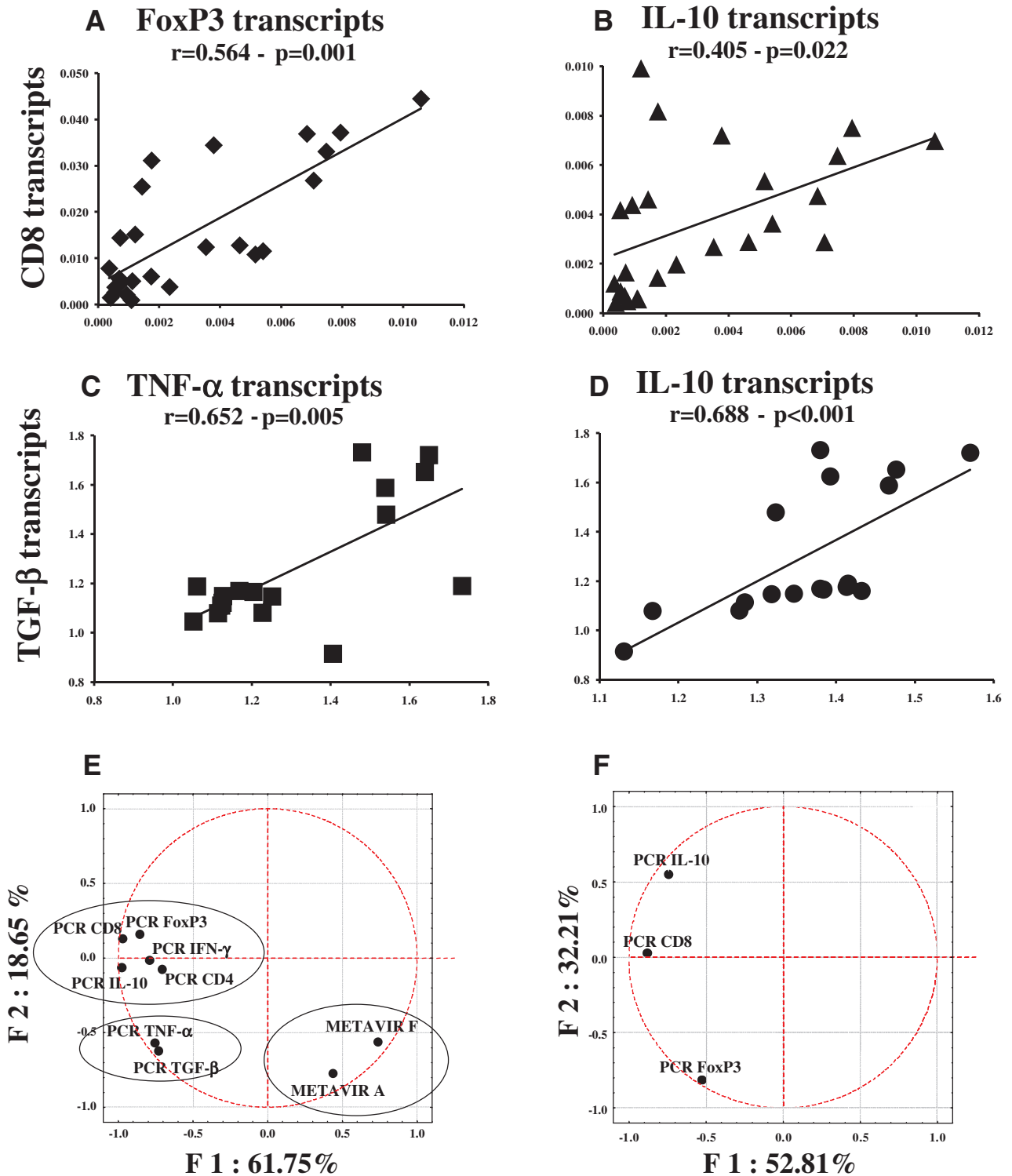
**Fig. 2.** Relationship between intra-hepatic number of FoxP3 cells and CD4 or CD8 lymphocytes in different histological areas. (A–D) The total number of FoxP3 cells significantly correlates, in chronic HCV-infected liver with: total CD4 lymphocytes (A) and total CD8 lymphocytes (B), CD8 in fibrous septa (C), and CD8 in parenchyma (D). (E,F) In parenchymatous areas, FoxP3 cells and CD8 lymphocytes are statistically correlated (E), especially within necro-inflammatory areas (F).

less than 0.1% of peripheral CD8<sup>+</sup> lymphocytes expressed CD25<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup>. A similar analysis achieved on 3 uninfected-HCV biopsies showed that the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes represented less than 0.1% of the total lymphocytes and did not allow to detect CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes (data not shown).

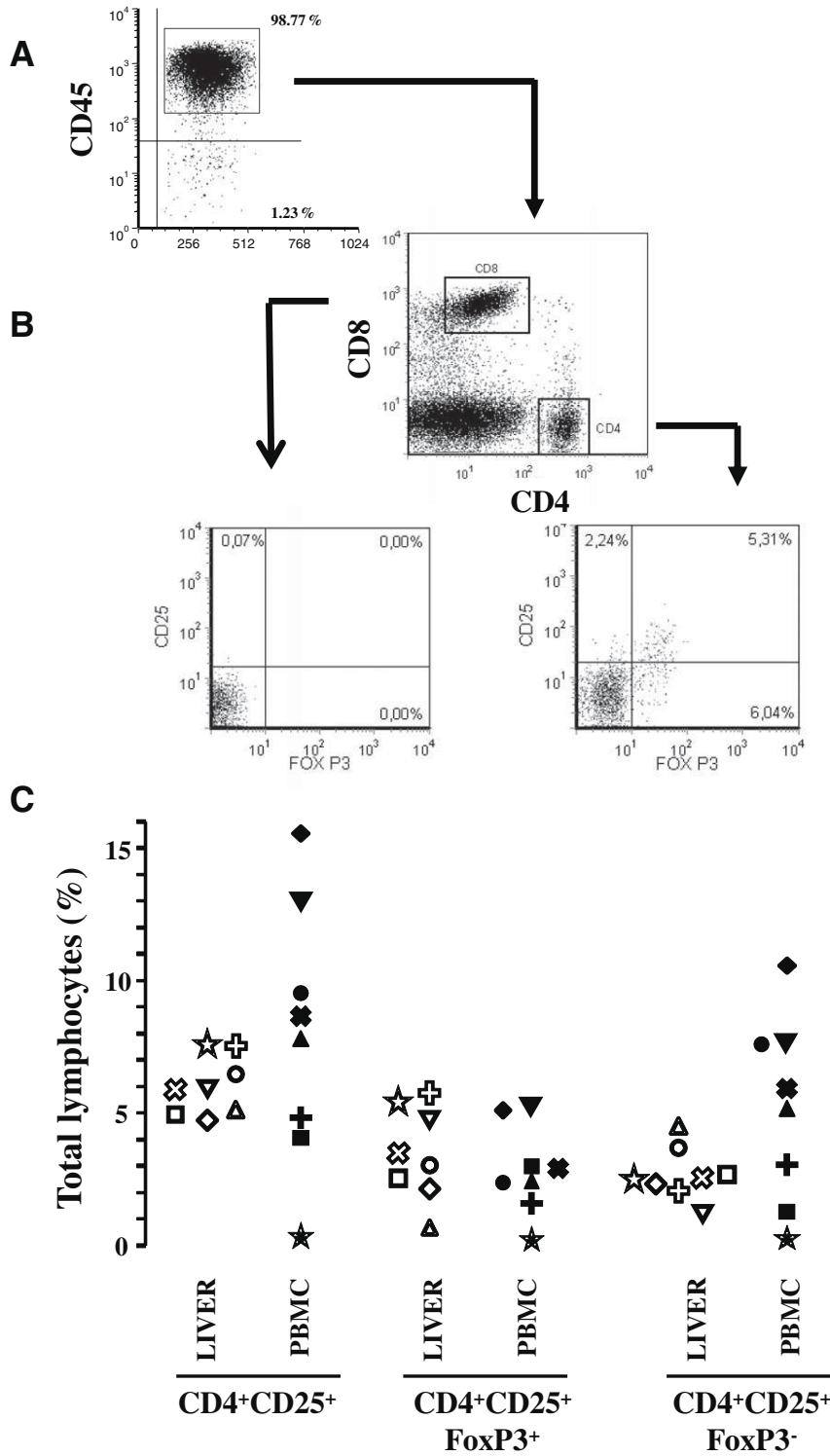
#### Relationship between immune markers and histological parameters

We studied the correlation between the grade and the stage of the disease according to the Metavir classification and intra-hepatic lymphocytes, quantitatively evaluated by immunohistochemical

Research Article



**Fig. 3.** Correlation between expression levels of intra-hepatic immune markers. (A,B) CD8 transcripts are significantly correlated with FoxP3 (A) and IL-10 transcripts (B). (C,D) TGF- $\beta$  transcripts are also strongly correlated with TNF- $\alpha$  (C) and IL-10 transcripts (D). Principal component analysis (PCA) allowed defining gene expression clustering between CD8 and FoxP3 and IL-10 transcripts and between TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  and IL-10 transcripts. (E,F) PCA shows correlation circles of the most relevant clusters (E) and the correlation circle of the link between FoxP3, CD8, and IL-10 transcripts (F). Note that the first two factorial axes of the PCA analysis explain more than 80% of the total inertia.



**Fig. 4. CD25/Foxp3 flow cytometry gating strategy.** (A) Blood or intra-hepatic total lymphocytes are electronically separated on the basis of their CD45<sup>+</sup> expression. (B) Total viable lymphocytes are gated on the basis of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> expression. Then, each CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> population is gated on CD25 and FoxP3 expression. Finally, Treg is determined by evaluating CD25/FoxP3 double positive cells. (C) Average percentages of each sub-population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> are calculated for samples obtained from the liver (white symbols) and from the blood (black symbols) of patients.

## Research Article

**Table 3. Quantification of intra-hepatic and peripheral lymphocytes in chronic HCV-infected patients (n = 8).**

Sub-populations of lymphocytes	Intra-hepatic lymphocytes* (%)	Peripheral lymphocytes* (%)
CD4 <sup>+</sup> /total lymphocytes	16.6 ± 8.0	39.3 ± 13.6
CD8 <sup>+</sup> /total lymphocytes	34.6 ± 5.9	26.7 ± 16.5
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	6.0 ± 1.0	8.5 ± 5.4
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	53.0 ± 20.0	43.5 ± 21.6
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> /total lymphocytes	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	Undetectable	0.1 ± 0.1

\* Results are expressed as % (mean ± standard deviation).

(n = 20) and RT-PCR (n = 47) analyses. Concerning Metavir necro-inflammatory grade, it was correlated with the total number of CD4<sup>+</sup> cells (r = 0.526, p = 0.017). The number of CD8<sup>+</sup> cells was higher along with Metavir activity grades, however this trend was not statistically significant (p = 0.073). FoxP3<sup>+</sup> cells were two fold more abundant in livers with Metavir activity grade A1 than in those with Metavir grade A2, whereas their number was lower in livers with Metavir activity grade A3, but these differences were not statistically significant (Fig. 5A and B). RT-PCR analyses showed that CD8 (r = 0.547, p = 0.001) and IL-10 (r = 0.318, p = 0.040) transcripts were the only parameters significantly correlated with Metavir activity grade. Concerning Metavir fibrosis stage, it was correlated with (i) total number of CD4<sup>+</sup> cells (r = 0.713, p < 0.001), (ii) total number of CD8<sup>+</sup> cells (r = 0.714, p < 0.001), (iii) number of FoxP3<sup>+</sup> cells in necro-inflammatory lesions (r = 0.469, p = 0.037), especially in piecemeal necrosis lesions (r = 0.510, p = 0.022). While the total number of CD8<sup>+</sup> cells was significantly higher along with Metavir fibrosis stages, the total number of FoxP3<sup>+</sup> cells was higher along with Metavir fibrosis stage F0 to stage F3 and was lower at the cirrhosis F4 stage in a non significantly way (Fig. 5C and D). In addition, Metavir fibrosis stage was only correlated with CD8 (r = 0.481, p = 0.005) and IL-10 (r = 0.409, p = 0.007) transcripts. Concerning the FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells ratio, it varied little from Metavir activity grade A1 to grade A3 and from Metavir fibrosis stage F0 to stage F3 (Fig. 5E and F). Strikingly, it was significantly lower at the cirrhosis stage (Metavir fibrosis stage F3 to stage F4, median range: 3.5 vs 1.3 - z = 2.324, p = 0.024) (Fig. 5F). Finally, it is worth to note that no correlation was found between serum viral load and any immune marker at cellular and transcriptional levels.

### Discussion

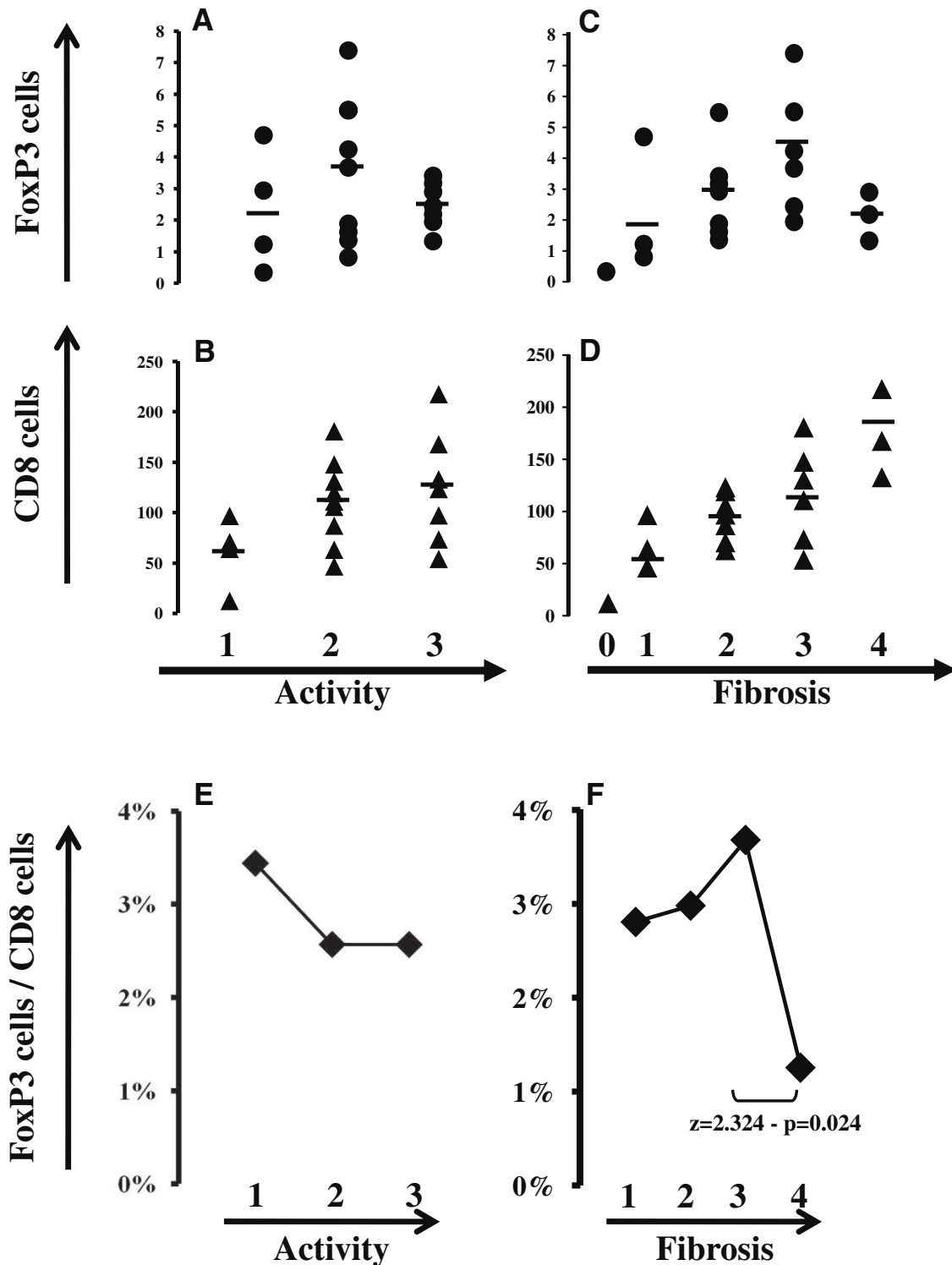
HCV-specific T-cell responses are generally weak, narrowly focused and often dysfunctional in CHC [8,9]. The current debate is to determine whether Treg population plays a role in the immune dysfunction. To date, because of difficulty in obtaining HCV-infected liver tissue, Treg were mainly studied in PBMC samples, on cells expanded *in vitro* after HCV peptides stimulation [28]. We thus focused our analysis on intra-hepatic Treg, in direct *ex vivo* condition. Three complementary approaches were combined in order to characterize their phenotype, frequency and localization, to search for relationships with other immune markers and to assess their potential role in CHC pathogenesis.

The most important finding of our immunohistochemical study demonstrates that intra-hepatic Treg are mainly CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells while CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells are very scarce. This point is supported by our complementary flow cytometry analy-

sis which does not detect CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg in the liver samples. We confirm that CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg are very low in blood as already published [27,28,33–35] and that the liver contains a population of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> which does not express CD25, as reported in HCV [36] and HBV [37].

Another major immunohistochemical finding concerns the distribution of Treg in histological areas, showing that FoxP3<sup>+</sup> cells are predominantly localized in piecemeal and lobular necroses, in contact with CD8<sup>+</sup>T cells. In addition, we confirm that CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells infiltrate the hepatic lymphoid aggregates, portal or septal tracts as well as parenchymatous lobules or nodules, in agreement with a previous study [38]. This would mean that Treg, within HCV-infected livers, has the direct access to interact with cytotoxic T cells at the site of action. Their plausible inhibitory role on the effector cells is supported by their localization together with CD8<sup>+</sup>T cells, inside necro-inflammatory lesions. Furthermore, activated lymphocytes, either by viral or other antigens, which enter the liver are likely to encounter Treg since these cells are localized in portal tracts.

The next step was to determine if the presence of Treg and CD8<sup>+</sup>T cells was related to cytokines. Our RT-PCR analysis reveals significant correlations between FoxP3 and CD8 transcripts and IL-10, TGF-β, TNF-α, and IFN-γ. Moreover, PCA indicates gene expression clustering of CD8 with FoxP3 and IL-10, and of TGF-β with TNF-α and IL-10. The low number of immune cells in the liver does not allow assessing the kind of cells producing these cytokines. However, it is now established that IL-10 is mainly produced by T cells with regulatory or suppressive functions [39,40]. Secretion of TGF-β, also produced by Treg, is considered as an important factor for the local survival and function of natural Treg [11,41], but it also contributes to induction of fibrosis [42]. *In vitro* studies have demonstrated that both TGF-β and IL-10 inhibits the cytokine secretion and the cytotoxicity of CD8<sup>+</sup>T lymphocytes [11,43]. Considering our data and extrapolating the results achieved in PBMC, the correlation between the intra-hepatic cytokines TGF-β and IL-10 might favor synergistic effects on each other in (i) maintaining the Treg pool and (ii) reducing pro-inflammatory cytokine secretions. It is known that TNF-α production is induced and up-regulated in the liver by NS3 of HCV [44]. TNF-α intervenes at an early stage of the cascade of events leading to liver damage [45] and is involved in the healing process including fibrogenesis [46]. As the majority (40/47) of patients included in our study have proven fibrosis, it was not surprising to detect high TNF-α expression in the liver of these patients. It has been also demonstrated that Treg inhibit *in vitro* production of IFN-γ by core specific CD4<sup>+</sup>T cells and HCV-specific CD8<sup>+</sup>T cells [13,47]. As we found correlations between IL-10 and TGF-β, and between TNF-α and IFN-γ, one could speculate that the HCV inflammatory context favors production of both anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines. If Treg only partially inhibit the pool of intra-hepatic effector T cells, some effector cells could thus produce IFN-γ. These hypotheses are supported by previous data showing that IFN-γ is released by effector T cells in HCV infection [3,5,6]. Whatever the balance between the four cytokines, our regression analysis highlights strong correlations between FoxP3, CD8 and IL-10. This would mean that FoxP3, CD8 and IL-10 altogether establish a beneficial equilibrium for both the host and the virus. On one hand, the host would gain benefit from Treg which restrain CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, thus preventing liver damage. On the other hand, the virus would be preserved through the suppression of Treg on CD8<sup>+</sup>T cells.



**Fig. 5.** Relationship between the frequency of FoxP3 cells or CD8T lymphocytes and the severity of disease according to Metavir scoring system. (A-D) The number of FoxP3<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes is shown according to Metavir activity grades (A,B) and Metavir fibrosis stages (C,D) respectively. (E) The FoxP3/CD8 ratio does not change significantly in patients with different Metavir activity grades. (F) Significant decrease of the FoxP3/CD8 ratio is observed in cirrhosis stage (F4).

It is important to note that the number of CD8<sup>+</sup>T cells is higher along with the necro-inflammatory activity and fibrosis, whereas

the number of Treg is high, up to Metavir activity grade A2 and Metavir fibrosis stage F3 but is low after this grade and stage.

## Research Article

Interestingly, the FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells ratio is significantly lower at the cirrhosis stage. In the light of these observations, the most likely scenario would be that, during the first steps of the disease, Treg modulate effector functions of T lymphocytes. During the cirrhosis end stage, when the tissue environment and the architecture are altered, Treg would be exhausted by the overflow of effector T cells. Interestingly, at different steps of the disease, no correlation was found between viral load and intra-hepatic Treg, suggesting that the essential role of Treg is to limit the CD8<sup>+</sup>T cells pool. This would imply that the balance between Treg and effector lymphocytes is crucial to limit T lymphocytes-induced lesions. Therefore, the breakdown of equilibrium between FoxP3 and CD8T cells, up to stage F3, could appear to be a turning point in the course of the disease.

In conclusion, this study provides new insights in the phenotype of intra-hepatic Treg and their distribution in the different histological areas in chronic HCV-infected liver. It also suggests a link between Treg, CD8 and IL-10 which altogether could balance immune responses between the host and the virus, contributing to the viral persistence and preventing immunopathological liver tissue damages. It remains to be determined whether the loss of Treg-CD8T cells interaction, beyond the stage F3, promotes an increase in the cytolytic functions of CD8T lymphocytes, thus impacting on the expansion of liver damage.

### 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), by a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida (ANRS), by specific support from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and in part by the "Biotherapeutic" and "AlphaVac" programs 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 their skilful assistance.

### 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, Rehmann 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 USA* 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] Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007;25:71–99.
- [9] Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395–1406.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Pruffer 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Claassen M, de Knecht R, Turgut D, Groothuisink A, Jansen H, Boonstra A. Role of multiple regulatory T cell populations in controlling peripheral blood and liver immunity to human hepatitis C virus infections. *Eur J Immunol* 2009;39:S590.
- [17] Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389–400.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006;212:86–98.
- [22] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209–226.
- [23] Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008;82:5043–5053.
- [24] Li S, Gowans EJ, Chougnat C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 2008;82:21–30.
- [25] 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.
- [26] Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 2005;175:246–253.
- [27] Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25:195–201.
- [28] Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. 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* 2007;179:1039–1048.
- [29] Bonorino P, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thelu MA, Sturm N, et al. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009;51:458–467.
- [30] 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.
- [31] 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.



- [32] Vigan I, Jouvin-Marche E, Leroy V, Pernellet 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.
- [33] Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 2005;115:2904–2913.
- [34] Endharti AT, IMS Rifa, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 2005;175:7093–7097.
- [35] 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.
- [36] Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, et al. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009;119:551–564.
- [37] Stoop JN, Claassen MA, Woltman AM, Binda RS, Kuipers EJ, Janssen HL, et al. Intrahepatic regulatory T cells are phenotypically distinct from their peripheral counterparts in chronic HBV patients. *Clin Immunol* 2008;129:419–427.
- [38] Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 2007;47:316–324.
- [39] Abel M, Sene D, Pol S, Bourliere M, Poynard T, Charlotte F, et al. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;44:1607–1616.
- [40] Billerbeck E, Thimme R. CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. *Hum Immunol* 2008;69:771–775.
- [41] Bolacchi F, Sinistro A, Ciapri C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006;144:188–196.
- [42] Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10:S59–67.
- [43] Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:708–716.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860–7867.

## **Intra-hepatic lymphocytes in HCV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma**

Auteurs : M Ramzan, N Sturm, MA Thélu, C Guillermet, P Bioulac Sage, B Bancel, P Merle, J Tran Van Nhieu, R Slama, C Létoublon, JP Zarski, E Jouvin-Marche, PN Marche, V Leroy

### **But**

L'infiltrat inflammatoire associé à certaines pathologies chroniques peut favoriser le développement d'un cancer et/ou son évolution. L'infection chronique par le VHC est particulièrement associée à l'inflammation et représente le facteur de risque le plus important de CHC. Le but de cette étude était de comparer les populations de cellules inflammatoires, plus particulièrement lymphocytaires, présentes au sein des cirrhoses virales C (avec ou sans CHC) et au sein des CHC développés sur cirrhose virale C. Les marqueurs phénotypiques et fonctionnels de cet infiltrat étaient corrélés à l'évolution tumorale et à la survie.

### **Matériel et méthodes**

**Patients et matériel** : notre étude portait sur une cohorte "test" A grenobloise comportant 18 résections chirurgicales pour CHC développé sur cirrhose virale C, sans co-morbidité, et 27 biopsies hépatiques à l'aiguille avec un diagnostic de cirrhose virale C constituant le groupe contrôle sans cancer, puis sur une cohorte "de validation" B multicentrique (Lyon, Bordeaux et Créteil) constituée de 47 cirrhoses virales C provenant de résections chirurgicales pour CHC.

**Méthodes** : nous disposions (1) pour la cohorte A, de tissu hépatique fixé en formol et inclus en paraffine et de tissu congelé. Dans le groupe CHC, le tissu cirrhotique était prélevé à distance de la tumeur (> 3 cm), (2) pour la cohorte B de tissu cirrhotique fixé en formol et inclus en paraffine.

**Analyse immunohistochimique** : il s'agissait de immunomarquages anti-CD3, CD8, CD4, CD20 et FoxP3 sur tissu fixé et anti-CD56, TCR  $\gamma\delta$  sur tissu congelé, en technique manuelle ou automatisée selon les Ac utilisés avec une immunodétection en trois couches. Les comptages cellulaires étaient réalisés sur une station de morphométrie (LUCIA, Nikon) dans 40 champs consécutifs et dans 3 compartiments (zones de fibrose, nodules parenchymateux et tumeur) et étaient exprimés en nombre de cellules par champ (X40).

**Analyse en RT-PCR** : il s'agissait de la quantification d'IL-6, IFN- $\gamma$ , perforine et RANTES réalisée sur Light Cycler 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) à partir d'ARN totaux issus des fragments tissulaires congelés.

## Résultats

En IHC : dans les cirrhoses C avec ou sans CHC de la cohorte A, le nombre de cellules CD3+, CD4+, CD8+ et TCR $\gamma\delta$ + était corrélé au score d'activité selon Métavir. Tous les types de cellules inflammatoires étudiés étaient plus nombreux dans le tissu fibreux que dans les nodules et deux types de clusters étaient mis en évidence: CD3/CD4/CD8/CD20/FoxP3 et CD56/TCR  $\gamma\delta$ . Le nombre de cellules FoxP3+ corrélait avec CD4+ et CD8+ seulement dans les nodules. Le nombre de cellules CD3+ (dans la fibrose et les nodules), CD8+ (dans les nodules), CD20+ et CD4+ (dans la fibrose) était significativement plus élevé dans le parenchyme cirrhotique ayant développé un CHC que dans les cirrhoses sans cancer, alors que c'était l'inverse pour les CD56+ (dans la fibrose). Le nombre de cellules CD3+, CD4+, CD8+ et FoxP3+ était significativement plus élevé dans le parenchyme cirrhotique des CHC qui récidivaient, **mais en analyse multivariée seul le nombre de CD8+ dans le parenchyme non tumoral était associé à la récurrence tumorale (p<0,001)**. Les résultats concernant la valeur pronostique de CD8 étaient confirmés dans la cohorte B (p=0,015). Combinant les résultats des cohortes A et B (dont les patients présentaient des caractéristiques similaires), 21 récurrences carcinomateuses étaient observées avec un délai médian de 2 ans. La survie à 5 ans sans récurrence était de 67%. Le nombre de CD8 au sein du parenchyme cirrhotique restait fortement corrélé à la récurrence tumorale (p<0,001) et un nombre de CD8  $\geq 100$ /champ dans le tissu cirrhotique (moyenne de 40 champs à l'objectif X40) était associé à une survie sans récurrence à 5 ans significativement plus basse que pour un nombre de CD8 < 100/champ (p=0,005). Enfin, le tissu tumoral contenait moins de tous les types de cellules inflammatoires étudiés que le parenchyme cirrhotique considéré dans son ensemble. Il contenait par contre plus de FoxP3+ et moins de CD56+ que les nodules parenchymateux cirrhotiques et les rapports CD4/CD8 et FoxP3/CD8 y étaient plus élevés. Aucune corrélation n'était retrouvée entre l'infiltrat inflammatoire intra-tumoral et la récurrence du CHC après résection.

En RT-PCR : l'expression d'FN- $\gamma$  et RANTES était plus élevée dans la cirrhose cancéreuse que non cancéreuse, et ces deux paramètres étaient fortement liés entre eux, alors que l'expression d'IL-6 était plus basse.

## Commentaires

1- Nos résultats soulignent le rôle de l'infiltrat inflammatoire présent au sein du parenchyme cirrhotique dans la survenue du CHC et dans sa récurrence. Globalement, cet infiltrat est plus marqué au sein des cirrhoses qui ont développé un cancer qu'au sein des cirrhoses sans cancer et il existe un accroissement des populations lymphocytaires B et T, alors que les FoxP3 et TCR  $\gamma\delta$  sont stables et les CD56 décroissent. En particulier, les lymphocytes CD8+ sont plus nombreux au sein du parenchyme nodulaire cirrhotique où le rapport CD4/CD8 est abaissé,

qu'au sein du tissu fibreux (alors que les autres lymphocytes se concentrent dans le tissu fibreux), et leur nombre est corrélé à la récurrence du CHC après résection. Ces données confortent l'hypothèse du "nodule cirrhotique transformé" à l'origine du cancer, avec un rôle pro-tumorigène possible des TCD8, et celle plus récente d'une "signature moléculaire inflammatoire" dans le parenchyme non tumoral corrélée à la récurrence tumorale et à la survie. L'expression de la cytokine IFN- $\gamma$  et de la chimiokine RANTES est également plus élevée dans le parenchyme cirrhotique qui a développé un CHC, traduisant encore un état pro-inflammatoire propice au cancer.

2- Nos résultats montrent également que l'infiltrat inflammatoire au sein de la tumeur joue un rôle davantage régulateur que cytotoxique. Toutes les populations cellulaires étudiées sont observées en plus grande densité dans le parenchyme cirrhotique que dans la tumeur. Si on compare les densités au sein de la tumeur et des nodules parenchymateux, les cellules FoxP3+ sont plus nombreuses dans la tumeur, alors que les cellules CD56+ sont moins nombreuses, et qu'on n'observe pas de différence pour les LT et LB. Les cellules NK et NKT sont impliquées dans l'immunité anti-tumorale et sont les seules étudiées sans pouvoir tumorigène connu. Nous montrons ici une diminution progressive des cellules NK des cirrhoses sans cancer aux cirrhoses ayant développé un CHC, et à nouveau au sein du CHC. Leur effondrement progressif au cours de la progression de la maladie virale C sous-tend l'hypothèse d'une défaillance de l'immunité anti-tumorale au cours du processus de carcinogenèse et au cours de l'évolution du CHC, confortée par la diminution des cellules cytotoxiques CD8+ et une augmentation des sous-populations T régulatrices suppressives de la réponse anti-tumorale, au sein de la tumeur.

**Intra-hepatic lymphocytes in HCV-related cirrhosis and  
hepatocellular carcinoma**

Journal:	<i>Gut</i>
Manuscript ID:	gutjnl-2011-300996
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Aug-2011
Complete List of Authors:	RAMZAN, Muhammad; INSERM, U823 STURM, Nathalie; CHU, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques THÉLU, Marie-Ange; INSERM, U823 GUILLERMET, Christiane; CHU, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques BRAMBILLA, Elisabeth; CHU, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques Bioulac-Sage, Paulette; Groupe Hospitalier Pellegrin, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique BANCEL, Brigitte; Hôpital de la Croix Rousse, Service de Pathologie MERLE, Philippe; Hôpital de la Croix-Rousse, Service d'Hépatologie TRAN VAN NHIEU, Jeanne; Groupe Hospitalier Henri-Mondor - Université Paris Est, Département de Pathologie - APHP SLAMA, Rémy; INSERM, U823 LETOUBLON, Christian; CHU Grenoble, Clinique d'Hépatogastroentérologie, pôle DiGiDune Zarski, jean-pierre; CHU de grenoble, Hépatogastroentérologie JOUVIN-MARCHE, Evelyne; INSERM, U823 Marche, Patrice; INSERM, U823 Leroy, Vincent; CHU de Grenoble
Keywords:	INFLAMMATION, HCV, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, T LYMPHOCYTES, HEPATIC FIBROSIS

# Intra-hepatic lymphocytes in the HCV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma

Muhammad RAMZAN<sup>1,2</sup>, Nathalie STURM<sup>1,2,3</sup>, Marie-Ange THÉLU<sup>1,2</sup>, Christiane GUILLERMET<sup>3</sup>, Elisabeth BRAMBILLA<sup>1,2,3</sup>, Paulette BIOULAC-SAGE<sup>4</sup>, Brigitte BANCEL<sup>5,7,8</sup>, Philippe MERLE<sup>6,7,8</sup>, Jeanne TRAN VAN NHIEU<sup>9</sup>, Rémy SLAMA<sup>1,2</sup>, Christian LETOUBLON<sup>1,2,10</sup>, Jean-Pierre ZARSKI<sup>1,2,10</sup>, Evelyne JOUVIN-MARCHE<sup>1,2</sup>, Patrice N MARCHE<sup>1,2,10</sup> and Vincent LEROY<sup>1,2,10</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Unité 823, Grenoble, France

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, UMR-S823 Grenoble, France

<sup>3</sup> CHU Grenoble, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie, France

<sup>4</sup> Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique. Groupe Hospitalier Pellegrin, Bordeaux, France

<sup>5</sup> Service de Pathologie, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France

<sup>6</sup> Service d'Hépatologie Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France

<sup>7</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France

<sup>8</sup> Hospices Civils de Lyon, France

<sup>9</sup> Département de Pathologie - APHP, Groupe Hospitalier Henri-Mondor - Université Paris Est-Créteil Val de Marne

<sup>10</sup> CHU Grenoble, Clinique d'Hépatogastroenterologie, pôle DiGiDune, France

**Corresponding author:** Patrice N Marche

Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche INSERM-UJF U823, Equipe Immunologie Analytique des Pathologies Chroniques, UJF Site Santé BP 170, Grenoble 38042, Cedex 9, France. Tel.: +33 (0) 476 54 94 95; fax: +33 (0) 476 54 94 54.

[patrice.marche@ujf-grenoble.fr](mailto:patrice.marche@ujf-grenoble.fr)

**Word count:** 3952

**Abstract**

*Objective:* Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the fastest growing cancers in the Western populations. The aim of this study was to characterize the immune status of cirrhotic liver associated with HCV-related hepatocellular carcinoma (HCC-HCV) and HCV-related cirrhotic liver without HCC (cHCV) in reference to tumour progression, recurrence and survival.

*Methods:* Immuno-markers (CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, TCR $\gamma\delta$  and FoxP3) and gene expression profiles (CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , FoxP3, IL-6, IFN- $\gamma$ , perforin and RANTES) were analyzed on serial non-tumoral and tumoral tissues by immunohistochemistry and quantitative PCR on 18 HCC-HCV and 27 cHCV patients, in relation with group difference, survival and recurrence. An additional 47 HCC-HCV patients were studied for anti-CD8 immuno-staining in the liver and tumour as a validation group.

*Results:* Immune environment of adjacent non-tumoral liver in HCC-HCV group was more inflammatory than non-cancerous liver in cHCV group. The number of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> liver-infiltrating lymphocytes (LILs) was significantly higher whereas the number of CD56<sup>+</sup> cells was lower in HCC-HCV than cHCV group. These differences were restricted to hepatic septa for CD4<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> cells and to nodular parenchyma for CD8<sup>+</sup> cells, indicating that cirrhotic livers of HCC-HCV particularly nodular parenchyma is more inflammatory than cHCV. In parallel, gene expressions of CD8 $\alpha$ , FoxP3 and RANTES were also higher in HCC-HCV than in cHCV group. Strikingly, we found that a high number of CD8<sup>+</sup> cells in the inflammatory cirrhotic liver away from the tumours was associated with tumour recurrence and was validated on a cohort of 65 patients.

*Conclusion:* High densities of LILs prevail inflammatory conditions in the HCC livers and could contribute to tumorigenesis and tumour recurrence. These results could contribute towards better clinical evaluations of patients susceptible for recurrence.

1  
2  
3 **Keywords:** Inflammation; Hepatitis C Virus; Immunohistochemistry; T cell; Natural Killer  
4  
5 cell.  
6  
7  
8  
9

### 10 **Significance of this study**

#### 11 **What is already known about this subject?**

- 12  
13  
14  
15  
16 • HCC recurrence is a frequent phenomenon after surgical resection in HCV-related  
17  
18 cirrhotic patients.  
19  
20  
21  
22 • Inflammatory gene expression signatures in the non tumoral liver are associated with  
23  
24 an increased risk of HCC recurrence and poor survival.  
25  
26  
27 • Transgenic mouse model studies indicate that prolonged inflammation with  
28  
29 continuous increase in LILs and decrease in NK/NKT cells favour HCC development.  
30  
31

#### 32 **What are the new findings?**

- 33  
34  
35 • Intra-hepatic lymphocytes and inflammatory gene expressions are significantly greater  
36  
37 in the non tumoral liver of HCC-HCV patients than in HCV cirrhotic patients without HCC  
38  
39 (cHCV).  
40  
41  
42  
43 • NK/NKT cells are the only immune cells that are decreased in the liver of HCC-HCV  
44  
45 as compared to cHCV patients.  
46  
47  
48 • Nodular parenchyma away from the tumour is more inflammatory than septa in HCC-  
49  
50 HCV making this region susceptible for *de novo* carcinogenesis or recurrence.  
51  
52  
53 • Intense lymphocyte (CD8<sup>+</sup> cells) infiltration in the cirrhotic liver away from the  
54  
55 tumour is associated with tumour recurrence in HCC-HCV patients treated by resection.  
56  
57  
58  
59 • Intra-tumoral lymphocyte infiltration is independent of that observed in non tumoral  
60  
liver and not related to prognosis after resection.



### How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Evaluation of intra-hepatic inflammatory status and CD8<sup>+</sup> infiltration in chronic HCV-infected patients with cirrhosis could help to identify patients who have the highest risk for HCC and who need to be prioritised for reinforced HCC screening and antiviral treatment.
- Once HCC has occurred, histological evaluation of non tumoral liver including intra-hepatic CD8<sup>+</sup> T lymphocyte count could be a useful tool to identify patients at high risk of recurrence after resection to whom should be directly offered liver transplantation.
- Decreasing intra-hepatic inflammatory lymphocytes either by an antiviral treatment or by the immunotherapeutic strategies appears to be relevant in both primary and secondary HCC prevention.

## Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) mostly occurs in inflammatory cirrhotic livers. Hepatitis C virus (HCV) infection seems to represent an additional risk factor for HCC as compared to cirrhosis induced by HBV infection and alcoholism<sup>1-3</sup>. HCV-cirrhotic liver harbours high numbers of liver-infiltrating lymphocytes (LILs) which are considered the manifestations of host immune response against the virus. These LILs cause persistent and ineffective inflammatory response in chronically infected liver which is considered to promote carcinogenesis<sup>4,5</sup>.

Clinical and epidemiological studies have suggested the links between chronic infection, inflammation and cancer<sup>6,7</sup>. However, it is assumed that a tumour promoting inflammation and anti-tumour immunity coexist at different points throughout the tumour progression and that environmental and micro-environmental conditions dictate balance between the two<sup>8</sup>. Immune cells including  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells and tumour-associated macrophages are the most frequent immune cells within the tumour environment.  $\alpha\beta$  T cells can be further subdivided into CD8<sup>+</sup> cytotoxic (CTL) and CD4<sup>+</sup> helper T (Th) cells, which include Th1, Th2, Th17 and regulatory T (Treg) cells. In addition, other immune cells such as B cells, natural killer (NK) and natural killer T (NKT) cells are also found<sup>8-10</sup>. Increased numbers of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), particularly activated CTL and Th1 cells are reported to correlate with better survival in some cancers including HCC<sup>11-13</sup>. However, there is evidence that many T cell subsets, like CD8<sup>+</sup> T cells, Tregs, Th1, Th2 and Th17 cells found in solid tumours, are involved in the tumour initiation, progression, metastasis and recurrence<sup>2, 8, 14, 15</sup>. Different cytokines can either promote or inhibit tumour development and progression regardless of their source. Cytokines control the immune and inflammatory milieu to either favour anti-tumour immunity (IL-12, TRAIL, IFN- $\gamma$ ) or enhance tumour progression (IL-6, IL-17, IL-23) and can also have direct effects on cancer cell growth and survival<sup>8, 16</sup>. Recently, the role of

1  
2  
3 IL-28B polymorphism has been described in the course of chronic hepatitis C, the risk of  
4 HCC development <sup>17</sup> and in response to the anti-viral therapy <sup>18</sup>. A considerable data is  
5 available on molecular signature of tumour recurrence, metastasis and survival in HCC <sup>19</sup> but  
6 inflammatory immune status in non-tumoral tissues is less documented. However, two studies  
7 showed that inflammatory/immune response-related gene signatures in non-tumoral liver  
8 correlated with tumour progression, metastasis, recurrence and reduced survival in HCC  
9 patients <sup>20, 21</sup>.

10 Evaluating the risk of HCC in HCV-cirrhotic patients is of crucial importance in order to  
11 adapt on individual basis the periodic surveillance for detection of HCC at an early stage.  
12 More specifically, once HCC eligible for the surgical treatment has occurred, it would be  
13 especially useful to estimate the risk of recurrence after liver resection. In the present study,  
14 we comprehensively analyzed phenotypic and inflammatory markers of LILs and TILs in  
15 HCV-related HCC patients treated by liver resection as compared to HCV-related cirrhotic  
16 patients without HCC. Our data clearly indicate that LILs favour de novo tumorigenesis and  
17 tumour recurrence after resection. These features could be harnessed for future trends in HCC  
18 screening and therapeutic management.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Patients and Methods

### *Patients*

This multicentric study included 65 HCV-related cirrhotic patients with histological proven HCC (HCC-HCV) treated by liver resection between 1999 and 2010 in France. Study group was divided into two cohorts: cohort-A including 18 patients seen in Grenoble served for a comprehensive immunohistochemical and gene expression evaluation and cohort-B including 47 patients from Lyon, Bordeaux and Créteil served to validate the relevance of CD8 immunostaining (Table 1 and supplementary data; Table 1s). All the patients were treated by surgical resection that was considered curative with margins of resection greater than 10 mm. They were longitudinally followed-up after resection for clinical evaluation, AFP dosage and CT-scan that were performed every 3-6 months. Tumour recurrence was diagnosed according to the EASL-criteria. The control group included 27 cirrhotic patients without HCC (cHCV) who underwent a needle liver biopsy as part of their diagnostic evaluation. All patients were anti-HCV positive and had detectable serum HCV-RNA by PCR. Exclusion criteria included co-infection with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus or hepatitis delta virus, other causes of liver disease, alcohol consumption higher than 30 g/day, previous antiviral treatment within three months and previous liver transplantation. The study protocol was conformed to the ethical guidelines of the 1975 Helsinki Declaration and was approved by our institutional review board. The patients were enrolled after giving their written informed consent.

### *Immunohistochemical Study*

Immunohistochemical staining for CD3, CD8, CD20 and FoxP3 (supplementary data; Table 2s) was performed on paraffin-embedded, formalin-fixed liver tissues and processed on an automated immunostainer (Nexes, Ventana, Tucson, AZ, USA); CD4 staining was processed manually. Briefly, 4µm-thick consecutive liver tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols. Antigen retrieval was done by heating slides in adequate

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

buffer by using water bath or microwave oven. Non-specific protein binding was blocked by 30 min incubation in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, with 2% milk. Endogenous peroxidase activity was blocked by 1% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5 min. Slides were alternatively rinsed with PBS (pH 7.4) and then processed on the immunostainer, starting with an automatic incubation with primary antibodies followed by an immunodetection with DAB (diaminobenzidine) I-view kit according to the manufacturer's recommendations (Ventana, Tucson, AZ, USA). For CD4 immunostaining, after incubation with the primary antibody, slides were fixed five min with 0.05% glutaraldehyde in PBS pH 8.6, incubated with the secondary antibody by using the Envision system (labeled polymer HorseRadish Peroxidase anti-mouse antibody, K4000, Dako, Glostrup, Denmark), and finally stained with DAB chromogen and counterstained with haematoxylin.

Immunohistochemical staining for CD56, CD123 and TCR $\gamma\delta$  (supplementary data; Table 2s) was performed manually on 10  $\mu$ m-thick frozen sections. Sections stored at -70°C were defrosted for 30 min at room temperature, fixed in a first bath of cold pure acetone (10 min at -20°C) and in a second bath of acetone with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min at 4°C). They were then briefly rinsed in pure acetone, dried and washed in PBS pH 7.4. Non-specific protein binding was blocked by 30 min incubation in PBS (pH 7.4) with 2% milk. Further steps (incubation with primary and secondary antibodies, amplification and revelation) were similar to those described for manual CD4 immunodetection. As a negative control, non-immunized mouse or rabbit immunoglobulin was substituted in place of primary antibody.

