

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie/Microbiologie/Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Jérémie MARTINET**

Thèse dirigée par **Joël PLUMAS** et  
codirigée par **Caroline ASPORD**

préparée au sein du **Laboratoire immunobiologie et  
immunothérapie des cancers UJF INSERM U823**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

## **Cellules dendritiques plasmocytoïdes et infection par le virus de l'hépatite B, rôle physiopathologique et potentiel vaccinal**

Thèse soutenue publiquement le **11 Octobre 2012**,  
devant le jury composé de :

**Pr. Jean-Michel PAWLOTSKY**

INSERM U955, institut Mondor, Paris (Rapporteur)

**Dr. David DURANTEL**

INSERM U1052, centre de recherche en cancérologie, Lyon  
(Rapporteur)

**Dr. Agnès LEHUEN**

INSERM UMR986, hôpital Cochin/Saint-Vincent de Paul, Paris  
(Membre)

**Pr. Vincent LEROY**

INSERM U823, CHU Grenoble, Grenoble (Président)

**Dr. Joël PLUMAS**

INSERM U823, EFS, Grenoble (Directeur)

**Dr. Caroline ASPORD**

INSERM U823, EFS, Grenoble (Directeur)



**«On se lasse de tout sauf de comprendre » *Virgile***

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement le Pr Jean-Michel Pawlotsky et le Dr David Durantel pour avoir accepté de rapporter ma thèse, ainsi que le Dr Agnès Lehuein et le Pr Vincent Leroy pour avoir bien voulu participer à son examen. Je remercie également mes co-directeurs de thèse les Dr Joël Plumas et Caroline Aspard pour leur participation au jury.

Ce travail de thèse ainsi que l'ensemble des travaux associés n'auraient pu avoir lieu sans l'aide de plusieurs personnes que je tiens à remercier ici.

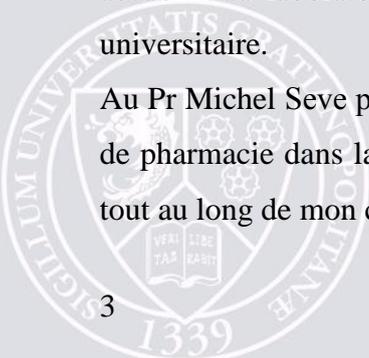
Tous d'abord je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse qui ont su me soutenir lorsque c'était nécessaire et me pousser à avancer. A Joël pour avoir accepté de me recruter dans le laboratoire et pour m'avoir confié ce sujet de thèse. Merci pour les nombreux conseils. A Caroline pour m'avoir tout appris, pour m'avoir supporté dans les périodes difficiles et pour m'avoir poussé à me dépasser. Tu as été un exemple et un objectif à atteindre tout au long de ma thèse, je n'en serais pas là aujourd'hui sans ton aide.

Aux anciens comme aux nouveaux membres du laboratoire (Dalil, David, Françoise, Jean-Paul, Jeremy, Julie, Tania, Laurence) avec qui j'ai pu échanger autant sur le plan scientifique que personnel. Dalil, Jeremy et Julie qui m'ont précédé dans la thèse et m'ont montré que oui il était possible de la finir. Tania pour toute l'aide précieuse que tu m'as apporté au niveau des manip et pour les nombreuses discussions que l'on a eues au café. Françoise pour tes conseils et les pauses « tea time » ou nous avons repensé l'université. Jean-Paul pour tes connaissances techniques, Laurence pour tes conseils. David pour nos nombreuses discussions toujours sérieuses bien sur. A toute l'équipe de l'EFS de Grenoble des laboratoires de recherche au centre de prélèvement.

Au Pr Vincent Leroy, à Marlu Alice et à toute l'équipe du service d'hepato-gastro du CHU de Grenoble pour m'avoir donné accès aux prélèvements de patients, pour m'avoir aidé à compiler les différentes données cliniques et pour toute l'aide apportée lors de la rédaction des différentes publications.

Au Dr Marie-Jeanne Richard ainsi qu'à toute l'équipe de thérapie cellulaire pour m'avoir accueilli au laboratoire et m'avoir permis de découvrir ma voie dans le monde hospitalo-universitaire.

Au Pr Michel Seve pour m'avoir permis d'effectuer des vacances d'enseignement à la faculté de pharmacie dans la composante biochimie et biologie moléculaire et pour m'avoir soutenu tout au long de mon cursus.



# UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Je voudrais tout particulièrement remercier le Pr Alain Favier qui tout au long de mes études a su me donner le goût de la recherche et de l'enseignement. Si je me suis engagé dans cette grande aventure qu'est la thèse d'université c'est en partie grâce à lui.

A toute l'équipe de mon nouveau laboratoire Rouennais et tout particulièrement au Pr Olivier Boyer qui m'a laissé finir cette thèse tout en me permettant de prendre mes marques dans mon nouveau laboratoire.

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de ces quatre années.

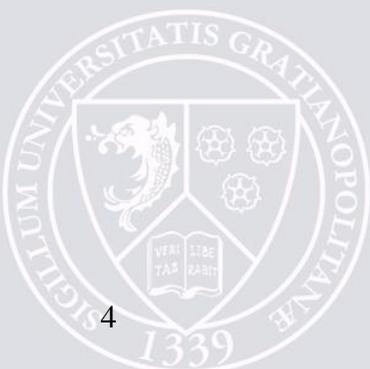
En premier lieu ma famille, ma mère et mon père qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenu pendant toutes mes études de ma première année de pharmacie jusqu'à la fin de la thèse. Ma sœur Sarah et son mari Jonathan qui ont toujours été présents quand j'en avais besoin. Ma grand mère Suzon pour nos repas de famille du Vendredi et ma grand-mère Christiane que je ne vois plus assez souvent depuis que j'ai quitté Grenoble. A Denis, Marianne, David, Elie pour leur présence. A mes deux grands pères Daniel et Jean, j'espère que de là ou vous êtes, vous êtes fiers de moi.

A tout mes anciens co-internes et plus particulièrement à la team O'callaghan, nos petites sorties du soir me manque. A la nouvelle team O'Kallaghan rouennaise, merci de m'avoir aussi bien accueilli.

A Pierrick mon comparse de voyage, après le Japon on repart quand tu veux ou tu veux.