The immunopositive cells were counted in three distinct histological areas: tumour (inside the tumour), septa (fibrous septa, portal tracts and lymphoid aggregates) and nodule (nodular parenchyma) in the cirrhotic livers. Non-tumoral cirrhotic liver tissues were taken at least 3 cm away from the tumour. Cells were counted on serial sections in 40 random fields along the whole section of the resected liver or biopsy on a computer screen with the help of a software

1  
2  
3 LUCIA (Laboratory Universal Computer Image Analysis, version 5.0, Laboratory Imaging,  
4 Prague, Czech) at 400X magnification (0.068mm<sup>2</sup>/field) (moving along left to right and vice  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

LUCIA (Laboratory Universal Computer Image Analysis, version 5.0, Laboratory Imaging, Prague, Czech) at 400X magnification (0.068mm<sup>2</sup>/field) (moving along left to right and vice versa, measuring area of each zone and equalizing them per field). Positive cells were independently counted by two observers with 92-95% concordance.

### *Real-Time Quantitative RT-PCR analysis*

Total RNA extraction, cDNA preparation, quantification and analysis were performed essentially as described previously<sup>22</sup>. Primer pairs and probes for quantification of human CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , FoxP3, IL-6, IFN- $\gamma$ , perforin and RANTES genes were designed with the Software ProbeFinder for Human (version 2.35; Roche Diagnostics, Meylan, France) (supplementary data; Table 3s). Values were normalized by using Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase (HPRT) as a housekeeping gene. Results were expressed as Ct values of the targeted transcripts. IL-28B genotyping was performed by commercial kit IL28B rs12979860 C/T ToolSet<sup>TM</sup> for LightCycler<sup>TM</sup> (Roche).

### *Statistical analysis*

Non-parametric Wilcoxon and Mann-Whitney U-test were performed to compare quantitative variables between groups. Within groups, comparisons were performed by using 2-tailed Spearman and Pearson's rank correlation coefficient ( $r_s$ ). P values less than 0.05 were considered significant. Cumulative survival probability was estimated by the Kaplan-Meier method. A logistic regression model was used to identify immune parameters associated with recurrence. Statistical analysis was performed by using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and STATA 11.2 software (College Station, TX, USA).

## Results

### *Demographic/Biochemical Parameters*

The main characteristics of the patients are presented in Table 1. There was no significant difference between the patients from cohorts A and B. Combining both cohorts (Table 1s), the tumours were unifocal in 70% of cases with the size ranging from 12 to 190 mm in the largest diameter. Milan's criteria were met in 81% of patient. Majority of the tumours were moderately or well differentiated and 37% of them had vascular invasion. AFP levels were greater than 400 mg/L in HCC-HCV than cHCV patients. HCC-HCV patients were significantly older, had lower ALT, AST serum levels, lower METAVIR activity and higher AFP levels. Other parameters such as viral load, serum bilirubin and prothrombin time did not differ between the two groups. Logically, METAVIR activity was positively correlated with ALT ( $r_s=0.525$ ,  $p=8.3 \times 10^{-6}$ ), AST ( $r_s=0.682$ ,  $p=5.3 \times 10^{-10}$ ) and viral load ( $r_s=0.632$ ,  $p=1.4 \times 10^{-6}$ ) in both HCC-HCV and cHCV groups. Serum viral load was also correlated to ALT ( $r_s=0.546$ ,  $p=1.5 \times 10^{-3}$ ) and AST ( $r_s=0.686$ ,  $p=2.0 \times 10^{-5}$ ) in both groups.

### *Immune cell populations in the cirrhotic liver*

In cohort-A, liver histology showed that the liver-infiltrating lymphocytes (LILs) were not uniformly distributed in cirrhotic areas. High numbers of LILs (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> cells) were observed in the hepatic septa where they were concentrated in the lymphoid follicles, portal areas and fibrous septa. They were randomly distributed in the nodular parenchyma where they were less abundant as compared to the septa (Fig.1). The lymphoid follicles, hallmarks of the chronic hepatitis C infection<sup>23</sup>, are characterised by a high number of CD20<sup>+</sup> cells in the centre, surrounded by CD3<sup>+</sup> cells. These pericentric CD3<sup>+</sup> cells were mainly CD4<sup>+</sup> cells while CD8<sup>+</sup> cells were more concentrated in the peri-portal and peri-septal areas and in the nodules in contact with piecemeal and lobular necroses (Fig.1s supplementary data).

1  
2  
3 Quantitative analysis confirmed that all the markers of LILs included in our panel (CD3,  
4 CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD56, and TCR $\gamma\delta$  cells) were 4 to 16 folds higher in the septa than  
5 in the nodules in both HCC-HCV and cHCV cirrhotic groups (Table 2). We found two  
6 correlation clusters; the first and the strongest one comprised of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>  
7 and FoxP3<sup>+</sup> cells while the second one comprised of CD56<sup>+</sup> and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells. Interestingly,  
8 FoxP3<sup>+</sup> cells correlated positively with CD4<sup>+</sup> ( $r_s=0.469$ ,  $p=0.014$ ) and CD8<sup>+</sup> cells ( $r_s=0.478$ ,  
9  $p=0.012$ ) only in the nodular parenchyma in both groups (Fig.2s supplementary data).  
10 METAVIR-activity score correlated with the nodular T cells, including CD3<sup>+</sup> ( $r_s=0.417$ ,  
11  $p=0.017$ ), CD4<sup>+</sup> ( $r_s=0.563$ ,  $p=0.002$ ), CD8<sup>+</sup> ( $r_s=0.386$ ,  $p=0.047$ ) and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells ( $r_s=0.427$ ,  
12  $p=0.026$ ) in both groups (Fig.3s supplementary data). Notably, the CD4/CD8 cell ratio in both  
13 groups was significantly higher (1.86 vs 0.93;  $p<0.001$ ) in the septa than in the nodular  
14 parenchyma of the liver.

### 31 ***Comparison between LILs in the liver cirrhotic areas of HCC-HCV and cHCV groups***

32 The composition and distribution of LILs were compared between HCC-HCV cohort-A and  
33 cHVC groups. The number of CD3<sup>+</sup> ( $p=0.010$ ), CD4<sup>+</sup> ( $p=0.034$ ) and CD20<sup>+</sup> cells ( $p=0.031$ )  
34 was significantly higher in HCC-HCV than cHCV cirrhotic group (Fig.2). Moreover, the  
35 CD3<sup>+</sup> cells were more abundant in both septa and nodules ( $p=0.014$  and  $p=0.050$ ) while CD4<sup>+</sup>  
36 ( $p=0.031$ ) and CD20<sup>+</sup> cells ( $p=0.029$ ) were only higher in the septa. In contrast, CD56<sup>+</sup> cells  
37 were lower ( $p=0.053$ ) in the cirrhotic liver of HCC-HCV than cHCV group and this  
38 difference was limited only to the septa. The other cellular markers (TCR $\gamma\delta$  and FoxP3) did  
39 not differ between the two groups. Taken together, these results demonstrate that the HCV-  
40 related cirrhotic liver in which HCC has developed is more inflammatory than HCV-related  
41 cirrhotic liver without cancer.



### ***Gene expression levels in the liver cirrhotic areas of HCC-HCV and cHCV groups***

To further investigate the immune cells infiltrate in the cirrhotic liver, we selected seven cellular, inflammatory and cytolytic markers including CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , FoxP3, IFN- $\gamma$ , IL-6, RANTES and perforin for the gene expression study. The gene expression levels of CD8 $\alpha$  and FoxP3 was closely correlated to the numbers of CD8 $^{+}$  and FoxP3 $^{+}$  cells counted by immunohistochemistry (Fig.3b). As expected from these data, the gene expression levels of CD8 $\alpha$  (p=0.001), FoxP3 (p=0.001) but also RANTES (p=0.027) were significantly higher in HCC-HCV than in cHCV cirrhotic livers. In contrast, the gene expression levels of IL-6 (p=0.048) was lower in HCC-HCV than cHCV samples (Fig.3a). These results obtained by a gene expression level strongly support the fact that an inflammatory profile in the cirrhotic liver is associated with HCC occurrence.

Interestingly, we observed the strong correlations of CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  with FoxP3 (Fig.4s supplementary data). In addition, CD8 $\beta$  and RANTES strongly correlated with IFN- $\gamma$  ( $r_s=0.469$ , p=0.031 and  $r_s=0.560$ , p<0.001 respectively) indicating that RANTES could recruits IFN- $\gamma$  secreting CD8 cells in the milieu of inflammatory environment of the diseased liver. Importantly, we found no relationships between IL-28B polymorphism and any immunological or clinical parameter (data not shown).

### ***HCC-HCV group: LILs vs. TILs***

The lymphocyte composition was then evaluated in the tumour. All the markers (CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, TCR $\gamma\delta$  and FoxP3) were 6 to 13 folds lower (p<0.001) in the tumour than in the cirrhotic liver away from the tumour (Table 4s, Fig.1). TILs were present in the same range of LILs except CD56 $^{+}$  cells (p=0.045) which were lower and FoxP3 $^{+}$  cells (p<0.001) which were higher in the tumour than nodular parenchyma. It is important to note that no correlation was found between the number of any lymphocyte inside and outside the tumour. Thus, in the setting of HCC-related HCV infection, the high numbers of inflammatory LILs in

1  
2  
3 contrast with the low number of TILs might be two independent populations of the immune  
4  
5 cells.  
6

7  
8 ***What role do LILs and TILs play in the tumour recurrence?***  
9

10 Finally, the impact of intra-hepatic lymphocyte infiltration at the time of surgery on the long-  
11 term outcome was assessed. After a median follow-up of 36 months (range 3 to 105), HCC  
12 recurrence was diagnosed in cohort-A in 8 (44%) patients. The density of CD8<sup>+</sup> (143.3±12.8  
13 vs 91.3±18.7, p<0.001) and FoxP3<sup>+</sup> T cells (62.3±21.5 vs 28.9±10.0, p=0.030) in non tumoral  
14 parenchyma was significantly greater in patients who achieved HCC recurrence as compared  
15 to the patients free of tumour recurrence. This finding was observed in the septa as well as in  
16 the nodules (data not shown). In multiple regression analysis, only the number of CD8<sup>+</sup> cells  
17 remained associated with recurrence. To validate our results, we recruited 47 HCC-HCV  
18 patients from three other centres with similar characteristics (cohort-B) to whom anti-CD8  
19 immunostaining was performed in both cirrhotic liver and the tumours. We confirmed that the  
20 number of CD8<sup>+</sup> (125.7±15.5 vs 89.2±15.3, p=0.015) present in extra-tumoral cirrhotic liver  
21 was significantly higher in the recurrent patients as compared to the non-recurrent patients.  
22 Both cohorts were then combined to further examine the link between intra-hepatic CD8<sup>+</sup> T  
23 cell densities and the risk of recurrence. Overall, after a median follow-up of 35 months  
24 (range 1 to 105); the tumour recurrence was observed in 21 out of 65 HCC-HCV patients  
25 (32%). The only significant differences between recurrent and non recurrent patients were  
26 AFP levels and the density of intra-hepatic CD8<sup>+</sup> T cells. The diagnostic performance of the  
27 CD8<sup>+</sup> T cells evaluated by the areas under ROC curves was 0.83 ± 0.05. The cut-off of 100  
28 CD8<sup>+</sup> T cells per field gave a sensitivity of 76%, a specificity of 70%, a negative predictive  
29 value of 85% and a positive predictive value of 64%. In the patients with intra-hepatic CD8<sup>+</sup>  
30 T cells above this cut-off, the 3-year disease free survival was significantly lower than  
31 patients with low number of CD8<sup>+</sup> cells (numbers < 100/field) (Fig.4). After the adjustment of  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 sex and age, Cox regression model demonstrated that high number of CD8<sup>+</sup> cells (numbers ≥  
4 100 per field) was associated with an increased risk of HCC recurrence (Hazard ratio: 7.2,  
5 95% confidence interval: 2.4-21.6, p=5.1x10<sup>-4</sup>). In contrast, we found no association between  
6 the densities of TILs and tumour recurrence. Thus, high numbers of CD8<sup>+</sup> cells outside the  
7 tumour might be a significant indicator of tumour recurrence in HCC patients.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Discussion

Our data demonstrate that the high number of LILs prevail inflammatory conditions in HCV-infected liver and could contribute to hepatic tumorigenesis. We observed differences in the numbers of LILs in HCC-HCV patients as compared to cHCV patients without HCC. Particularly, T cells (CD3, CD8 and CD4 cells) and B cells (CD20 cells) were more abundant in the non tumoral parenchyma in HCC-HCV than in cHCV patients. This suggests that cirrhotic liver at the time of HCC occurrence is more inflammatory than cirrhotic liver without HCC. The main weakness of our analysis is its cross-sectional design, which makes difficult to identify the density of lymphocyte infiltrate as an independent factor of carcinogenesis. However, it has been established in several cancers that carcinogenesis could be promoted and/or exacerbated by inflammation<sup>8, 16</sup>, making conceivable that the increased numbers of LILs might play a pro-tumorigenic role in HCC patients. Investigating precise locations in the inflamed liver, T helper (CD4) cells and B (CD20) cells were higher in the septa while cytotoxic T (CD8) cells were higher in the nodules. Nodular parenchyma in the cirrhotic liver is the key area as most HCCs are thought to arise from a transformed nodule<sup>1</sup>. Flow cytometric studies on liver biopsies have reported an altered CD4/CD8 ratio in chronic HCV patients with a high number of CTLs. Our detailed histological analysis showed that an imbalanced CD4/CD8 ratio is limited to the nodular parenchyma where numerous CD8<sup>+</sup> cells are found making it more inflammatory and susceptible for new tumour or recurrence, while, CD4<sup>+</sup> cells remain higher in the septa. Tumour promoting role of CD8<sup>+</sup> cells has been described in the skin carcinoma in mice<sup>24</sup> and could be involved in HCC. A recent study on HBV transgenic mouse model also elaborates the role of liver non specific CD8<sup>+</sup> T cells in the development of cirrhosis and HCC<sup>25</sup> and this could be the case in human.

In a second step, we investigated whether the characteristics of the intra-hepatic lymphocyte infiltrate could have an impact on the risk of HCC recurrence after liver resection, which is

1  
2  
3 known to be frequent with a strong impact on mortality<sup>26</sup>. Interestingly, we found that the T  
4  
5 cells, especially CD8<sup>+</sup> and to a lesser extent FoxP3<sup>+</sup> cells, were significantly higher in the  
6  
7 cirrhotic liver away from the tumour in recurrent patients than in non-recurrent patients. Our  
8  
9 results are partially similar to the previous findings showing increased Foxp3<sup>+</sup>Tregs in the  
10  
11 different cancers including HCC, their presence being a predictor of recurrence and reduced  
12  
13 survival<sup>15, 27</sup>. As we already published, presence of Tregs could be the consequence of CD8<sup>+</sup>  
14  
15 T cells activity to reduce liver damage<sup>22</sup>. The fact that FoxP3 was no longer associated to  
16  
17 recurrence in our multivariate analysis strongly supports this hypothesis. Thus, we propose  
18  
19 that the inflammatory environment, particularly high numbers of liver-infiltrating CD8<sup>+</sup> T  
20  
21 cells in the cirrhotic liver away from the tumour are not only associated with HCC  
22  
23 development but also with tumour recurrence after liver resection.  
24  
25  
26  
27  
28

29  
30 Importantly, two comprehensive studies have stated that the inflammatory gene signatures  
31  
32 outside but not inside the tumour were predictors of tumour recurrence and poor survival in  
33  
34 operated HCC<sup>20, 21</sup>. We thus completed our study by evaluating the intra-hepatic gene  
35  
36 expression of a panel of phenotypic and functional markers. HCC-HCV cirrhotic liver had  
37  
38 higher expressions of CD8 $\alpha$  and FoxP3 which correlated to CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells.  
39  
40 Moreover, RANTES expression was higher while IL-6 expression was lower in HCC-HCV  
41  
42 than cHCV livers. Importantly, CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  gene expression correlated with the pro-  
43  
44 inflammatory cytokine INF- $\gamma$  and chemokine RANTES in cirrhotic liver, supporting our  
45  
46 hypothesis, a link between increased inflammation and HCC. IL-6 can act as pro as well as  
47  
48 anti-inflammatory cytokine involved in liver regeneration<sup>28</sup> and was found high in cHCV  
49  
50 cirrhotic liver. Overall, there is a shift from pro-inflammatory and regenerative gene marker  
51  
52 (IL-6) towards only inflammatory gene markers (CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  and RANTES) from cirrhosis  
53  
54 (cHCV) to HCC (HCC-HCV) indicating again a link between inflammation and HCC and  
55  
56 correlation of FoxP3 expression with CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  and RANTES might be the consequence  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 of inflammatory process to reduce the liver damage . Our previous<sup>29</sup> and present data showed  
4  
5 a correlation between the METAVIR-activity score (indicator of necro-inflammatory immune  
6  
7 damage) and infiltration of inflammatory cells (CD3, CD4, CD8 and TCR $\gamma\delta$  cells) only in the  
8  
9 nodules combined with the indicators of liver damage (ALT, AST). This again confirms that  
10  
11 nodular parenchyma is the real area susceptible to be transformed into HCC. We propose that  
12  
13 RANTES could attract inflammatory cells like T and B cells, particularly CTL<sup>30</sup> in the liver  
14  
15 parenchyma where they induce hepatocytes death, tissue remodelling, signalling pathways  
16  
17 alteration and cell transformation, finally leading to HCC<sup>4, 5, 31</sup>.

18  
19  
20  
21  
22 NK and NKT cells are the main players against anti-tumoral immunity and are the only cells  
23  
24 lacking a pro-tumorigenesis role<sup>8, 32</sup>. A lower frequency of CD56<sup>+</sup> cells has been reported in  
25  
26 HCV-infected liver as compared to the healthy liver<sup>33, 34</sup>. Moreover, we have reported  
27  
28 decreasing NK cells densities from F0 to F4 METAVIR-fibrosis stage<sup>34</sup>. We already  
29  
30 published in HCC transgenic mouse model that T, B and dendritic cells density increase but  
31  
32 only NK, NKT cell density decrease during the course of HCC<sup>4</sup>. Here, we also found that the  
33  
34 only immune cells which decrease in the cirrhotic livers between cHCV and HCC-HCV are  
35  
36 the CD56<sup>+</sup> cells. NK and NKT cells kill transformed cell via perforin, granzyme B, TRAIL or  
37  
38 FasL-dependent mechanism<sup>35, 36</sup>, thus their decreased numbers in HCC-HCV patients might  
39  
40 favour tumour progression.  
41  
42  
43  
44

45  
46 Comparing outside and inside of the tumour, we observed the higher densities of all kinds of  
47  
48 immune cells among LILs than TILs. Regarding lymphocyte localization in different  
49  
50 histological areas, we found that all classes of LILs were more concentrated in the septa than  
51  
52 in nodular parenchyma. However, FoxP3<sup>+</sup> cells were higher and CD56<sup>+</sup> NK/NKT cells were  
53  
54 lower in the tumours as compared to the liver nodules away from the tumour. This suggests  
55  
56 that the immune microenvironment within the tumour is more regulatory than in the cirrhotic  
57  
58 liver tissues<sup>13</sup>. Notably, the only cells that lack pro-tumorigenic role, so far, are NK, NKT  
59  
60

1  
2  
3 cells<sup>8</sup>. Lower numbers of these cells combined with higher numbers of Tregs in the tumour  
4  
5 indicate an impaired effective immune-surveillance in HCC. Overall, tumour  
6  
7 microenvironment seems to be more regulatory and the inflammatory/cytotoxic immune  
8  
9 responses within the tumours might be counterbalanced by high numbers of regulatory T cells  
10  
11  
12 15, 37, 38.

13  
14  
15 Taken together, our results show that high densities of inflammatory LILs in cirrhotic liver  
16  
17 favour HCC development. The total number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in non tumoral areas but  
18  
19 not in the tumours appears to have a prognosis value in terms of risk of recurrence after the  
20  
21 resection and disease free survival. Interestingly, these features can be assessed by simple  
22  
23 immunohistochemistry from a pre-operative liver biopsy of non tumoral parenchyma, in order  
24  
25 to identify the patients at high risk of recurrence who could be offered liver transplantation  
26  
27 rather than resection. Our results also indirectly support the need for an antiviral treatment  
28  
29 after resection to prevent HCC recurrence by reducing liver inflammation secondary to viral  
30  
31 eradication.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 1: Demographic, biochemical, and histological characteristics of patients (Mean  $\pm$  SD).**

	<b>Cohort-A HCC-HCV (N=18)</b>	<b>Cohort-B HCC-HCV (N=47)</b>	<b>Control cHCV (N=27)</b>
<i>Gender (male)</i>	12 (67%)	34 (72%)	20 (74%)
<i>Age (years)</i>	61.5 $\pm$ 12.4*	62.4 $\pm$ 11.9*	53.1 $\pm$ 9.2
<i>Child-Pugh score A</i>	7 (38%)	51 (78%)	17 (63%)
<i>Alanin aminotransferase (ALT) (IU/ml)</i>	75 $\pm$ 53	69 $\pm$ 46	178 $\pm$ 186*
<i>Aspartate aminotransferase (AST) (IU/ml)</i>	79 $\pm$ 47	81 $\pm$ 62	149 $\pm$ 139*
<i>Viral load (log IU/l)</i>	5 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1
<i>Prothrombin Time (%)</i>	76 $\pm$ 19	84 $\pm$ 14	77 $\pm$ 23
<i>Bilirubin (<math>\mu</math>m/l)</i>	27 $\pm$ 28	28 $\pm$ 21	43 $\pm$ 85
<i><math>\alpha</math>-Fetoprotein (AFP) (<math>\mu</math>g/l)</i>	242 $\pm$ 933*	502 $\pm$ 997*	22 $\pm$ 43
<i>Metavir-Activity score</i>			
	1 7 (39%)	22 (47%)	1 (4%)
	2 6 (33%)	17 (36%)	11 (41%)
	3 5 (28%)	8 (17%)	15 (55%)
<i>Mean Metavir-Activity score</i>	1.89	1.70	2.5*
<i>Necrosis (%)</i>	15 $\pm$ 30	25 $\pm$ 40	
<i>Tumour Capsule (present)</i>	9 (50%)	28 (60%)	
<i>Vascular Invasion (present)</i>	6 (33%)	18 (38%)	
<i>Tumour count/Patient</i>			
	Unifocal	13	30
	Multifocal	5	17
<i>T Size (mm)</i>	35 $\pm$ 16	42 $\pm$ 35	
<i>T Size Range (mm)</i>	15-70	12 - 190	
<i>T Differentiation (WHO classification)</i>			
	Well	3 (17%)	22 (47%)
	Moderate	13 (72%)	20 (42%)
	Poor	2 (11%)	5 (11%)
<i>Ki67 Labelling Index</i>	23.3 $\pm$ 14.9	24.3 $\pm$ 16.1	

\* p&lt;0.05 (Comparison of control with cohort A or B)



**Table 2: Comparison of lymphocyte counts in the liver septa and nodules in both HCC-HCV (cohort-A) and cHCV groups (Mean  $\pm$  SD).**

	<i>Lymphocytes in Septa</i>	<i>Lymphocytes in Nodules</i>	<i>p values</i>
CD3	289.39 $\pm$ 77.83	18.63 $\pm$ 12.77	p<0.001
CD4	187.29 $\pm$ 57.62	8.15 $\pm$ 4.73	p<0.001
CD8	103.76 $\pm$ 30.27	8.96 $\pm$ 6.41	p<0.001
CD20	116.83 $\pm$ 74.94	1.85 $\pm$ 1.09	p<0.001
CD56	2.43 $\pm$ 1.27	0.61 $\pm$ 0.27	p<0.001
TCR $\gamma\delta$	6.65 $\pm$ 2.79	1.14 $\pm$ 0.41	p<0.001
FoxP3	43.99 $\pm$ 24.95	0.86 $\pm$ 0.29	p<0.001
CD123	9.52 $\pm$ 6.49	0.66 $\pm$ 0.28	p<0.001

**Table 3: Demographic, biochemical, histological and immuno-histochemical parameters of recurrent and non-recurrent patients (Mean  $\pm$  SD).**

		Recurrent Patients (N=21)	Non-recurrent Patients (N=44)
<i>Gender (male)</i>		14 (67%)	32 (73%)
<i>Age (years)</i>		61.87 $\pm$ 11.6	62.13 $\pm$ 12.3
<i>Viral load (log IU/l)</i>		7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1
<i><math>\alpha</math>-Fetoprotein (AFP) (<math>\mu</math>g/l)</i>		887 $\pm$ 1567	68 $\pm$ 99
<i>Metavir-Activity score</i>	1	7 (33%)	15 (48%)
	2	9 (43%)	10 (32%)
	3	5 (24%)	6 (20%)
<i>Mean Metavir-Activity score</i>		1.9	1.7
<i>Necrosis (%)</i>		27.1 $\pm$ 38.2	23.9 $\pm$ 32.4
<i>Tumour Capsule (present)</i>		8 (38%)	28 (64%)
<i>Vascular Invasion (present)</i>		14 (67%)	15 (34%)
<i>Tumour count/Patient</i>	Unifocal	13	30
	Multifocal	8	14
<i>T Size (mm)</i>		42.76 $\pm$ 25.37	38.03 $\pm$ 32.39
<i>T Size Range (mm)</i>		15-110	12-190
<i>T Differentiation (WHO classification)</i>	Well	6 (29%)	17 (39%)
	Moderate	12 (57%)	23 (52%)
	Poor	3 (14%)	4 (9%)
<i>Ki67 Labelling Index</i>		26.63 $\pm$ 16.73	18.74 $\pm$ 14.41
<i>Outside the Tumour</i>	<i>CD8<sup>+</sup> cells</i>	117.9 $\pm$ 23.1*	91.7 $\pm$ 16.2
	<i>Inside the Tumour</i>		
	<i>CD8<sup>+</sup> cells</i>	7.7 $\pm$ 7.7	6.9 $\pm$ 4.3

\*p<0.001

Only

**Acknowledgement:**

We thank to Alice Cheveau for her skilful assistance in patients selection.

**Competing interests:** None.

**Financial support:** This work was supported by: institutional Grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); a specific grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida (ANRS); specific grants from DRRC, CHU Grenoble and in part by the “Biotherapeutic” and “AlphaVac” programs of the “Pôle de Compétitivité Lyon Biopôle” and by Ligue Contre le Cancer (CD42, CD63 & CD73). M.R. was supported by a fellowship from the Higher Education Commission (HEC) of Pakistan.

## References

- 1 **Benvegnu L**, Noventa F, Bernardinello E, *et al.* Evidence for an association between the aetiology of cirrhosis and pattern of hepatocellular carcinoma development. *Gut* 2001;**48**:110-5.
- 2 **Sasaki Y**, Yamada T, Tanaka H, *et al.* Risk of recurrence in a long-term follow-up after surgery in 417 patients with hepatitis B- or hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2006;**244**:771-80.
- 3 **Fattovich G**, Stroffolini T, Zagni I, *et al.* Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;**127**:S35-50.
- 4 **Haybaeck J**, Zeller N, Wolf MJ, *et al.* A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2009;**16**:295-308.
- 5 **Nakamoto Y**, Guidotti LG, Kuhlen CV, *et al.* Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 1998;**188**:341-50.
- 6 **Coussens LM**, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;**420**:860-7.
- 7 Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002;**16**:217-26, 29; discussion 30-2.
- 8 **Grivennikov SI**, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;**140**:883-99.
- 9 **DeNardo DG**, Barreto JB, Andreu P, *et al.* CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009;**16**:91-102.
- 10 **Smyth MJ**, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006;**90**:1-50.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- 11 **Laghi L**, Bianchi P, Miranda E, *et al.* CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009;**10**:877-84.
- 12 **Wada Y**, Nakashima O, Kutami R, *et al.* Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 1998;**27**:407-14.
- 13 **Chew V**, Tow C, Teo M, *et al.* Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2010;**52**:370-9.
- 14 **Zhou J**, Ding T, Pan W, *et al.* Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2009;**125**:1640-8.
- 15 **Fu J**, Xu D, Liu Z, *et al.* Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007;**132**:2328-39.
- 16 **Lin WW**, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007;**117**:1175-83.
- 17 **Fabris C**, Falleti E, Cussigh A, *et al.* IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 2011;**54**:716-22.
- 18 **Tanaka Y**, Nishida N, Sugiyama M, *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;**41**:1105-9.
- 19 **Villanueva A**, Hoshida Y, Battiston C, *et al.* Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;**140**:1501-12 e2.

- 1  
2  
3 20 **Budhu A**, Forgues M, Ye QH, *et al.* Prediction of venous metastases, recurrence, and  
4  
5 prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the  
6  
7 liver microenvironment. *Cancer Cell* 2006;**10**:99-111.  
8  
9  
10 21 **Hoshida Y**, Villanueva A, Kobayashi M, *et al.* Gene expression in fixed tissues and  
11  
12 outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;**359**:1995-2004.  
13  
14  
15 22 **Sturm N**, Thelu MA, Camous X, *et al.* Characterization and role of intra-hepatic  
16  
17 regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. *J Hepatol* 2010;**53**:25-35.  
18  
19  
20 23 **Lefkowitz JH**, Schiff ER, Davis GL, *et al.* Pathological diagnosis of chronic  
21  
22 hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis  
23  
24 Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 1993;**104**:595-603.  
25  
26  
27 24 **Roberts SJ**, Ng BY, Filler RB, *et al.* Characterizing tumor-promoting T cells in  
28  
29 chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:6770-5.  
30  
31  
32 25 **Wang J**, Zhao W, Cheng L, *et al.* CD137-mediated pathogenesis from chronic  
33  
34 hepatitis to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol*  
35  
36 2010;**185**:7654-62.  
37  
38  
39 26 **Regimbeau JM**, Abdalla EK, Vauthey JN, *et al.* Risk factors for early death due to  
40  
41 recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study. *J*  
42  
43 *Surg Oncol* 2004;**85**:36-41.  
44  
45  
46 27 **Sasaki A**, Tanaka F, Mimori K, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+  
47  
48 regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2008;**34**:173-9.  
49  
50  
51 28 **Duncan AW**, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration.  
52  
53 *Gastroenterology* 2009;**137**:466-81.  
54  
55  
56 29 **Leroy V**, Vigan I, Mosnier JF, *et al.* Phenotypic and functional characterization of  
57  
58 intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;**38**:829-41.  
59  
60

- 1  
2  
3 30 **Shields PL**, Morland CM, Salmon M, *et al.* Chemokine and chemokine receptor  
4 interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver  
5 compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999;**163**:6236-43.  
6  
7  
8  
9  
10 31 **Budhu A**, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc*  
11 *Biol* 2006;**80**:1197-213.  
12  
13  
14  
15 32 **Foss FM**. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002;**29**:5-11.  
16  
17 33 **Meier UC**, Owen RE, Taylor E, *et al.* Shared alterations in NK cell frequency,  
18 phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus  
19 infections. *J Virol* 2005;**79**:12365-74.  
20  
21  
22  
23  
24 34 **Bonorino P**, Ramzan M, Camous X, *et al.* Fine characterization of intrahepatic NK  
25 cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009;**51**:458-  
26  
27 67.  
28  
29  
30  
31 35 **Dunn GP**, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance  
32 and immunoediting. *Immunity* 2004;**21**:137-48.  
33  
34  
35  
36 36 **Martin-Orozco N**, Muranski P, Chung Y, *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T  
37 cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009;**31**:787-98.  
38  
39  
40  
41 37 **Gallimore A**, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells.  
42 *Immunology* 2002;**107**:5-9.  
43  
44  
45  
46 38 **Unitt E**, Rushbrook SM, Marshall A, *et al.* Compromised lymphocytes infiltrate  
47 hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005;**41**:722-30.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Figure legends

**Fig.1.** Liver-infiltrating and tumour-infiltrating lymphocytes in HCC-HCV patients. Infiltrating CD3<sup>+</sup> T cells are more abundant in liver cirrhotic areas (A) than in tumoral (T) areas (B). In cirrhotic liver, they are more concentrated in septa (S) (*fibrous septa, portal areas and lymphoid follicles*) than in nodule (N) (*Nodular parenchyma*) (magnification 100X). CD4, CD8, CD20 and FoxP3 positive cells are much more concentrated in septa than nodule and tumour. The pattern of distribution and density of T cells (CD4 and CD8 cells) and B cells (CD20 cells) are similar in nodules and tumours while regulatory T cells (FoxP3 cells) are more abundant in tumours than nodules (C) (magnification 400X).

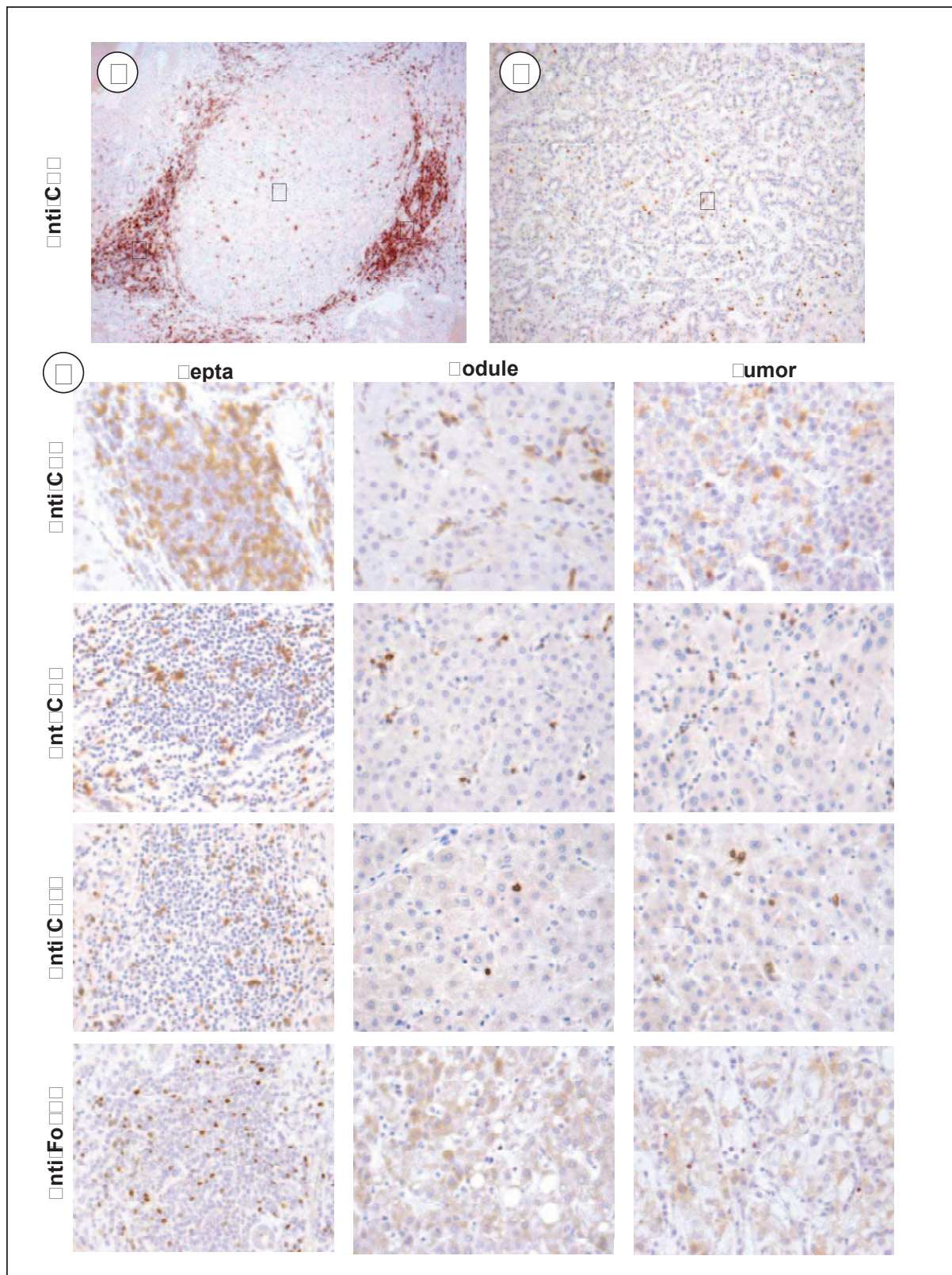
**Fig.2.** Comparison of liver-infiltrating lymphocytes between HCC-HCV (cohort-A) and cHCV cirrhotic groups. As a whole, T cells (CD3<sup>+</sup>), T helper cells (CD4<sup>+</sup>) and B cells (CD20<sup>+</sup>) are present in significantly higher numbers (\*p<0.005) in HCC-HCV than cHCV group. In contrast, numbers of NK and NKT (CD56<sup>+</sup>) cells are lower in HCC-HCV livers than cHCV livers.

**Fig.3.** Gene expression levels of selected markers in HCC-HCV (cohort-A) and cHCV cirrhotic groups. CD8 $\alpha$ , FoxP3 and RANTES expression levels are significantly higher in HCC-HCV group than in cHCV group whereas IL-6 expression is lower for HCC-HCV (\*p<0.05) (A). Liver expression of CD8 $\alpha$  and FoxP3 correlate positively with liver infiltrating CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cell densities in both cirrhotic groups (B).

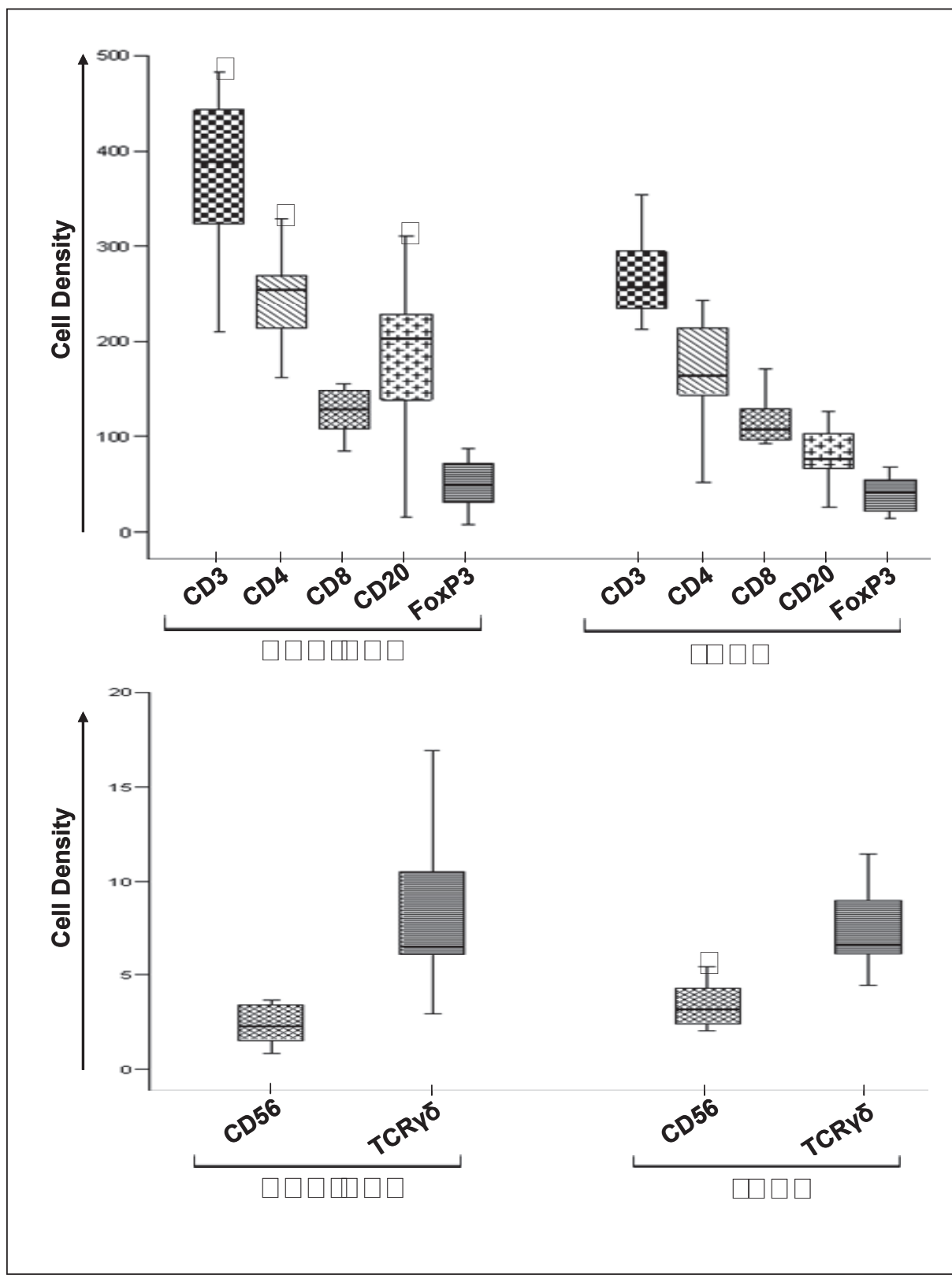
**Fig.4.** Kaplan-Meier analysis of disease free survival (cohort-A+B) as a function of numbers of liver-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells. High numbers of CD8<sup>+</sup> cells outside the tumour (number  $\geq$  100 cells/field) is associated with a high recurrence rate in HCV-related hepatocellular carcinoma.

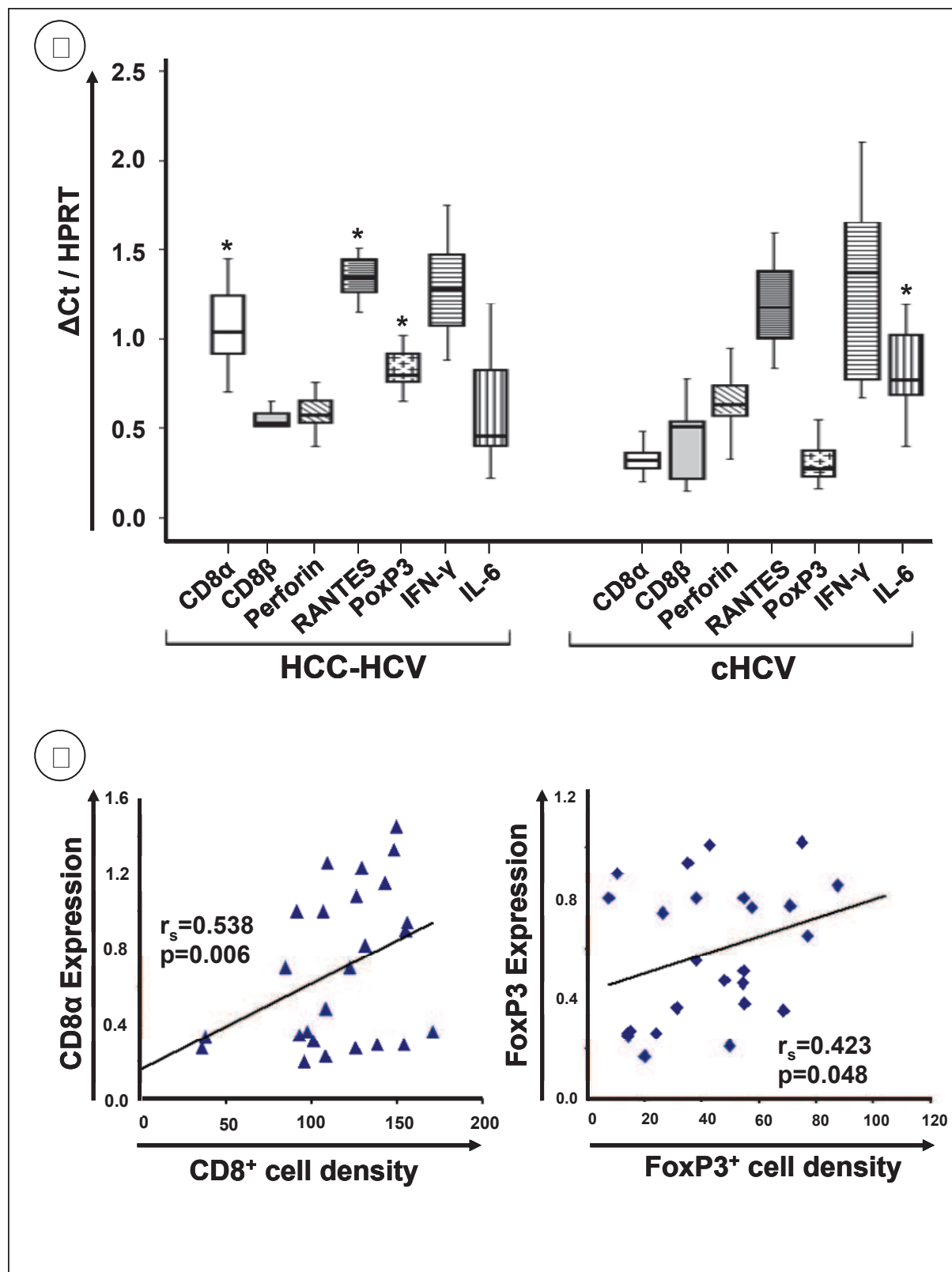


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

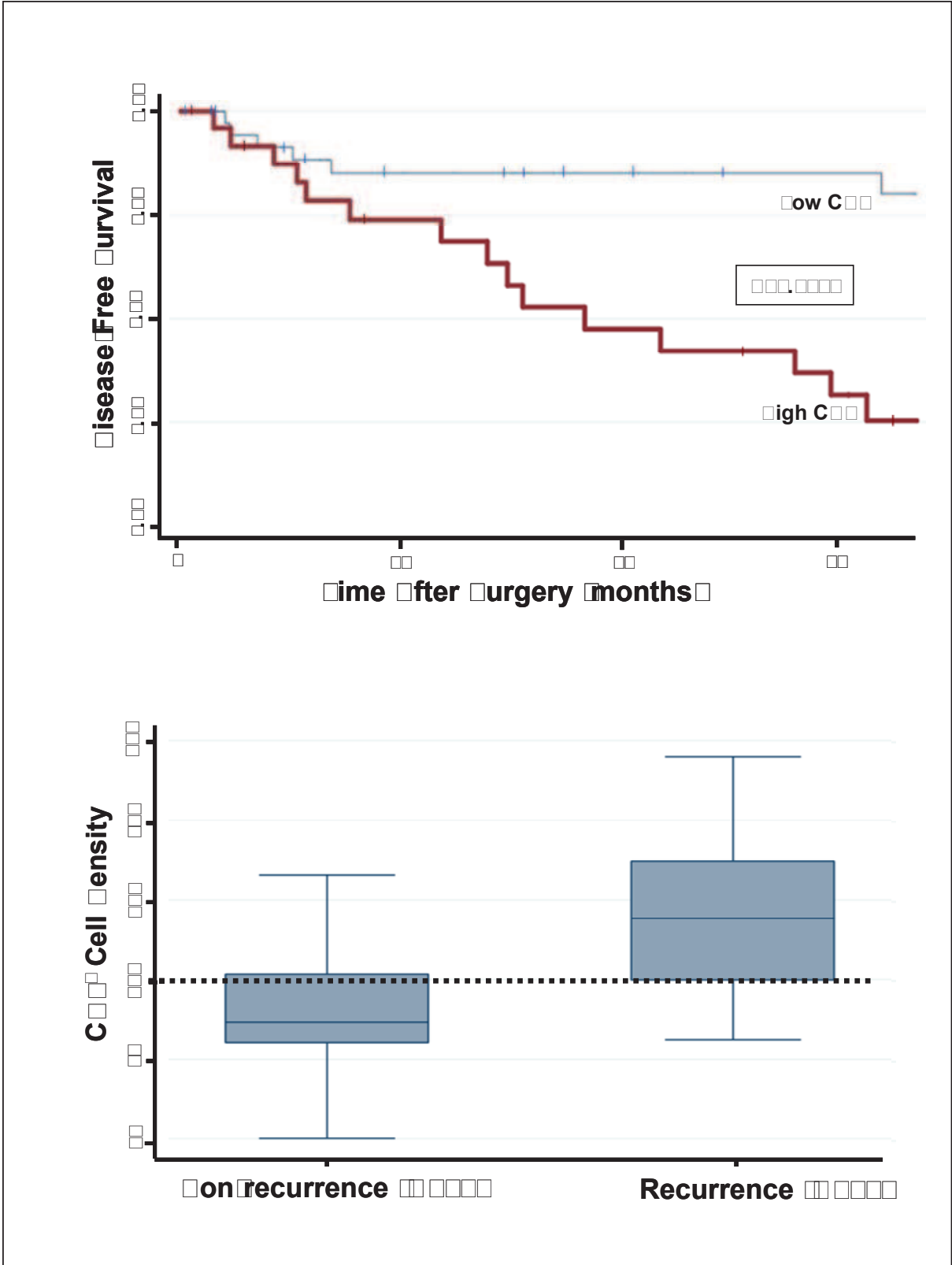


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60





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



### Supplementary data

**Table 1s: Demographic, biochemical, and histological characteristics of patients (Mean  $\pm$ SD).**

	<b>Cohort-A+B HCC-HCV (N=65)</b>	<b>Control cHCV (N=27)</b>
<i>Gender (male)</i>	46 (71%)	20 (74%)
<i>Age (years)</i>	62.9 $\pm$ 12.9*	53.1 $\pm$ 9.2
<i>Child-Pugh score A</i>	51 (78%)	17 (63%)
<i>Alanin aminotransferase (ALT) (IU/ml)</i>	71 $\pm$ 53	178 $\pm$ 186*
<i>Aspartate aminotransferase (AST) (IU/ml)</i>	80 $\pm$ 47	149 $\pm$ 139*
<i>Viral load (log IU/l)</i>	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1
<i>Prothrombin Time (%)</i>	80 $\pm$ 19	77 $\pm$ 23
<i>Bilirubin (<math>\mu</math>m/l)</i>	27 $\pm$ 28	43 $\pm$ 85
<i><math>\alpha</math>-Fetoprotein (AFP) (<math>\mu</math>g/l)</i>	388 $\pm$ 933*	22 $\pm$ 43
<i>Metavir-Activity score</i>		
	1 28 (43%)	1 (4%)
	2 23 (35%)	11 (41%)
	3 14 (22%)	15 (55%)
<i>Mean Metavir-Activity score</i>	1.80	2.5*
<i>Necrosis (%)</i>	25 $\pm$ 37	
<i>Tumour Capsule (present)</i>	47 (72%)	
<i>Vascular Invasion (present)</i>	24 (37%)	
<i>Tumour count/Patient</i>		
	Unifocal 42	
	Multifocal 23	
<i>T Size (mm)</i>	40 $\pm$ 30	
<i>T Size Range (mm)</i>	12 - 190	
<i>T Differentiation (WHO classification)</i>		
	Well 22 (34%)	
	Moderate 36 (55%)	
	Poor 7 (11%)	
<i>Ki67 Labelling Index</i>	23.3 $\pm$ 14.9	

\* p<0.05 (Comparison between control and cohort A+B)

**Table 2s: Characteristics of the antibodies.**

<i>Antigen</i>	<i>Pre-treatment for antigen retrieval</i>	<i>Dilution</i>	<i>Clone</i>	<i>Source</i>
<i>CD3</i>	Citrate buffer, pH 6, Water bath 100°C, 1h	1:100	polyclonal	Dako, Glostrup, Denmark
<i>CD4</i>	Tris-citrate buffer, pH 9, Microwave oven 3x5 min	1:75	4B12	Novocastra, Newcastle, UK
<i>CD8</i>	Citrate buffer, pH 6, Water bath 100°C, 1h	1:100	C8/144B	Dako, Glostrup, Denmark
<i>CD20</i>	Citrate buffer, pH 6, Water bath 100°C, 1h	1:50	L26	Dako, Glostrup, Denmark
<i>FoxP3</i>	Tris-citrate buffer with 0.02% saponin, pH 9, Microwave oven 15 min	1:20	mAbcam 22510	Abcam, Cambridge, UK
<i>Ki67</i>	Tris-citrate buffer, pH 9.5 Water bath, 1h	1:50	Ki S5	Dako, Glostrup, Denmark
<i>CD123</i>	No	1:300	6H6	Biologend, San Diego, CA
<i>CD56</i>	No	1:200	1B6	Novocastra, Fremont, CA
<i>TCR<math>\gamma\delta</math></i>	No	1:200	B1	BD Pharmigen, Oxon, UK

**Table 3s. Primers and Universal probe Library (UPL) Sequences used in the LightCycler® 480 Real-Time Quantitative PCR System.**

<i>Gene</i>		<i>Primer Sequences</i>	<i>Product Length</i>	<i>UPL sequences</i>
CD8 $\alpha$	F	cgctgtgatatctacatctgg	108 nt	ttctctg
	R	caaacacgtcttcggtcc		
CD8 $\beta$	F	caggccagagaccagaa	84 nt	gcctgctg
	R	gaaaccagcagaaccaggac		
FoxP3	F	ctacgccacgctcatccgctgg	260 nt	gctccaga
	R	cccagcaggtgtccaacccta		
IFN- $\gamma$	F	ggcattttgaagaattggaaag	112 nt	cagagcca
	R	tttggatgctctggatcatt		
IL-6	F	cacattcctggtgctgga	88 nt	ctcctctg
	R	cagctccacgtcttcttga		
Perforine	F	cttgctcactgcaacctc	105 nt	ttctctg
	R	aaaattagctgggcatggtg		
RANTES	F	cctcattgctactgccctct	63 nt	ctgcctcc
	R	ggtgtggtgtccgaggaata		
HPRT	F	gaccagtcacaggggacat	95 nt	tggtggag
	R	gtgtcaattatattccacaatcaag		

**Table 4s: Quantitative analysis of lymphocyte-infiltrating lymphocytes in different histological areas in HCC-HCV (cohort-A) and cHCV groups (Mean  $\pm$  SD).**

	<i>Total Lymphocytes in Liver</i>	<i>Lymphocytes in Fibrotic areas</i>	<i>Lymphocytes in Parenchymatous area</i>	<i>Lymphocytes in Tumor</i>	
HCC-HCV	CD3	346.75 $\pm$ 84.26 <sup>††</sup>	323.11 $\pm$ 74.92 <sup>†</sup>	23.64 $\pm$ 15.78	26.98 $\pm$ 9.12
	CD4	219.23 $\pm$ 59.66 <sup>††</sup>	210.14 $\pm$ 56.36 <sup>†</sup>	9.09 $\pm$ 4.81	12.65 $\pm$ 4.10
	CD8	111.50 $\pm$ 30.72 <sup>††</sup>	100.04 $\pm$ 26.24 <sup>†</sup>	11.46 $\pm$ 7.87	9.13 $\pm$ 6.36
	CD20	148.86 $\pm$ 86.81 <sup>††</sup>	147.18 $\pm$ 86.34 <sup>†</sup>	1.68 $\pm$ 0.85	2.31 $\pm$ 2.23
	CD56	2.63 $\pm$ 1.58 <sup>††</sup>	1.99 $\pm$ 1.40 <sup>†</sup>	0.63 $\pm$ 0.26*	0.44 $\pm$ 0.21
	TCR $\gamma\delta$	8.07 $\pm$ 3.90 <sup>††</sup>	6.88 $\pm$ 3.82 <sup>†</sup>	1.19 $\pm$ 0.41	0.90 $\pm$ 0.52
	FoxP3	48.41 $\pm$ 26.34 <sup>††</sup>	47.49 $\pm$ 26.26 <sup>†</sup>	0.93 $\pm$ 0.34	3.04 $\pm$ 1.38**
	CD123	12.08 $\pm$ 6.21 <sup>††</sup>	11.32 $\pm$ 6.14 <sup>†</sup>	0.76 $\pm$ 0.18	0.71 $\pm$ 0.20
cHCV	CD3	253.37 $\pm$ 66.00	239.60 $\pm$ 64.28 <sup>†</sup>	13.77 $\pm$ 5.52	
	CD4	168.13 $\pm$ 58.71	160.66 $\pm$ 56.84 <sup>†</sup>	6.38 $\pm$ 1.95	
	CD8	108.59 $\pm$ 36.70	102.21 $\pm$ 35.88 <sup>†</sup>	7.47 $\pm$ 3.58	
	CD20	87.26 $\pm$ 49.18	85.11 $\pm$ 49.46 <sup>†</sup>	2.15 $\pm$ 1.42	
	CD56	3.37 $\pm$ 1.09	2.78 $\pm$ 1.07 <sup>†</sup>	0.59 $\pm$ 0.28	
	TCR $\gamma\delta$	7.56 $\pm$ 2.09	6.46 $\pm$ 1.72 <sup>†</sup>	1.11 $\pm$ 0.43	
	FoxP3	42.01 $\pm$ 24.54	41.21 $\pm$ 24.40 <sup>†</sup>	0.80 $\pm$ 0.25	
	CD123	8.66 $\pm$ 6.86	8.09 $\pm$ 6.60 <sup>†</sup>	0.57 $\pm$ 0.32	

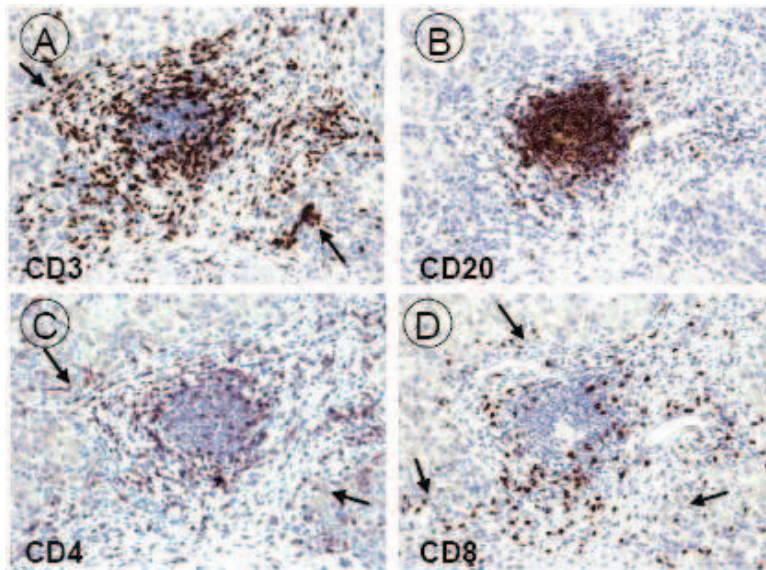
<sup>††</sup> Comparison between total lymphocytes in liver and lymphocytes in tumours (<sup>††</sup> p<0.001).

<sup>†</sup> Comparison between total lymphocytes in liver and lymphocytes in parenchyma (<sup>†</sup> p<0.001).

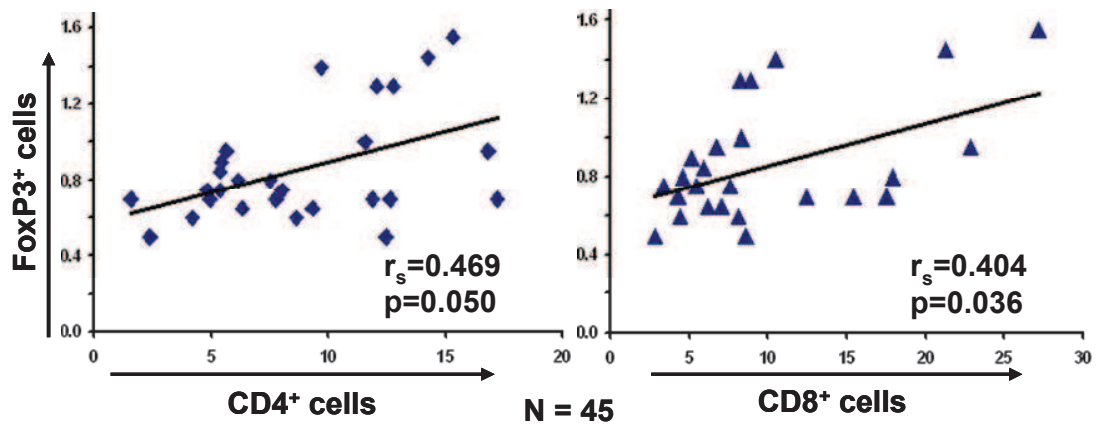
\* Comparison between lymphocytes in parenchyma and lymphocytes in tumour (\* p=0.05).

\*\* Comparison between lymphocytes in parenchyma and lymphocytes in tumour (\*\* p<0.001).

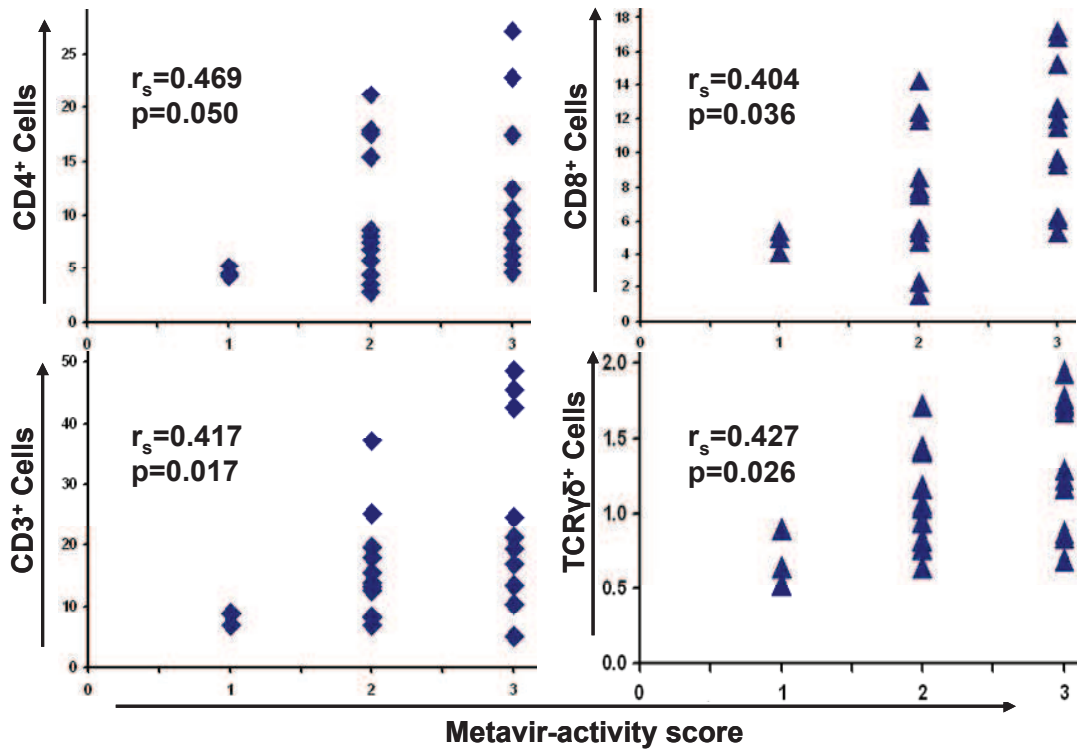




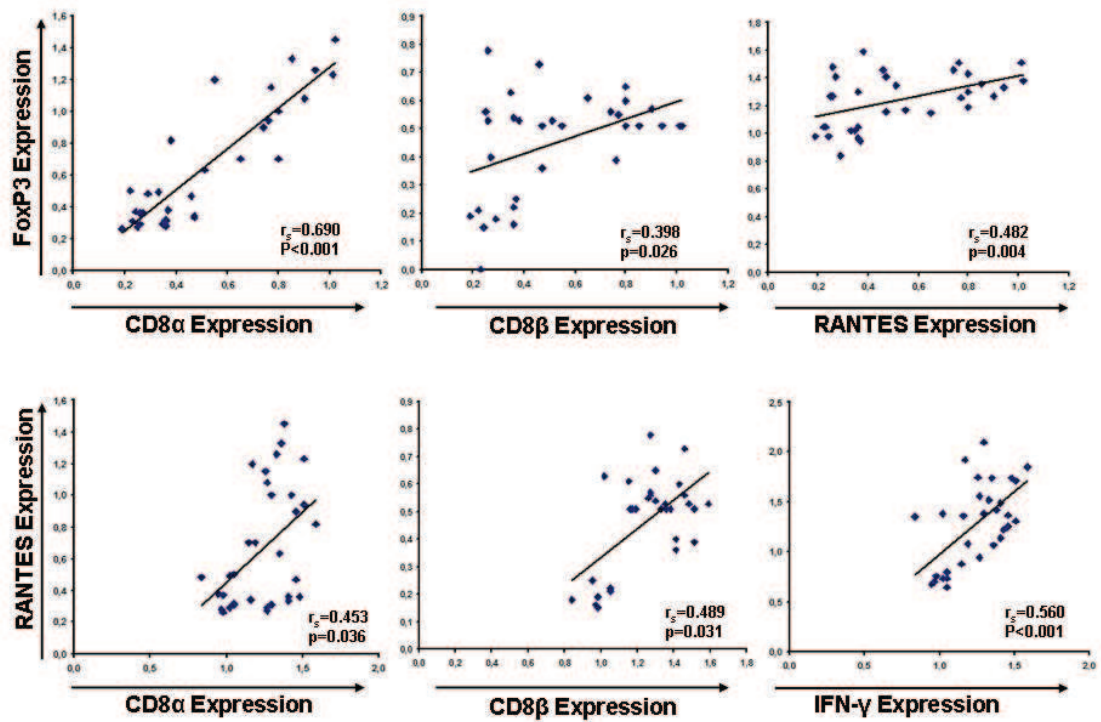
**Fig.1s.** Lymphocyte composition of lymphoid follicles in fibrotic septa in HCC-HCV cirrhotic liver. High numbers of CD20<sup>+</sup> cells are observed in the centre of the follicle (A) surrounded by a zone rich in CD3<sup>+</sup> cells (B). These pericentric CD3<sup>+</sup> cells are primarily CD4<sup>+</sup> cells (C) while CD8<sup>+</sup> cells are mainly localized in the peripheral part of the follicle (D), septa and in piecemeal necrotic areas (arrows indicate foci of piecemeal necrosis).



**Fig.2s.** Correlations of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell with CD4<sup>+</sup> helper (Th) and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T (CTL) cells in cirrhotic parenchymatous areas. Regulatory T cells correlate positively with Th and CTL in parenchymatous areas of both HCC-HCV (cohort-A) and cHCV groups.



**Fig.3s.** Correlations of Metavir-activity score with CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells. Metavir-activity score is positively correlated with T cells (CD3) including T helper (CD4), cytotoxic T cells (CD8) and  $\gamma\delta$ T cells (TCR $\gamma\delta$ ) in parenchymatous areas of both HCC-HCV (cohort-A) and cHCV groups.



**Fig.4s.** Correlations of gene expression in the liver. Expressional levels of FoxP3 correlate positively with CD8α, CD8β and RANTES while RANTES expressional levels correlate with CD8α, CD8β and IFN-γ in the cirrhotic liver of both HCC-HCV (cohort-A) and cHCV groups.

**Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C**

**J Hepatol 2009; 51: 458-467**

P Bonorino, M Ramzan, X Camous, T Dufeu-Duchesne, MA Thélu, N Sturm, A Dariz, C Guillermet, M Pernollet, JP Zarski, PN Marche, V Leroy, E Jouvin-Marche.

**But**

Le VHB et le VHC, principales causes d'hépatite chronique dans le monde, n'ont pas d'effet cytopathique direct et leur persistance semble résulter d'une défaillance des réponses innées et adaptatives du système immunitaire. L'activité des cellules NK, intervenants majeurs de l'immunité innée, est régulée par plusieurs types de récepteurs. Les différentes stratégies virales employées pour contourner ces cellules illustrent leur rôle central dans la réponse précoce de l'hôte contre l'infection virale. Il est clairement établi que la fréquence des cellules NK dans le sang est diminuée chez les patients infectés par le VHC, et de nombreuses études *in vitro* suggèrent que le fonctionnement de ces cellules est altéré au cours des infections chroniques par le VHB et le VHC. Cependant, les résultats sont contradictoires et le débat est ouvert concernant l'existence et l'impact d'un dysfonctionnement des NK sur l'évolution chronique de la maladie. Peu de choses sont connues sur les cellules NK intra-hépatiques. Le but de notre travail était de caractériser les sous-populations de cellules NK présentes au sein du parenchyme hépatique chroniquement infecté par le VHC, en comparaison avec des patients infectés par le VHB et des patients non infectés, de préciser leur localisation, et de corrélérer leur présence aux paramètres biologiques, virologiques et histologiques.

**Matériel et méthodes**

**Patients et matériel:** le matériel d'étude provenait de 28 patients porteurs d'une hépatopathie chronique virale C et de 19 patients porteurs d'une hépatopathie chronique virale B (sang et biopsie hépatique) et de 18 patients "contrôle" non infectés (sang seulement). Les données biochimiques, virologiques et histologiques de chaque patient étaient disponibles.

**Méthodes:** le matériel biopsique était divisé: une partie fixée pour étude histologique conventionnelle (évaluation des scores d'activité et de fibrose selon Métavir) et étude immunohistochimique et une partie fraîche pour étude en cytométrie de flux.

**Analyse en CF :** il s'agissait de l'immunophénotypage des lymphocytes totaux issus des PBMC et des fragments tissulaires frais, sur la base de leur expression CD3 ou CD56 puis CD158a,h CD158b,j NKG2A, perforine.

**Analyse immunohistochimique:** il s'agissait de marquages CD56 et de doubles marquages CD3/CD56 réalisés sur les biopsies des patients, fixées en formol et déparaffinées, avec une immunodétection en trois couches sur l'automate Benchmark XT (Ventana, Tucson, AZ, USA). Les comptages cellulaires étaient réalisés sur une station de morphométrie (LUCIA, Nikon) dans les zones de fibrose, au sein du parenchyme et au sein des lésions nécrotico-inflammatoires, et étaient exprimés en nombre de cellules par 40 champs (X40).

## **Résultats**

En CF, le nombre de cellules CD56+CD3- était significativement réduit dans le sang périphérique et encore davantage dans le tissu hépatique des patients VHC, par rapport aux sujets contrôle ou VHB, et ceci toujours au dépens de la fraction CD56<sup>dim</sup> qui était diminuée alors que la fraction CD56<sup>bright</sup> était augmentée chez les VHC, et alors que les fractions étaient constantes chez les sujets contrôle et VHB.

La fréquence des NKG2A+ était identique dans le sang des patients VHC et des sujets contrôle, alors qu'elle était significativement diminuée chez les patients VHB. Elle était conservée dans le foie des patients VHC alors qu'elle était significativement diminuée dans le foie des patients VHB. Concernant les CD158a,h et les CD158 b,j leur fréquence dans le sang des VHC était identique à celle des VHB et des sujets contrôle. Par contre leur fréquence était significativement diminuée dans le foie des patients VHC par rapport aux VHB.

L'analyse du contenu des cellules CD3-CD56+ intra-hépatiques en perforine montrait que la fréquence des CD56+perforine+ était plus élevée chez les patients VHC que chez les VHB (67% vs 35%) et que 87% des cellules CD56+NKG2A+ étaient perforine+. La proportion de cellules exprimant la perforine parmi les TNK CD56+CD3+ intra-hépatiques représentait moins de 10%.

Chez les patients VHC, le nombre de cellules CD3-CD56+ intra-hépatiques mais pas périphériques décroissait avec le degré d'activité et de fibrose. Le nombre de cellules CD3-CD56<sup>bright</sup>+NKG2A+ périphériques était corrélé à la sévérité de l'activité et de la fibrose et le nombre de cellules CD3-CD56+NKG2A+ périphériques et notamment le sous-type CD3-CD56<sup>dim</sup>+NKG2A+ était inversement corrélé avec la charge virale. Aucune corrélation de ce type n'était observée chez les patients infectés par le VHB.

En IHC, sur une petite série de patients (6 cirrhoses virales C, dont 3 A1 et 3 A3, et 6 cirrhoses virales B appariées), le nombre de lymphocytes totaux intra-hépatiques augmentait en fonction de la gravité des lésions nécrotico-inflammatoires (A1 à A3 selon Métavir) quelle que soit l'étiologie virale mais de manière plus importante dans les foies VHC que VHB, alors que le nombre de cellules CD56+ restait stable quelle que soit l'étiologie virale mais était plus bas dans les foies VHC que VHB. Ceci contribuait à une diminution du rapport CD56/lymphocytes totaux

au cours de l'aggravation des lésions nécrotico-inflammatoires, plus nette dans le VHC que le VHB. Les cellules CD56<sup>+</sup> étaient moins nombreuses dans le parenchyme nodulaire des foies cirrhotiques VHC que VHB. Elles étaient peu présentes au sein des lésions nécrotico-inflammatoires mais y étaient plus souvent observées dans le VHC que dans le VHB. Le nombre de cellules CD56<sup>+</sup> tendait à diminuer au sein des lésions de nécrose parcellaire et de nécrose lobulaire quand l'activité inflammatoire augmentait, chez les patients VHC seulement.

### **Commentaires**

Nos résultats démontrent que les deux virus utilisent des stratégies différentes concernant les populations de cellules NK.

1- L'altération du rapport CD56<sup>dim/bright</sup> dans le VHC pourrait être expliquée par une plus grande susceptibilité des CD56<sup>dim</sup> à l'apoptose dans ces conditions inflammatoires et infectieuses, mais la différence dans la fréquence des cellules NK et dans le rapport<sup>CD56dim/bright</sup> entre les patients infectés par le VHB ou le VHC suggère que le VHC lui-même soit capable d'altérer directement la prolifération et l'activation des cellules NK.

2- L'activation des cellules NK via les récepteurs inhibiteurs de surface est diversement altérée selon le type d'infection virale. Les CD158 étant plus exprimés dans les CD56<sup>dim</sup> que dans les CD56<sup>bright</sup>, leur diminution démontre une fois de plus l'interaction préférentielle du VHC dans le foie avec l'activation/différenciation de la fraction CD56<sup>dim</sup>, connue comme la plus cytotoxique.

3- Même si les cellules NK sont moins nombreuses dans le foie des patients VHC, la majorité des cellules CD3-CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> contient des granules de perforine capables de lyser les cellules infectées et conserve donc son potentiel cytolytique. La forte expression de CD94 (couplé à NKG2A à la surface des CD56<sup>bright</sup>) étant associée à une augmentation de la résistance des cellules NK à la mort cellulaire, on peut penser que l'infection virale C sélectionne une population CD56<sup>bright</sup>NKG2A qui acquiert des propriétés cytotoxiques plus importantes responsables des lésions nécrotico-inflammatoires, et qui est susceptible de représenter un marqueur de l'activité de la maladie inflammatoire chronique.

## Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C<sup>☆</sup>

Paula Bonorino<sup>#</sup>, Muhammad Ramzan<sup>#</sup>, Xavier Camous, Tania Dufeu-Duchesne, Marie-Ange Thélu, Nathalie Sturm, Aurélie Dariz, Christiane Guillermet, Martine Pernollet, Jean-Pierre Zarski, Patrice N. Marche\*, Vincent Leroy, Evelyne Jouvin-Marche

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 823-Equipe IAPC Institut Albert Bonniot, Grenoble Cedex 09, France  
Université Joseph Fourier-Grenoble I, Faculté de Médecine, Institut Albert Bonniot, UMR-U823, Grenoble, France

**Background/Aims:** The fate of intrahepatic NK cell subsets in the course of HCV and HBV infections is not clearly understood.

**Methods:** Blood and intrahepatic CD56<sup>+</sup> NK cell subsets (expressing NKG2A, CD158a,h or CD158b,j receptors) from HCV or HBV patients were quantified by flow cytometry and localized by immunohistochemistry in liver biopsies.

**Results:** A significant reduction in NK cell frequency and a quantitative imbalance between CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> subsets were observed in chronic HCV patients as compared to HBV patients, underlining that the inflammatory environment is not the only cause of these phenomena. The proportions of intrahepatic NK cells expressing either NKG2A, and/or CD158a,h, CD158b,j differed significantly between HCV and HBV patients. A higher frequency of perforin among intrahepatic CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells was observed in HCV compared to HBV patients. Double immunohistochemical staining showed that CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells were localized within necrotic areas. Immune monitoring of circulating CD56 subsets revealed that CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells were positively correlated with the necroinflammatory score and inversely correlated with viral load, respectively, in HCV patients.

**Conclusions:** HCV and HBV affect NK cell subsets according to the status of the diseases, especially CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells, may be of interest for disease monitoring.

© 2009 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Viral hepatitis B, C; NK cells; Intrahepatic lymphocytes

Received 3 April 2009; received in revised form 6 May 2009; accepted 11 May 2009; available online 25 June 2009

Associate Editor: V. Barnaba

<sup>☆</sup> The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding from industry or conflict of interest with respect to this manuscript.

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 76549495; fax: +33 4 76549454.  
E-mail address: Patrice.Marche@ujf-grenoble.fr (P.N. Marche).

<sup>#</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** HCV, hepatitis C virus; HBV, hepatitis B virus; NK, natural killer; NKR, natural killer receptor; PKR, protein kinase R; IRF, interferon regulatory factor; KIR, killer immunoglobulin-like receptor; HLA, human leucocyte antigen; LIR, leucocyte Ig-like receptor; ILT2, Ig-like transcript 2; PN, piecemeal necrosis; LN, lobular necrosis.

### 1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) are preferentially hepatotropic, not directly cytopathic, capable of provoking acute and chronic necroinflammatory liver injury and are the most common causes of liver disease worldwide [1].

The various strategies that many viruses have evolved to evade natural killer (NK) cell effector functions illustrate the central role for these cells in early host defense against viral infections [2,3]. It is known that both HCV and HBV impair human and murine NK cell activity



[4,5]. HCV may inhibit the activation of Interferon Regulatory Factor (IRF) [6] and can interfere with PKR kinase function [7] which can activate NK cells. In the case of HBV, both IRF and PKR appear to mediate signals that modulate viral replication in IRF<sup>(-/-)</sup> or PKR<sup>(-/-)</sup> transgenic mice [8]. In contrast to other viruses, HCV and HBV induce sustained HLA class I expression on infected cells [9,10]. The inhibitory effect of NK cells on HCV replication in cultured human hepatocytes [11] suggests that NK cells might be able to contribute to the control of these infections. In the early phase of HBV infection, the host's response to HBV mediates the activation of NK cells which produce IFN- $\alpha$  and are able to lyse infected cells by TRAIL-mediated death of hepatocytes [12].

Despite multiple studies on the functional potential of NK cells in persistent HCV and HBV infections [13–15], evidence of a role for NK cell defects in these chronic infections remains open to debate. It is established that NK cell frequencies in HCV-infected patients are lower than those observed in the uninfected population [14–16]. According to the surface expression level of CD56, NK cells can be divided into two subsets with important functional distinctions. The vast majority of NK cells displays a moderate level of CD56 (CD56<sup>dim</sup>) with a marked cytotoxicity potential, while, a small proportion harbors a high CD56 expression level (CD56<sup>bright</sup>) having a greater capacity to secrete cytokines [17,18]. Recently, it was reported that the frequency of peripheral blood cytolytic CD56<sup>dim</sup> NK cells is decreased in HCV-infected patients [15]. Less is known about expression of HLA class I specific NK receptors (NKR). NKRs are subdivided into two major families. The first family is composed of killer immunoglobulin-like receptors (KIR), such as CD158 molecules and LIR1/ILT2 (leukocyte Ig-like receptor 1/Ig-like transcript 2) which recognize classical HLA-A, -B and -C class I molecules. The second family includes C type lectin-like molecules, such as, NKG2A that associate with CD94 to form inhibitory heterodimer that recognize non-classical HLA-E molecules.

Here, we have performed flow cytometry analyses and detailed histological studies on liver biopsies to quantify and localize the CD56<sup>+</sup> cells in the different histological areas. Furthermore, we investigated the perforin contents of different NK cells subset as markers of their cytotoxicity. Then, we searched for relationship between NK cells subset distribution and the clinical parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Chronic hepatitis C ( $n = 28$ ) and B patients ( $n = 19$ ) seen in the Grenoble University Hospital between 2005 and 2007, were included

in this study. Their main characteristics were analyzed as previously described [19] and are summarised in Table 1. For immunohistochemical studies, HCV ( $n = 6$ ) and HBV ( $n = 6$ ) patients were classed as have low necroinflammatory grading (Metavir-A1, 3 patients) and high necroinflammatory grading (Metavir-A3, 3 patients) by the French Metavir Scoring System. Blood samples from healthy volunteers ( $n = 18$ ) were obtained from the regional Etablissement Français du Sang (La Tronche, France).

### 2.2. Isolation of intrahepatic cells

Liver biopsies obtained by using 1.5 mm diameter disposable biopsy needles were processed for histopathological examination and immunological analysis. Cells were prepared as described previously [20,21].

### 2.3. Monoclonal antibodies, immunostaining and flow cytometry

The monoclonal antibodies used were anti-CD3 PC7 (UCHT1), anti-CD56 PE (NCAM16.2), and anti-Perforin FITC-conjugated ( $\delta$ G9), from Becton–Dickinson Biosciences (Pont de Claix, France). Anti-CD158a,h+-PE (EB6), anti-CD158b,j-PE (GL183), anti-NKG2A(CD159A)-PE (Z199) were obtained from Beckman Coulter France (Villepinte, France). Immunostaining and flow cytometric analysis were done as described previously [19,22].

### 2.4. Immunohistochemical staining

Single and double CD56/CD3 immunohistochemical staining was performed on an automatic immunostainer (Benchmark XT, Ventana, Tucson, AZ, USA) [19,22]. Briefly, slides were incubated with a

**Table 1**  
Demographic, biochemical and clinical characteristics of chronic HCV and HBV infected patients studied by flow cytometry.

	HCV <sup>+</sup> patients ( $n = 28$ )	HBV <sup>+</sup> patients ( $n = 19$ )
<i>Demography</i>		
Male, $n$ (%)	17 (61%)	10 (53%)
Age (y) <sup>a</sup>	50 (26–64)	38 (17–63)
Plasma viral load (log UI/mL)	6.2 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 1.9
Serum ALT (UI/mL)	73.8 $\pm$ 53.1	42.7 $\pm$ 27.8
<i>Liver histology<sup>b</sup></i>		
Metavir activity score, $n$ (%)	$n = 27^c$	$n = 11^c$
0	0	1 (9%)
1	14 (50%)	6 (55%)
2	9 (32%)	4 (36%)
3	4 (14%)	0
Unknown	1	8
Metavir activity score, $n$ (%)	$n = 28$	$n = 11^c$
0	2 (7%)	3 (27%)
1	12 (43%)	6 (55%)
2	6 (21%)	2 (18%)
3	3 (11%)	0
4	5 (18%)	0
Unknown	0	8

ALAT, alanine amino transferase.

<sup>a</sup> Median (Range).

<sup>b</sup> Number of cases/Total (%).

<sup>c</sup> Note that for technical reasons ( $N^\circ$  of available), the entire set of experiments described could not be performed for every single patient.

primary anti-CD56 antibody (Clone 1B6 Novacastra, Newcastle, United Kingdom), followed by an immunodetection with DAB (diaminobenzidine) I-view Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). CD56<sup>+</sup> cells were counted in 40 randomly selected fields per slide with the help of LUCIA software (Laboratory Universal Computer Image Analysis, version 5.0, Laboratory Imaging, Prague, Czech) at high magnification (400×) [20]. Several parameters were scored separately including total lymphocytes, CD56<sup>+</sup> cells, and association of CD56<sup>+</sup> cells with piecemeal necrosis or lobular necrosis as well as their localization in the fibrotic tissues and in the nodular parenchyma. The numbers of cells were expressed as Unit defined as 40 fields (400×) equivalent of an area of 2.74 mm<sup>2</sup>.

For double immunostaining, antigen retrieval was performed with CC1 basic buffer pre-treatment for 60 min, followed by incubation with the primary anti-CD56 antibody and detected with Ultra-View Diaminobenzidine multimer kit. For CD3 detection, a second CC1 pre-treatment was applied on the same slides followed by incubation with the primary antibody (polyclonal rabbit CD3, 1/100, Dako A0452) incubation with a secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG, 1/750, Jackson Immunoresearch 111-065-003). The detection was done with Ultra-View Alkaline Phosphatase red multimer kit and counterstaining (Conterstain 2) for 5 min.

The non-parametric Wilcoxon, Spearman and Mann–Whitney *U*-tests were performed for comparisons between the groups of patients and controls as previously described [19].

### 3. Results

#### 3.1. Decreased frequency of blood and intrahepatic NK cells in HCV patients

The flow cytometric gating strategy used to identify the different subsets of NK cells is depicted in Fig. 1. Phenotypic analysis of PBMCs from HCV patients demonstrated that the proportion of CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells relative to lymphocyte populations was significantly decreased as compared to healthy donors (8.6% vs 13.3%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2A). Examination of the CD3<sup>−</sup>CD56<sup>dim</sup> and CD3<sup>−</sup>CD56<sup>bright</sup> cells distribution revealed that the frequency of CD3<sup>−</sup>CD56<sup>bright</sup> cells was significantly increased (10.0% vs 6.0%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2B) while the frequency of CD3<sup>−</sup>CD56<sup>dim</sup> cells was significantly reduced (90.0% vs 94.0%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2C) in HCV patients as compared to healthy donors. These results are similar to those described by other investigators [14–16]. No such frequency differences were observed between HBV patients and healthy for either CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells (12.3% vs 13.3%), CD3<sup>−</sup>CD56<sup>bright</sup> cells (6.0% vs 6.0%), or CD3<sup>−</sup>CD56<sup>dim</sup> cells (94.0% vs 94.0%). In HCV patients, the proportion of total intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells appeared dramatically lower than that of their blood counterparts (5.1% vs 8.6%,  $p < 0.005$ ) (Fig. 2A). Again, this feature was not found in HBV patients where the proportion of intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells was similar to that of their blood counterparts (15.2% vs 12.3%, *NS*) and thus significantly higher than that observed in the liver from HCV patients (15.2% vs 5.1%,  $p < 0.005$ ). The low number of intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> cells precluded accurate analysis of the proportion of intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>bright</sup> cells was significantly higher (6.0%

vs 19.5%,  $p < 0.005$ ) than those observed in the peripheral blood while the proportion of intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>dim</sup> cells was significantly lower (94.0% vs 80.5%,  $p < 0.005$ ) than in the peripheral blood (Fig. 2B and C).

#### 3.2. Intrahepatic localization of CD56<sup>+</sup> cells in HCV and HBV patients

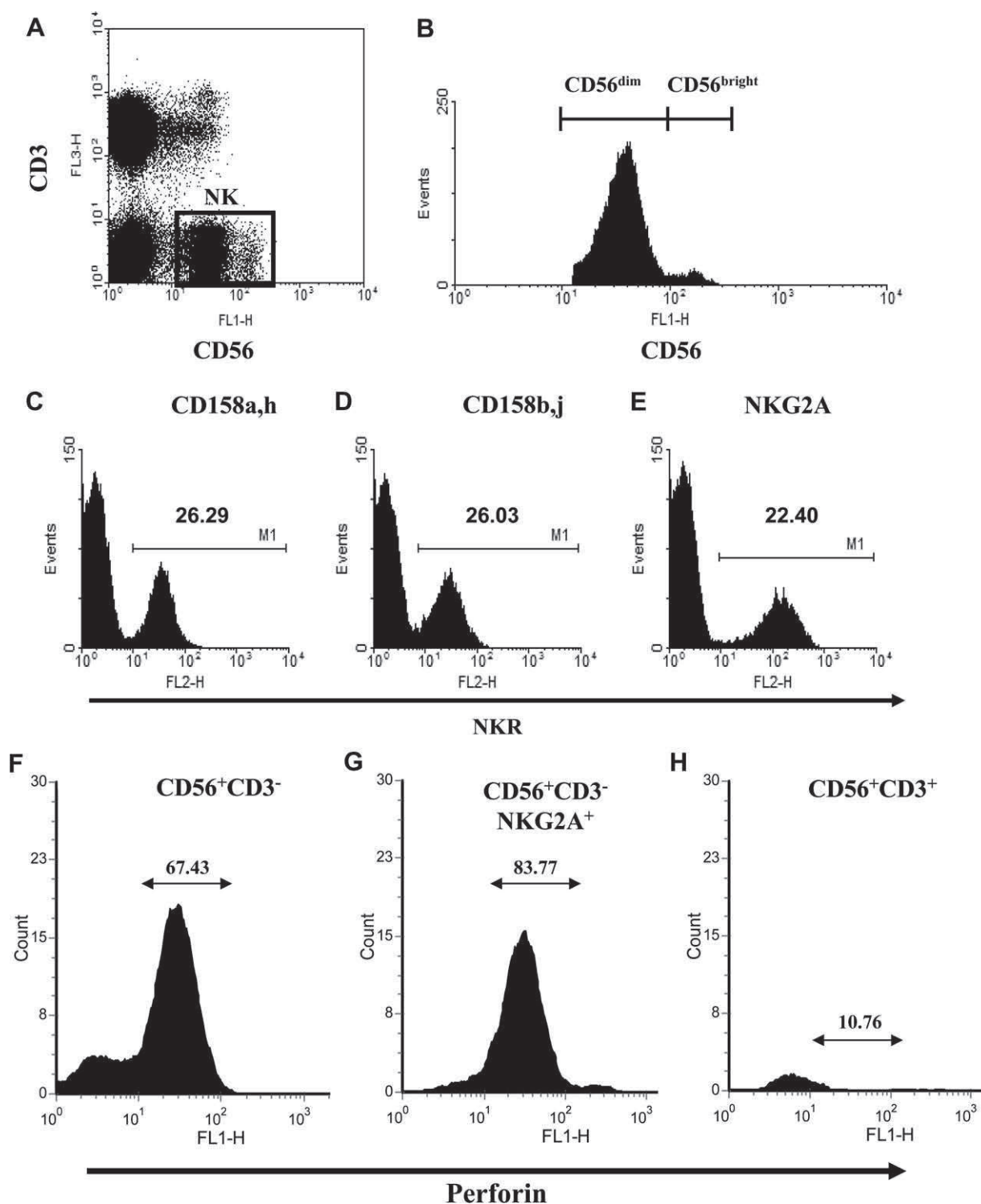
In order to precisely quantify and localise CD56<sup>+</sup> cells in different intrahepatic areas (nodular parenchymatous areas and necroinflammatory lesions) immunohistochemistry was performed. We selected 6 chronic HCV patients with A1 ( $n = 3$ ) and A3 ( $n = 3$ ) Metavir scores and 6 chronic histologically-matched HBV patients. The presence of CD56<sup>+</sup> cells was detected essentially in piecemeal and lobular necrosis (Fig. 3A–D). CD56<sup>+</sup> cell density were significantly lower in the liver of HCV patients compared to HBV patients (69 vs 134 –  $p < 0.05$ ) (Fig. 3E). Strikingly, the density of CD56<sup>−</sup> cells was significantly higher in HCV patients compared to HBV patients (on average 2122 vs 583 cells/U,  $p < 0.005$ ). Thus, the percentage of CD56<sup>+</sup> cells among the total infiltrating immune cells was significantly lower in HCV patients compared to HBV patients (3.6% vs 18.4%,  $p < 0.005$ ).

Considering the localization of CD56<sup>+</sup> cells in the different histological areas, we observed that (i) CD56<sup>+</sup> cells density was significantly lower in parenchymatous areas in HCV patients compared to HBV patients (28 vs 114,  $p < 0.005$ ) (Fig. 3F); and (ii) CD56<sup>+</sup> cell density was low inside the necroinflammatory lesions (piecemeal necrosis and lobular necrosis) in both HCV and HBV patients. However, inside the necroinflammatory lesions, CD56<sup>+</sup> cells were significantly higher in HCV patients as compared to HBV patients (9 vs 2,  $p < 0.005$ ) (Fig. 3G).

In some cases, double immunostaining of CD56 and CD3 cells was investigated in order to distinguish between classical NK cells (CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup>) and cells expressing CD3 and CD56 molecules. We observed numerous CD3<sup>+</sup> lymphocytes (red, Fig. 3H and I) and few CD56<sup>+</sup> cells (brown, Fig. 3H and I) present in the fibrous areas and in necroinflammatory lesions. Orange CD56/CD3 double-stained cells were scarce and observed in the fibrous septa only (Fig. 3H).

#### 3.3. Relationship between blood and intrahepatic CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in necroinflammatory lesions

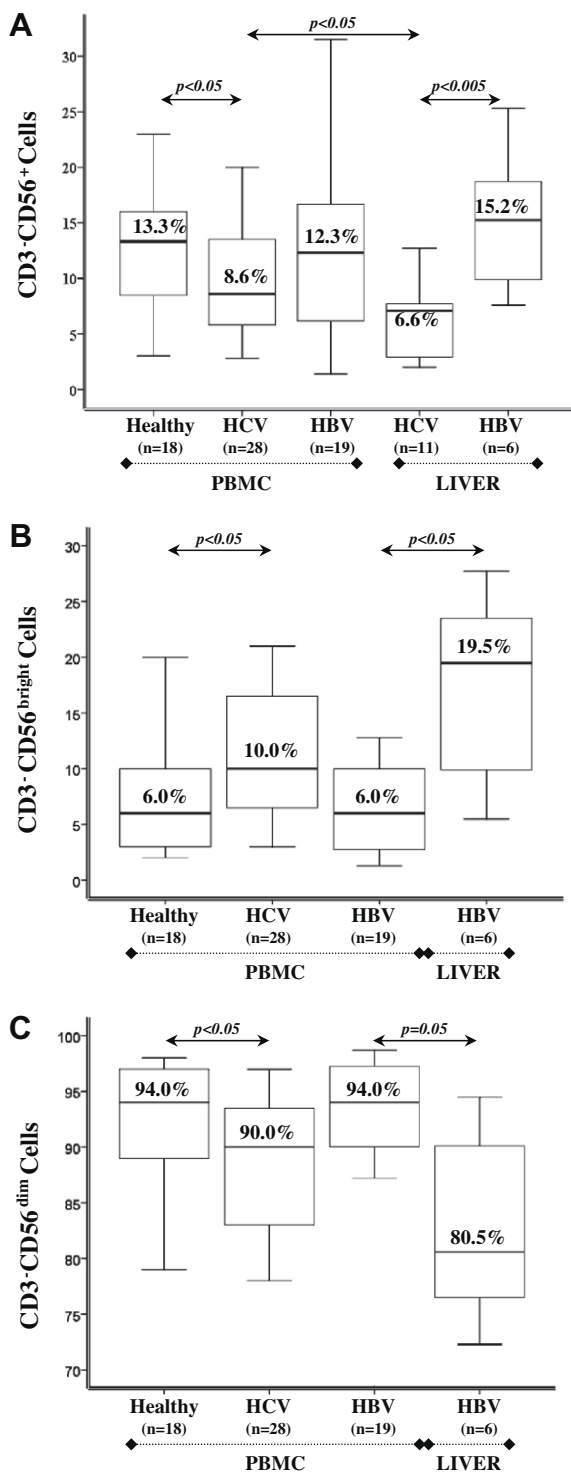
In both HCV and HBV infection, intrahepatic CD56<sup>+</sup> cells density remained constant whatever the necroinflammatory grading (Fig. 3). In contrast, the CD56<sup>−</sup> cell density increased from A1 to A3 Metavir score, in both HCV and HBV patients (Table 2). Thus, the proportion of CD56<sup>+</sup> cells among total lymphocytes decreased from A1 to A3 Metavir in both HCV and HBV groups. The CD56<sup>+</sup> cell density inside the necroinflammatory lesions



**Fig. 1.** Expression of Natural Killer Receptors (NKR) by NK cells. A representative four-color flow cytometry analysis for peripheral blood lymphocytes is shown for a patient chronically infected by the Hepatitis C virus. (A) Dot plot representation of CD3 and CD56 double staining used to estimate the frequency of NK cells (boxed CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>); (B) Histogram of the CD56<sup>+</sup> cells defining the CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>); (C) CD158a,h; (D) CD158b,j and (E) NKG2A expressions, respectively. (F–H) Histogram of the perforin cells in CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (F), CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> (G) and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells (H).

was higher in Metavir-A1 than in Metavir-A3 patients in HCV groups but such difference was not found in HBV groups. With increasing necroinflammatory activity,

CD56<sup>+</sup> cells tended to localize preferentially outside of necroinflammatory lesions in HCV patients. In both groups, peripheral CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells did not



**Fig. 2.** Frequency of blood and intrahepatic NK cells in Chronic HCV or HBV patients. The frequency of (A) NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) (B) CD56<sup>dim</sup> within CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells (C) CD56<sup>bright</sup> within CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells was evaluated by flow cytometry in the blood and/or in liver of healthy, HCV<sup>+</sup> and HBV<sup>+</sup> patients. Data are represented as boxplots showing medians (horizontal lines), upper and lower quartiles (boxes) and extreme values (whiskers).

correlate with any bioclinical parameters including necro-inflammatory grade, ALT serum levels and viral load.

#### 3.4. Analysis of HLA class I specific receptors expression by NK cells

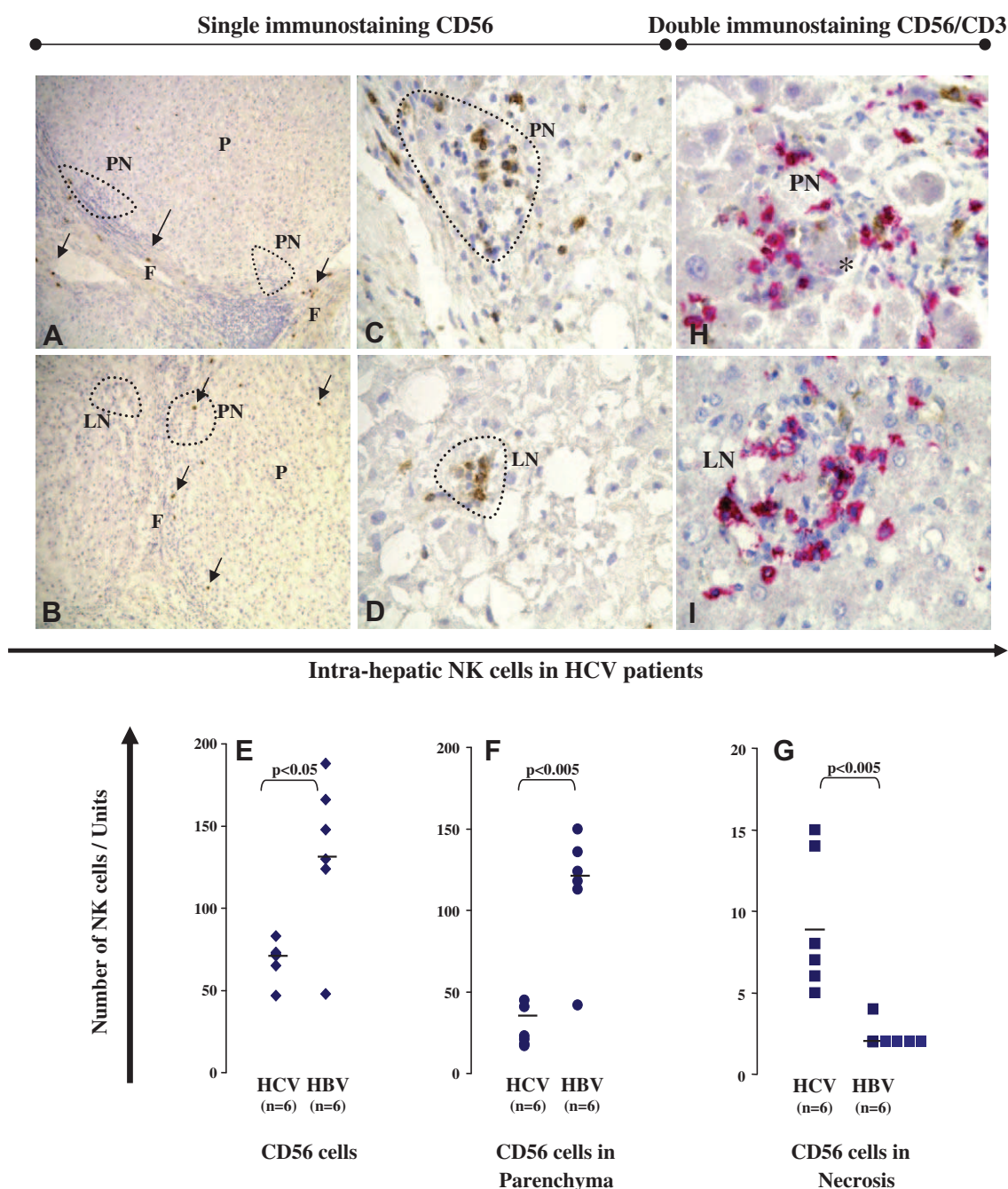
Among blood NK cells, expression of CD158a/h, CD158b/j and NKG2A did not differ between HCV patients and healthy donors. However, we detected a significant decrease of NKG2A<sup>+</sup> expression in HBV patients as compare to HCV patients (54.5% vs 24.7%,  $p < 0.001$ ) and healthy donors (55.4% vs 24.7%,  $p < 0.001$ ) (Fig. 4A).

In HCV patients, the frequencies of both CD158a,h<sup>+</sup> and CD158b,j<sup>+</sup> NK cells were significantly higher among blood lymphocytes relative to the liver infiltrating lymphocytes (mean values: 19.2% vs 7.6% –  $p < 0.001$ , 30.0% vs 15.0%  $p < 0.001$ , respectively) (Fig. 4B and C), whereas NKG2A<sup>+</sup> NK cell frequency was comparable in liver and blood NK cells (58.0% vs 54.5%, *NS*) (Fig. 4A). In contrast, in the liver of HBV patients, the frequency of CD158a,h<sup>+</sup>, CD158b,j<sup>+</sup> and NKG2A NK cells appeared similar to those observed in the blood (mean values: 26.3% vs 27.5% – *NS*, 30.9% vs 28.6% – *NS*, 24.7% vs 26.1% – *NS*, respectively) (Fig. 4B and C).

In HCV patients, the frequency of intrahepatic CD158a,h<sup>+</sup> and CD158b,j<sup>+</sup> NK cells appeared significantly lower than those observed in HBV patients (7.6% vs 27.5%,  $p < 0.001$  and 15.0% vs 28.6% –  $p < 0.005$ , respectively). Inversely, the frequency of intrahepatic NKG2A<sup>+</sup> NK cells was significantly higher in HCV than in HBV patients (58% vs 26.1% –  $p < 0.005$ ). Taken together, our findings revealed striking modifications in the tissue distribution of these NK cell subsets in patients with persistent HCV or HBV infection, in particular: (i) reduced proportions of CD158a,h<sup>+</sup> and CD158b,j<sup>+</sup> liver infiltrating NK lymphocytes among HCV patients, at different stages of the viral infections, even in patients with low Metavir Activity score (data not shown) and, (ii) alterations in intrahepatic NKG2A<sup>+</sup> NK cells in HBV patients (Fig. 4A).

#### 3.5. Analysis of perforin expression among intrahepatic CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells

To provide further insights into the potential cytotoxicity of NK cells, we studied the cellular contents of perforin in intrahepatic CD56<sup>+</sup> cells of 5 HCV patients and 2 HBV patients. In HCV patients, 67.43 ± 6.09% of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells were perforin positive (Fig. 1F), suggesting that a large amount of CD56<sup>+</sup> cells showed a cytotoxic potential. As in HCV patients, NKG2A<sup>+</sup> cells represented the major subset of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells, we investigated their perforin content. These cells (83.77 ± 45.36%) were perforin positive (Fig. 1G) indicating that the subset of NK cells expressing NKG2A marker had the cytolytic potential in HCV-infected patients. Interestingly, the same analysis conducted on



**Fig. 3.** Immunohistochemical detection and quantification of intrahepatic CD56<sup>+</sup> cells in hepatitis C or hepatitis B patients. (A) CD56<sup>+</sup> cells are present in the Fibrotic area (indicated by F and black arrows) of hepatitis C patients without localization in the Piecemeal Necrosis (PN) (Original magnification X100). (B) CD56<sup>+</sup> cells are present in the Fibrotic area and Parenchyma (indicated by P and black arrows) of hepatitis C patients with the localization in Piecemeal Necrosis (Original magnification X100). (C) Localization of CD56<sup>+</sup> cells in the Piecemeal Necrosis (Original magnification 400×) of hepatitis C patients. (D) Localization of CD56<sup>+</sup> cells in the Lobular Necrosis (LN) (Original magnification 400×). (E) Total CD56<sup>+</sup> cells in both groups of patients. (F) CD56<sup>+</sup> cells in Parenchyma in both groups of patients. (G) CD56<sup>+</sup> cells in necrosis (piecemeal and lobular necrosis) in both groups of patients. In (E–G), all the values represent a density of CD56<sup>+</sup> cells/unit area = 2.74 mm<sup>2</sup> and the horizontal bar represents median values. (H) CD3<sup>+</sup> lymphocytes (red) and CD56<sup>+</sup> lymphocytes (brown) are taking part in Parcellar Necrosis, with two CD56 cells in contact with an apoptotic body (asterisk, objective × 40). (I) CD3<sup>+</sup> lymphocytes (red) and CD56<sup>+</sup> lymphocytes (brown) inside a lobular necrosis (objective × 40).

HBV patients revealed that only 35.48 ± 22.17% of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells were perforin positive. The low frequency of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> in HBV patients impedes accurate quantification perforin-expressing

cells. In parallel, in HCV patients, the analysis of intrahepatic cells selected for the expression CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> and perforin revealed that the proportion of perforin positive cells was low (less than 10%). These results were

Table 2

Expression of CD56<sup>+</sup> cells by immunohistochemistry among cirrhosis C and B patients with Low necroinflammatory grading (Metavir-A1, *n* = 3) and High necroinflammatory grading (Metavir-A3, *n* = 3) according to the French Metavir score System.

	Cirrhosis C		Cirrhosis B	
	Metavir A1 <i>n</i> = 3	Metavir A3 <i>n</i> = 3	Metavir A1 <i>n</i> = 3	Metavir A3 <i>n</i> = 3
CD56 <sup>+</sup> cells	68	69	134	134
Total	1501	2744	531	635
Lymphocytes				
CD56 <sup>+</sup> cells/ Lymphocytes (%)	4.6	2.6	20.3	16.4
CD56 <sup>+</sup> cells in Parenchyma	36	19	129	99
CD56 <sup>+</sup> cells outside Necrosis	55	63	132	131
CD56 <sup>+</sup> cells inside Necrosis	12	6	2	3

All parameters were expressed as/Unit – 1Unit = 40 fields (400×) = 2.74 mm<sup>2</sup>.

in agreement with our previous report indicating that the proportion of perforin positive cells among blood CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells was reduced in HCV patients (Fig. 1H) [19].

### 3.6. Analysis of the frequencies of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells subsets with clinical parameters in HCV and HBV patients

First, we analyzed the correlation between intrahepatic and peripheral CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells according to activity or fibrosis in HCV or HBV infected patients. In HCV patients, negative correlations were observed between intrahepatic CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells and Metavir Activity ( $r = -0.579$ ,  $p = 0.006$ ) or Metavir Fibrosis ( $r = -0.547$ ,  $p = 0.010$ ). More specifically, the frequencies of intrahepatic CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells decreased with increased Metavir activity (Fig. 5A) (A1/A3- $z = -2.386$  –  $p = 0.016$  or A2/A3- $z = -2.148$  –  $p = 0.030$ ) and Metavir fibrosis scores (Fig. 5B) (F0/F2,  $z = -1.890$ ,  $p = 0.073$ ). Such correlations were not observed in peripheral cells in HCV patients and in peripheral or intrahepatic cells in HBV patients.

Second, we found that the percentage of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells with NKG2A expression was positively associated with the severity of both necroinflammation ( $r = 0.545$ ,  $p < 0.01$ ) and fibrosis ( $r = 0.454$ ,  $p < 0.05$ ) in HCV patients. Moreover, the number of blood CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells increased also with the severity of disease in these patients. Indeed, positive correlations were observed between these peripheral cells and Activity (A1/A3- $z = 2.550$ ;  $p = 0.008$  and A2/A3- $z = 2.472$ ;  $p = 0.011$ ) (Fig. 5C) and also with fibrosis (F1/F3- $z = 1.927$ ;  $p = 0.052$  and F1/F4- $z = 1.974$ ;  $p = 0.051$ ) (Fig. 5D). It is important to note that the correlations mentioned

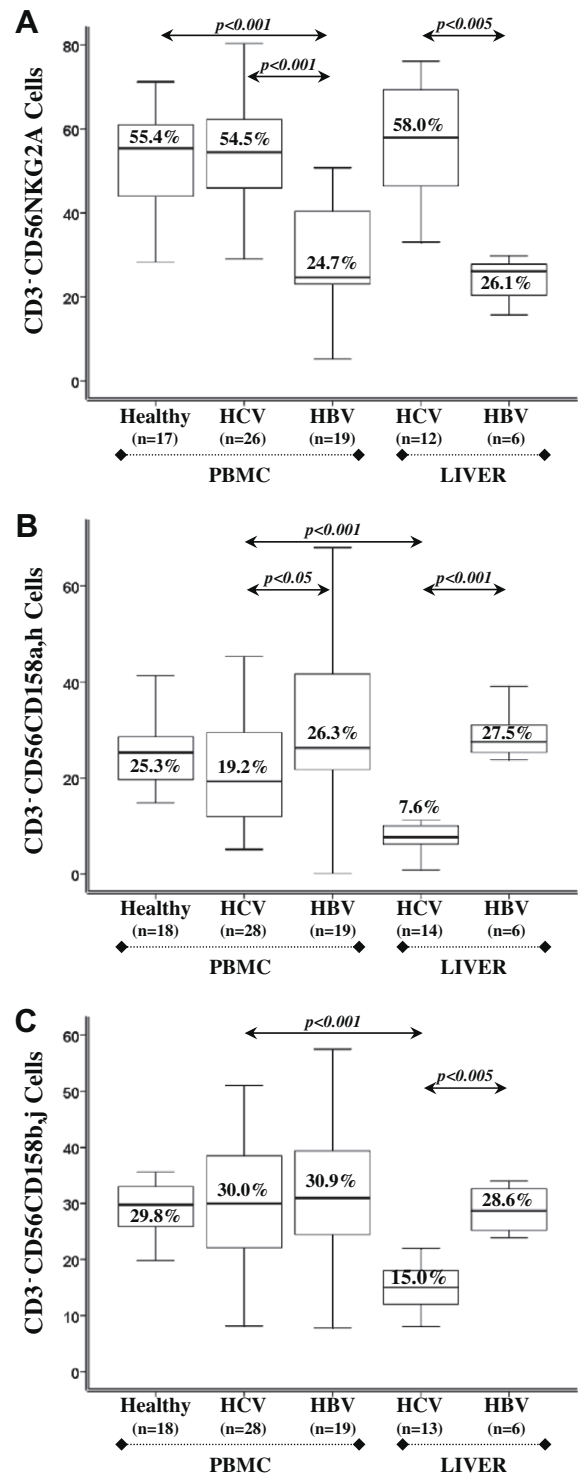


Fig. 4. Frequency of NK<sup>+</sup> cells within the total NK population (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). The frequency of (A) NKG2A<sup>+</sup>, (B) CD158a,h<sup>+</sup> and (C) CD158b,j<sup>+</sup> cells within the total NK cells population (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) was analyzed in blood lymphocytes for healthy control, HCV<sup>+</sup> and HBV<sup>+</sup> patients and in intrahepatic lymphocytes for HCV<sup>+</sup> and HBV<sup>+</sup> patients by the flow cytometry.

above between the subsets of NK cells and severity of disease, were not found in the case of HBV patients.

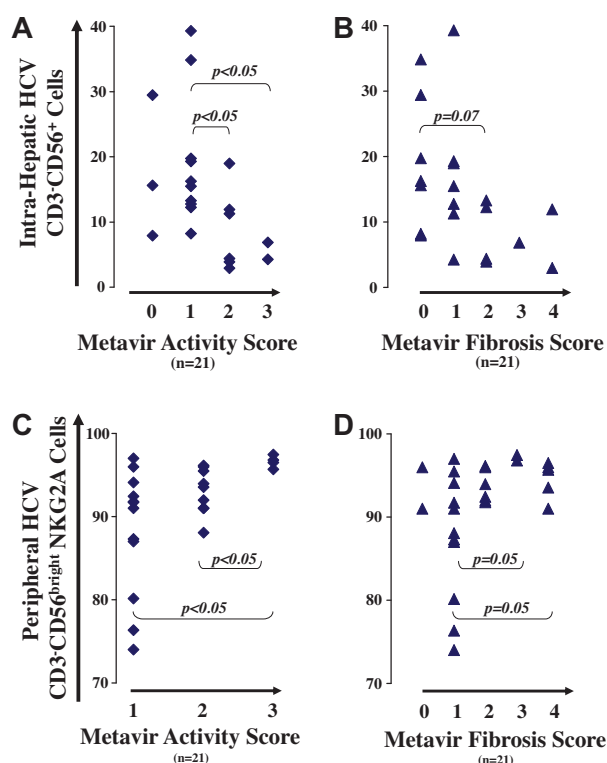


Fig. 5. Correlation between intrahepatic CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells and peripheral CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells according to the Metavir Activity Score and Metavir Fibrosis Scores in chronic Hepatitis C patients. Wilcoxon statistical tests were performed between intrahepatic CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells and Metavir Activity (A), Metavir Fibrosis (B). Same analysis between peripheral CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A cells and Metavir Activity (C), or Metavir Fibrosis (D).

Concerning HCV patients, we observed a negative association ( $r = -0.540$ ,  $p < 0.01$ ) between the frequency of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells and the serum viral load (Fig. 6A). This comparable negative correlation was also detectable in these patients when the analysis was restricted to the blood CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> subset ( $r = -0.441$ ,  $p < 0.05$  (Fig. 6B). In HBV-infected patients, we did not observe any correlation between viral load and peripheral NK cell subsets. However, in the six HBV-infected patients in whom viral load and intrahepatic flow cytometric data were available, a negative correlation between CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> and viral load ( $r = -0.900 - p < 0.05$ ) was found.

#### 4. Discussion

Our data confirm a significant reduction in NK cell frequency and a quantitative imbalance of the CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> subsets within the total NK cell population in HCV- and HBV-infected patients [14,16]. In HCV infections, under proinflammatory conditions, it has also been reported that CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells are more susceptible to apoptosis compared to CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells,

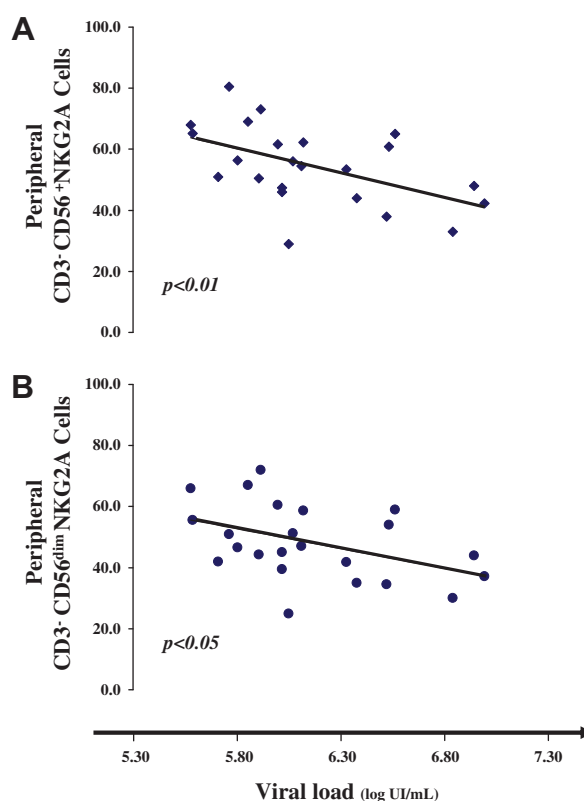


Fig. 6. Correlation between CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells and viral load from PBMCs of HCV<sup>+</sup> Patients. Spearman statistical tests were performed between viral load and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells (A) or CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells (B).

under inflammatory conditions and that this can contribute to altered maintenance of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells in infectious diseases [23]. In healthy individuals, there are clearly more apoptotic, activated CD56<sup>dim</sup> cells among blood NK cells compared to their CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> counterparts thereby suggesting that a differential susceptibility to cell death is a natural feature of these two subsets [13]. Here, neither decreases of CD56<sup>+</sup> cell numbers nor differences in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>/CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> ratios were observed in HBV patients, thereby suggesting that the pro-inflammatory environment is not sufficient to explain the altered CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>/CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> ratio in the HCV group. The clear differences in NK cell frequencies and the expression of differential CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>/CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> ratio in both viral infections strongly supports that HCV itself may be able to alter significantly the activation, proliferation of NK cells [4,5,24].

The examination of perforin contents in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells in both pathologies show a striking difference: CD56<sup>+</sup> cells in HCV patients are enriched in perforin whereas in HBV patients a low number of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup> cells are observed. Thus, in HCV patients the frequencies of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells are lower than in HBV patients, but these CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells contain more cytolytic proteins which are able to lyse

the infected cells. One can hypothesize that HCV may be able to negatively regulate proliferation and differentiation of CD56<sup>+</sup> cells but not their toxicity.

NK cell activation may be impaired and/or prevented by cell surface inhibitory receptors expressed by NK cells [25]. We did not observe any significant change in the frequencies of both CD158a,h<sup>+</sup> and CD158b,j<sup>+</sup> cells in the blood of HCV and HBV patients as depicted by others in patients with chronic HCV and hepatocellular carcinoma [16,26]. Instead, we report a strong alteration in the frequencies of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells expressing CD158a,h<sup>+</sup> or CD158b,j<sup>+</sup> in the liver of HCV patients but not in HBV patients. The role of these subsets of NK cells in the liver has not been clearly determined, although they represent a significant proportion of intrahepatic NK cells in healthy donors [26]. As the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD158a,h<sup>+</sup> and CD158b,j<sup>+</sup> are more expressed in CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> than in CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> [16,17] the decrease of these subsets in the liver of HCV patients, again underlines that HCV may interfere with the activation/differentiation of intrahepatic CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> cells subset which is generally more cytotoxic. In type 2 transmembrane proteins, no significant change in the frequencies of liver infiltrating NKG2A<sup>+</sup> cells were detected in HCV patients, whereas they are significantly reduced in the blood and liver compartments of HBV patients. Taken together, our results suggest that both viruses differentially interfere with NK cell homeostasis. This point requires further analysis in particular by investigating additional receptors for each family to determine if the viruses have a tropism for one or another of these receptors.

Statistical analysis indicates that the peripheral CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells are positively correlated with necroinflammatory activity score in HCV patients but not HBV patients. It has been reported that NKG2A expression correlates with CD94 and that high levels of CD94 expression (a well established feature of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK cells) is associated with an enhanced resistance of NK lymphocytes to cell death [27]. One can argue that under constant HCV-mediated inhibition combined to cell–cell interaction(s) and/or local cytokine production a level of selective persistence/retention of specific intrahepatic NK cell subsets lose the ability to undergo differentiation beyond the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> stage but acquire higher cytotoxic activity.

This hypothesis is supported by our data showing that the frequency of intrahepatic CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> cells in HCV patients is higher than the equivalent counterpart in HBV patients. In summary, our analysis indicates that a high necroinflammatory activity score is associated to a high frequency of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells in the peripheral blood of HCV patients. We thus propose that the quantitative assessment of the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> NK

cell subpopulation has potential for incorporation to current grading schemes of persistent HCV infection.

Interestingly, we found a negative correlation between CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells and viral load in HCV and HBV patients. To pin-point this correlation, we observed that the viral load was correlated negatively with CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells subset. Taking into account that (i) CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells represent half of the CD56<sup>+</sup>NK cells and, (ii) as we discussed above that HCV tends to control negatively the frequency of CD56<sup>+</sup> NK cells during chronic infection, it is not surprising that in patients with a high level of virus (HCV), the frequency of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells is low. In the 6 HBV patients, we observed a high decrease of CD56<sup>+</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells and a negative correlation between viral load and intrahepatic CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells or CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells. Taken together, these data suggest that both viruses have tropism to NKG2A expressing CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> cells subset.

Finally, our analyses identify two subsets of NK cells with potential as new markers for disease grading in HCV infection. First, the frequency of circulating CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells is correlated with high score of necroinflammatory activity and second, the frequency of circulating CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> cells which is negatively correlated with viral load in both infections. In addition, differential CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>/CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> ratios and frequency of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> subsets in the liver of HCV and HBV patients highlighted that both viruses may use some different strategies to target immune system.

#### Acknowledgements

We are grateful to the patients who enrolled in this study for their cooperation. This work was supported by grants from INSERM, from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida (ANRS) and from Pole de compétitivité LyonBiopole. P.B. was supported by ANRS; M.R. from Higher Education Commission of Pakistan and X.C. by Région-Rhône Alpes “Cluster 10”. The authors thank Dr. Mary Callanan for reading this manuscript.

#### References

- [1] Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23–61.
- [2] Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225–274.
- [3] Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol* 2002;3:1006–1012.
- [4] Crotta S, Stilla A, Wack A, D’Andrea A, Nuti S, D’Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35–41.



- [5] Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43–49.
- [6] Foy E, Li K, Wang C, Sumpter Jr R, Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145–1148.
- [7] Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107–110.
- [8] Guidotti LG, Morris A, Mendez H, Koch R, Silverman RH, Williams BR, et al. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2617–2621.
- [9] Herzer K, Falk CS, Encke J, Eichhorst ST, Ulsenheimer A, Seliger B, et al. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 2003;77:8299–8309.
- [10] Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 1990;64:4025–4028.
- [11] Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004;76:1171–1179.
- [12] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007;204:667–680.
- [13] Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, et al. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004;137:408–416.
- [14] Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, et al. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2005;79:12365–12374.
- [15] Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006;43:573–580.
- [16] Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008;57:1121–1128.
- [17] Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146–3151.
- [18] Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3121–3127.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, et al. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol* 2005;175:6852–6860.
- [24] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938–941.
- [25] Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 1997;155:135–144.
- [26] Yuen MF, Norris S. Expression of inhibitory receptors in natural killer (-)CD56(+) cells and CD3(+)CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Immunol* 2001;101:264–269.
- [27] Gunturi A, Berg RE, Forman J. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol* 2003;170:1737–1745.

**Natural cytotoxic functions of *in situ* intra-hepatic natural killer cells are not affected in chronic viral infections**

E Fugier, MA Thelu, A Dariz, T Dufeu-Duchesne, N Vancampenhout, V Leroy, JP Zarski, N Sturm, PN Marche, E Jouvin-Marche

**But**

Bien qu'il soit établi que le nombre des NK est diminué dans les tissus hépatiques au cours de l'infection chronique par le VHC, une potentielle action suppressive du VHC sur leurs fonctions (activation, potentiel cytotoxique, production de cytokines) est toujours débattue, la majorité des études étant réalisées *in vitro* et/ou sur des NK périphériques et ne reflétant pas la situation *in situ*. Peu de données sont disponibles concernant l'expression des récepteurs activateur ou inhibiteur des cellules NK. Nous proposons dans ce travail de réaliser une étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK intrahépatiques *ex vivo* à partir de biopsies hépatiques fraîches de patients infectés par le VHC, en présence ou absence de stimulation et de comparer les résultats avec ceux de patients non infectés ou infectés par le VHB.

**Matériel et méthodes**

**Patients et matériel:** le matériel d'étude provenait de 50 patients porteurs d'une hépatite chronique virale C et de 22 patients porteurs d'une hépatite chronique virale B avec une atteinte inflammatoire et fibreuse modérée A0-A2/F0-F2 selon Métavir afin d'obtenir un nombre correct de cellules NK (sang et biopsie hépatique) et d'un groupe contrôle constitué de 31 patients non infectés porteurs d'une NAFLD modérée (biopsie hépatique seulement) et de 17 patients non infectés (sang seulement).

**Méthodes:** le matériel biopsique était divisé: une partie fixée pour étude histologique conventionnelle (évaluation des scores d'activité et de fibrose selon Métavir pour les VHC et VHB ou équivalent Métavir pour les stéatopathies) et étude immunohistochimique et une partie fraîche pour étude en CF.

**Analyse en CF:** il s'agissait de l'immunophénotypage des lymphocytes totaux issus des PBMC et des fragments tissulaires hépatiques frais, sur la base de leur expression CD3 et/ou CD56 pour déterminer les populations T, TNK et NK puis de leur expression NKG2A, NKG2C, NKG2D, CD107a, IFN- $\gamma$ , perforine (cytomètre en flux BD LSRII, BD Biosciences, analyse avec le programme FCS Express V3). Ces analyses ont été réalisées *ex-vivo* de manière systématique

sur tous les patients. Une étude de l'activité de dégranulation suivant l'exposition aux cellules K562 a été réalisée sur les NK périphériques et intra-hépatiques de 26 VHC, 16 VHB et 27 NAFLD/17 sujets sains en utilisant le marqueur de dégranulation CD107a. Une étude de la production d'IFN- $\gamma$  a été réalisée avant/après une phase de stimulation de 12 heures par un cocktail de cytokines IL-12/IL-18 sur les NK intra-hépatiques de 8 VHC, 4 VHB et 4 NAFLD.

**Analyse immunohistochimique** : il s'agissait de marquages perforine et de doubles marquages CD3/perforine et CD56/perforine réalisés sur les biopsies hépatiques de 4 patients VHC et de 3 patients NAFLD, fixées en formol et déparaffinées, avec une immunodétection en trois couches sur l'automate Benchmark XT (Ventana, Tucson, AZ, USA).

## **Résultats**

Le nombre de NK intra-hépatiques CD3-CD56+ était moins important chez les patients VHC et VHB que chez les non infectés (NAFLD), avec une diminution plus significative pour les VHC. La proportion de cellules NK exprimant NKG2D activateur, NKG2A inhibiteur, NKG2C activateur était identique dans le foie des patients VHC (respectivement 93%, 61%, 4%), VHB et NAFLD et n'était pas significativement différente des proportions observées au niveau périphérique dans les groupes VHC (respectivement 85%, 58% et 3%), VHB et sujets sains. La présence d'une population minoritaire de cellules exprimant à la fois NKG2A et NKG2C était détectée dans les mêmes proportions dans les trois groupes VHC, VHB, NAFLD (respectivement 1,9%, 1,7% et 2,3%) mais moins fréquemment dans le sang des patients VHC et VHB (0,5%).

De manière spontanée, les cellules NK intra-hépatiques provenant de 24 VHC, 6 VHB et 4 NAFLD n'exprimaient pas IFN- $\gamma$ , alors que 3% des cellules NKT provenant des mêmes foies VHC exprimaient IFN- $\gamma$ . Approximativement 50% des NK intrahépatiques des trois groupes exprimaient la perforine (18 VHC, 3 VHB et 8 NAFLD) et approximativement 5% exprimaient CD107a dans les trois groupes (26 VHC, 12 VHB et 27 NAFLD). Les résultats étaient globalement identiques pour les NK périphériques des trois groupes, en dehors de l'expression de CD107a qui était basse dans les trois groupes (<1%) et significativement plus basse que dans le foie des patients VHB et VHC.

Sous stimulation *ex-vivo* par les cytokines IL-12 et IL-18, les cellules NK intra-hépatiques exprimaient IFN- $\gamma$  dans les trois groupes (moyenne de 3,2% chez 8 VHC, 1,9% chez 4 VHB et 1,1% chez 4 NAFLD testés).

Sous stimulation *ex-vivo* courte (12h) par des cellules K562, le nombre de cellules NK intra-hépatiques et périphériques CD107a+ augmentait de manière significative dans les 3 groupes. Leur fréquence après stimulation dans le sang n'était pas différente entre les 3 groupes. Leur fréquence dans le foie après stimulation n'était pas non plus significativement différente

dans les 3 groupes mais elle était au moins triplée dans 60% des VHC, 50% des VHB et 40% des NAFLD. Après stimulation, il existait une différence significative entre le nombre de cellules NK CD107a+ dans le foie et dans le sang des patients VHC ( $p=0,01$ ), limite chez les patients VHB ( $p=0,06$ ). Dans les 3 groupes, alors que le nombre de cellules NKG2A+ et NKG2C+ intra-hépatiques et périphériques restait inchangé après stimulation, le nombre de NKG2D+ diminuait significativement, de manière plus importante chez les VHC que dans les deux autres groupes. Le processus de dégranulation des NKG2A+ après stimulation était également augmenté de manière significative et dans les mêmes proportions pour les trois groupes.

L'étude immunohistochimique montrait que les cellules perforine+ étaient présentes dans les deux groupes, essentiellement isolées dans les lobules et rares au sein des lésions nécrotico-inflammatoires ou dans la fibrose. Sur les doubles marquages étagés, ces cellules étaient CD3-/perforine+ et CD56+/perforine+, correspondant vraisemblablement à des cellules NK, avec un marquage perforine nettement polarisé, telles des cellules sentinelles prêtes à dégranuler et à exercer leur fonction lytique sur les hépatocytes infectés.

### **Commentaires**

1- Les cellules NK intra-hépatiques des patients VHC arborent autant de récepteurs activateurs ou inhibiteurs à leur surface que celles des patients VHB ou des patients non infectés. Des récepteurs inhibiteurs et activateurs peuvent être co-exprimés à la surface de cellules NK intra-hépatiques.

2- Les cellules NK intra-hépatiques ne produisent pas d'IFN- $\gamma$ , mais 50% d'entre elles sont chargées de grains de perforine et 5% d'entre elles montrent une activité de dégranulation, quel que soit le groupe étudié. La seule différence observée entre les NK périphériques et intra-hépatiques est une activité de dégranulation plus basse pour les NK périphériques soulignant que ce processus se déroule essentiellement dans le foie des patients infectés.

3- En présence d'un cocktail approprié de cytokines, les cellules NK intra-hépatiques sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$ , à des niveaux globalement similaires entre les patients infectés par le VHC ou le VHB et les patients non infectés NAFLD, donc indépendamment d'un contexte viral et notamment de la présence du virus C. Les cellules NK sont aptes à reconnaître des cellules cibles K562 déficientes en CMH de classe I. Sous stimulation, le nombre de cellules NK en capacité de dégranuler augmente de manière quasi similaire dans les trois groupes et donc indépendamment du contexte viral. L'importance du processus de dégranulation semble plus important dans le groupe VHC, suggérant que les NK des patients infectés sont en capacité maximale de dégranulation avant stimulation, peut-être en raison d'une sur-exposition des récepteurs activateurs à leurs ligands. Ces données démontrent que dans un contexte d'infection chronique, notamment virale C, les fonctions effectrices des cellules NK sont actives ou

activables, que des cellules NK supplémentaires peuvent être recrutées et que leur flexibilité dans la balance d'expression des récepteurs activateur ou inhibiteur n'est pas altérée par le virus.

**Natural cytotoxic functions of in situ intra-hepatic natural killer cells are not affected in chronic viral infections**

Journal:	<i>Hepatology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fugier, Emilie; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine Thélu, Marie- Ange; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine; CHU-Grenoble, Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie Dariz, Aurélie; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine Dufeu-Duchesne, Tania; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine; CHU-Grenoble, Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie Vancampenhout, Nicolas; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine Leroy, Vincent; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine; CHU-Grenoble, Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie Zarski, Jean-Pierre; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine; CHU-Grenoble, Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie Sturm, Nathalie; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine Marche, Patrice; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine Jouvin-Marche, Evelyne; INSERM, U823; Université Grenoble, Faculté de Médecine
Keywords:	Hepatitis C Virus, Hepatitis B Virus, Liver, Cytotoxicity, Natural Killer cells Receptors

22/03/2011

1

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

# Natural cytotoxic functions of *in situ* intra-hepatic natural killer cells are not affected in chronic viral infections.

Emilie Fugier<sup>1,2\*</sup>, Marie Ange Thélou<sup>1,2,3\*</sup>, Aurélie Dariz<sup>1,2</sup>, Tania Dufeu Duchesne<sup>1,2,3</sup>,  
Nicolas Van Campenhout<sup>1,2</sup>, Vincent Leroy<sup>1,2,3</sup>, Jean-Pierre Zarski<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Sturm<sup>1,2</sup>,  
Patrice N. Marche<sup>1,2</sup> and Evelyne Jouvin-Marche<sup>1,2</sup>

1- INSERM, U823, Grenoble, F-38042, France

2- Université Joseph Fourier, UMR-S823, F-38042, France

3- CHU-Grenoble, Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, F-38043, France

[Emilie.Fugier@ujf-grenoble.fr](mailto:Emilie.Fugier@ujf-grenoble.fr); [Marie-Ange.Thelu@ujf-grenoble.fr](mailto:Marie-Ange.Thelu@ujf-grenoble.fr); [Aurelie.Dariz@ujf-grenoble.fr](mailto:Aurelie.Dariz@ujf-grenoble.fr); [Tania.Dufeu-Duchesne@ujf-grenoble.fr](mailto:Tania.Dufeu-Duchesne@ujf-grenoble.fr); [Nicolas.Vancampenhout@bvra.e.ujf-grenoble.fr](mailto:Nicolas.Vancampenhout@bvra.e.ujf-grenoble.fr); [VLeroy@chu-grenoble.fr](mailto:VLeroy@chu-grenoble.fr); [JPZarski@chu-grenoble.fr](mailto:JPZarski@chu-grenoble.fr); [NSturm@chu-grenoble.fr](mailto:NSturm@chu-grenoble.fr); [Patrice.Marche@ujf-grenoble.fr](mailto:Patrice.Marche@ujf-grenoble.fr); [Evelyne.Marche@cnrs-dir.fr](mailto:Evelyne.Marche@cnrs-dir.fr).

\*EF and MAT have contributed equally to this work

**Keywords:** Hepatitis C Virus; Hepatitis B Virus; Liver; Cytotoxicity; Natural Killer cells Receptors.

22/03/2011

2

1  
2  
3 **Corresponding author: Patrice MARCHE**, Equipe Immunologie Analytique des Pathologies  
4  
5 Chroniques, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble cedex 09, Mail: [patrice.marche@ujf-grenoble.fr](mailto:patrice.marche@ujf-grenoble.fr),  
6  
7 Phone: +33 (0) 476 54 94 95, GSM: +33 (0) 670 16 53 52, Fax : +33 (0) 476 54 94 13.  
8  
9

10  
11 **Abbreviations used in this paper:** IFN, interferon; NAFLD, non alcoholic fatty liver  
12  
13 disease; NK, natural killer cells; NKR, natural killer receptor; NKT, natural killer T  
14  
15 lymphocytes; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.  
16  
17

18  
19  
20  
21 **Fundings:** This work was supported by institutional Grants from Institut National de la Santé  
22  
23 et de la Recherche Médicale (INSERM) and by a specific grant from the Agence Nationale  
24  
25 pour la Recherche sur le Sida (ANRS), (n°AO 2009 - 2, CSS7). EF received financial support  
26  
27 from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); AD from ALPHA VAC of the  
28  
29 “Pôle de Compétitivité Lyon Biopole”, and NVC was the recipient of a grant from the Rhône-  
30  
31 Alpes region Cluster 10 “Infectiologie”.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



22/03/2011

3

**Abstract:**

The effect of hepatitis C virus (HCV) on innate immune cells in chronically HCV-infected patients is a subject of debate. The data reported in the literature were derived from studies using peripheral blood or *in vitro* assays. Here, we directly explored cytotoxic and cytolytic activities of NK cells in HCV-infected liver and compared them to non-infected liver. Fifty chronically HCV-, 22 HBV-infected patients (grade/stage A0/A2-F0/F2), and 31 non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) individuals (equivalent grade/stage A0/A2-F0/F2) were studied using both peripheral and intra-hepatic NK phenotypic and functional assays. Phenotype analysis on activating or inhibitory NKG2 family receptors expression on the surface of peripheral and intra-hepatic NK cells indicated no major differences in the three cohorts of patients. In contrast, functional activity analysis showed that intra-hepatic NK cells and not circulating NK cells are under degranulation process. Upon *ex vivo* stimulation (either cytokines cocktail or K562 target cells), NK cells from each groups of patients reacted similarly (production of IFN- $\gamma$  and increase of degranulating intra-hepatic NK cells). Taken together, these results indicate that intra-hepatic NK cells from chronically infected patients were reactive. Moreover they have same functional features than NK cells extracted from a non infectious environment. **Conclusion:** Our study highlights that, within the human liver, persistent stimulation due to HCV presence coupled with commensurate inhibitions result in a sustained NK cells responsiveness.

22/03/2011

4

**Introduction:**

A large majority of hepatitis C virus (HCV)-infected patients develops a persistent disease with increasing hepatic injury over time<sup>1</sup>. Despite intensive investigations, persistent infection and parameters involved in damaging tissue are not fully understood. It is worth noting that the liver displays a unique anatomy which may facilitate direct or indirect priming of immune cells but which may also contribute to induction of antigen specific tolerance<sup>2</sup>. NK and NKT cells are both components of the innate immune system and, once activated these cells are known to eliminate virus-infected cells through natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) using perforin and granzyme without the need for prior antigen sensitization<sup>3,4</sup>.

Following blood infection, HCV uses cellular interactions to migrate towards the liver where it remains and develops multiple strategies to escape elimination through immune effector functions or antiviral treatments<sup>5-8</sup>. Several studies have shown that the HCV-E2 envelope protein, through its interaction with the tetraspanin CD81, inhibits NK cell functions<sup>9,10</sup>. This observation was completed by other studies which indicated that NK and NKT cells could inhibit HCV replication in human hepatocytes<sup>11,12</sup>. However, most of these data were obtained from *in vitro* assays using hepatocyte cell lines and viral recombinant proteins. Using a more appropriate HCV culture system producing infectious viral particles, conclusions were quite different demonstrating that HCV do not modulate NK cell functions<sup>13</sup>. Moreover during acute HCV infection, NK cells are activated and participate to T cell priming<sup>14,15</sup>. These results challenge accepted beliefs on what is happening in the liver of infected patients during the chronic phase of infection, and reopen the debate on HCV persistence and how it is linked to functional modifications of the host immune response.

22/03/2011

5

1  
2  
3 NK cells regulation depends on a fine balance between inhibitory and activating receptors  
4  
5 (NKR) which belong either to Immunoglobulin-like superfamily (Killer cell  
6  
7 Immunoglobulin-like receptor or KIR) or C-type lectine-like molecule such as NKG2D,  
8  
9 NKG2A and NKG2C both associated with CD94<sup>4,16</sup>. The NKG2D activating receptor is  
10  
11 constitutively expressed on human NK and CD8T cells and recognizes MICA and MICB  
12  
13 over-expressed on senescent activated hepatic stellate cells<sup>4,17</sup>. The NKG2C activating  
14  
15 receptor and the NKG2A inhibitory receptor interact both with non-classical class I molecule  
16  
17 HLA-E ubiquitously expressed in most tissue which allow NK cells to scrutinize an altered  
18  
19 self class I molecule caused by tumor or pathogens invasion<sup>18,19</sup>. If NKG2A is detectable at  
20  
21 relative early stage of NK cell differentiation, less information is available on expression of  
22  
23 NKG2C during NK cell differentiation. Studies reported that NKG2A and NKG2C gene may  
24  
25 be co-transcribed at the clonal level in some NK cells and more recently, both receptors have  
26  
27 been found occasionally at the surface of peripheral NK cells<sup>16</sup>. However, the functional  
28  
29 implication of minor NK cells subset co-expressing NKG2A and NKG2C was not elucidated  
30  
31 yet.  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38  
39 NK cells in the liver of HCV patients have been shown to interact with the virus and the pool  
40  
41 of these cells to decrease with the severity of liver lesions, as illustrated by modifications to  
42  
43 the ratio of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>bright and dim subsets<sup>20,21</sup>. Decreased numbers of peripheral NK cells  
44  
45 with an imbalance of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>bright and dim subsets is also reported in HCV patients, but  
46  
47 their cytolytic killing potential is not affected<sup>22</sup>.  
48  
49

50  
51 In this work, we explored NKR-related phenotypes and functions of intra-hepatic NK cells in  
52  
53 the presence of natural replicative infectious HCV particles under a physiological context to  
54  
55 determine if intra-hepatic NK cells from HCV-infected patients are altered. After analysis of  
56  
57 the NKG2 family receptors distribution on intra-hepatic NK cells surface, we investigated  
58  
59  
60

22/03/2011

6

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

cytolytic and cytotoxic effector functions of fresh *ex vivo* intra-hepatic NK cells. In addition, we investigated the ability of NK cells to be enhanced upon appropriate cytokine stimulation or specific target cells. These data were compared to two other groups of patients, a first group composed of patients with no viral infection (NAFLD) and a second group with HBV infection. Overall, our data provide new insight into effector's function thresholds of NK cells within the liver during chronic HCV infection.

22/03/2011

7

## MATERIALS and METHODS

**Patients.** HCV and HBV patients in Grenoble University Hospital, France were prospectively selected for a moderate necro-inflammatory grading (A0 to A2) and moderate fibrosis staging (F0 to F2) according to the French Metavir Scoring System prior any treatment. Their main characteristics are described in **Table 1**. We chose to use percutaneous liver biopsies which were divided into two parts: one part for histological examination assessed by an experienced liver pathologist and the other part for immunological analyses. At the time of biopsy, leucocytes were recovered by mechanical disruption and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated as previously described<sup>22</sup>. Liver biopsies from patients with Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with low equivalent activity and fibrosis stage (without septa) were included, as well as blood samples from healthy donors obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Grenoble, France). The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Helsinki Declaration and was approved by our institutional review board. Patients were enrolled after giving their written informed consent.

**Immunostaining and flow cytometry analysis.** Immunophenotyping was performed on paired PBMC and liver samples with the following anti-human antibodies: CD3-PE-Cy7, CD56-PE and NKG2A-PE from Beckman Coulter, CD56-FITC, IFN- $\gamma$ -PE, Perforin-FITC, CD107a-APC from Becton-Dickinson Biosciences, CD3-APC-Cy7, uncoupled CD107a, CD107a Pacific Blue and NKG2D PE-Cy7 from Biolegend, NKG2C-APC from R&D Systems Europe LTD. Immunostaining and flow cytometry analyses were done as previously described<sup>23, 24</sup>. Total lymphocytes were gated on the basis of their CD56 or CD3 expression to distinguish NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) lymphocytes. Data were acquired on BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FCS Express V3 software (De novo software).

22/03/2011

8

1  
2  
3 **IFN- $\gamma$  production following IL-12/IL-18 stimulation.** Paired PBMC and liver biopsies from  
4  
5 8 HCV, 6 HBV and 4 non-infected patients were cultured at 37°C as described elsewhere<sup>25</sup>,  
6  
7 with or without IL-12 (R&D Systems) and IL-18 (MBL Clinisciences). Brefeldin A  
8  
9 (GolgiPlug, Becton Dickinson) was then added 4h after initiation of stimulation and culture  
10  
11 was maintained for another 8h (a total of 12h of stimulation) before harvesting. Finally, cells  
12  
13 were washed and stained prior to flow cytometry analysis.  
14  
15

16  
17 **Degranulation activity following K562 target cells activation.** Peripheral and intra-hepatic  
18  
19 immune cells from HCV (n=26), HBV (n=16) –infected patients and NAFLD patients (n=27)  
20  
21 were incubated in the presence of anti-CD107a antibody for 3h at 37°C with or without K562  
22  
23 target cells (Cell:Target=1:1). Cells were then harvested, washed and stained for flow  
24  
25 cytometry analysis.  
26  
27

28  
29 **Immunohistochemical study.** Immunohistochemical staining was performed on consecutive  
30  
31 4 $\mu$ m thick liver sections from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, as described in<sup>26</sup>. The  
32  
33 staining was realized on 4 HCV-infected liver and 3 NAFLD liver controls. For simple  
34  
35 perforin immunostaining, slides were incubated with the primary anti-perforin Ab2 antibody  
36  
37 (Clone 5B10, Neomarkers), followed by incubation with the secondary antibody using the  
38  
39 Envision kit (Dako). Diaminobenzidine (DAB) was used as the chromogen for  
40  
41 immunodetection and slides were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated and  
42  
43 mounted in Pertex (Histolab Products AB). For double perforin immunostaining, slides were  
44  
45 stained with the anti-perforin antibody and revealed with the N-Histofine kit (Nichirei  
46  
47 Biosciences Inc). Fast red was used as the chromogen for perforin immunodetection. Then,  
48  
49 antigen retrieval was performed in Tris-citrate buffer for CD56 or in Citrate buffer for CD3.  
50  
51 Slides were incubated with the primary anti-CD56 (clone 1B6, Novocastra) or anti-CD3  
52  
53 (polyclonal rabbit CD3, Dako) antibodies and then incubated with the secondary antibody  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

9

1  
2  
3 using the Envision kit. DAB was used as the chromogen for CD56 or CD3 immunodetection  
4  
5 as previously described<sup>26</sup>. All sections were counterstained with Harris hematoxylin, washed  
6  
7 in tap water and mounted in aquamount (Merck). Sur-fixation in glutaraldehyde (0.05% in  
8  
9 PBS pH 8.6) followed each incubation with primary or secondary antibody.

10  
11  
12 **Statistical methods.** Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 software (*SPSS Inc.,*  
13  
14 *Chicago, IL, USA*) as previously described in<sup>26</sup>. Two-sided *P* values < 0.05 were considered to  
15  
16 be significant.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

10

## RESULTS

To clarify whether HCV affects intra-hepatic NK cells functions, systematic *ex vivo* analyses were conducted on a cohort of HCV-infected patients at early stage of the chronic disease to get enough NK cells and to limit the influence of pre-tumoral environment. To complete our survey, similar analysis were investigated simultaneously, on a group of patients who were infected with another hepatotropic virus such as HBV and on a group of patients with no viral infection such as Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) patients.

### Phenotyping of intra-hepatic activating and inhibitory NK receptors (NKR) in HCV-, HBV-infected and non-infected patients

Among the CD45<sup>+</sup> intra-hepatic immune cells, we confirmed that the frequency of NK cells (identified on their CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> extra-cellular markers expression) was lower in HCV- and in HBV-infected patients (13.1% and 15.2%) compared to control group (22.9%) (p=0.004 and p=0.05 respectively) (**Table 2**) as previously reported<sup>22,27</sup>.

Examinations of NKG2 family receptors expression (Table 2) indicated that 93.4% of NK cells from HCV patients harbored NKG2D receptor which was similar to NAFLD and HBV patients. Half of NK cells population expressed the inhibitory NKG2A receptor in the three cohorts. The activating NKG2C molecule was also detected on intra-hepatic NK cells from all groups of patients but the frequency of NKG2C<sup>+</sup>NK cells was obviously lower than the frequency of NKG2A<sup>+</sup>NK cells (p=0.000 for all cases). Taken together, the percentage of NKG2D<sup>+</sup>, NKG2A<sup>+</sup> or NKG2C<sup>+</sup> intra-hepatic NK cells was similar in each cohort. Interestingly, we detected the presence of the double NKG2A<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>NK cells population within the liver of each cohort as previously described in peripheral NK cells<sup>16</sup>. We noticed that the NKG2A<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>NK cells stay poorly enriched in the liver and similar in HCV, HBV and NAFLD groups.



22/03/2011

11

1  
2  
3 Brief examination of the distribution of these NKRs on the circulating NK cells from HCV  
4 and HBV patients revealed similar frequency of NKG2D, NKG2A or NKG2C receptors  
5 expression than what we found in their liver compartment. Since no PBMC from NAFLD  
6 patients was available, comparison between intra-hepatic and peripheral NK cells could not be  
7 achieved. In HCV and HBV patients, the double population NKG2A<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>NK cells was  
8 less expressed in the blood than in the liver (<1%). Since the number of intra-hepatic cells is  
9 limited, we essentially investigated the total NK cells population and the major NK cells  
10 subset NKG2A<sup>+</sup> for the further functional analysis.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

### 22 **Analysis of intra-hepatic and circulating NK cells activity of HCV-, HBV- and non-** 23 **infected patients** 24 25

26  
27 The intracellular detection of IFN- $\gamma$  within the liver of the three groups of patients indicated  
28 that intra-hepatic NK cells did not spontaneously produce this cytokine (**Figure 1A, Table3**).  
29 On the contrary, at least 3.0% of intra-hepatic NKT cells from HCV-infected liver samples  
30 spontaneously produced IFN- $\gamma$  (**Figure S1**). In the three cohorts of patients, about half of  
31 intra-hepatic NK cells contained perforin granules (**Figure 1A and Table 3**).  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38  
39 Then, we investigated the spontaneous degranulation capacity of NK cells by monitoring the  
40 CD107a marker at the cell surface. The frequency of CD107a<sup>+</sup>NK cells in HCV and HBV  
41 was similar to those in NAFLD individuals (5.4% in HCV vs 6.3% in HBV vs 4.4% in  
42 NAFLD patients) (**Figure 1B**). The frequency of CD107a<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup>NK cells was again  
43 similar in the three groups and closed to what we observed for CD107a<sup>+</sup>NK cells (**Figure 1A**  
44 **and Table 3**).  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52  
53 Briefly, when similar analyses were conducted on NK cells from blood of the three cohorts of  
54 patients, we still not detect any production of IFN- $\gamma$  by NK cells whilst half of them contained  
55 perforin granules (**Table 3**). Interestingly, the frequency of peripheral CD107<sup>+</sup>NK cells from  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

12

1  
2  
3 HCV- and HBV-infected patients and healthy donors was very low (<1%) and statistically  
4 different between paired liver and blood of infected patients ( $p < 0.001$ ) (**Figure 1C and 1D**).

7  
8 This underlines that degranulation process of NK cells was essentially observed in the liver  
9 organ.

### 12 13 **Analysis of NK cells activity in HCV-infected and non-infected liver patients upon** 14 **stimulation with IL-12 and IL-18**

17 Among the results described above, we were puzzled by the fact that IFN- $\gamma$  was not detected  
18 in intra-hepatic NK cells in HCV liver biopsies whereas it was spontaneously expressed by  
19 intra-hepatic NKT lymphocytes. The plausible hypotheses for this observation were: i) intra-  
20 hepatic NK cells were not able to produce IFN- $\gamma$ ; ii) the virus itself inhibited IFN- $\gamma$   
21 production by NK cells; or iii) the inflammatory context in the liver was not sufficient to  
22 induce IFN- $\gamma$  production by NK cells. To investigate which scenario was more probable,  
23 whole fresh HCV, HBV and NAFLD liver biopsies were stimulated with a combination of  
24 two cytokines, IL-12 and IL-18, known to promote IFN- $\gamma$  production by human NK cells<sup>25</sup>.  
25 We chose a 12h period of stimulation based on preliminary results of IFN- $\gamma$  production  
26 kinetic detection. In these conditions, intra-hepatic NK cells were able to release IFN- $\gamma$ , even  
27 in the presence of the virus (**Figure S1 and Table 4**). Indeed, in stimulated HCV liver  
28 biopsies, average frequencies of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells reached 3.2%. When similar experiments  
29 were conducted on intra-hepatic NK cells from NAFLD patients, production of IFN- $\gamma$  was  
30 detected in 2 out of 4 NAFLD patients with a frequency of 1.8% and 2.6% of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells.  
31 Similar results were obtained with intra-hepatic NK cells from HBV patients, which was in  
32 agreement with recent report<sup>28</sup>. In conclusion, these results indicate that an appropriate  
33 cocktail of cytokines allowed significant and similar levels of IFN- $\gamma$  production by either  
34 intra-hepatic NK cells from HCV-, HBV-infected or non-viral infected individuals.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

13

### Analysis of intra-hepatic and circulating NK cells activation via K562 target cell stimulation

We next wondered whether the intra-hepatic NK cells' cytolytic activity within HCV-infected liver was already maximal or if it could be increased through stimulation. To answer this, immune cells from liver biopsies of chronic HCV, HBV and control individuals were incubated with known K562 target cells. Upon stimulation, we observed a highly statistical significant increase of intra-hepatic CD107<sup>+</sup>NK cells in the three cohorts, as well as circulating CD107<sup>+</sup>NK cells (**Figure 2A and 2B**). Frequency of either degranulating intra-hepatic or peripheral NK cells reached upon stimulation was similar whatever the group of patients monitored (**Figure 2C and 2D**). However, the increase of paired circulating and intra-hepatic CD107<sup>+</sup>NK cells upon stimulation was statistically higher in the liver than in the blood for HCV patients ( $p=0.010$ ) and limit to significant for HBV patients ( $p=0.060$ ) (**Figure 2E**). Interestingly, we noticed a different fold increase repartition of degranulating intra-hepatic NK cells induced by *ex vivo* stimulation among the three cohorts of patients. Indeed, induction of more than 3 fold increase happened in 60% of HCV patients, 50% of HBV patients and 40% of NAFLD patients.

The degranulation process of intra-hepatic NKG2A<sup>+</sup>NK cells subset upon stimulation was also significantly increased and in the same range for the three groups of patients (**Figure S2**). Stimulation did not affect the percentage of either circulating or intra-hepatic NK cells expressing NKG2A or NKG2C receptors (**Figure 3**). In contrast, frequency of NKG2D<sup>+</sup>NK cells significantly decreased upon stimulation in all cases ( $p=0.000$  for HCV,  $p=0.028$  for HBV and  $p=0.026$  for NAFLD patients).

### Localization of intra-hepatic CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> immune cells

To complete the cytometry analysis, we checked the presence of CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> immune

22/03/2011

14

1  
2  
3 cells by immunohistochemistry (**Figure 4**). This allowed to provide information on the  
4  
5 localization of these CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> immune cells and to use another set of anti-CD56 and  
6  
7 anti-perforin antibodies, since the specificity of anti-perforin antibody used for cytometry  
8  
9 analysis was recently debated<sup>29</sup>. Perforin<sup>+</sup>cells could be detected both in HCV and non-  
10  
11 infected biopsies with perforin granules polarized to the cytoplasm (**Figure 4A-4B**).  
12  
13 Perforin<sup>+</sup>cells were mainly present in lobular and sinusoidal areas, while they were very  
14  
15 scarce in necrotico-inflammatory, fibrotic portal or septal areas (**Figure 4C**). To determine  
16  
17 the phenotype of these perforin<sup>+</sup>cells, double immunohistochemical staining was performed  
18  
19 using either anti-CD56 or anti-CD3 antibodies. As shown in **Figure 4D-F**, both  
20  
21 CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup>cells were detected in HCV liver. Interestingly, single  
22  
23 positive CD3<sup>-</sup>perforin<sup>+</sup>cells (**Figure 4D**) and double positive CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup>cells were  
24  
25 detected mainly in lobular areas far away from parcellar necrosis (**Figure 4E-4F**), whereas  
26  
27 CD3<sup>+</sup>perforin<sup>-</sup>cells were detected in fibrosis portal tract (**Figure 4D**). Altogether, these  
28  
29 observations suggest that perforin<sup>+</sup>cells immunostained with CD56 marker must be intra-  
30  
31 hepatic NK cells.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

15

## DISCUSSION

NK cell functions are tightly regulated by a complex network signals through inhibitory, activating and co-stimulatory receptors. The dogma is that in a non-infectious context, the balance between inhibitory versus activating receptors at the surface of NK cells favors inhibitory signaling<sup>4,7</sup>. In contrast, in an infectious context the equilibrium shifts towards an NK cells' activating state<sup>4</sup>. Currently, this theory is widely debated during an HCV infection<sup>30</sup>. Here, when we analyzed the expression of NKG2A, NKG2C and NKG2D receptors, we noticed that intra-hepatic NK cells from HCV patients expressed as many inhibitory receptors or activating receptors as those from the two other cohorts of patients (HBV and control groups). Furthermore, we observed that intra-hepatic NK cells from the three groups of patients shared similar functions. Indeed, they were skewed toward degranulation activity without a concomitant IFN- $\gamma$  production. However, redirected cytotoxicity assays through NK cells activation, in response to K562 target cells, increased the level of degranulating intra-hepatic NK cells from either virally-infected patients or not. Similarly, intra-hepatic NK cells can produce IFN- $\gamma$  after previous *ex vivo* incubation with IL-12 and IL-18 cytokines. Therefore, these findings supports that *in situ* NK cells in the liver of HCV-infected patients are activated like intra-hepatic NK cells from HBV-infected patients or patients with no viral infection.

In the three cohorts of patients selected to have minimal to moderate liver damages, intra-hepatic NK cells mainly expressed the activating NKG2D receptor (~90%) and the inhibitory NKG2A receptor (~60%). Direct *ex vivo* examinations revealed that total NK cells' degranulation frequencies were similar to that of NKG2A<sup>+</sup> or NKG2A<sup>-</sup> NK cells subsets in the liver. More interestingly, upon K562 target cells stimulation, frequency of NK cells bearing NKG2A was maintained and their degranulation activity was higher to that of total NK cells

22/03/2011

16

1  
2  
3 in HCV, HBV and non infected individuals. This suggests that, even in an infectious context,  
4  
5 intra-hepatic NK cells responsiveness did not correlate with NKR-expression. In other words,  
6  
7 intra-hepatic NK cells could be “tuned” of their environmental signals such that their  
8  
9 inhibition state related to inhibitory receptors’ expression was balanced by greater potential  
10  
11 responsiveness. Molecular mechanism(s) involved in the process that determines NK  
12  
13 responsiveness vs hypo-responsiveness as “licensing” vs “disarming” leading to an active or  
14  
15 inactive state of NK cells remained unknown. Further studies must be investigated to  
16  
17 determine whether the basal degranulation activity is a threshold controlled by the liver  
18  
19 tolerance or/and by the sustained HCV peptides presence. The more plausible scenario is that  
20  
21 combination of persistent viral stimulation coupled with commensurate inhibition (liver  
22  
23 tolerance or engagement of inhibitory receptor) result in the controlled NK cells  
24  
25 responsiveness. However, this sustained responsiveness would have its own limits which lead  
26  
27 to an exhaustion of NK cell pool. This may reflect the intra-hepatic NK cell decrease over the  
28  
29 evolution of the disease as reported by us and others<sup>22,30</sup>.

30  
31 Comparative data collected from circulating and intra-hepatic NK cells allowed to raise a  
32  
33 major difference: the intra-hepatic NK cells were engaged in the degranulation process  
34  
35 whereas peripheral NK cells did not. Since no specific marker has been described yet to  
36  
37 differentiate NK cells from blood to NK cells from liver, it is difficult to establish if the  
38  
39 degranulating NK cells in the liver are circulating contaminant or liver resident NK cells.  
40  
41 Nevertheless, our observations by immunohistochemistry on liver tissues clearly indicated  
42  
43 that CD56<sup>+</sup> cells (which must be NK cells) localized in lobular areas were fully loaded in  
44  
45 perforin granules polarized within the cytoplasm, which suggest that these intra-hepatic  
46  
47 resident cells may are those engaged in the degranulation process. In addition, it is important  
48  
49 to keep in mind, I) that CD107 is transiently expressed at the surface of cells only from the  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

17

1  
2  
3 beginning to the end of the degranulation process and this process is very rapid<sup>31</sup>, and ii) that  
4  
5 our ex vivo analysis were driven at a given time and indicated only the percentage of NK cells  
6  
7 mobilized for degranulation activity (with or without stimulation) and not the cumulative  
8  
9 percentage of degranulating NK cells. Our immunohistochemistry data support that in the  
10  
11 infected liver, NK cells were scattered within the tissue exerting their main innate immune  
12  
13 function of self vs non-self determinants surveillance.  
14  
15

16  
17 In conclusion, it is well documented that HCV, through its high rate of mutation, has probably  
18  
19 found the best strategy to allow it to settle in the liver and to escape the immune response<sup>1,8</sup>.  
20  
21 Upon viral infection, our data highlight that the liver seems to present an innate immune  
22  
23 response during the early phase of the disease, allowing a relative control of the virus attempts  
24  
25 to sustain itself within the organ. More knowledge on mechanisms controlling the shift of  
26  
27 intra-hepatic NK cells equilibrium towards an activated state as well as cytokine environment  
28  
29 in the liver needs to be acquired in order to define new therapies to control viral infection.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

18

**References**

1. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S21-29.
2. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43:S54-62.
3. Shey MR, Ballas ZK. Assessment of natural killer (NK) and NKT cells in murine spleens and livers. *Methods Mol Biol* 2008;447:259-276.
4. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-49.
5. Pawlotsky JM. Treatment failure and resistance with direct acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 2011.
6. Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008;389:1283-1298.
7. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009;119:1745-1754.
8. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005;79:9369-9380.
9. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35-41.
10. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-49.
11. Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004;76:1171-1179.
12. Ye L, Wang X, Wang S, Wang Y, Song L, Hou W, et al. CD56+ T cells inhibit



22/03/2011

19

1  
2  
3 hepatitis C virus replication in human hepatocytes. *Hepatology* 2009;49:753-762.

4  
5 13. Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehermann B. Natural killer cell function is intact  
6  
7 after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 2009;49:12-21.

8  
9 14. Amadei B, Urbani S, Cazaly A, Fiscaro P, Zerbini A, Ahmed P, et al. Activation of  
10  
11 natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology*  
12  
13 2010;138:1536-1545.

14  
15 15. Pelletier S, Drouin C, Bedard N, Khakoo SI, Bruneau J, Shoukry NH. Increased  
16  
17 degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-  
18  
19 specific T cell responses. *J Hepatol* 2010;53:805-816.

20  
21 16. Saez-Borderias A, Romo N, Magri G, Guma M, Angulo A, Lopez-Botet M. IL-12-  
22  
23 dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates  
24  
25 CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol* 2009;182:829-836.

26  
27 17. Wen C, He X, Ma H, Hou N, Wei C, Song T, et al. Hepatitis C virus infection  
28  
29 downregulates the ligands of the activating receptor NKG2D. *Cell Mol Immunol* 2008;5:475-  
30  
31 478.

32  
33 18. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al.  
34  
35 HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795-  
36  
37 799.

38  
39 19. Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U.  
40  
41 Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic  
42  
43 hepatitis C. *Gut* 2006;55:869-877.

44  
45 20. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, et al. Resident  
46  
47 human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J*  
48  
49 *Hepatol* 1998;28:84-90.

22/03/2011

20

- 1  
2  
3 21. Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin*  
4  
5  
6 *Immunol* 2009;130:16-26.
- 7  
8 22. Bonorino P, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thelu MA, Sturm N, et al.  
9  
10 Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic  
11  
12 hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009;51:458-467.
- 13  
14 23. Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. Simultaneous  
15  
16 evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear  
17  
18 cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol*  
19  
20 2002;130:518-525.
- 21  
22 24. Vigan I, Jouvin-Marche E, Leroy V, Pernollet M, Tongiani-Dashan S, Borel E, et al. T  
23  
24 lymphocytes infiltrating the liver during chronic hepatitis C infection express a broad range of  
25  
26 T-cell receptor beta chain diversity. *J Hepatol* 2003;38:651-659.
- 27  
28 25. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al.  
29  
30 Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation  
31  
32 with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response.  
33  
34 *J Immunol* 1999;162:4511-4520.
- 35  
36 26. Sturm N, Thelu MA, Camous X, Dimitrov G, Ramzan M, Dufeu-Duchesne T, et al.  
37  
38 Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C  
39  
40 pathogenesis. *J Hepatol* 2010;53:25-35.
- 41  
42 27. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE,  
43  
44 et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus  
45  
46 infection following single source exposure. *Gut* 2008;57:1121-1128.
- 47  
48 28. Zhang Z, Zhang S, Zou Z, Shi J, Zhao J, Fan R, et al. Hypercytolytic activity of  
49  
50 hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

21

Hepatology 2011;53:73-85.

29. Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A* 2008;73:1050-1057.

30. Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. *Eur J Clin Invest* 2010;40:851-863.

31. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78.

22/03/2011

22

## Legends

**Figure 1. Flow cytometry direct ex vivo analysis of intra-hepatic and peripheral NK cells activity from HCV, HBV and NAFLD patients.**

(A) Representative dot plots show the expression of intracellular markers (IFN- $\gamma$  and perforin) and cell surface markers (CD107a) by intra-hepatic NK cells from HCV, HBV and NAFLD patients. Percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells, perforin<sup>+</sup>NK cells and CD107a<sup>+</sup>NK cells were detected by the combination of following antibodies: CD56-FITC, CD3-PE-Cy7, IFN- $\gamma$ -PE and perforin-FITC, CD56-PE, CD3-PE-Cy7, CD107a-APC respectively. The percentage of degranulation from perforin-loaded NK cells was determined after gating on perforin<sup>+</sup>NK cells. Percentage of degranulating intra-hepatic (B) and peripheral (C) NK cells from the three cohorts of patients. (D) Comparison of paired peripheral and intra-hepatic NK cell cytotoxic activity of HCV and HBV patients.

**Figure 2. The number of intra-hepatic NK cells from chronic HCV, HBV and NAFLD patients engaged in the degranulation process increases upon K562 target cell stimulation.**

Detection by flow cytometry of degranulating intra-hepatic NK cells (A) and circulating NK cells (B) using CD56-FITC, NKG2A-PE, CD3-APC-Cy7, CD107a-Pacific Blue antibodies after activation with K562 target cells or not from HCV, HBV and NAFLD patients. Comparisons of NK cells degranulation activity upon stimulation in the liver (C) and in the blood (D) for each group of patients. (E) Comparison of paired peripheral and intra-hepatic K562-stimulated NK cells' degranulation process from 21 chronic HCV patients and 7 chronic HBV patients. (F) Fold increase of CD107<sup>+</sup>NK cells from the liver of HCV, HBV and NAFLD patients upon stimulation.

22/03/2011

23

1  
2  
3  
4  
5  
6 **Figure 3. The percentage of NKG2A<sup>+</sup> and NKG2C<sup>+</sup> intra-hepatic and peripheral NK**  
7 **cells subset from chronic HCV, chronic HBV and NAFLD patients did not evolve upon**  
8 **K562 target cell stimulation contrary to NKG2D<sup>+</sup> one.**

9  
10  
11  
12 Intra-hepatic (**A**) and peripheral (**B**) NK cells from HCV, HBV and NAFLD patients were  
13 analyzed by flow cytometry (CD56<sup>+</sup>-FITC; CD3<sup>-</sup>-APC-Cy7) for NKG2A-PE, NKG2C-APC  
14 and NKG2D-PE-Cy7 expression after activation with K562 target cells or not.\*p<0.05.  
15  
16  
17  
18  
19

20  
21  
22 **Figure 4. Single and double immunohistochemical detection of perforin cells in HCV-**  
23 **infected and non-infected liver.**

24  
25  
26  
27 (**A**) Control liver without fibrosis or necro-inflammatory activity in the portal tract (PT) and  
28 the lobule (L). (**B**) HCV-infected liver with fibrous PT and low A1 Metavir activity, showing  
29 5 perforin positive brown cells in the L, without localization in PT or in piece meal necrosis  
30 PN). (**C**) HCV-infected liver with portal fibrosis and moderate A2 Metavir activity, showing 2  
31 perforin positive brown cells in contact with PN. (**D**) Double immunohistochemical detection  
32 of brown CD3<sup>+</sup> cells and red perforin<sup>+</sup> cells in HCV-infected liver with septal fibrosis and low  
33 A1 Metavir activity. Rare double positive CD3<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> cells were detected in lobules. (**E,F**)  
34 Double immunohistochemical detection of brown CD56<sup>+</sup> cells and red perforin<sup>+</sup> cells in  
35 HCV-infected liver with septal fibrosis and low A1 Metavir activity. Many double positive  
36 CD56<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> cells (asterisk) were detected, mainly localized in lobules, far away from PN.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

22/03/2011

24

### Acknowledgments

We would like to thank the patients enrolled in this study for their participation. We are grateful Mary Callanan for providing K562 cells, Alice Cheveau for providing clinical characteristics on patients and Christiane Guillermet for technical support with immunohistochemistry.

**Conflicts of interest:** The authors disclose no conflicts.

EF: acquisition of data, analysis and interpretation of data, technical support drafting of the manuscript.

MAT: analysis and interpretation of data, statistical analysis, drafting of the manuscript.

AD, TDD, NVC: acquisition of data, technical support.

VL, JPZ: material support, critical revision of the manuscript.

NS: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript.

PNM: critical revision of the manuscript for important intellectual content, study supervision.

EJM: study concept and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, obtained funding, study supervision.

**Table 1. Demographic, biochemical and clinical characteristics of patients included in the study.**

	NAFLD Patients				HCV Patients				HBV Patients			
	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4		Group 5		Group 6	
	n=4		n=27		n=24		n=26		n=6		n=16	
<b>Male</b> , n(%)	3	75%	11	41%	9	38%	15	58%	6	100%	12	75%
<b>Age</b> (y) <sup>a</sup>	55	±1.9	49	±14	57	±7	54	±11	34	±12	36	±11
<b>Serum ALT</b> (IU/mL)	2.0	±1.0	1.6	±1.0	2.3	±1.2	2.2	±2.8	1.2	±1.1	0.9	±0.8
<b>Plasma Viral Load</b> (IoIU/mL)	-	-	-	-	6.0	±0.7	5.6	±0.7	4.7	±0.6	3.6	±0.8
<b>Liver histology</b>												
<i>Metavir Activity Score, n(%)</i>												
<b>0</b>	2	50%	0	-	2	8%	0	-	1	17%	5	38%
<b>1</b>	2	50%	1	4%	9	38%	10	42%	4	67%	8	62%
<b>2</b>	0	-	0	-	13	54%	13	54%	1	17%	0	0
<b>3</b>	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
<i>unknown</i>	-	-	26	-	-	-	3	-	-	-	3	-
<i>Metavir Fibrosis Score, n(%)</i>												
<b>0</b>	1	25%	3	11%	1	4%	0	-	2	33%	2	15%
<b>1</b>	3	75%	2	7%	14	58%	11	46%	4	67%	10	77%
<b>2</b>	0	-	0	-	9	38%	13	54%	0	-	1	8%
<b>3</b>	0	-	0	-	-	-	0	-	0	-	0	-
<b>4</b>	0	-	0	-	-	-	0	-	0	-	0	-
<i>unknown</i>	-	-	22	-	-	-	2	-	-	-	3	-

Group 1: NAFLD liver biopsies tested for IFN- $\gamma$  - Group 2: NAFLD liver biopsies tested for CD107a and perforin - Group 3: HCV liver biopsies tested for IFN- $\gamma$  - Group 4: HCV liver biopsies tested for CD107a and perforin - Group 5: HBV liver biopsies tested for IFN- $\gamma$  - Group 6: HBV liver biopsies tested for CD107 and perforin.

<sup>a</sup>Means  $\pm$  Standard Deviation

ALT: Alanine Amino Transferase.

**Table 2. Percentage of intra-hepatic and peripheral NK cells from NAFLD or Healthy donors, HCV and HBV-infected patients expressing NKG2D, NKG2A and NKG2C receptors.**

	LIVER			BLOOD		
	NAFLD	HCV	HBV	Healthy	HCV	HBV
	<i>n</i> =27	<i>n</i> =26	<i>n</i> =12	<i>n</i> =17	<i>n</i> =21	<i>n</i> =11
<b>NK cells</b>	<b>22.9%</b>	<b>13.1%</b>	<b>15.2%</b>	<b>26.6%</b>	<b>14.9%</b>	<b>11.0%</b>
	(8.8-65.9)	(4.2-38.0)	(6.1-38.8)	(4.1-69.0)	(3.7-37.8)	(5.9-32.8)
	<i>n</i> =16	<i>n</i> =16	<i>n</i> =8	<i>n</i> =9	<i>n</i> =14	<i>n</i> =5
<b>NKG2D<sup>+</sup>NK cells</b>	<b>89.0%</b>	<b>93.4%</b>	<b>89.1%</b>	<b>85.6%</b>	<b>85.4%</b>	<b>85.0%</b>
	(61.8-97.4)	(71.8-99.6)	(75.3-98.9)	(0.0-98.2)	(62.1-98.5)	(79.4-94.5)
	<i>n</i> =27	<i>n</i> =26	<i>n</i> =12	<i>n</i> =14	<i>n</i> =21	<i>n</i> =11
<b>NKG2A<sup>+</sup>NK cells</b>	<b>58.2%</b>	<b>61.0%</b>	<b>47.9%</b>	<b>42.3%</b>	<b>58.4%</b>	<b>39.0%</b>
	(11.7-87.0)	(32.1-82.0)	(24.9-61.2)	(29.7-59.1)	(27.6-76.1)	(5.3-58.4)
	<i>n</i> =20	<i>n</i> =20	<i>n</i> =9	<i>n</i> =9	<i>n</i> =17	<i>n</i> =6
<b>NKG2C<sup>+</sup>NK cells</b>	<b>3.5%</b>	<b>4.0%</b>	<b>7.2%</b>	<b>0.6%</b>	<b>3.0%</b>	<b>1.7%</b>
	(0.0-21.0)	(0.0-56.8)	(1.2-19.0)	(0.0-24.3)	(0.1-37.0)	(0.1-57.5)
	<i>n</i> =20	<i>n</i> =19	<i>n</i> =9	<i>n</i> =8	<i>n</i> =17	<i>n</i> =6
<b>NKG2A<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> NK cells</b>	<b>2.3%</b>	<b>1.9%</b>	<b>1.7%</b>	<b>0.2%</b>	<b>0.5%</b>	<b>0.5%</b>
	(0.0-17.3)	(0.0-16.3)	(0.0-6.9)	(0.0-1.1)	(0.0-15.8)	(0.1-1.2)

The percentage of NKRs-positive NK cells was expressed as median (Min-Max values).



**Table 3. IFN- $\gamma$  production, perforin, CD107a<sup>+</sup> and CD107a<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> expression by intra-hepatic NK cells from NAFLD , HCV- and HBV-infected patients.**

	<b>LIVER</b>		
	<b>NAFLD</b>	<b>HCV</b>	<b>HBV</b>
	n=4	n=24	n=6
<b>IFN-<math>\gamma</math><sup>+</sup></b>	<b>0.0%</b>	<b>0.0%</b>	<b>0.0%</b>
	(0.0-0.0)	(0.0-0.3)	(0.0-0.1)
	n=8	n=18	n=3
<b>Perforin<sup>+</sup></b>	<b>61.3%</b>	<b>55.7%</b>	<b>54.7%</b>
	(44.3-75.8)	(31.8-76.2)	(45.1-67.9)
	n=8	n=13	n=3
<b>CD107a<sup>+</sup>/Perforin<sup>+</sup></b>	<b>2.9%</b>	<b>6.6%</b>	<b>4.3%</b>
	(0.0-8.9)	(0.0-33.8)	(0.0-11.8)
	n=27	n=26	n=12
<b>CD107a<sup>+</sup></b>	<b>4.4%</b>	<b>5.4%</b>	<b>6.3%</b>
	(0.6-15.2)	(0.4-12.2)	(1.8-17.1)

The percentage of positive NK cells was expressed as median (Min-Max values).

**Table 4. IFN- $\gamma$  production by intra-hepatic NK from NAFLD, HCV and HBV-infected patients with or without 12h of cytokine stimulation.**

	LIVER		
	NAFLD	HCV	HBV
<b>Unstimulated</b>	<i>n</i> =4 <b>0.0%</b> (0.0-0.0)	<i>n</i> =8 <b>0.0%</b> (0.0-0.1)	<i>n</i> =4 <b>0.0%</b> (0.0-0.0)
<b>IL12/IL18 stimulation</b>	<i>n</i> =4 <b>1.1%</b> (0.0-2.6)	<i>n</i> =8 <b>3.2%</b> (0.7-5.9)	<i>n</i> =4 <b>1.9%</b> (0.0-6.0)

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

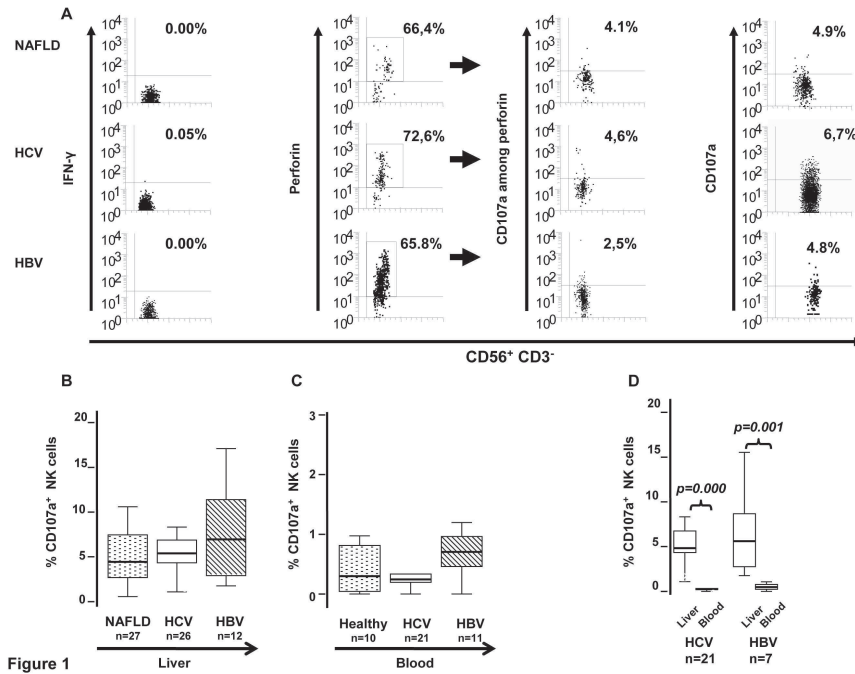


Figure 1

254x190mm (300 x 300 DPI)

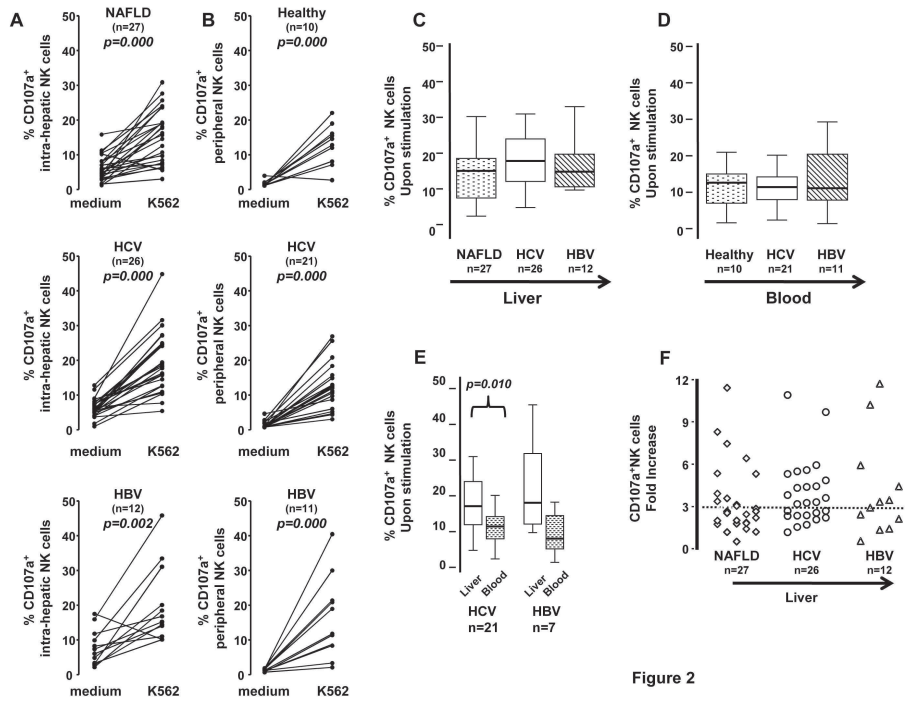


Figure 2

254x190mm (300 x 300 DPI)

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

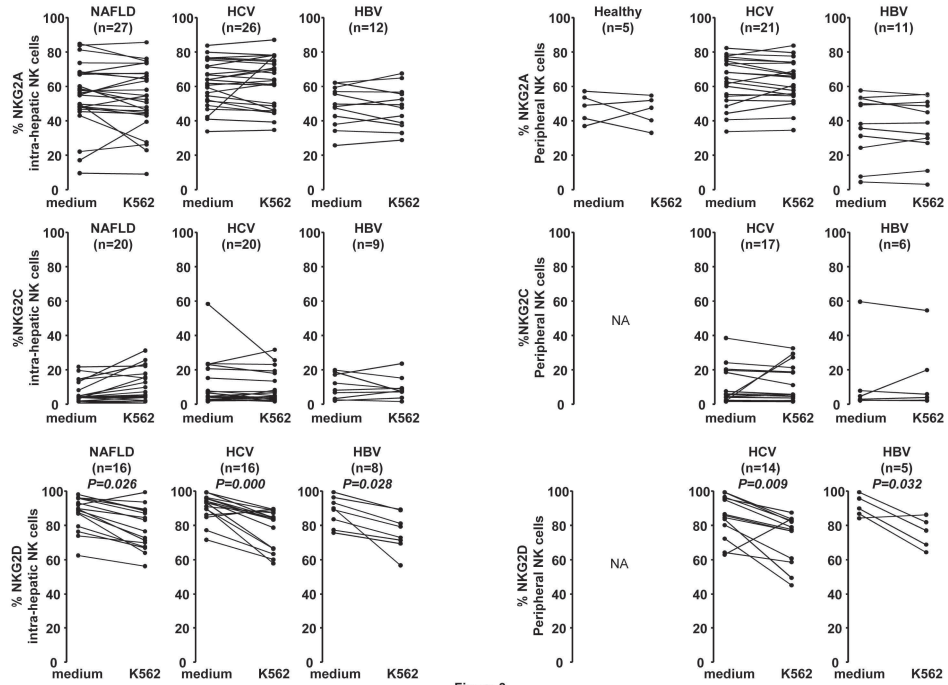


Figure 3

256x190mm (300 x 300 DPI)

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

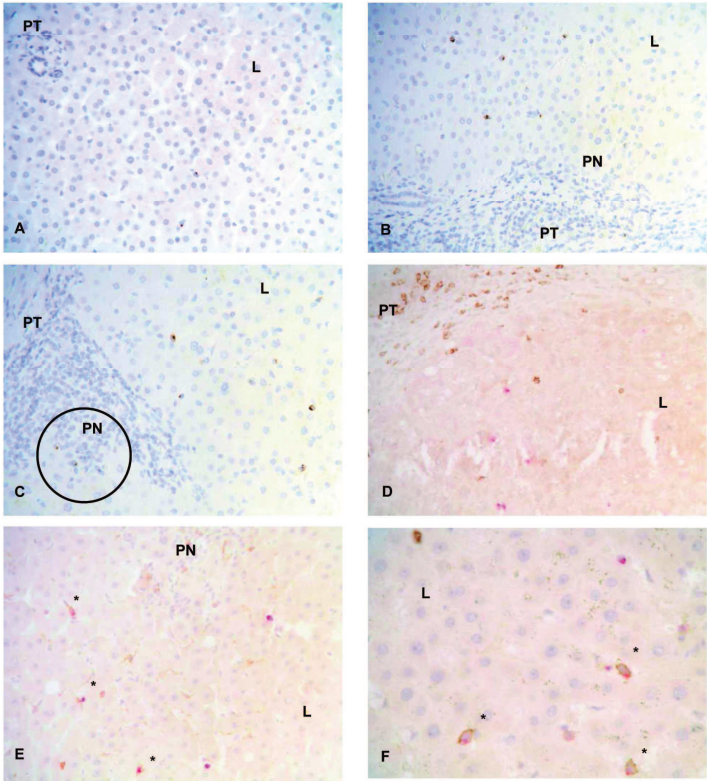


Figure 4

190x275mm (300 x 300 DPI)

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

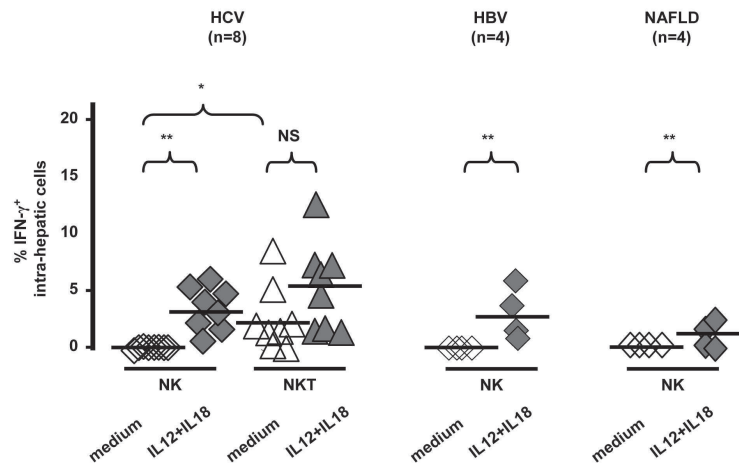


Figure S1

190x254mm (300 x 300 DPI)

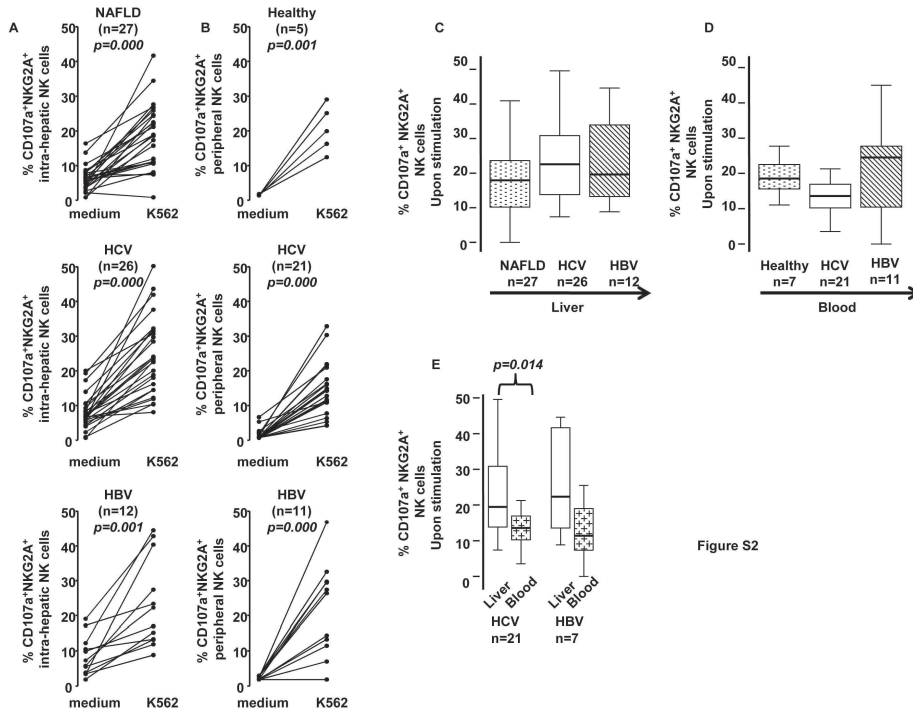


Figure S2

254x190mm (300 x 300 DPI)



## Supplementary legends

### **Figure S1. IFN- $\gamma$ production by intra-hepatic NK cells from chronic HCV, HBV patients and NAFLD patients increase upon cytokine stimulation.**

Detection by flow cytometry of IFN- $\gamma$  production by intra-hepatic NK and NKT lymphocytes from HCV patients (n=8), HBV patients (n=4) and NAFLD patients (n=4). IFN- $\gamma$  production is expressed as a percentage of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells for NK cells and CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells for NKT lymphocytes. IFN- $\gamma$  production was investigated without stimulation (open symbol) and after 12 h of stimulation with IL-12 and IL-18 cytokine cocktail (closed symbol). Each symbol represent a patient. \*p<0.05, \*\*p<0.001.

### **Figure S2. The number of intra-hepatic NKG2A<sup>+</sup>NK cells from chronic HCV, HBV patients and NAFLD patients engaged in the degranulation process increases upon K562 target cell stimulation.**

Detection by flow cytometry of degranulating intra-hepatic NKG2A<sup>+</sup>NK cells (**A**) and circulating NKG2A<sup>+</sup>NK cells (**B**) using CD56-FITC, NKG2A-PE, CD3-APC-Cy7, CD107a-Pacific Blue antibodies after 3h of activation with K562 target cells or not from HCV, HBV and NAFLD patients. Comparisons of NKG2A<sup>+</sup>NK cells degranulation activity upon 3h of K562 stimulation in the liver (**C**) and in the blood (**D**) for each group of patients. (**E**) Comparison of paired peripheral and intra-hepatic K562-stimulated NKG2A<sup>+</sup>NK cells' degranulation process from 21 chronic HCV patients and 7 chronic HBV patients.

## **Recherche de nouveaux marqueurs de progression de la cirrhose vers le CHC et d'évolution du CHC par analyse protéomique tissulaire**

Le développement de nouvelles technologies pour isoler des marqueurs en pathologie cancéreuse a connu un essor important ces dernières années et l'identification de nouveaux biomarqueurs par l'étude du peptidome/protéome (protéomie) représente un outil puissant pour le diagnostic, le traitement et/ou le pronostic des tumeurs. Après l'étude de l'expression de grandes séries de gènes représentée par l'analyse du transcriptome (mais qui ne donne qu'une représentation imparfaite de l'état fonctionnel d'une cellule ou d'un tissu à un instant donné puisqu'elle ne rend compte que de la présence d'ARNm et non pas de la présence effective de protéines fonctionnelles), l'avènement des techniques protéomiques dites de "haut débit" permet l'étude du protéome de mélanges complexes tels que le sérum et autres liquides biologiques, mais aussi d'extraits cellulaires ou tissulaires, sur de grandes séries de patients et a déjà été expérimenté dans des pathologies cancéreuses. Les avancées technologiques dans le domaine de la spectrophotométrie de masse permettent la caractérisation de la signature protéique, et le séquençage du génome humain a fourni un support bio-informatique très puissant par l'établissement de bases de données contenant toutes les protéines recensées.

Nous avons choisi de travailler sur des "empreintes" de tissu congelé provenant de CHC et de parenchyme cirrhotique prélevé à distance du CHC, dans deux contextes différents tels que l'infection chronique par le VHC et l'intoxication éthylique chronique (OH), et de comparer les profils protéiques des tissus issus de ces 4 conditions : CHC-OH, CHC-VHC, cirrhose/CHC-OH et cirrhose/CHC-VHC par la technique SELDI-TOF MS (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA). Schématiquement, des coupes de tissu congelé sont déposées sur des surfaces ou "puces" fonctionnalisées dérivées des surfaces de chromatographie et destinées à capturer les protéines (Protein Chip). Elles permettent de sélectionner les protéines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques ou biologiques et d'étudier des sous-protéomes représentatifs des protéines non majoritaires. Après des étapes de capture protéique et de lavages, le dépôt protéique est enrobé dans une matrice et la surface de l'empreinte protéique est lue par un faisceau laser (désorption par transfert d'énergie grâce au faisceau laser, accélération dans un champ magnétique et identification par spectrométrie en temps de vol). Cette technique génère un "profil" correspondant à l'inventaire des peptides/protéines présents dans l'échantillon tissulaire, chaque pic représentant une protéine caractérisée par sa masse moléculaire ( $m/z$ ), dont l'abondance est évaluée par l'intensité du pic. La comparaison des profils protéiques résultant

des différentes conditions nécessite des étapes de calibration, de normalisation et de contrôle par rapport à des échantillons tests.

## **Etude de faisabilité**

**Patients et matériel:** 4 patients (8 échantillons tissulaires tests) en duplicats : 2 échantillons de tissu CHC-OH et 2 de tissu apparié Cirrhose/CHC-OH ; 2 échantillons de tissu CHC-VHC et 2 de tissu apparié cirrhose/CHC-VHC.

**Méthodes** (Figures 27 et 28):

**1** - Contrôle histologique au giemsa de chaque échantillon tissulaire puis macrodissection des régions cirrhose ou CHC sur 6 coupes congelées consécutives de 10  $\mu\text{m}$  (surface 2  $\text{mm}^2$ )

**2** - Apposition des échantillons en duplicats sur les 3 types de barrettes disponibles dans le laboratoire d'accueil (Pr F Berger, Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM-UJF U836, Grenoble) en évitant les plis : Q10 (pour les protéines négatives), CM10 (pour les protéines positives) et H50 (pour les protéines hydrophobes)

**3** - Lavages (3 solutions): décrochement des protéines fixées de manière non spécifique

**4** - Application d'une matrice (Energy Absorbing Matrix) permettant l'enrobage des protéines fixées, l'absorption d'énergie et l'ionisation, en évitant les bulles

**5** - Analyse par spectrométrie de masse en tps de vol en utilisant 2 intensités du faisceau laser (210 points d'impact d'environ 50  $\mu\text{m}$  chacun): 2000 nJ (spot  $\frac{1}{4}$ ) et 4000 nJ (spot  $\frac{2}{4}$ ) : désorption des protéines par transfert d'énergie, accélération dans le champ magnétique, obtention de 2 spectres pour l'identification des protéines (m/z) :

- Etude protéines bas PM (< 20 000Da) : 2000 nJ, Focus Matrice (FM) 8000, Matrice Atténuation (MA) 500

- Etude protéines haut PM ( $\geq$  20 000Da) : 4000 nJ, FM 20 000 et MA 2500

**6** - Traitement des données brutes des spectrogrammes permettant de limiter les biais dûs à l'instrumentation et à l'expérimentateur :

- Sauvegarde de tous les spectres bruts

- Calibration grâce à des standards externes : barette NP20 (normal phase) sans propriété physico-chimique et 6 calibrants connus (myoglobine, anhydrase, cytochrome C...)

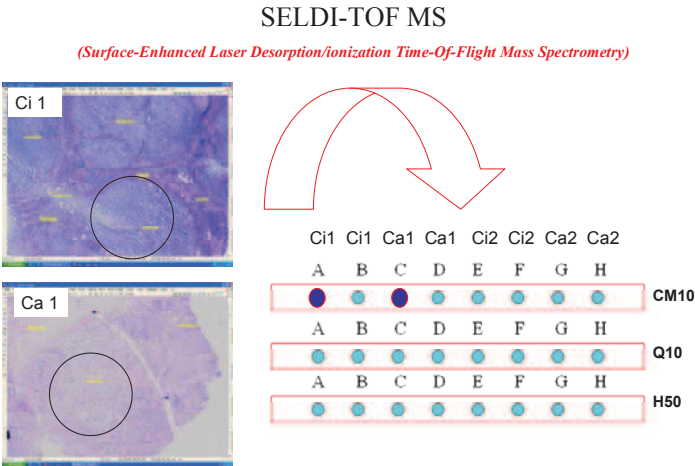
- Analyse signal/bruit de fond (spectres conservés : rapport S/B >5)

- Pics dûs à matrice (jusque vers 2000 Da)

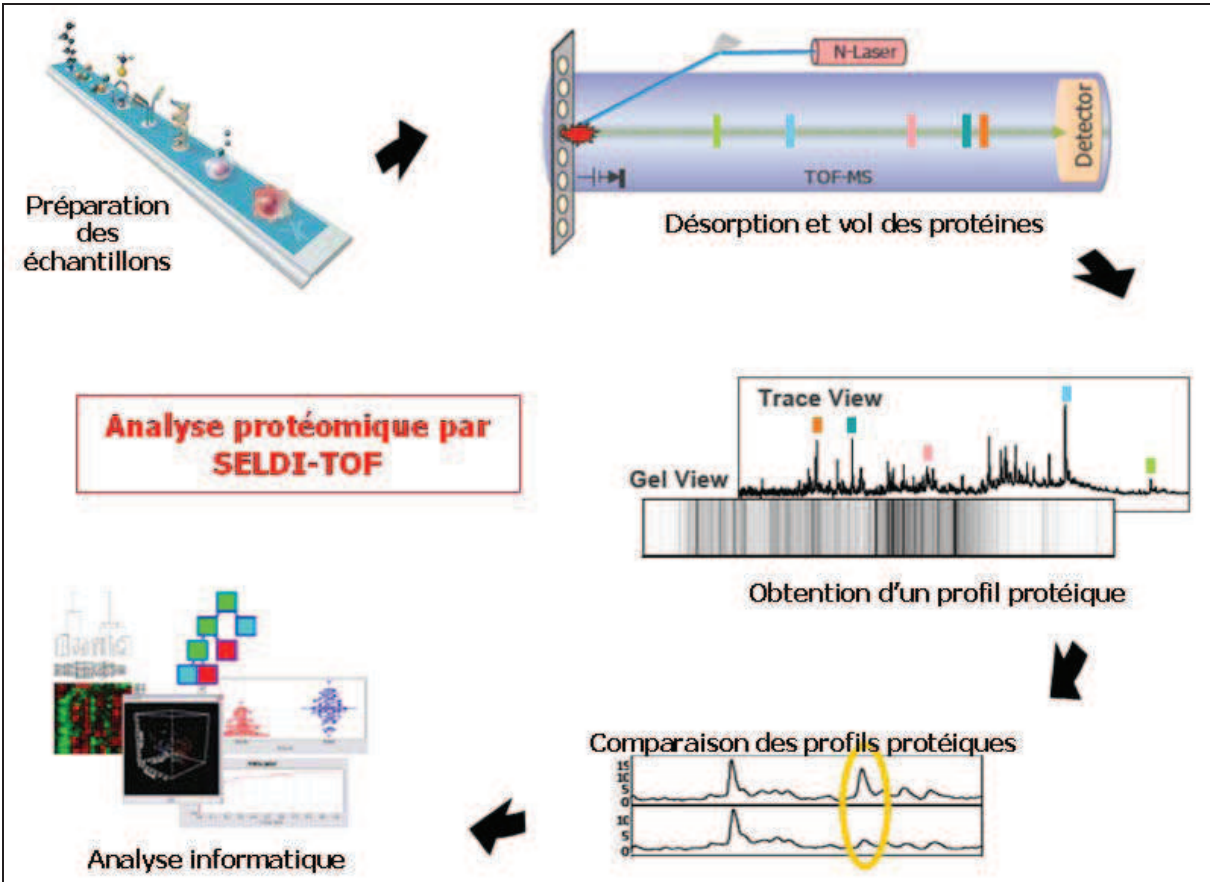
- Limite des pics entre protéines bas et haut PM (entre 10000-20000 Da)

- Normalisation des différents profils entre eux (spectres conservés : 0,5-2) : lissage des données par type de barette et intensité de lecture supprimant les irrégularités techniques

7 - Traitement bio-informatique : analyse différentielle et statistique (spectres conservés) : copie des données corrigées, édition EDM (Expression Differential Mapping), détection des pics et des clusters de pics entre 2000 à 400 000 Da



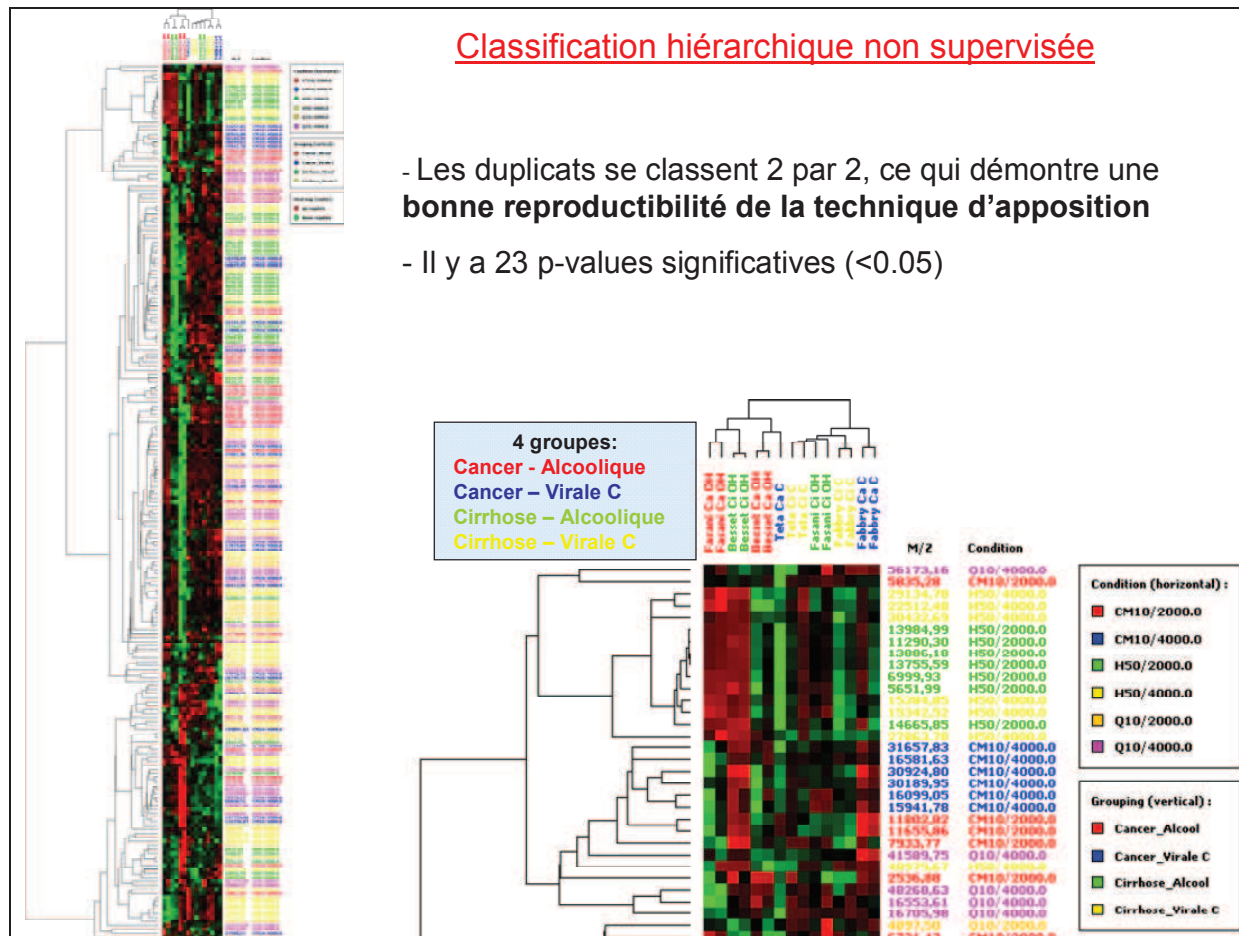
**Figure 27. Préparation des échantillons.** Après contrôle des tissus par une coloration au Giemsa, dépôt des échantillons Cirrhose (Ci) et Cancer (Ca) en duplicats sur les trois types de barettes CM10, Q10 et H50.



**Figure 28. Etapes de l'analyse protéomique des échantillons par SELDI-TOF/MS.**

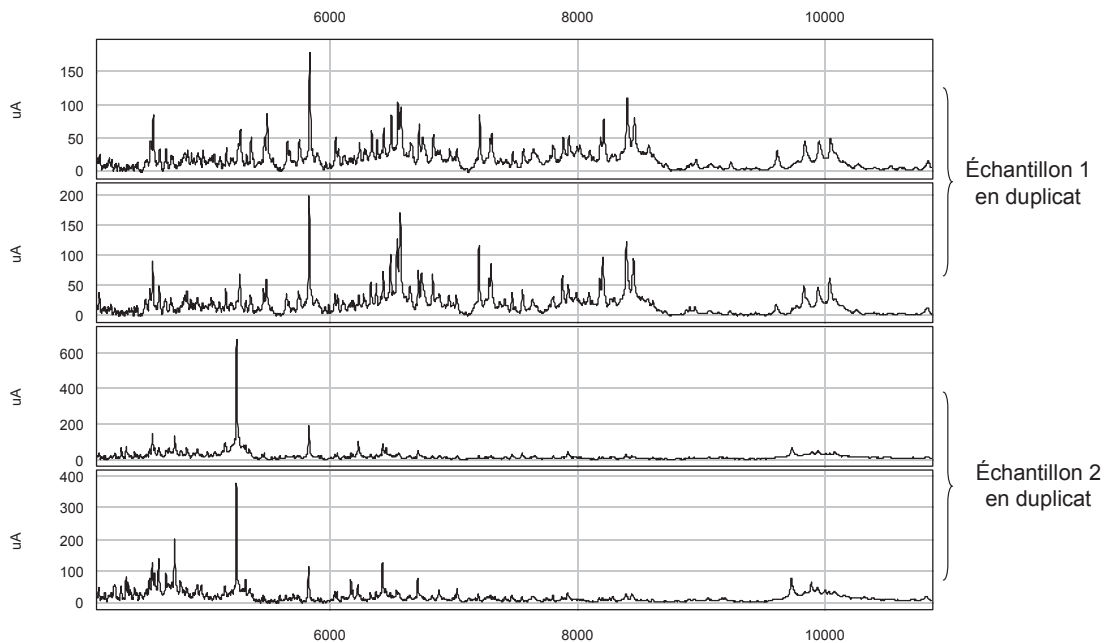
## Résultats

- **Classification hiérarchique non supervisée** : les profils obtenus au cours de la première expérience pour chaque duplicat d'échantillon tissulaire (deux coupes congelées consécutives) se groupent 2 à 2, ce qui signifie qu'ils sont superposables et que la technique d'apposition est reproductible (Figures 29 et 30).



**Figure 29.** Carte d'expression différentielle non supervisée des protéines présentes dans les 8 échantillons tissulaires tests (2 CHC-OH et les 2 cirrhoses appariées, 2 CHC-VHC et les 2 cirrhoses appariées), montrant en rouge les protéines dont le taux relatif varie de manière positive entre les différents échantillons et en vert celles dont le taux relatif varie de manière négative. Les annotations horizontales représentent les conditions expérimentales et les annotations verticales les caractéristiques des échantillons tissulaires. Les duplicats "clusterisent" deux à deux, ce qui démontre une reproductibilité de la technique d'apposition.

## Reproductibilité des duplicats

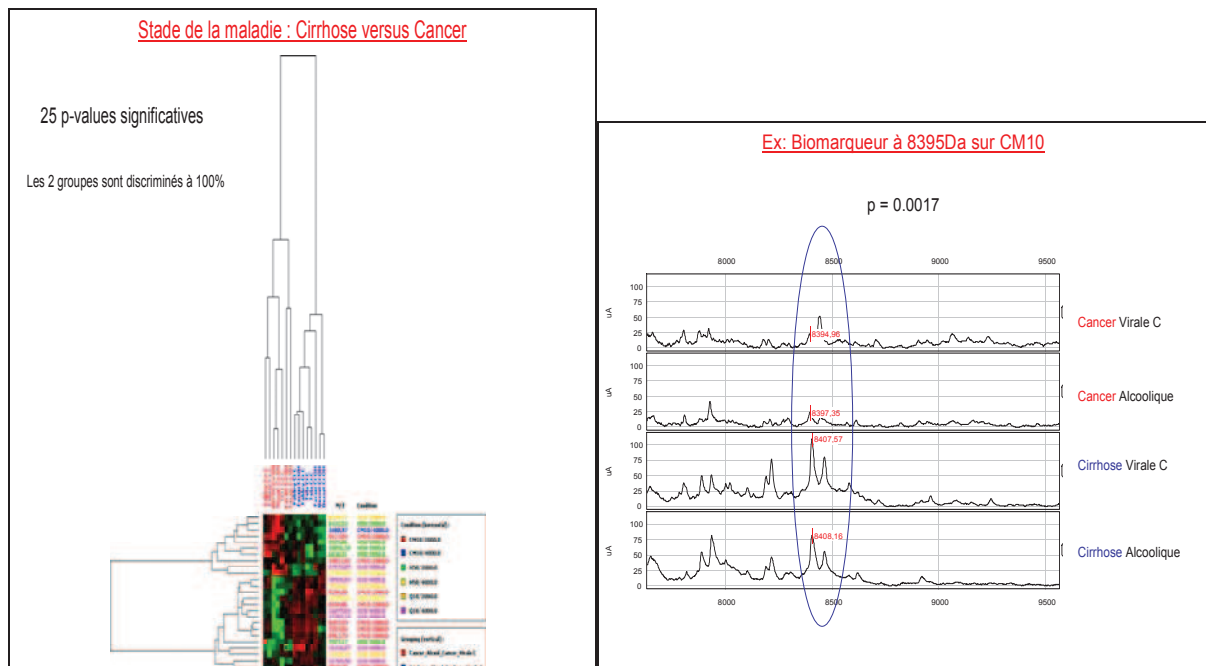


**Figure 30. Spectres de masse SELDI-TOF/MS (m/z 4000 à 10 000) obtenus à partir d'échantillons tissulaires tumoraux** (échantillon 1 : CHC-VHC et échantillon 2 : CHC-OH). Les duplicats de chaque échantillon tissulaire sont parfaitement superposables, ce qui confirme la reproductibilité de la technique, mais les profils protéiques des deux échantillons tissulaires sont totalement différents selon l'étiologie virale ou éthylique du CHC.

- **Classification hiérarchique supervisée** : elle permet une analyse comparative des sous-groupes 2 à 2.

Nous avons comparé différentes conditions : (1) groupe VHC versus groupe OH (quel que soit le stade de la maladie), (2) **groupe cirrhose vs groupe CHC (quelle que soit l'étiologie)**, (3) groupe CHC-OH vs groupe CHC-VHC, (4) groupe cirrhose OH vs groupe cirrhose VHC, (5) groupe CHC-OH vs groupe cirrhose OH et (6) groupe CHC-VHC vs groupe cirrhose VHC.

L'analyse protéomique permettait à chaque fois de discriminer les groupes à 100% avec respectivement un nombre de (1) 42 pic, (2) **25 pics** (Figure 31), (3) 35 pics, (4) 36 pics, (5) 19 pics et (6) 40 pics exprimés statistiquement de manière différentielle.



**Figure 31. Etude de faisabilité.** A. Carte d'expression différentielle des protéines présentes dans les 8 échantillons tests, représentée en classification hiérarchique supervisée selon le **statut cirrhose ou cancer**, mettant en évidence 25 pics protéiques exprimés de manière différentielle entre les 2 groupes. B. Spectre de masse SELDI-TOF/MS (m/z 7500 à 9500, barette CM10) montrant un pic protéique à 8395 exprimé de manière différentielle entre le groupe cirrhose et le groupe CHC.

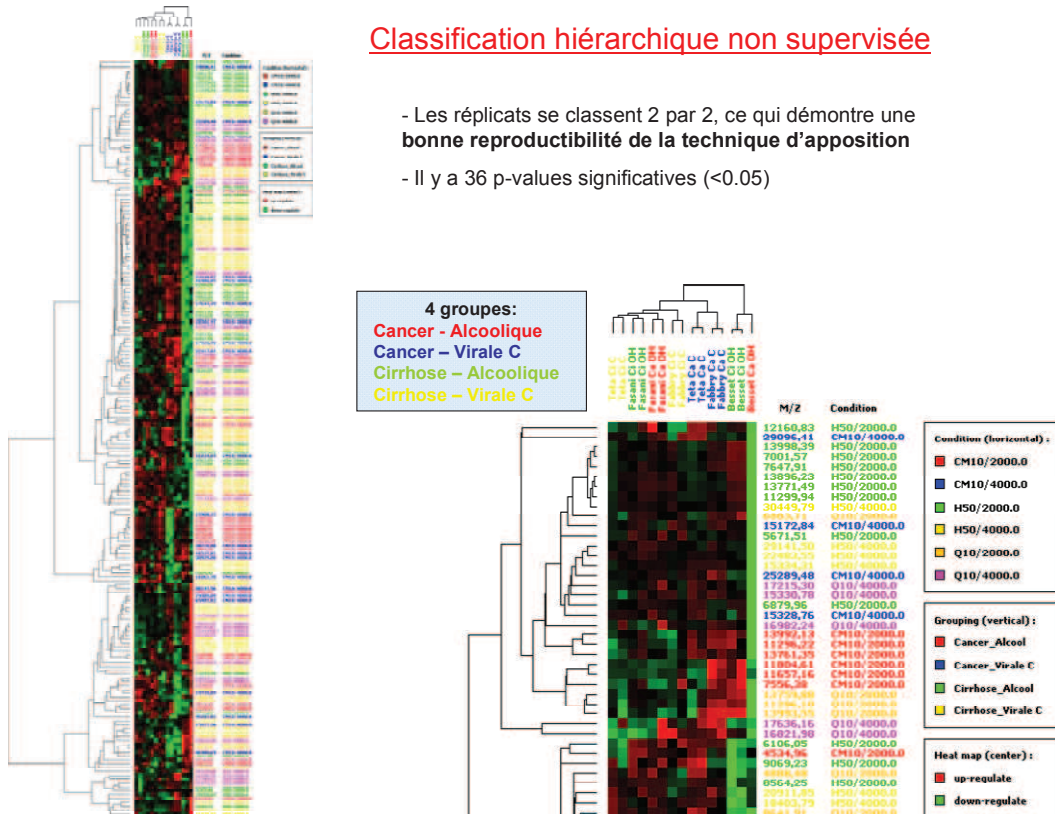
## Etude de reproductibilité

La technique est renouvelée à 1 mois d'intervalle sur les 8 mêmes échantillons tissulaires, traités en duplicats (intitulés « répliqués » pour les différencier des « duplicats » de la première manipulation, correspondant à 2 coupes tissulaires consécutives supplémentaires de 10 µm).

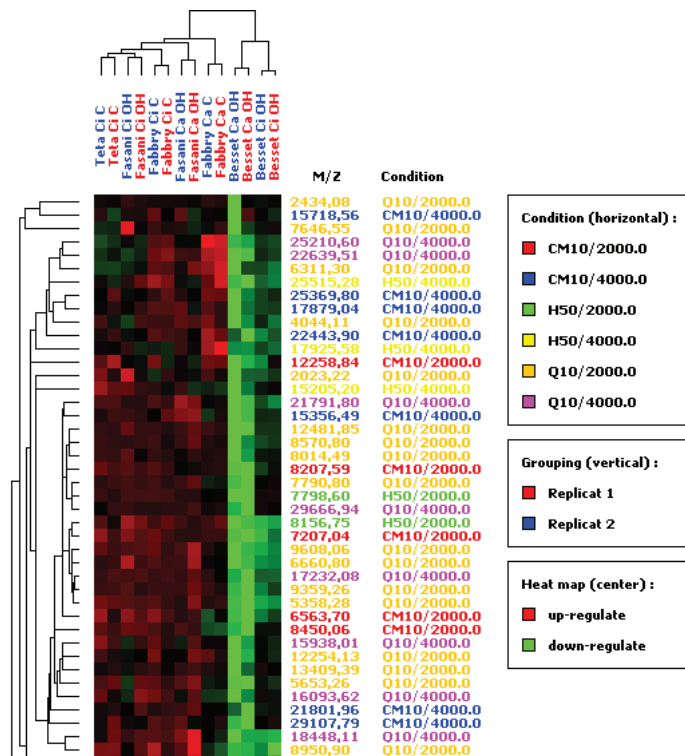
### Résultats

- **Classification hiérarchique non supervisée** : les profils obtenus montrent que les répliqués se regroupent 2 à 2, confirmant la reproductibilité de la technique d'apposition (Figure 32A). Les duplicats et les répliqués issus d'échantillons identiques (identifiés répliqués 1 et 2) se regroupent également, ce qui témoigne d'une bonne reproductibilité de l'analyse, notamment des paramètres inhérents à la lecture des échantillons (Figure 32B). Le test de Mann Whitney comparant les paires de duplicats et les paires de répliqués issus des mêmes échantillons ne retrouve aucune valeur p significative sur 260 clusters examinés, et les coefficients de corrélation entre chaque paire d'échantillons sont compris entre 0.45 et 0.86.

A



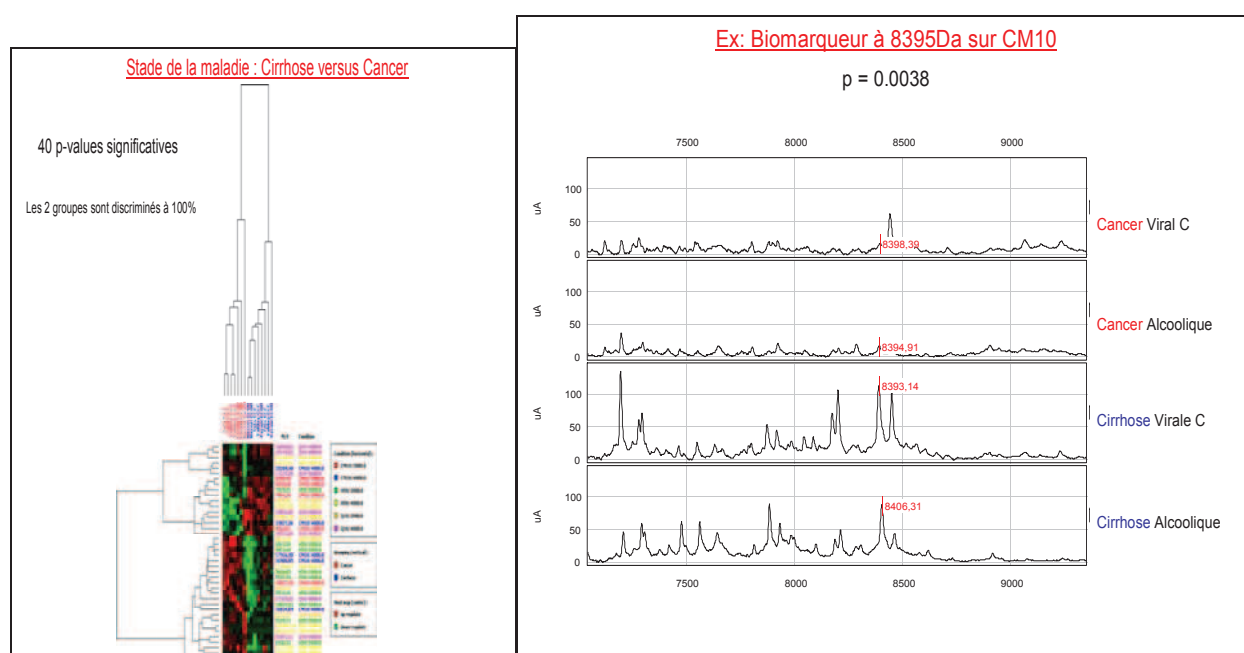
B



**Figure 32. Carte d'expression différentielle non supervisée des protéines** présentes dans les 8 échantillons tissulaires tests. (A) Les réplicats clusterisent deux à deux, confirmant la reproductibilité de la technique d'apposition (B) Les réplicats et les duplicats réalisés sur les mêmes échantillons à un mois d'intervalle clusterisent deux à deux, démontrant la reproductibilité globale de l'analyse.



- **Classification hiérarchique supervisée** : En comparant à nouveau les différentes conditions : (1) groupe VHC versus groupe OH, (2) groupe cirrhose vs groupe CHC, (3) groupe CHC OH vs groupe CHC VHC, (4) groupe cirrhose OH vs groupe cirrhose VHC, (5) groupe CHC OH vs groupe cirrhose OH et (6) groupe CHC VHC vs groupe cirrhose VHC, l'analyse protéomique permettait à nouveau de discriminer les groupes à 100% avec respectivement un nombre de (1) 24 pics, (2) 40 pics, (3) 27 pics, (4) 20 pics, (5) 28 pics et (6) 52 pics exprimés statistiquement de manière différentielle. Le pic identifié avec une masse moléculaire à 8395 permettant de discriminer le groupe cirrhose du groupe cancer avec une p-value à 0,0017 au cours de la première manipulation sur CM10 était retrouvé avec une p-value de 0,0038 (Figure 33).



**Figure 33. Etude de reproductibilité.** A gauche. Carte d'expression différentielle des protéines présentes dans les 8 échantillons tests, représentée en classification hiérarchique supervisée selon le statut cirrhose ou cancer, mettant en évidence 40 pics protéiques exprimés de manière différentielle entre les 2 groupes. A droite. Spectre de masse SELDI-TOF/MS (m/z 7500 à 9500, barette CM10) retrouvant le pic protéique à 8395 exprimé de manière différentielle entre le groupe cirrhose et le groupe CHC.

## Etude en cours

**Réalisation d'une série de 53 patients** : 18 patients porteurs de CHC développés sur cirrhose virale C et 15 patients porteurs de CHC développés sur cirrhose OH ; 9 patients atteints de cirrhose VHC sans CHC et 11 patients atteints de cirrhose OH sans CHC.

L'étude protéomique par SELDI-TOF-MS a donc intéressé 6 groupes de tissu : cirrhose VHC-CHC, cirrhose OH-CHC, tumeur CHC-VHC, tumeur CHC-OH, cirrhose VHC, cirrhose OH, soit 87 échantillons tissulaires traités en duplicats. Tous ces tissus ont également fait l'objet de comptages immunohistochimiques intéressants les marqueurs lymphocytaires CD3, CD8, CD4, CD20.

## Résultats

- **Classification hiérarchique supervisée** : nous nous sommes intéressés aux profils protéiques des tissus « cirrhose VHC-CHC » et « cirrhose OH-CHC », prélevés à plus de 3 cm du CHC. Les duplicats se regroupaient 2 par 2 avec un degré d'homologie de 90%. L'analyse de classification hiérarchique supervisée identifiait 105 pics, dont 26 étaient exprimés statistiquement de manière différentielle (17 sur-exprimés et 9 sous-exprimés) entre les groupes cirrhose VHC-CHC et cirrhose OH-CHC (Figure 34).

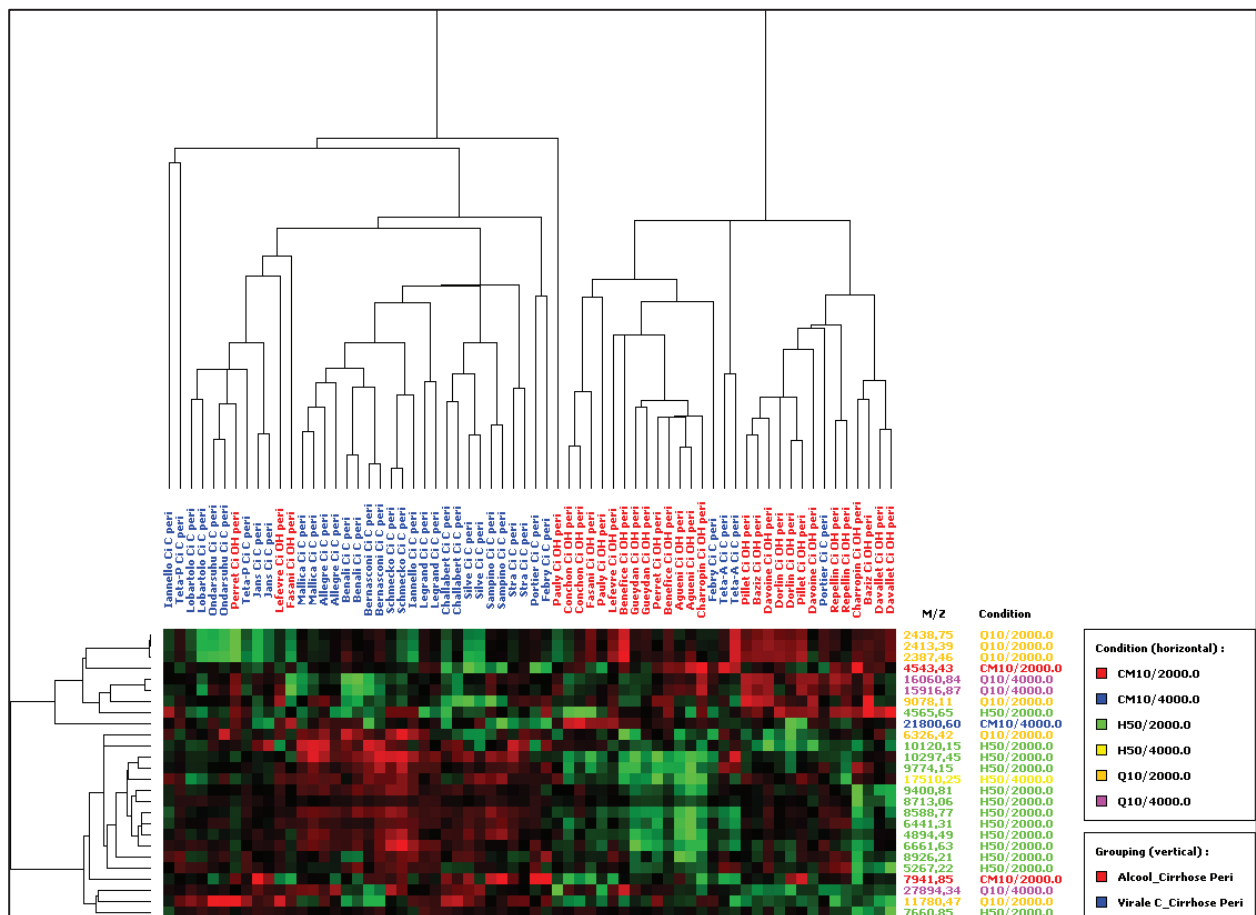
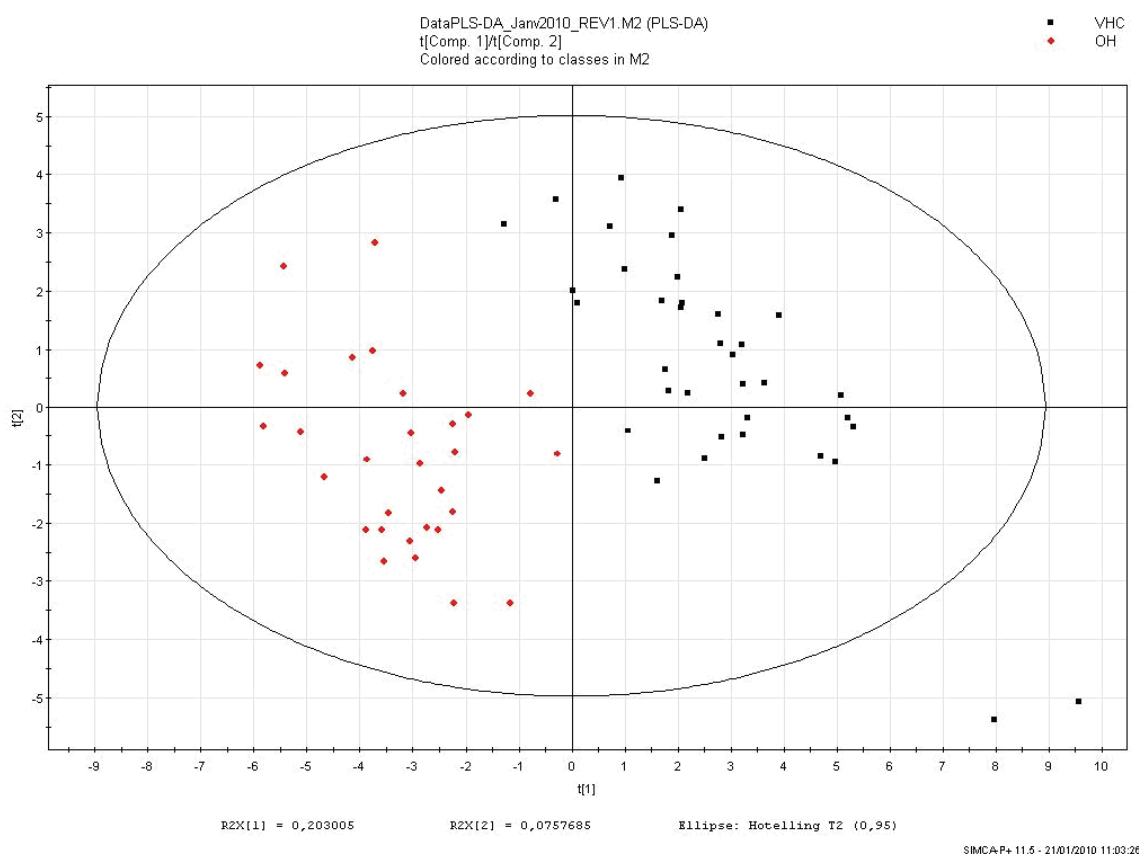


Figure 34. Carte d'expression différentielle en analyse de classification hiérarchique supervisée sur les groupes cirrhose VHC-CHC et cirrhose OH-CHC.

- **Analyse statistique supervisée par la méthode PLS-DA** (partial least squares - discrimination analysis) : cette analyse montrait une très bonne validité des résultats obtenus par SELDI et IHC pour discriminer les 2 groupes (Figure 35) et permettait d'identifier les variables les plus discriminantes entre les 2 groupes.



**Figure 35. Représentation des résultats obtenus en analyse statistique PLS-DA, montrant une très bonne discrimination des groupes cirrhose VHC-CHC et cirrhose OH-CHC en utilisant les variables obtenues par IHC et SELDI-TOF MS.**

Les surfaces H50 pour protéines hydrophobes et Q10 pour protéines anioniques étaient les plus intéressantes pour notre étude SELDI-TOF. Les pics H50-10282, H50-8721 et H50-10100 apparaissaient comme les variables les plus discriminantes entre les 2 groupes, de même que le nombre de cellules immunomarquées avec CD3, CD8 et CD20 (Figure 36). L'analyse des interdépendances entre les variables semblait montrer des relations entre les protéines hydrophobes et le nombre de CD3, CD20 et CD8 et entre les protéines anioniques et le nombre de CD4 (Figure 37).

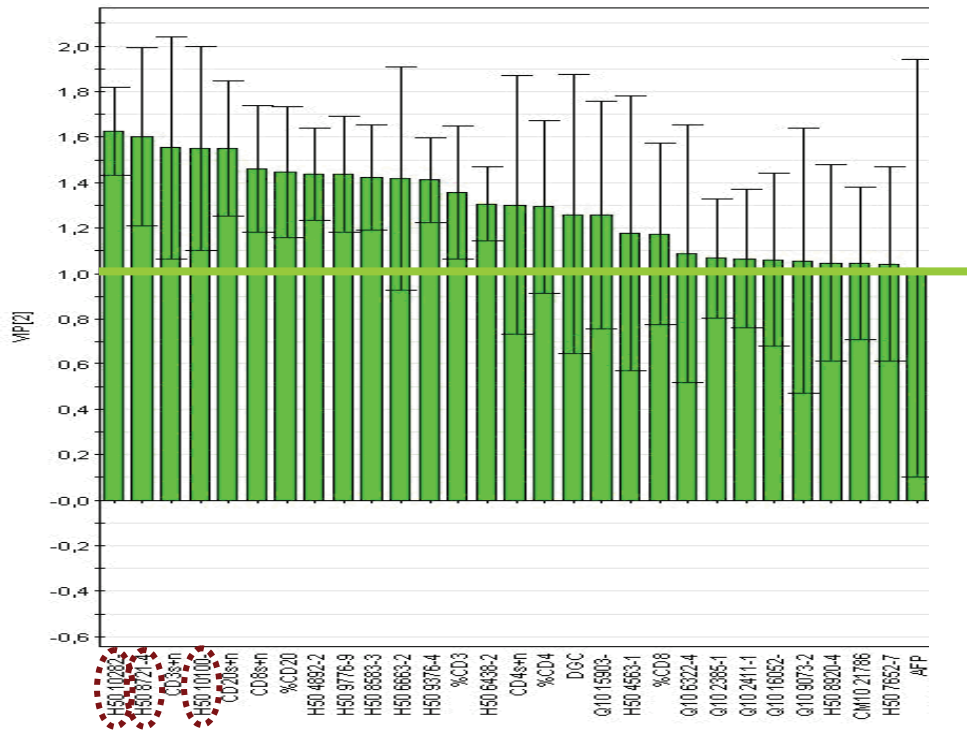


Figure 36. Représentation des résultats obtenus en analyse statistique PLS-DA montrant les marqueurs IHC et les pics obtenus en SELDI-TOF MS les plus discriminants parmi l'ensemble des variables étudiées (valeur  $\geq 1$ ) pour les groupes cirrhose VHC-CHC et cirrhose OH-CHC.

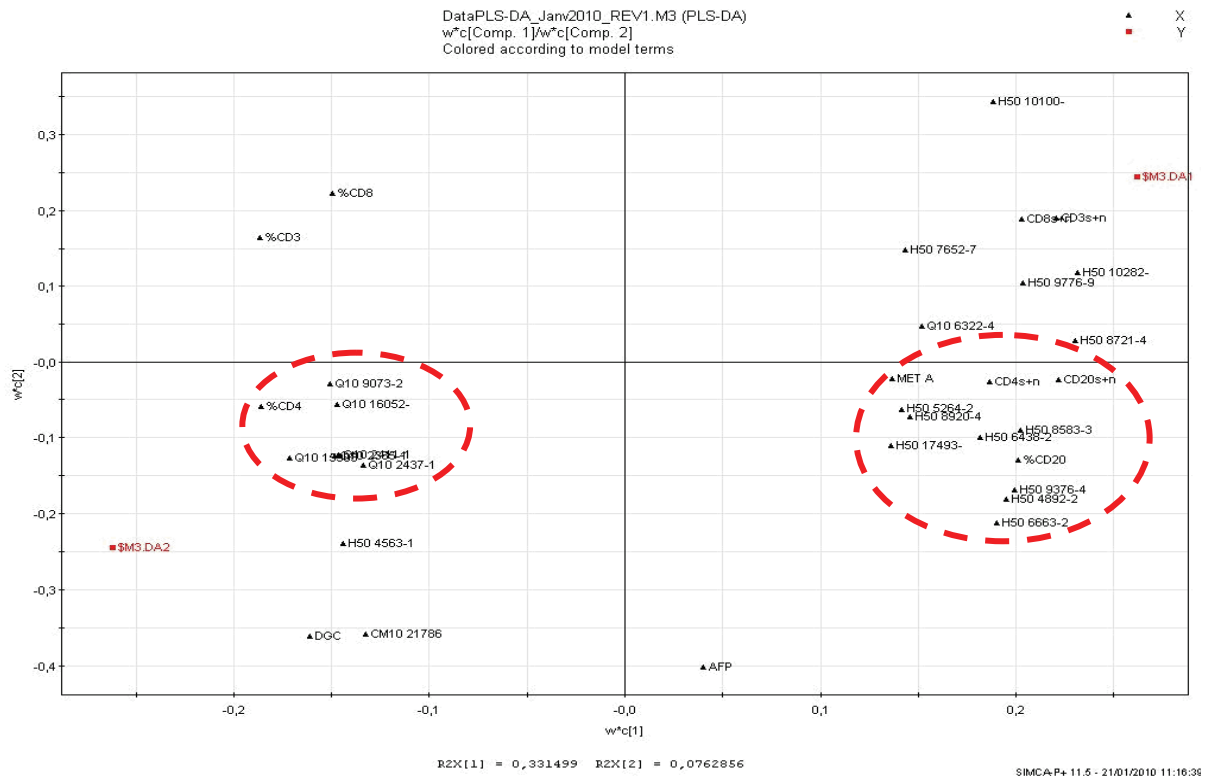


Figure 37. Représentation des résultats obtenus en analyse statistique PLS-DA montrant l'interdépendance des marqueurs IHC et des pics obtenus en SELDI-TOF MS pour les groupes cirrhose VHC-CHC et cirrhose OH-CHC.

### **- Identification des protéines d'intérêt**

Une fois les pics potentiellement intéressants identifiés, il est difficile de déterminer par SELDI-TOF MS, la nature des protéines impliquées car il n'est pas possible de récupérer le matériel fixé sur les ProteinChip. La purification d'une protéine d'intérêt dont la masse a été identifiée par cette méthode nécessite un enrichissement en utilisant des colonnes chargées par des résines de même affinité que les barettes-supports qui ont été utilisées pour identifier le pic d'intérêt, suivi d'une élution spécifique. Une fois la protéine purifiée, son identification repose sur les techniques classiques de peptid fingerprinting et éventuellement de séquençage par MS/MS.

Nous avons tenté une identification des pics intéressants par technique LC-MALDI-MS/MS (spectrophotométrie de masse en tandem par désorption/ionisation laser assistée par matrice, couplée à la chromatographie liquide).

- Dans un premier temps, le profilage par MALDI-TOF MS (Maldi Sandwich ou Maldi ZipTip) a été réalisé sur une coupe de tissu congelé disposée sur une lame non colorée. Il a permis de retrouver certains des pics identifiés en SELDI au sein des tissus cirrhotiques, avec un léger décalage. Un calibrage des appareils SELDI et MALDI s'est avéré nécessaire. La technique MALDI-TOF MS a également été appliquée sur des lysats de cellules, provenant de 2 coupes de 20 µm de tissu congelé, mis dans du tampon de lyse additionné à des inhibiteurs de protéase (dilutions au 1/100 et au 1/1000). Tous les patients et tissus ont été testés.

- Les tentatives suivantes ont porté sur un profilage des peptides/protéines par LC-MALDI. La première tentative de séparation des protéines a été effectuée par HPLC (high pressure liquid chromatography) sur un tout nouvel appareil, suivie de MALDI-MS qui n'a pas permis pour l'instant de retrouver les pics dans les différentes fractions protéiques (donc pas d'identification par MS tandem). La seconde tentative de purification de 4 lysats représentatifs des 4 sous-groupes de cirrhose sur colonne Cr8 micro-LC permettant une affinité plus importante pour les protéines hydrophobes a permis l'identification de 1 à 3 pics massiques par fraction. La prochaine tentative sera de tenter une identification MS/MS après digestion trypsique des fractions purifiées.

### **Projets à venir**

En plus d'identifier des protéines d'intérêt utiles au diagnostic ou au pronostic de la pathologie, nous aimerions donner une représentation quantitative et spatio-temporelle de ces protéines. Deux approches sont envisagées :

- **La microdissection** de cellules (infiltrats lymphocytaires...) ou de régions d'intérêt (foyers de nécrose parcellaire ou lobulaire, fibrose, nodule parenchymateux...) sur coupe

tissulaire congelée colorée par Giemsa, sous contrôle microscopique, suivie d'une analyse protéomique des extraits cellulaires et tissulaires.

- **L'imagerie moléculaire par spectrophotométrie de masse (IMS)** permettant de réaliser une quantification relative du peptidome/protéome au sein même du tissu, sur une coupe de tissu congelée (repérée par superposition à une coupe histologique colorée numérisée) et d'en observer la distribution spatiale. La coupe congelée de 10-20  $\mu\text{m}$  est déposée sur un support conducteur adapté et subit des étapes de préparation (délipidation, déshydratation), puis la matrice est déposée (pour ionisation de molécules supérieure à 700-800 Da) en vue de l'acquisition des spectres en MALDI-TOF-TOF MS (résolution spatiale de 100-200 $\mu\text{m}$ ) et analyse des spectres. L'intensité des signaux est matérialisée par une échelle de couleurs superposée à la coupe histologique numérisée. Cette méthode a l'avantage (1) de permettre de corréler les informations moléculaires déterminées par MS (masse moléculaire, abondance relative) à leur localisation au sein du tissu (2) de permettre la combinaison à des immunomarquages pour repérer les cellules d'intérêt et (3) de permettre une « microdissection » *in situ* [468-470]. Dans cette troisième partie de l'étude, nous tenterons de déterminer la localisation tissulaire des pics ou des marqueurs protéiques précédemment identifiés soit par IMS soit par immunohistochimie dans le cas où des Ac spécifiques seraient disponibles [471].

# DISCUSSION

Les virus de l'hépatite B et C n'ont pas d'effet cytopathique direct et leur persistance semble résulter d'une défaillance des réponses innées et adaptatives du système immunitaire. **Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à certains partenaires de cette réponse immunitaire, principalement les cellules NK et les lymphocytes Treg.**

L'activité des cellules NK, intervenants majeurs de l'immunité innée, est régulée par plusieurs types de récepteurs, activateurs ou inhibiteurs, qui interagissent avec un réseau cellulaire et cytokinique complexe. Les différentes stratégies employées par les virus des hépatites pour contourner ces cellules illustrent leur rôle central dans la réponse précoce de l'hôte contre les infections virales. De nombreuses études *in vitro* suggèrent que leur fonctionnement est altéré au cours des infections chroniques par le VHC et le VHB, mais certains résultats sont contradictoires. Notamment, les études *in situ* sont entravées par la faible quantité de tissu hépatique disponible dans un matériel biopsique et l'absence de tissu hépatique « contrôle » véritablement sain. Le débat reste ouvert concernant l'existence et l'impact d'un dysfonctionnement des NK sur l'évolution chronique de l'infection virale C.

**Nos travaux confirment le fait clairement établi que la fréquence des cellules NK est diminuée dans le sang des patients infectés par le VHC**, au dépens de la fraction CD56<sup>dim</sup>, de manière significative par rapport à des sujets sains et non significative par rapport aux patients infectés par le VHB [275-277]. **Ils montrent une diminution des NK intra-hépatiques des patients infectés par le VHC**, de manière significative par rapport aux NK périphériques de ces patients VHC et aux NK intra-hépatiques de patients infectés par le VHB, **toujours au dépens de la fraction CD56<sup>dim</sup>**. Cette diminution des CD56<sup>dim</sup>, qui avait été évoquée dans le foie de patients au stade de cirrhose virale C dans un travail antérieur [279], se confirme au cours de l'hépatite chronique virale C non cirrhotique. Nous observons, comme d'autres auteurs, que la fraction CD56<sup>bright</sup> est augmentée dans le foie des patients chroniquement infectés par le VHC [277], alors que les fractions CD56<sup>dim</sup> et CD56<sup>bright</sup> sont constantes chez les sujets contrôle ou infectés par le VHB. A contrario, le nombre de cellules NK et la répartition des fractions dim et bright dans le sang de patients porteurs d'infection chronique par le VHB ne semblent pas modifiés de manière significative par rapport à des sujets non infectés [472], soulignant que ces phénomènes ne sont pas seulement en rapport avec le contexte inflammatoire mais que le VHC y contribue probablement aussi. Cette atteinte des CD3-CD56<sup>dim+</sup> pourrait résulter en partie d'une sensibilité particulière de cette population à l'apoptose, naturellement observée chez les NK périphériques de sujets normaux [473], mais accrue sous certaines conditions infectieuses comme cela a été décrit au cours de la tuberculose [474] ou certaines situations thérapeutiques comme cela a été montré chez les patients VHC répondeurs à l'IFN [475]. Les différences observées au cours des infections virales C et B suggèrent également, en accord avec certaines



études, que le VHC soit capable d'altérer directement la prolifération et/ou la différenciation des cellules NK [23, 24, 476].

Nous montrons de plus une corrélation entre la fréquence de certains sous-types de cellules NK et les lésions histologiques hépatiques. **Le nombre de cellules CD3-CD56<sup>bright</sup>NKG2A<sup>+</sup> périphériques est corrélé à la sévérité de l'activité et de la fibrose**, probablement en relation avec le pouvoir pro-inflammatoire de cette population par le biais d'une importante production d'IFN- $\gamma$ , et en accord avec une publication antérieure montrant une corrélation entre les NK CD56<sup>bright</sup> activées et le degré d'inflammation selon Métavir [475]. **Le nombre de cellules CD3-CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> périphériques est inversement corrélé avec la charge virale**, suggérant que cette population soit celle principalement impliquée dans la défense anti-virale, alors qu'aucune corrélation de ce type n'est mise en évidence chez les patients infectés par le VHB. Les immunomarquages sur coupes tissulaires montrent que le nombre de cellules NK intra-hépatiques décroît avec le degré d'activité et de fibrose de l'hépatite chronique virale C, alors que le nombre de lymphocytes totaux augmente avec le degré d'activité, ceci contribuant à une diminution du rapport CD56/lymphocytes totaux au cours de l'aggravation des lésions nécrotico-inflammatoires, plus nette avec le VHC que le VHB. Les cellules CD56<sup>+</sup> auraient également tendance à se localiser préférentiellement hors des lésions nécrotiques lorsque le degré d'activité nécrotico-inflammatoire augmente.

Les études concernant l'existence d'altérations fonctionnelles des cellules NK au cours de l'hépatite chronique virale C sont controversées, notamment leur capacité de production d'IFN- $\gamma$  ou leur pouvoir cytotoxique direct, en raison de leur caractère *in vitro*, de leur faible effectif ou de populations hétérogènes sur le plan clinico-biologique, histologique ou virologique [276, 280, 281, 283]. Notamment, les études *in vitro* qui avait montré que la protéine d'enveloppe E2 était capable d'inhiber les fonctions des cellules NK [23, 24] ont été remises en question récemment en utilisant des systèmes de culture du virus C plus appropriés [255]. Plus précisément, la capacité de production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK des sujets infectés pourrait ne pas être altérée mais la diminution du nombre de cellules NK pourrait engendrer une diminution de production d'IFN- $\gamma$  en réponse aux cytokines IL-12 et IL-15, favorisant de cette manière une réponse Th2 plus propice à la persistance virale. **Nos travaux en cours de publication montrent dans des conditions *ex-vivo* que les cellules NK intra-hépatiques des patients VHC sont fonctionnelles. Bien qu'elles ne produisent pas spontanément d'IFN- $\gamma$ , elles sont capables d'en produire en présence d'un cocktail approprié de cytokines.** Des résultats identiques et à des niveaux globalement similaires sont observés avec les cellules NK intra-hépatiques de patients infectés par le VHB ou de patients non infectés, soulignant que ce phénomène est indépendant du contexte viral et notamment de la présence du virus C. Ces données favorisent l'hypothèse que le défaut de production d'IFN- $\gamma$  par les NK est probablement lié au contexte

inflammatoire et notamment à une stimulation cytokinique insuffisante, plutôt qu'à une incapacité de ces cellules à produire de l'IFN- $\gamma$  ou à une inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  directement par le VHC. Comme les TCD8, les NK peuvent exercer le phénomène de cytolyse par le biais de la perforine. Les grains de perforine nouvellement synthétisés par les NK activées se localisent préférentiellement près de la synapse immunologique, d'où s'effectuera le relarguage vers la cellule cible, contrairement à la sécrétion non polarisée des cytokines, et il a été démontré que la polarisation des grains de perforine culminait au moment du relarguage [477, 478]. Nous observons que la moitié des NK intra-hépatiques des patients infectés par le VHC renferme des granules de perforine et qu'environ 5% d'entre elles sont spontanément engagées dans un processus de dégranulation. Les immunomarquages sur coupes tissulaires montrent que ces grains de perforine sont polarisés dans le cytoplasme des cellules CD56+, suggérant que les NK sont en capacité de dégranuler, prêtes à exercer leur fonction effectrice, mais la faible proportion de cellules NK exprimant CD107 indique qu'elles ne sont pas encore engagées dans le processus de dégranulation. **Les cellules NK des patients infectés par le VHC sont donc en capacité de cytolyse**, dans les mêmes proportions que les NK des patients infectés par le VHB ou non infectés, **et cette activité cytolytique peut être stimulée** dans les trois groupes, mais de manière un peu plus importante pour le VHC, ce qui signifie qu'elle n'est spontanément pas à son maximum. Le nombre de cellules NK engagées dans le processus de dégranulation est également significativement plus bas dans le sang que dans leur foie des patients infectés par le VHB ou le VHC, ce qui signifie que l'activité cytolytique se produit majoritairement au site de l'infection.

Peu d'informations sont disponibles sur l'expression des récepteurs inhibiteurs et activateurs à la surface des NK périphériques ou intra-hépatiques et sur leur implication fonctionnelle dans la maîtrise de l'infection virale C. Le dogme de la balance entre NKR inhibiteurs et activateurs « en faveur d'un signal inhibiteur en dehors de tout contexte infectieux, et évoluant vers un signal activateur dans un contexte infectieux » est largement débattu dans le cas de l'infection chronique virale C [211, 479]. L'activation des cellules NK pourrait en effet être entravée par une expression inhabituellement élevée de récepteurs inhibiteurs à leur surface, contribuant à la persistance virale [480]. Nous nous sommes intéressés principalement à deux types de récepteurs inhibiteurs, les KIR CD158 et les NKG2A. Les NK exprimant CD158 représentent une population importante parmi les NK intra-hépatiques des sujets normaux [411]. En accord avec d'autres auteurs, nous ne retrouvons pas de diminution d'expression des récepteurs CD158 à la surface des NK périphériques des sujets chroniquement infectés par le VHC [277, 411]. Par contre, nous observons une **diminution des CD158 à la surface des NK intra-hépatiques des sujets infectés par le VHC, argument supplémentaire témoignant d'une atteinte préférentielle des CD3-CD56<sup>dim</sup> par le VHC**, ces récepteurs étant

préférentiellement exprimés dans cette population de cellules NK connue pour être la plus cytotoxique [204, 481]. Peu d'informations sont disponibles sur l'expression des récepteurs de la famille NKG2 à la surface des NK périphériques ou intra-hépatiques. Certains auteurs ont décrit une augmentation de l'expression des NKG2 (tout sous-type confondu) à la surface des NK circulantes des patients chroniquement infectés par le VHC, par rapport à des patients contrôles non infectés et à des patients VHC guéris [277]. D'autres ont observé *in vitro* une augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A indirectement induite par la protéine Core du VHC [285]. Kanto et al. rapportent une augmentation significative de l'expression des récepteurs NKG2A à la surface des cellules NK circulantes provenant de patients infectés par le VHC, par rapport à des patients contrôles non infectés, alors qu'ils n'observent aucune différence d'expression pour les récepteurs KIR et NKG2D [302]. Concernant les NK intra-hépatiques, sur de petits effectifs, une augmentation du récepteur activateur NKG2D a été décrite par rapport aux NK circulantes de patients VHC [482], et une augmentation de NKG2A par rapport aux NK hépatiques de patients non infectés [286]. Nos travaux récents sur une grande série de patients ne montrent **pas de différence dans le nombre et la proportion des récepteurs NKG2 A, C et D exprimés à la surface des cellules NK intra-hépatiques ou circulantes des patients infectés par le VHC**, en comparaison à des patients infectés par le VHB ou non infectés, à la différence de ce que nous avons décrit deux ans auparavant sur une petite série comparative VHC et VHB, soulignant un biais certain lié à l'effectif des études [483], et à la différence de l'augmentation des récepteurs NKG2A rapportée récemment à la surface des cellules NK circulantes de patients infectés par le VHB par rapport à des sujets sains [472]. Nous montrons que des récepteurs inhibiteurs et activateurs peuvent être co-exprimés à la surface de cellules NK intra-hépatiques comme cela a été démontré au niveau périphérique [484]. Enfin, nous rapportons que les cellules NK intra-hépatiques exprimant NKG2A ont une capacité de dégranulation spontanément identique et après stimulation supérieure à celles des cellules NK totales, et que seul le nombre de cellules NK intra-hépatiques exprimant NKG2D varie et diminue en présence de stimulation par des cellules cibles, qu'il s'agisse de patients infectés par le VHC ou le VHB ou non infectés. Ces données intéressantes suggèrent que le pouvoir cytolytique des NK n'est pas corrélé à l'expression des NKR.

Au cours de l'hépatite chronique virale C, les réponses immunitaires cellulaires T spécifiques du virus sont souvent altérées ou affaiblies. Une des pistes forte ces dernières années pouvant expliquer ce dysfonctionnement serait la présence de lymphocytes Treg intra-hépatiques spécifiques du VHC, dont on connaît l'augmentation dans le sang des patients infectés par le VHC et le caractère suppressif sur la prolifération des populations TCD4 et TCD8, mais aussi sur leur production cytokinique et leur fonction cytotoxique [314, 352-355]. Contrairement à de

nombreuses études réalisées *in vitro* sur des Treg périphériques, nos travaux sur des Treg intra-hépatiques, réalisés en condition *ex vivo*, permettent de mieux comprendre ce qui se passe au site de l'infection virale C. Grâce à des données basées sur l'expression de FoxP3 en immunohistochimie et en cytométrie de flux, nous pouvons préciser que **les Treg intra-hépatiques sont quasi exclusivement de phénotype TCD4**, en accord avec des travaux antérieurs [357] et qu'ils représentent environ 50% de la population CD4+CD25+ intra-hépatique ou circulante [353], confirmant ainsi l'existence au niveau du foie de lymphocytes CD4+FoxP3+ n'exprimant pas CD25 ou de manière très faible [485, 486]. De plus, nous montrons que les Treg CD8+CD25+FoxP3+, dont l'induction à partir de TCD8 circulants avait été démontrée *in vitro* [362] et la présence dans le foie soupçonnée par l'identification de lymphocytes TCD8 régulateurs sécrétant de l'IL-10 ou du TGF- $\beta$  [360, 361], sont très rares dans le sang [487]. Dans le parenchyme hépatique, ils ne sont pas détectables en cytométrie de flux, et d'exceptionnelles cellules FoxP3+CD8+ sont visualisées en immunohistochimie, démontrant l'extrême rareté de cette population régulatrice TCD8+FoxP3+ au site de l'infection virale C [488]. **Le nombre de Treg intra-hépatiques corrèle avec celui des TCD4 et des TCD8, soutenant l'hypothèse que l'expansion des Treg est la conséquence de l'inflammation hépatique** et témoignant de leur rôle dans la régulation de l'immunité cellulaire anti-virale adaptative au site de l'infection, non seulement sur les TCD8 mais aussi sur les TCD4. L'idée que les Treg s'accumulent dans le foie pour contrôler et inhiber la réponse immunitaire cellulaire intra-hépatique et limiter les lésions histologiques nécrotico-inflammatoires immuno-médiées est renforcée par le fait que le parenchyme hépatique de sujets normaux est quasi dépourvu de Treg CD4+FoxP3+ [486]. Dans cette étude récente, la proportion de Treg par rapport aux leucocytes, aux lymphocytes totaux et aux TCD4 est significativement plus élevée dans le foie des patients VHC que dans les foies normaux, et les Treg circulants sont moins activés et moins différenciés que les Treg intra-hépatiques des patients VHC, posant la question non résolue d'une accumulation dans le foie de Treg provenant du sang ou d'une génération *de novo* de Treg au site de l'inflammation. Cette richesse en Treg est particulièrement liée à l'infection chronique virale C, où elle y est plus marquée que dans l'infection chronique virale B ou dans d'autres pathologies auto-immunes comme la cirrhose biliaire primitive ou l'hépatite auto-immune [489]. Comme d'autres, nous observons les Treg dans les zones de fibrose et dans le parenchyme [357] et ils sont particulièrement nombreux dans les espaces portes et les septa fibreux, site de rencontre précoce et aisé pour les lymphocytes circulants transitant par le foie [486]. **Les Treg sont également présents au sein du parenchyme où la corrélation la plus forte est observée avec les LT cytotoxiques au sein des lésions nécrotico-inflammatoires, suggérant que les Treg contiennent l'expansion des TCD8 par un mode de contact cellulaire direct** [354, 355]. Nous démontrons également **une corrélation entre les transcrits CD8 et FoxP3, CD8 et IL-10,**

et TGF- $\beta$  et IL-10, traduisant probablement le fait que la production des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  constitue un autre mode d'action inhibitrice des Treg sur la cytotoxicité des TCD8 et sur leur production de cytokines pro-inflammatoires [353]. Cette relation étroite entre les Treg, les TCD8 et IL-10 témoigne du rôle crucial mais ambigu des Treg qui, tout en limitant les lésions tissulaires, contribuent à une réponse cellulaire inefficace et favorisent la persistance virale. Le but principal des Treg ne semble pas être celui du contrôle de la réplication virale, car nous n'observons aucune corrélation avec la charge virale ou le génotype viral, en accord avec certaines études [486], mais en contradiction avec d'autres qui utilisent le rapport FoxP3/CD3 plutôt que le nombre de Treg [490].

Nous mettons également en évidence une **rupture de l'équilibre entre les deux populations à un stade avancé de la maladie inflammatoire fibrosante virale C, au delà du stade F3 et du grade A2, se traduisant par une chute du rapport FoxP3/CD8 et témoignant de l'effet "bénéfique" exercé par les Treg intra-hépatiques sur les lésions histologiques au début de la maladie**. Ces résultats vont dans le sens de publications récentes montrant une corrélation inverse entre la fraction de CD4+FoxP3+ exprimant CD25+ et l'activité nécrotico-inflammatoire histologique [485] ou entre le ratio de Treg/leucocytes et le stade de fibrose, avec un nombre de Treg FoxP3+ plus élevé au stade de fibrose minimale [486]. Cette étape pourrait représenter un tournant dans l'évolution de la maladie où la diminution du nombre des Treg pourrait entraîner une perte de contrôle de l'activité cytolytique des TCD8. La manière dont les Treg inhibent la fibrogenèse n'est pas clairement établie. La production de TGF- $\beta$  par les Treg, cytokine connue pour activer les cellules étoilées du foie et la fibrogenèse [491], semble une source minoritaire de TGF- $\beta$  libre actif et celui fixé à la membrane des Treg inhibe seulement les cellules immunitaires au contact [492, 493]. Les hypothèses les plus probables reposent sur l'IL-10, cytokine principalement produite par des cellules régulatrices et capable d'inhiber les cellules étoilées et le dépôt de collagène [494] ou sur l'aptitude des Treg à inhiber directement les fonctions effectrices des cellules T intra-hépatiques et donc de manière indirecte leur production cytokinique impliquée dans l'activation des cellules étoilées du foie [495].

Il est clairement établi que l'infiltrat inflammatoire dans certaines pathologies chroniques s'accompagne de fibrose et fait le lit du cancer [496-498]. Dans le foie, 80% des CHC se développent sur une cirrhose, et les cirrhoses virales B et C sont les principales causes de CHC [499, 500]. Ces cirrhoses arborent de manière chronique un nombre important de lymphocytes considérés comme promoteurs de carcinogenèse [145]. Nos résultats confirment que **les populations lymphocytaires B (CD20+) et T (CD3+, CD4+, CD8+) sont plus nombreuses dans les cirrhoses virales C qui ont développé un CHC que dans celles sans CHC**, alors que le nombre de CD56+ est significativement abaissé et que celui de FoxP3 et TCR  $\gamma\delta$  ne diffère

pas. Dans les cirrhoses virales C avec ou sans CHC, tous les types de cellules inflammatoires étudiés (CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD56+, TCR  $\gamma\delta$  +, FoxP3+) sont plus nombreux dans le tissu fibreux que dans les nodules parenchymateux, et en nombre largement supérieur à ce qui est observé au sein d'un groupe « contrôle » de cirrhoses éthyliques ayant développé un CHC, probablement en raison de la présence de nodules et follicules lymphoïdes caractéristiques de l'infection virale C [110, 501, 502]. Il y a moins de tous les types de cellules inflammatoires dans les cirrhoses éthyliques qui développent un CHC que dans les cirrhoses virales C qui développent un CHC, excepté pour les CD56+, mais cette différence entre les deux étiologies disparaît au sein des nodules parenchymateux (data not shown). Cette caractéristique « inflammatoire » apparaît très discriminante dans l'analyse statistique en PLS-DA intéressants l'ensemble des données obtenues en protéomique et en immunohistochimie sur les groupes cirrhose virale C ou cirrhose éthylique ayant développé un CHC. Les pics protéiques les plus discriminants sont fortement interdépendants de l'infiltrat lymphocytaire TCD3, TCD8, TCD4 et B. Si on s'intéresse à l'infiltrat au sein des nodules parenchymateux, le nombre de cellules CD3+, CD4+, CD8+ et TCR $\gamma\delta$ + est corrélé à l'activité nécrotico-inflammatoire selon Métavir. Le nombre de CD3+ et CD8+ est significativement plus élevé dans les cirrhoses C qui développent un CHC que dans celles sans cancer, avec une diminution du rapport CD4/CD8 en faveur d'un enrichissement du nodule en lymphocytes cytotoxiques. Le nombre de cellules FoxP3+ corrèle également avec CD4+ et CD8+ seulement dans les nodules. **Concernant l'évolution tumorale, seul le nombre de CD8+ est corrélé à la récurrence tumorale en analyse multivariée**, bien que les CD3+, CD4+ et Fox+ sont également plus nombreux dans les cirrhoses des CHC qui récidivent que dans les cirrhoses des CHC guéris.

**Ces données illustrent le rôle de l'infiltrat inflammatoire dans la survenue et la récurrence du cancer et confortent les résultats d'études récentes en faveur d'une "signature moléculaire inflammatoire" dans le parenchyme non tumoral corrélée à la récurrence tumorale et à la survie** [142, 381]. Cette signature moléculaire est le reflet de l'intensité de la pathologie inflammatoire et soutient le concept d'un "effet champ", en l'occurrence l'exposition du parenchyme cirrhotique à l'infection virale B ou C, renfermant un potentiel accru de transformation maligne, à l'origine des "récurrences" carcinomateuses dont les analyses de clonalité ont montré que certaines, plus volontiers celles survenant tardivement, possédaient un clone différent de la tumeur primitive [142]. **Nos résultats confortent également l'hypothèse du "nodule cirrhotique transformé" à l'origine du cancer** [499], avec un rôle **protumorigène possible des TCD8**, rôle préalablement évoqué dans un modèle murin de cancer cutané [503]. Différentes cytokines sont connues pour influencer le développement ou la progression du CHC, certaines favorisant l'immunité anti-tumorale (IL-12, IFN- $\gamma$ , TRAIL) et d'autres favorisant la progression tumorale (IL-6, IL-17, IL-23) [143, 497]. Nous avons observé

une expression de la cytokine IFN- $\gamma$  et de la chimiokine RANTES plus élevée dans les cirrhoses C qui ont développé un CHC que dans les cirrhoses C sans CHC, traduisant là encore un état pro-inflammatoire propice au cancer, accompagnée d'une diminution de l'expression d'IL-6, cytokine impliquée dans la régénération hépatocytaire. RANTES attirerait particulièrement les LT cytotoxiques dans le nodule parenchymateux, conduisant aux lésions nécrotico-inflammatoires à l'origine de remodelage tissulaire, d'altérations de certaines voies de signalisation et de transformation maligne des hépatocytes [143, 504, 505].

Bien que les cellules inflammatoires soient en général plus nombreuses dans les cancers se développant sur une pathologie inflammatoire chronique, nous avons constaté que tous les types de cellules inflammatoires étudiées (CD20+, CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, TCR- $\gamma\delta$ +, FoxP3+) étaient significativement moins nombreux dans le tissu carcinomateux que dans le tissu cirrhotique d'origine virale C qui leur avait donné naissance, confortant et complétant les résultats rapportés par d'autres auteurs en matière de CHC d'étiologies diverses [506]. Nous avons observé des résultats similaires dans les secteurs cirrhotiques et carcinomateux de CHC d'étiologie éthylique, sans différence majeure dans la composition de l'infiltrat inflammatoire au sein des tissus carcinomateux d'origine éthylique ou virale C, au plan immunohistochimique et transcriptionnel (CD4, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, perforine, RANTES) (data not shown). **Ces données suggèrent un défaut de pénétration des cellules inflammatoires dans le CHC, possiblement responsable d'une altération des mécanismes de la réponse anti-tumorale, et peuvent expliquer la croissance tumorale en dépit d'un infiltrat péri-tumoral abondant.** Lorsque nous comparons les densités cellulaires au sein de la tumeur et des nodules parenchymateux, les cellules CD56+ sont moins nombreuses et les cellules FoxP3 sont plus nombreuses dans la tumeur, alors qu'on n'observe pas de différence pour les lymphocytes T et B. Les cellules NK et NKT, impliquées dans l'immunité anti-tumorale, sont les seules cellules étudiées sans pouvoir tumorigène connu. **Nous avons déjà montré une diminution du nombre des cellules CD56+ au cours du processus de fibrogenèse de F0 à F4 dans l'hépatite chronique virale C [483].** Nous montrons à nouveau une diminution des cellules CD56+ d'une part entre les stades de cirrhose virale C sans cancer et de cirrhose virale C avec CHC, et d'autre part entre la cirrhose virale C ayant développé un CHC et le tissu tumoral du CHC. **L'effondrement progressif des cellules CD56+ au cours de la progression de la maladie virale C sous-tend l'hypothèse d'une défaillance de l'immunité anti-tumorale au cours du processus de carcinogenèse et au cours de l'évolution du CHC, confortée par la diminution des lymphocytes cytotoxiques TCD8+ et par l'augmentation des lymphocytes Treg suppressifs de la réponse anti-tumorale au sein de la tumeur.** La diminution du nombre de cellules CD56+ dans le tissu tumoral pourrait engendrer un défaut de présentation des Ag tumoraux et/ou une co-stimulation inefficace des cellules cytotoxiques. Cette diminution

progressive des CD56<sup>+</sup> de la cirrhose virale C au CHC s'observe aussi de la cirrhose éthylique avec cancer au CHC développé sur cirrhose éthylique, sans différence significative dans le nombre de CD56<sup>+</sup> observé dans les cirrhoses avec CHC et dans les CHC de ces 2 étiologies, suggérant un mécanisme indépendant du virus. Cette diminution des cellules NK dans le CHC (par rapport au tissu non tumoral adjacent) est en accord avec la diminution qui a été rapportée dans des CHC à un stade avancé aux dépens de la population NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, associée à une diminution de la cytotoxicité et de la production d'IFN- $\gamma$  et à une augmentation des cellules régulatrices TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, traduisant une altération de la réponse anti-tumorale intra-tumorale [410]. Lorsque nous comparons l'infiltrat inflammatoire au sein des CHC et au sein des nodules cirrhotiques où se concentrent les TCD3<sup>+</sup> et les TCD8<sup>+</sup>, nous constatons nous aussi un enrichissement significatif du tissu tumoral en FoxP3<sup>+</sup> et une augmentation du rapport FoxP3/CD8, alors que les cellules CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> sont en nombre sensiblement équivalent, soutenant l'hypothèse que les Treg ont pour principale fonction de supprimer le rejet tumoral médié par les lymphocytes cytotoxiques [507]. Contrairement à d'autres, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre récurrence tumorale et densité intra-tumorale de FoxP3<sup>+</sup> [464, 466] ou densité des autres marqueurs lymphocytaires testés dans cette série [376, 377, 383], que ce soit au niveau cellulaire ou cytokinique, peut-être en raison d'un effectif réduit de CHC. Notamment, nous notons une diminution du nombre de LT $\gamma\delta$  du parenchyme cirrhotique au tissu tumoral, et nous n'observons pas de corrélation entre le nombre de ces lymphocytes intra-tumoraux et la récurrence tumorale, alors que leur présence a été décrite comme un facteur pronostique de récurrence dans les carcinomes ovariens à un stade avancé [508]. Peu de choses sont connues dans le CHC. Dans une étude déjà ancienne, leur concentration au niveau de la capsule tumorale, site où ils exprimeraient préférentiellement CD8 et CD56 par rapport au parenchyme cirrhotique sans cancer et cirrhotique autour du cancer, pourrait représenter un moyen de lutter contre l'expansion tumorale [509].

Enfin récemment, dans une série de 24 CHC d'étiologies éthylique ou virale C, pour laquelle le taux de récurrence était significativement supérieur dans les CHC sur cirrhose virale C, nous avons observé que le nombre de cellules CD123<sup>+</sup> (marqueur immunohistochimique des PDC), de manière identique à toutes les autres cellules inflammatoires déjà étudiées, était plus élevé dans le parenchyme cirrhotique que dans la tumeur. Néanmoins, la densité intra-tumorale de cellules CD123<sup>+</sup> était corrélée à la récurrence tumorale (data not shown). Ces données préliminaires demandent à être confirmées sur une plus grande série, mais vont dans le sens de publications impliquant les PDC comme facteur indépendant de mauvais pronostic dans les cancers du sein, tant sur la survie globale que sur la récurrence [445]. Par contre, au sein des nodules cirrhotiques, bien que les TCD8<sup>+</sup> soient les seuls associés de façon indépendante à la récurrence tumorale, le nombre de FoxP3<sup>+</sup> était corrélé à celui des TCD8<sup>+</sup> et était



significativement plus élevé dans les cirrhoses virales C avec CHC qui récidivaient. Ces résultats suggèrent que la présence des Treg contrebalance celle des TCD8 et qu'ils sont une "conséquence" de l'activité des TCD8 qu'ils doivent contrôler et inhiber, comme nous l'avons récemment décrit au cours de la progression des lésions fibro-inflammatoires dans l'hépatite chronique virale C [488]. **L'ensemble de ces données comparatives suggère que l'infiltrat lymphocytaire tumoral du CHC développé sur cirrhose virale C est davantage régulateur que cytotoxique, comparé à l'infiltrat lymphocytaire de la cirrhose péri-tumorale**, et plus particulièrement celui du nodule parenchymateux, ce qui va dans le sens d'une l'inertie de l'infiltrat tumoral et de la quiescence de ses lymphocytes, déjà rapportées dans des CHC d'étiologies plus variées [384, 402].

Nous concluons que la présence d'un infiltrat inflammatoire important dans le parenchyme cirrhotique à distance du CHC ne constitue pas un élément bénéfique à l'évolution de la pathologie tumorale, et que le rôle pronostique de l'infiltrat inflammatoire intra-tumoral dépend de son caractère cytotoxique ou régulateur, ce dernier semblant prédominer en matière de CHC.

**CONCLUSIONS**  
**&**  
**PERSPECTIVES**

## Conclusions

Nos résultats ont permis d'apporter des informations complémentaires sur le rôle de l'infiltrat inflammatoire au cours de l'hépatite chronique virale C et de la carcinogenèse hépatique, de manière globale, mais également en fonction de certains types cellulaires. Bien qu'ils soient plus descriptifs (phénotype, nombre, localisation) que fonctionnels et qu'ils se heurtent à la difficulté d'obtenir du parenchyme hépatique sain constituant le meilleur des groupes « contrôle », ils présentent l'avantage d'être réalisés en dans des conditions *ex vivo* et d'utiliser des méthodes *in situ*. Les données que nous avons recueillies suscitent certaines réflexions, que nous projetons d'explorer en détail dans nos travaux futurs :

1- L'infiltrat inflammatoire lymphocytaire est plus dense dans le parenchyme cirrhotique ayant développé un CHC que dans celui qui en est indemne, suggérant un rôle dans la carcinogenèse hépatique. Cet état inflammatoire s'accompagne d'un milieu cytokinique pro-inflammatoire comme en témoigne l'augmentation de l'expression d'IFN- $\gamma$  et RANTES.

2- Les TCD8, qui représentent une population majoritaire, semblent particulièrement délétères. Leur nombre dans le foie atteint d'hépatite chronique virale C est corrélé aux lésions tissulaires, et notamment à l'activité nécrotico-inflammatoire. Les TCD8 sont aussi significativement augmentés dans le parenchyme nodulaire des cirrroses virales C qui ont évolué vers le CHC et dans le parenchyme cirrhotique des CHC qui ont récidivé après traitement, suggérant que les TCD8 jouent un rôle dans la tumorigenèse et la récurrence carcinomateuse.

3- Les cellules NK, en nombre particulièrement élevé dans le foie normal, ne cessent de diminuer à tous les stades de la maladie virale C, notamment la fraction des NK les plus activées (CD56<sup>dim</sup>). Leur nombre décroît du stade F1 au stade F4 de l'hépatopathie chronique, mais également de l'état de cirrhose sans cancer à celui de cirrhose avec CHC, et enfin il est le plus bas dans le tissu carcinomateux. Les capacités de cytolyse et de cytotoxicité des NK intra-hépatiques ne semblent pas altérées *ex vivo* mais leurs fonctions seraient déviées vers un mode davantage régulateur que cytotoxique. Le sous-type CD3-CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>+</sup> inversement corrélé à la charge virale semble important pour le contrôle du virus et pourrait être utilisé comme cible thérapeutique. Les cellules TNK sont également diminuées dans le sang et le foie des patients atteints d'hépatopathie chronique virale C.

4- Les lymphocytes T régulateurs intra-hépatiques (CD4+CD25+FoxP3+) représentent une population minoritaire dont l'impact sur l'évolution de la maladie semble majeur. Leur rôle principal consiste en la « suppression » de l'activité cytotoxique des TCD8, par contact cellulaire direct ou par sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$ . Cette modification du profil cytokinique en faveur d'un mode davantage régulateur que cytotoxique, a un double effet : d'une part, limiter les lésions nécrotico-inflammatoires et d'autre part, favoriser la persistance virale en créant un état de tolérance immunitaire. Ce mécanisme de contrôle semble cependant dépassé aux stades les plus graves de la maladie (grade/stade A3-F4).

L'ensemble des manifestations immunitaires observées dans le parenchyme hépatique chroniquement infecté par le VHC, qu'elles soient cytotoxiques ou régulatrices, est susceptible, par le biais de la régénération cellulaire ou de TGF- $\beta$ , de favoriser la fibrogenèse et/ou la carcinogenèse.

5- Dans la tumeur, l'infiltrat inflammatoire est moins abondant que dans la cirrhose virale C au sein de laquelle il se développe. Il semble davantage régulateur que cytotoxique, avec moins de cellules NK CD56+, plus de lymphocytes Treg FoxP3+ et une augmentation des rapports CD4/CD8 et FoxP3/CD8 dans le CHC par rapport aux nodules cirrhotiques. L'ensemble témoigne d'un défaut de pénétration de l'infiltrat inflammatoire dans le tissu tumoral et/ou d'une défaillance de l'immunité anti-tumorale, susceptible de favoriser la croissance tumorale et/ou la récurrence tumorale.

## Perspectives

Nous poursuivons nos travaux dans les axes "inflammation chronique" et "cancer" liés au VHC, en développant des groupes d'étude comparatifs constitués d'une part d'hépatopathies chroniques liées au VHB, afin de mieux comprendre les rôles respectifs de l'inflammation chronique et du virus C, d'autre part d'hépatopathies chroniques liées à l'alcool ou à la NASH dont la pathogenèse et le type d'infiltrat inflammatoire sont différents.

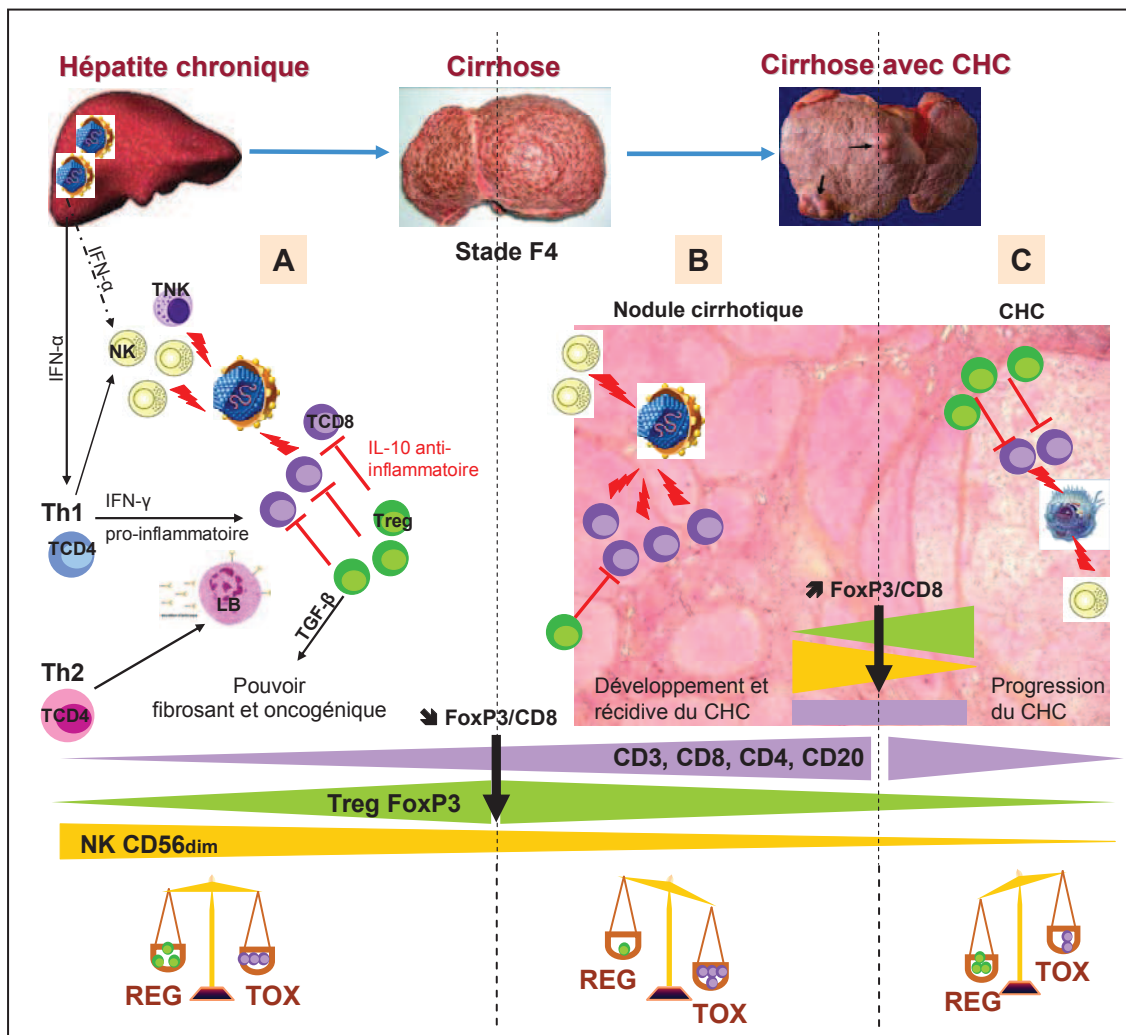
La poursuite des travaux de protéomique tissulaire s'effectuent en collaboration avec les équipes du Pr F Berger à Grenoble (Grenoble Institut Neurosciences, CRI U836 UJF-CEA-CHU) et du Dr P Bulet (TIMC-IMAG, UMR5525 UFF CNRS, Archamps, France) dans le cadre du projet "**lymphocytes du foie dans les cirrhoses et le CHC**" financé par la Ligue du Cancer. Ces travaux pourraient permettre d'identifier, grâce aux différentes techniques utilisées (SELDI-

TOF/MS, MALDI-TOF MS/MS ou IMS), des protéines en relation avec le système immunitaire, biomarqueurs potentiels pour le diagnostic précoce ou pour le pronostic du cancer. La disponibilité et/ou la mise au point d'Ac spécifiques pourrait idéalement constituer une application précieuse au diagnostic quotidien du pathologiste.

La poursuite des travaux sur la réponse immunitaire au cours de l'hépatite chronique virale C s'inscrit dans le cadre d'un projet pluri-disciplinaire sur le "**rôle des lymphocytes cytotoxiques et régulateurs et des cellules NK intra-hépatiques dans l'évolution de l'hépatite chronique virale C**" soutenu par l'ANRS, en collaboration avec le Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques au CHU de Grenoble. Nous nous intéresserons plus particulièrement à des sous-populations immunitaires minoritaires, notamment à leur fréquence et leur localisation, aux mécanismes liés à leurs fonctions effectrices cytolytiques ou régulatrices, et aux interactions/rerelations entre les différentes populations de lymphocytes.

## SCHEMA RECAPITULATIF

Nous proposons de résumer les principaux résultats du travail de thèse dans le schéma ci-dessous (Figure 38)



**Figure 38. Modifications de l'infiltrat inflammatoire lymphocytaire au cours de la maladie virale C, de l'hépatite chronique au carcinome hépatocellulaire.** Les NK CD56<sup>dim</sup> diminuent dans le parenchyme hépatique de l'hépatite chronique au CHC. Les LT et LB se densifient régulièrement jusqu'au stade de cirrhose et notamment de cirrhose avec CHC, puis leur nombre diminue dans le CHC, alors que les Treg FoxP3 augmentent jusqu'au stade de fibrose F3 puis diminuent au stade de cirrhose, l'ensemble conduisant à un effondrement du rapport FoxP3/CD8. **(A).** Dans les premiers stades de l'hépatite chronique, la présence du virus induit la sécrétion d'IFN- $\alpha$  et une cascade pro-inflammatoire, activant les NK et TNK et induisant des TCD8 par le biais d'une réponse Th1. Elle génère une réponse Th2 plus discrète conduisant à la différenciation de LB. Dans cette phase de la maladie, les Treg (REG) contiendraient alors la prolifération et la cytotoxicité (TOX) des TCD8 jusqu'au stade F3 par contact direct et/ou par sécrétion d'IL-10. Le rôle du TGF- $\beta$  au cours de l'évolution de l'hépatite chronique virale C serait progressivement dévié vers un rôle pro-fibrosant et au-delà du stade de cirrhose vers un rôle oncogénique. **(B).** Au stade de cirrhose et notamment dans la cirrhose ayant évolué vers le CHC, l'infiltrat inflammatoire lymphocytaire T est dense dans le tissu fibreux et il existe une prédominance de TCD3 et de TCD8 dans les nodules parenchymateux, ce qui pourrait être associé à une activité cytotoxique accrue, qui serait d'autre part favorisée par la déplétion des Treg. **(C)** Dans le CHC, inversement, tous les lymphocytes sont moins nombreux que dans la cirrhose. Les cellules NK intra-tumorales sont particulièrement peu nombreuses, les Treg sont plus nombreux dans le CHC que dans le nodule cirrhotique et le rapport FoxP3/CD8 intra-tumoral est élevé, ce qui semble signifier que l'infiltrat inflammatoire intra-tumoral serait davantage régulateur que cytotoxique.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2406-2415.
3. Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, Baumert TF. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med* 2010; 16: 277-286.
4. Song Y, Friebe P, Tzima E, Junemann C, Bartenschlager R, Niepmann M. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 2006; 80: 11579-11588.
5. Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 419-427.
6. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 2004; 63: 71-180.
7. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009; 119: 1745-1754.
8. Pascarella S, Clement S, Guilloux K, Conzelmann S, Penin F, Negro F. Effects of hepatitis C virus on suppressor of cytokine signaling mRNA levels: comparison between different genotypes and core protein sequence analysis. *J Med Virol*; 83: 1005-1015.
9. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000; 106: 1239-1249.
10. Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Ray S, Hahn YS. HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology* 2003; 314: 271-282.
11. Ruggieri A, Murdolo M, Rapicetta M. Induction of FAS ligand expression in a human hepatoblastoma cell line by HCV core protein. *Virus Res* 2003; 97: 103-110.
12. Hoffmann M, Zeisel MB, Jilg N, Paranhos-Baccala G, Stoll-Keller F, Wakita T, Hafkemeyer P, Blum HE, Barth H, Henneke P, Baumert TF. Toll-like receptor 2 senses hepatitis C virus core protein but not infectious viral particles. *J Innate Immun* 2009; 1: 446-454.
13. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E, Szabo G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004; 127: 1513-1524.
14. Chang S, Dolganiuc A, Szabo G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 479-487.
15. Batailler R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 529-540.
16. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 10983-10986.
17. Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, Fontemaggi G, Spaziani A, Balsano C. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003; 22: 2573-2580.
18. Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 59-66.
19. Yamanaka T, Kodama T, Doi T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 528-534.
20. Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 2005; 41: 1096-1105.
21. Arora P, Kim EO, Jung JK, Jang KL. Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Lett* 2008; 261: 244-252.



22. Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D, Zignego AL, Atfi A, Brechot C, Bourgeade MF. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2009; 4: e4355.
23. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195: 35-41.
24. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-49.
25. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110.
26. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5-19.
27. Habersetzer F, Fournillier A, Dubuisson J, Rosa D, Abrignani S, Wychowski C, Nakano I, Trepo C, Desgranges C, Inchauspe G. Characterization of human monoclonal antibodies specific to the hepatitis C virus glycoprotein E2 with in vitro binding neutralization properties. *Virology* 1998; 249: 32-41.
28. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15394-15399.
29. Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, Li L, Ke JS, Qi ZT. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res* 2005; 305: 23-32.
30. Zhao LJ, Zhang XL, Zhao P, Cao J, Cao MM, Zhu SY, Liu HQ, Qi ZT. Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 424-432.
31. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 2007; 3: e103.
32. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003; 535: 34-38.
33. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 2007; 81: 8374-8383.
34. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437: 1167-1172.
35. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, Gale M, Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; 300: 1145-1148.
36. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr., Lemon SM. 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* 2005; 102: 2992-2997.
37. Schulze zur Wiesch J, Schmitz H, Borowski E, Borowski P. The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Arch Virol* 2003; 148: 1247-1267.
38. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, Hotta H. 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* 2006; 87: 1703-1713.
39. Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001; 82: 2235-2241.
40. Kwun HJ, Jang KL. Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *J Viral Hepat* 2003; 10: 249-255.
41. Borowski P, Kuhl R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 1999; 13: 61-69.
42. Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13038-13043.

43. Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000035.
44. Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, Moriishi K, Takeuchi O, Kawai T, Kanto T, Hayashi N, Akira S, Matsuura Y. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007; 81: 8953-8966.
45. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006; 80: 866-874.
46. Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5208-5218.
47. Khabar KS, Polyak SJ. Hepatitis C virus-host interactions: the NS5A protein and the interferon/chemokine systems. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1005-1012.
48. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 2005; 19: 159-170.
49. De Mitri MS, Cassini R, Bagaglio S, Morsica G, Andreone P, Marino N, Bernardi M. Evolution of hepatitis C virus non-structural 5A gene in the progression of liver disease to hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2007; 27: 1126-1133.
50. Hung CH, Chen CH, Lee CM, Wu CM, Hu TH, Wang JH, Yen YH, Lu SN. Association of amino acid variations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus 1b with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2008; 15: 58-65.
51. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002; 76: 9207-9217.
52. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75: 1401-1407.
53. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 4801-4811.
54. Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 2000; 67: 173-178.
55. Bonte D, Francois C, Castelain S, Wychowski C, Dubuisson J, Meurs EF, Duverlie G. Positive effect of the hepatitis C virus nonstructural 5A protein on viral multiplication. *Arch Virol* 2004; 149: 1353-1371.
56. Wu WB, Shao SW, Zhao LJ, Luan J, Cao J, Gao J, Zhu SY, Qi ZT. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 2007; 50: 341-346.
57. Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Calle V, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*; 139: 1355-1364.
58. Helle F, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 100-112.
59. Zeisel MB, Barth H, Schuster C, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Front Biosci* 2009; 14: 3274-3285.
60. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278: 20358-20366.
61. Khoo US, Chan KY, Chan VS, Lin CL. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *J Mol Med* 2008; 86: 861-874.
62. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27: 3300-3310.
63. Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 77-85.

64. Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004; 78: 5288-5298.
65. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 2004; 78: 3480-3488.
66. Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000546.
67. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1089-1097.
68. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008; 82: 2120-2129.
69. Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, Coste J, Izopet J, Duverlie G, Payan C, Pawlotsky JM, Defer C, Bogard M, Gerolami V, Halfon P, Buisson Y, Fouqueray B, Loiseau P, Lamoril J, Lefrere JJ, Marcellin P. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *The GEMHEP. J Viral Hepat* 1999; 6: 435-443.
70. Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* 2010; 30: 342-355.
71. Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, Alomair A, Amarapurkar D, Chen CH, Dou X, El Khayat H, Elshazly M, Esmat G, Guan R, Han KH, Koike K, Largen A, McCaughan G, Mogawer S, Monis A, Nawaz A, Piratvisuth T, Sanai FM, Sharara AI, Sibbel S, Sood A, Suh DJ, Wallace C, Young K, Negro F. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int* 2011; 31 Suppl 2: 61-80.
72. Irshad M, Ansari MA, Singh A, Nag P, Raghvendra L, Singh S, Badhal SS. HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenicity and response to treatment. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1529-1538.
73. Chayama K, Hayes CN. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 83-95.
74. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.
75. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.
76. Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gomez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; 52: 33-37.
77. Chung-Feng H, Chia-Yen D, Jee-Fu H, Wan-Long C, Ming-Lung Y. Linkage of the hepatitis C virus genotype and interleukin-28B genetic polymorphisms in Asian patients. *Hepatology* 2011; 53: 367-368; author reply 368.
78. Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int* 2011.
79. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010; 52: 421-429.
80. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2436-2441.
81. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-567.

82. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1: 74-81.
83. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillion JF, Flisiak R, Fornis X, Frankova S, Goldis A, Goulis I, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibbel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E, Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31 Suppl 2: 30-60.
84. Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 2002; 62 Suppl 1: 8-17.
85. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31: 777-782.
86. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.
87. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut* 1999; 45: 613-617.
88. Cramp ME. Hbv + Hcv = Hcc? *Gut* 1999; 45: 168-169.
89. Sanchez-Quijano A, Andreu J, Gavilan F, Luque F, Abad MA, Soto B, Munoz J, Aznar JM, Leal M, Lissen E. Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the natural course of chronic parenterally acquired hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 949-953.
90. Zarski JP, Bohn B, Bastie A, Pawlotsky JM, Baud M, Bost-Bezeaux F, Tran van Nhieu J, Seigneurin JM, Buffet C, Dhumeaux D. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1998; 28: 27-33.
91. Bochud PY, Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour JF, Mullhaupt B, Borovicka J, Heim M, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Francioli P, Negro F. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 51: 655-666.
92. Batailler R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493-503.
93. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver Int* 2011; 31: 443-460.
94. Li Y, Chang M, Abar O, Garcia V, Rowland C, Catanese J, Ross D, Broder S, Shiffman M, Cheung R, Wright T, Friedman SL, Sninsky J. Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2009; 51: 750-757.
95. Trepo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, Lemmers A, Berthillon P, Amininejad L, Chevallier M, Schlue J, Kreipe H, Deviere J, Manns M, Trepo C, Sninsky J, Wedemeyer H, Franchimont D, Moreno C. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 54: 60-69.
96. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 297-306.
97. Marcolongo M, Young B, Dal Pero F, Fattovich G, Peraro L, Guido M, Sebastiani G, Palu G, Alberti A. A seven-gene signature (cirrhosis risk score) predicts liver fibrosis progression in patients with initially mild chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 50: 1038-1044.
98. Trepo E, Potthoff A, Pradat P, Bakshi R, Young B, Lagier R, Moreno C, Verset L, Cross R, Degre D, Lemmers A, Gustot T, Berthillon P, Rosenberg W, Trepo C, Sninsky J, Adler M, Wedemeyer H. Role of a cirrhosis risk score for the early prediction of fibrosis progression in hepatitis C patients with minimal liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 38-44.
99. Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, Rumi MG, Cheroni C, Scavelli R, Crimi M, Soffredini R, Abrignani S, De Francesco R, Colombo M. Genetic variation in IL28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011.
100. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832.

101. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 97-104.
102. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S47-56.
103. Castera L, Hezode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003; 52: 288-292.
104. Perumalswami P, Kleiner DE, Lutchman G, Heller T, Borg B, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH, Ghany MG. Steatosis and progression of fibrosis in untreated patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006; 43: 780-787.
105. Hassan MM, Frome A, Patt YZ, El-Serag HB. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 266-269.
106. Kobayashi K, Hashimoto E, Ludwig J, Hisamitsu T, Obata H. Liver biopsy features of acute hepatitis C compared with hepatitis A, B, and non-A, non-B, non-C. *Liver* 1993; 13: 69-72.
107. Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 40-55.
108. Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15: 567-571.
109. Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology* 1992; 15: 572-577.
110. Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, Perrillo RP, Lindsay K, Bodenheimer HC, Jr., Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 1993; 104: 595-603.
111. Negro F. Hepatitis C virus-induced steatosis: an overview. *Dig Dis* 2010; 28: 294-299.
112. Rubbia-Brandt L, Leandro G, Spahr L, Giostra E, Quadri R, Male PJ, Negro F. Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3. *Histopathology* 2001; 39: 119-124.
113. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001; 33: 1358-1364.
114. Tillmann HL, Patel K, Muir AJ, Guy CD, Li JH, Lao XQ, Thompson A, Clark PJ, Gardner SD, McHutchison JG, McCarthy JJ. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011.
115. Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Kaddai V, Bochud M, Negro F, Bochud PY. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol* 2011; 55: 529-535.
116. Bedossa P, Moucari R, Chelbi E, Asselah T, Paradis V, Vidaud M, Cazals-Hatem D, Boyer N, Valla D, Marcellin P. Evidence for a role of nonalcoholic steatohepatitis in hepatitis C: a prospective study. *Hepatology* 2007; 46: 380-387.
117. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
118. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.
119. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.
120. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20: 15-20.
121. Scheuer PJ. Liver biopsy size matters in chronic hepatitis: bigger is better. *Hepatology* 2003; 38: 1356-1358.
122. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.

123. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* 2003; 39: 239-244.
124. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 448-458.
125. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42 Suppl 3: S206-214.
126. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576.
127. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-1491.
128. Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A, Richardson P, El-Serag HB. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2011; 140: 1182-1188 e1181.
129. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16.
130. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249.
131. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology* 2008; 48: 137-145.
132. Nguyen VT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *J Viral Hepat* 2009; 16: 453-463.
133. Yeung YP, Lo CM, Liu CL, Wong BC, Fan ST, Wong J. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1995-2004.
134. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56: 918-928.
135. El-Serag HB, Siegel AB, Davila JA, Shaib YH, Cayton-Woody M, McBride R, McGlynn KA. Treatment and outcomes of treating of hepatocellular carcinoma among Medicare recipients in the United States: a population-based study. *J Hepatol* 2006; 44: 158-166.
136. Liu JH, Chen PW, Asch SM, Busuttill RW, Ko CY. Surgery for hepatocellular carcinoma: does it improve survival? *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 298-303.
137. Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S. Improved long-term survival after liver resection for hepatocellular carcinoma in the modern era: retrospective study from HCV-endemic areas. *World J Surg* 2006; 30: 1567-1578.
138. Alvite-Canosa M, Pita-Fernandez S, Quintela-Fandino J, Aguirrezabalaga J, Corbal G, Fernandez C, Suarez F, Otero A, Gomez-Gutierrez M. Prognostic and developmental factors in patients receiving liver transplant due to hepatocellular carcinoma: one center's experience in the north of Spain. *Transplant Proc* 2010; 42: 4578-4581.
139. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327.
140. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol* 2010; 134: 237-250.
141. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010; 29: 2309-2324.
142. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone MG, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM, Golub TR. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 1995-2004.
143. Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1197-1213.
144. Lowes KN, Croager EJ, Abraham LJ, Olynyk JK, Yeoh GC. Upregulation of lymphotoxin beta expression in liver progenitor (oval) cells in chronic hepatitis C. *Gut* 2003; 52: 1327-1332.
145. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, Bremer J, Iezzi G, Graf R, Clavien PA, Thimme R, Blum H, Nedospasov SA, Zatloukal K, Ramzan M, Ciesek S, Pietschmann T, Marche PN, Karin M, Kopf M, Browning JL, Aguzzi A, Heikenwalder M. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2009; 16: 295-308.

146. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193-199.
147. Vainer GW, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. Contradictory functions of NF-kappaB in liver physiology and cancer. *Cancer Lett* 2008; 267: 182-188.
148. You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999; 73: 2841-2853.
149. Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997; 71: 9417-9426.
150. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G847-851.
151. Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Niiyama G, Ikeda H, Hanano S, Suehiro M, Togawa K, Yamada G. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 19-24.
152. Maki A, Kono H, Gupta M, Asakawa M, Suzuki T, Matsuda M, Fujii H, Rusyn I. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1182-1190.
153. Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998; 28: 738-743.
154. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 2002; 16: 935-942.
155. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163: 1301-1311.
156. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 2000; 192: 373-378.
157. Libbrecht L, Craninx M, Nevens F, Desmet V, Roskams T. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. *Histopathology* 2001; 39: 66-73.
158. Marchio A, Terris B, Meddeb M, Pineau P, Duverger A, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Chromosomal abnormalities in liver cell dysplasia detected by comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 2001; 54: 270-274.
159. Makino Y, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Fujikawa K, Takase K, Nakano T. Histological features of cirrhosis with hepatitis C virus for prediction of hepatocellular carcinoma development; a prospective study. *Anticancer Res* 2000; 20: 3709-3715.
160. Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000; 33: 76-84.
161. Maggioni M, Coggi G, Cassani B, Bianchi P, Romagnoli S, Mandelli A, Borzio M, Colombo P, Roncalli M. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology* 2000; 32: 942-946.
162. Zondervan PE, Wink J, Alers JC, JN IJ, Schalm SW, de Man RA, van Dekken H. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000; 192: 207-215.
163. Paradis V, Laurendeau I, Vidaud M, Bedossa P. Clonal analysis of macronodules in cirrhosis. *Hepatology* 1998; 28: 953-958.
164. Lin WR, Lim SN, McDonald SA, Graham T, Wright VL, Peplow CL, Humphries A, Kocher HM, Wright NA, Dhillon AP, Alison MR. The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1017-1026.
165. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236.
166. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-1022.
167. Marrero JA, El-Serag HB. Alpha-fetoprotein should be included in the hepatocellular carcinoma surveillance guidelines of the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; 53: 1060-1061; author reply 1061-1062.

168. Durand F, Belghiti J, Paradis V. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: role of biopsy. *Liver Transpl* 2007; 13: S17-23.
169. Caturelli E, Solmi L, Anti M, Fusilli S, Roselli P, Andriulli A, Fornari F, Del Vecchio Blanco C, de Sio I. Ultrasound guided fine needle biopsy of early hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis: a multicentre study. *Gut* 2004; 53: 1356-1362.
170. Paradis V, Degos F, Dargere D, Pham N, Belghiti J, Degott C, Janeau JL, Bezeaud A, Delforge D, Cubizolles M, Laurendeau I, Bedossa P. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 40-47.
171. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 2487-2493.
172. Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33: 832-840.
173. Llovet JM, Chen Y, Wurbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1758-1767.
174. Kim JW, Ye Q, Forgues M, Chen Y, Budhu A, Sime J, Hofseth LJ, Kaul R, Wang XW. Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 518-527.
175. Le Faouder J, Laouirem S, Chapelle M, Albuquerque M, Belghiti J, Degos F, Paradis V, Camadro JM, Bedossa P. Imaging Mass Spectrometry Provides Fingerprints for Distinguishing Hepatocellular Carcinoma from Cirrhosis. *J Proteome Res* 2011.
176. Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party. *Hepatology* 1995; 22: 983-993.
177. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009; 49: 658-664.
178. Choi SB, Lee JG, Kim KS, Yoon DS, Choi JS, Lee WJ, Kim BR. The prognosis and survival analysis according to seven staging systems of hepatocellular carcinoma following curative resection. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 2140-2145.
179. Hao K, Luk JM, Lee NP, Mao M, Zhang C, Ferguson MD, Lamb J, Dai H, Ng IO, Sham PC, Poon RT. Predicting prognosis in hepatocellular carcinoma after curative surgery with common clinicopathologic parameters. *BMC Cancer* 2009; 9: 389.
180. Kurokawa Y, Matoba R, Takemasa I, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Ueno N, Oba S, Ishii S, Kato K, Monden M. Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 284-291.
181. Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40: 667-676.
182. Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, Sheu JC, Chen CL, Hsu HC. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 119-127.
183. Qin LX, Tang ZY. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 497-513.
184. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Fujimoto M, Nishisaka T, Okita K, Oka M, Nakamura K. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *Proteomics* 2005; 5: 1686-1692.
185. Oo YH, Shetty S, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis* 2010; 28: 31-44.
186. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med* 2006; 45: 183-191.
187. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 147-163.
188. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 16-34.



189. Agaugue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Hepatitis C lipo-Viro-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell. *PLoS One* 2007; 2: e330.
190. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, Nolan N, Hegarty J, O'Farrelly C. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 1998; 28: 84-90.
191. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 5-20.
192. Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogenous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 1999; 60: 20-31.
193. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1473-1482.
194. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15669-15674.
195. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151-161.
196. Liu YJ, Kadowaki N, Risoan MC, Soumelis V. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251: 149-159.
197. Dolganiuc A, Szabo G. Dendritic cells in hepatitis C infection: can they (help) win the battle? *J Gastroenterol* 2011; 46: 432-447.
198. Rodrigue-Gervais IG, Lamarre D. [Hepatitis C virus subverts pattern recognition receptors-mediated control of adaptive immunity orchestrated by dendritic cells]. *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 869-874.
199. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97: 14-32.
200. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869.
201. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997.
202. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
203. Kanto T. Virus associated innate immunity in liver. *Front Biosci* 2008; 13: 6183-6192.
204. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640.
205. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151.
206. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3121-3127.
207. Maghazachi AA. Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 339-357.
208. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285: 727-729.
209. Wen C, He X, Ma H, Hou N, Wei C, Song T, Zhang Y, Sun L, Ma Q, Zhong H. Hepatitis C virus infection downregulates the ligands of the activating receptor NKG2D. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 475-478.
210. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391: 795-799.
211. Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 851-863.

212. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, Lopez-Botet M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1809-1818.
213. Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* 2005; 42: 485-488.
214. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002; 169: 4279-4287.
215. Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1171-1179.
216. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.
217. Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; 35: 694-703.
218. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004; 25: 47-52.
219. Golden-Mason L, Rosen HR. Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transpl* 2006; 12: 363-372.
220. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 327-333.
221. Davodeau F, Peyrat MA, Necker A, Dominici R, Blanchard F, Leget C, Gaschet J, Costa P, Jacques Y, Godard A, Vie H, Poggi A, Romagne F, Bonneville M. Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. *J Immunol* 1997; 158: 5603-5611.
222. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, Littman DR. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 2005; 3: e113.
223. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. 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* 1999; 163: 2314-2321.
224. Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin Immunol* 2009; 130: 16-26.
225. Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens* 2009; 73: 535-545.
226. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 43-55.
227. Brigl M, Brenner MB. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* 2010; 22: 79-86.
228. Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, Brosnan CF. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J Immunol* 1997; 159: 3723-3730.
229. Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol* 2004; 113: 56-63.
230. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008; 213: 173-182.
231. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995; 373: 255-257.
232. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 511-532.
233. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279: 1737-1740.
234. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 2000; 191: 937-948.

235. Laad AD, Thomas ML, Fakih AR, Chiplunkar SV. Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80: 709-714.
236. Thomas ML, Samant UC, Deshpande RK, Chiplunkar SV. gammadelta T cells lyse autologous and allogenic oesophageal tumours: involvement of heat-shock proteins in the tumour cell lysis. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 653-659.
237. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int J Cancer* 2004; 112: 727-732.
238. Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* 2007; 67: 5-8.
239. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 539-546.
240. Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintiere C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, Catros V. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 531-539.
241. Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, Caignard A. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 174: 1338-1347.
242. Martorelli D, Muraro E, Merlo A, Turrini R, Rosato A, Dolcetti R. Role of CD4+ cytotoxic T lymphocytes in the control of viral diseases and cancer. *Int Rev Immunol* 2010; 29: 371-402.
243. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 478-483.
244. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253-257.
245. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003; 102: 4107-4114.
246. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004; 172: 5149-5153.
247. Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008; 389: 1283-1298.
248. Perrella A, Atripaldi L, Bellopede P, Patarino T, Sbriglia C, Tarantino G, Sorrentino P, Conca P, Ruggiero L, Perrella O. Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: possible pathogenetic mechanisms. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1105-1109.
249. Hancharou AY, Titov LP, DuBuske LM. Altered phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in acute hepatitis C and chronic hepatitis C. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: S221.
250. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Jung MC, Gruener N, Wachtler M, Backmund M, Santantonio T, Schraut W, Heeg MH, Schirren CA, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 643-651.
251. Decalf J, Fernandes S, Longman R, Ahloulay M, Audat F, Lefrerre F, Rice CM, Pol S, Albert ML. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med* 2007; 204: 2423-2437.
252. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2004; 190: 1919-1926.
253. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 559-565.
254. Dolganiuc A, Chang S, Kodys K, Mandrekar P, Bakis G, Cormier M, Szabo G. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006; 177: 6758-6768.
255. Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehmann B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 2009; 49: 12-21.

256. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001; 97: 3171-3176.
257. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L, Jr., Mandrekar P, Zapp M, Szabo G. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003; 170: 5615-5624.
258. Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 43479-43486.
259. Perrin-Cocon L, Agaoglu S, Diaz O, Vanbervliet B, Dollet S, Guironnet-Paquet A, Andre P, Lotteau V. Th1 disabled function in response to TLR4 stimulation of monocyte-derived DC from patients chronically-infected by hepatitis C virus. *PLoS One* 2008; 3: e2260.
260. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999; 162: 5584-5591.
261. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001; 120: 512-524.
262. Szabo G, Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 2005; 210: 237-247.
263. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 2004; 103: 1026-1029.
264. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Albert ML. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2005; 192: 497-503.
265. Piccioli D, Tavarini S, Nuti S, Colombatto P, Brunetto M, Bonino F, Ciccorossi P, Zorat F, Pozzato G, Comar C, Abrignani S, Wack A. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J Hepatol* 2005; 42: 61-67.
266. Barnes E, Salio M, Cerundolo V, Francesco L, Pardoll D, Klenerman P, Cox A. Monocyte derived dendritic cells retain their functional capacity in patients following infection with hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2008; 15: 219-228.
267. Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 2003; 38: 851-858.
268. Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J Virol* 2004; 78: 6151-6161.
269. Dolganiuc A, Paek E, Kodys K, Thomas J, Szabo G. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* 2008; 135: 2119-2127.
270. Duramad O, Fearon KL, Chan JH, Kanzler H, Marshall JD, Coffman RL, Barrat FJ. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* 2003; 102: 4487-4492.
271. Piazzolla G, Tortorella C, Schiraldi O, Antonaci S. Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha. *J Clin Immunol* 2000; 20: 54-61.
272. Jia HY, Du J, Zhu SH, Ma YJ, Chen HY, Yang BS, Cai HF. The roles of serum IL-18, IL-10, TNF-alpha and sIL-2R in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 378-382.
273. Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 335-345.
274. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 170: 1249-1256.
275. Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P. Shared alterations in NK cell frequency,

- phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2005; 79: 12365-12374.
276. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE, Emerson SS, Shuhart MC, Gretch DR. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006; 43: 573-580.
277. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008; 57: 1121-1128.
278. Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, Nolan N, Traynor O, McEntee G, Hegarty JE, O'Farrelly C. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002; 37: 101-108.
279. Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, Ohkawa T, Koike Y, Aihara T, Habu Y, Nakagawa R, Ami K, Hiraide H, Mochizuki H. 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* 2000; 32: 962-969.
280. Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 451-457.
281. Par G, Rukavina D, Podack ER, Horanyi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, Paal M, Szereday L, Mozsik G, Par A. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2002; 37: 514-522.
282. Bonavita MS, Franco A, Paroli M, Santilio I, Benvenuto R, De Petrillo G, Levrero M, Perrone A, Balsano C, Barnaba V. Normalization of depressed natural killer activity after interferon-alpha therapy is associated with a low frequency of relapse in patients with chronic hepatitis C. *Int J Tissue React* 1993; 15: 11-16.
283. Duesberg U, Schneiders AM, Flieger D, Inchauspe G, Sauerbruch T, Spengler U. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 35: 650-657.
284. De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, Congia S, Mingari MC, Moretta L. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* 2007; 37: 445-455.
285. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004; 173: 6072-6081.
286. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 443-453.
287. Sene D, Levasseur F, Abel M, Lambert M, Camous X, Hernandez C, Pene V, Rosenberg AR, Jouvin-Marche E, Marche PN, Cacoub P, Caillat-Zucman S. Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001184.
288. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D, Carrington M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169: 2818-2822.
289. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429-434.
290. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193: 1159-1167.
291. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305: 872-874.

292. de Lucas S, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis* 2005; 191: 93-99.
293. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, Hayashi N. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 171: 5423-5429.
294. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 513-528.
295. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. 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. *Hepatology* 2008; 48: 664-672.
296. 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.
297. Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, Osada T, Yabe T, Ishikawa Y, Nagawa H, Muto T, Juji T. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2406-2413.
298. Nuti S, Rosa D, Valiante NM, Saletti G, Caratozzolo M, Dellabona P, Barnaba V, Abrignani S. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3448-3455.
299. Exley MA, He Q, Cheng O, Wang RJ, Cheney CP, Balk SP, Koziel MJ. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J Immunol* 2002; 168: 1519-1523.
300. Durante-Mangoni E, Wang R, Shaulov A, He Q, Nasser I, Afdhal N, Koziel MJ, Exley MA. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol* 2004; 173: 2159-2166.
301. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921-930.
302. Kanto T, Hayashi N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatology* 2007; 45 Suppl 3: S319-326.
303. Nikolopoulou V, Skoutelis A, Thomopoulos K, Salsaa B, Zoumbos N. An increased number of circulating gamma/delta TCR + T cells in patients with chronic viral hepatitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 10: 115-118.
304. Tseng CT, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001; 33: 1312-1320.
305. Yonekura K, Ichida T, Sato K, Yamagiwa S, Uchida M, Sugahara S, Ito S, Abo T, Asakura H. Liver-infiltrating CD56 positive T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Liver* 2000; 20: 357-365.
306. Agrati C, D'Offizi G, Narciso P, Abrignani S, Ippolito G, Colizzi V, Poccia F. Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med* 2001; 7: 11-19.
307. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 829-841.
308. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 233-242.
309. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-1406.
310. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
311. Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601.

312. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15661-15668.
313. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302: 659-662.
314. 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.
315. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436: 946-952.
316. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003; 77: 4911-4927.
317. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002; 76: 12584-12595.
318. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933-941.
319. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41: 1019-1028.
320. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 1189-1198.
321. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. 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.
322. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449.
323. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 71-99.
324. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58: 391-424.
325. He XS, Rehmann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis MM, Greenberg HB. 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.
326. Rehmann B, Chang KM, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 1996; 98: 1432-1440.
327. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-1512.
328. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75: 5550-5558.
329. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2004; 127: 924-936.
330. Rehmann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996; 70: 7092-7102.
331. Vigan I, Jouvin-Marche E, Leroy V, Pernollet M, Tongiani-Dashan S, Borel E, Delachanal E, Colomb M, Zarski JP, Marche PN. 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.
332. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
333. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006; 80: 11398-11403.
334. Radziejewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. 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* 2007; 81: 2545-2553.
335. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002; 8: 379-385.
336. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 172: 1744-1753.
337. Anfossi N, Doisne JM, Peyrat MA, Ugolini S, Bonnaud O, Bossy D, Pitard V, Merville P, Moreau JF, Delfraissy JF, Dechanet-Merville J, Bonneville M, Venet A, Vivier E. Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 173: 7223-7229.
338. Northfield JW, Kasprovicz V, Lucas M, Kersting N, Bengsch B, Kim A, Phillips RE, Walker BD, Thimme R, Lauer G, Klenerman P. CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology* 2008; 47: 396-406.
339. Bonorino P, Leroy V, Dufeu-Duchesne T, Tongiani-Dashan S, Sturm N, Pernollet M, Vivier E, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. 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.
340. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 667-678.
341. Del Porto P, Puntoriero G, Scotta C, Nicosia A, Piccolella E. High prevalence of hypervariable region 1-specific and -cross-reactive CD4(+) T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN-alpha treatment. *Virology* 2000; 269: 313-324.
342. Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY, Sheen IS, Yeh CT, Huang JH, Kuo GC, Liaw YF. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115: 954-965.
343. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344.
344. Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H, Ruppert T, Rispeter K, Henklein P, Sijts A, Hengel H, Kloetzel PM, Rehermann B. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 2004; 114: 250-259.
345. Kimura Y, Gushima T, Rawale S, Kaumaya P, Walker CM. Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 4870-4876.
346. Chang KM, Rehermann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest* 1997; 100: 2376-2385.
347. Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* 2003; 64: 662-673.
348. Urbani S, Amadei B, Cariani E, Fisicaro P, Orlandini A, Missale G, Ferrari C. The impairment of CD8 responses limits the selection of escape mutations in acute hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2005; 175: 7519-7529.



349. Irshad M, Khushboo I, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008; 27: 497-517.
350. Kim HS, Lee JK, Yang IH, Ahn JK, Oh YI, Kim CJ, Kim YS, Lee CK. Identification of hepatitis C virus core domain inducing suppression of allostimulatory capacity of dendritic cells. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 364-369.
351. Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol* 2003; 77: 10862-10871.
352. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2006; 69: 129-141.
353. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062-1071.
354. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsacker F, Thimme R. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7867.
355. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, Alexander GJ. 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.
356. Rushbrook SM, Hoare M, Alexander GJ. T-regulatory lymphocytes and chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1689-1703.
357. Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, Fleming KA, Banham AH, Klenerman P. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 2007; 47: 316-324.
358. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 188-196.
359. Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudjehane L, Miroux C, Podevin P, Morales O, Chouzenoux S, Scatton O, Groux H, Auriault C, Calmus Y, Pancre V, Delhem N. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 2102-2112.
360. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004; 113: 963-972.
361. Abel M, Sene D, Pol S, Bourliere M, Poynard T, Charlotte F, Cacoub P, Caillat-Zucman S. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006; 44: 1607-1616.
362. Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. 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* 2007; 179: 1039-1048.
363. Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J Virol* 2007; 81: 5882-5892.
364. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003; 63: 4516-4520.
365. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075-1085.
366. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 2006; 176: 1582-1587.
367. Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszyk A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004; 112: 258-267.

368. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 4676-4680.
369. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37: 577-589.
370. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582.
371. Kaplan M, Gawrieh S, Cotler SJ, Jensen DM. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: a review of immunological and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 125: 597-604.
372. Farci P, Alter HJ, Wong DC, Miller RH, Govindarajan S, Engle R, Shapiro M, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7792-7796.
373. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258: 135-140.
374. Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994; 68: 1494-1500.
375. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3468-3472.
376. Wada Y, Nakashima O, Kutami R, Yamamoto O, Kojiro M. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 1998; 27: 407-414.
377. Unitt E, Marshall A, Gelson W, Rushbrook SM, Davies S, Vowler SL, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol* 2006; 45: 246-253.
378. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964.
379. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008; 14: 518-527.
380. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4410-4417.
381. Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, Kammula US, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 2006; 10: 99-111.
382. Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SC, Hong-Nereng H. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol* 2005; 67: 35-50.
383. Chew V, Tow C, Teo M, Wong HL, Chan J, Gehring A, Loh M, Bolze A, Quek R, Lee VK, Lee KH, Abastado JP, Toh HC, Nardin A. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2010; 52: 370-379.
384. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722-730.
385. Zerbini A, Pilli M, Soliani P, Ziegler S, Pelosi G, Orlandini A, Cavallo C, Uggeri J, Scandroglia R, Crafa P, Spagnoli GC, Ferrari C, Missale G. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 40: 102-109.

386. Yoong KF, McNab G, Hubscher SG, Adams DH. Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 1998; 160: 3978-3988.
387. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 465-472.
388. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-1141.
389. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-852.
390. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476.
391. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 281-286.
392. Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, Marberger MJ. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* 2003; 56: 171-182.
393. Ciree A, Michel L, Camilleri-Broet S, Jean Louis F, Oster M, Flageul B, Senet P, Fossiez F, Fridman WH, Bachelez H, Tartour E. Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Int J Cancer* 2004; 112: 113-120.
394. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwajri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 2007; 178: 6730-6733.
395. Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET, Zou W. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol* 2007; 179: 1423-1426.
396. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautes-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 2114-2121.
397. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008; 112: 362-373.
398. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003; 101: 2620-2627.
399. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautes-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.
400. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-465.
401. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50: 980-989.
402. Chew V, Tow C, Teo M, Wong HL, Chan J, Gehring A, Loh M, Bolze A, Quek R, Lee VK, Lee KH, Abastado JP, Toh HC, Nardin A. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 52: 370-379.
403. Subleski JJ, Wiltrout RH, Weiss JM. Application of tissue-specific NK and NKT cell activity for tumor immunotherapy. *J Autoimmun* 2009; 33: 275-281.
404. Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, Medema JP, Kummer JA, Willems E, Braet F, Wisse E. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 668-676.
405. Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, Mitsuta H, Arihiro K, Asahara T. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 2006; 43: 362-372.

406. Ohira M, Ohdan H, Mitsuta H, Ishiyama K, Tanaka Y, Igarashi Y, Asahara T. Adoptive transfer of TRAIL-expressing natural killer cells prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Transplantation* 2006; 82: 1712-1719.
407. Jovic V, Konjevic G, Radulovic S, Jelic S, Spuzic I. Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma. *Tumori* 2001; 87: 324-329.
408. Balch CM, Tilden AB, Dougherty PA, Cloud GA, Abo T. Heterogeneity of natural killer lymphocyte abnormalities in colon cancer patients. *Surgery* 1984; 95: 63-70.
409. Zhou L, Cai L, Zhang Z, Yang YP, Wang FS. [Characteristics of peripheral NK cells in hepatocellular carcinoma patients]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2010; 18: 136-139.
410. Cai L, Zhang Z, Zhou L, Wang H, Fu J, Zhang S, Shi M, Zhang H, Yang Y, Wu H, Tien P, Wang FS. Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Immunol* 2008; 129: 428-437.
411. Yuen MF, Norris S. Expression of inhibitory receptors in natural killer (CD3(-)CD56(+)) cells and CD3(+)CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Immunol* 2001; 101: 264-269.
412. Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 165-171.
413. Shibolet O, Alper R, Zlotogarov L, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. NKT and CD8 lymphocytes mediate suppression of hepatocellular carcinoma growth via tumor antigen-pulsed dendritic cells. *Int J Cancer* 2003; 106: 236-243.
414. Margalit M, Shibolet O, Klein A, Elinav E, Alper R, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma by transplantation of ex-vivo immune-modulated NKT lymphocytes. *Int J Cancer* 2005; 115: 443-449.
415. Subleski JJ, Hall VL, Back TC, Ortaldo JR, Wiltout RH. Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer Res* 2006; 66: 11005-11012.
416. Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 2002; 196: 119-127.
417. Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002; 99: 1259-1266.
418. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000; 1: 515-520.
419. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
420. Gonzalez-Carmona MA, Marten A, Hoffmann P, Schneider C, Sievers E, Schmidt-Wolf IG, Sauerbruch T, Caselmann WH. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells. *Liver Int* 2006; 26: 369-379.
421. Sheng XL, Zhang H. In-vitro activation of cytotoxic T lymphocytes by fusion of mouse hepatocellular carcinoma cells and lymphotactin gene-modified dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5944-5950.
422. Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC, Steven NM, Kerr DJ, Young LS, Adams DH. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 124-132.
423. Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 431-436.
424. Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; 31: 323-331.
425. Ormandy LA, Farber A, Cantz T, Petrykowska S, Wedemeyer H, Horning M, Lehner F, Manns MP, Korangy F, Greten TF. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3275-3282.

426. Chen S, Akbar SM, Tanimoto K, Ninomiya T, Iuchi H, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2000; 148: 49-57.
427. Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinnati VR. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7260-7269.
428. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166: 678-689.
429. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999; 162: 5728-5737.
430. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103.
431. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005; 202: 919-929.
432. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 53-65.
433. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998.
434. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008; 222: 162-179.
435. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 2005; 175: 4583-4592.
436. Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, Zhang HG. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* 2007; 109: 4336-4342.
437. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 941-952.
438. Serafini P, Mgebrouff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 2008; 68: 5439-5449.
439. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell* 2008; 13: 181-183.
440. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009; 50: 799-807.
441. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, Greten TF, Korangy F. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008; 135: 234-243.
442. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 2007; 179: 977-983.
443. Hu CE, Gan J, Zhang RD, Cheng YR, Huang GJ. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 156-164.
444. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146.
445. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7466-7474.
446. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 4625-4629.

447. Kuwana M, Kaburaki J, Wright TM, Kawakami Y, Ikeda Y. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell energy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2547-2557.
448. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 695-704.
449. Zou W, Borvak J, Wei S, Isaeva T, Curiel DT, Curiel TJ. Reciprocal regulation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes during viral infection. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3833-3839.
450. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; 200: 771-782.
451. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 419-424.
452. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res* 2005; 32: 155-168.
453. Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK, Green A, Powrie F, Cerundolo V, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immunol* 2002; 2: 1.
454. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949.
455. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 606-612.
456. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4404-4408.
457. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+ CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2551-2559.
458. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772.
459. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-2761.
460. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M, Herlyn D. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 2002; 62: 5267-5272.
461. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1064-1071.
462. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C, Piris MA. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1467-1473.
463. Cao M, Cabrera R, Xu Y, Firpi R, Zhu H, Liu C, Nelson DR. Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Lab Invest* 2007; 87: 582-590.
464. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2586-2593.
465. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2457-2464.

466. Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Kai S, Shibata K, Ohta M, Kitano S, Mori M. Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 173-179.
467. Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA, Aoyagi Y. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 254-262.
468. MacAleese L, Stauber J, Heeren RM. Perspectives for imaging mass spectrometry in the proteomics landscape. *Proteomics* 2009; 9: 819-834.
469. McDonnell LA, Corthals GL, Willems SM, van Remoortere A, van Zeijl RJ, Deelder AM. Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J Proteomics* 2010; 73: 1921-1944.
470. Seeley EH, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends Biotechnol* 2011; 29: 136-143.
471. Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli RM. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76: 1145-1155.
472. Tjwa ET, van Oord GW, Hegmans JP, Janssen HL, Woltman AM. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2011; 54: 209-218.
473. Gunturi A, Berg RE, Forman J. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol* 2003; 170: 1737-1745.
474. Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, Alves L, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol* 2005; 175: 6852-6860.
475. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, Ha C, Jacobson IM, Talal AH. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 408-416.
476. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.
477. Makedonas G, Banerjee PP, Pandey R, Hersperger AR, Sanborn KB, Hardy GA, Orange JS, Betts MR. Rapid up-regulation and granule-independent transport of perforin to the immunological synapse define a novel mechanism of antigen-specific CD8+ T cell cytotoxic activity. *J Immunol* 2009; 182: 5560-5569.
478. Reefman E, Kay JG, Wood SM, Offenhauser C, Brown DL, Roy S, Stanley AC, Low PC, Manderson AP, Stow JL. Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol* 2010; 184: 4852-4862.
479. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274.
480. Burshtyn DN, Long EO. Regulation through inhibitory receptors: Lessons from natural killer cells. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 473-479.
481. Andre P, Spertini O, Guia S, Rihet P, Dignat-George F, Brailly H, Sampol J, Anderson PJ, Vivier E. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3400-3405.
482. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, De Filippi F, Bruno S, Mondelli MU. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 2009; 137: 1151-1160, 1160 e1151-1157.
483. Bonorino P, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thelu MA, Sturm N, Dariz A, Guillermet C, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Leroy V, Jouvin-Marche E. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009; 51: 458-467.
484. Saez-Borderias A, Romo N, Magri G, Guma M, Angulo A, Lopez-Botet M. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol* 2009; 182: 829-836.
485. Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, Cerino A, Mondelli MU, Barnaba V. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009; 119: 551-564.

486. Claassen MA, de Knecht RJ, Tilanus HW, Janssen HL, Boonstra A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol* 2010; 52: 315-321.
487. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
488. Sturm N, Thelu MA, Camous X, Dimitrov G, Ramzan M, Dufeu-Duchesne T, Bonorino P, Guillermet C, Brambilla E, Arvers P, Pernollet M, Leroy V, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. *J Hepatol* 2010; 53: 25-35.
489. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M, Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatol Res* 2008; 38: 354-361.
490. Miyaaki H, Zhou H, Ichikawa T, Nakao K, Shibata H, Takeshita S, Akiyama M, Ozawa E, Miura S, Eguchi K. Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients. *Liver Int* 2009; 29: 702-707.
491. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003; 10 Suppl 1: S59-67.
492. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008; 134: 392-404.
493. Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2008; 28: 647-659.
494. Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308.
495. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10663-10668.
496. Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-899.
497. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175-1183.
498. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
499. Benvegna L, Noventa F, Bernardinello E, Pontisso P, Gatta A, Alberti A. Evidence for an association between the aetiology of cirrhosis and pattern of hepatocellular carcinoma development. *Gut* 2001; 48: 110-115.
500. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-50.
501. Murakami J, Shimizu Y, Kashii Y, Kato T, Minemura M, Okada K, Nambu S, Takahara T, Higuchi K, Maeda Y, Kumada T, Watanabe A. Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999; 30: 143-150.
502. Walewska-Zielecka B, Madalinski K, Jablonska J, Godzik P, Cielecka-Kuszyk J, Litwinska B. Composition of inflammatory infiltrate and its correlation with HBV/HCV antigen expression. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4040-4046.
503. Roberts SJ, Ng BY, Filler RB, Lewis J, Glusac EJ, Hayday AC, Tigelaar RE, Girardi M. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6770-6775.
504. Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P, Chisari FV. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 1998; 188: 341-350.
505. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236-6243.
506. Chen CH, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Yu WY, Cheng KC, Lee PH, Jeng YM, Chen DS, Sheu JC. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1529-1533.
507. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339.



508. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Deg'Innocenti D, Amunni G, Villanucci A, Garbini F, Baroni G, Taddei GL. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 590-596.
509. Chin K, Morise K, Kanayama K, Nagura H. Immunohistochemical study of gamma delta T cell receptor-positive cells in the capsular region of hepatocellular carcinoma: possible role in defense against expansion of carcinoma in the liver. *J Gastroenterol* 1995; 30: 330-337.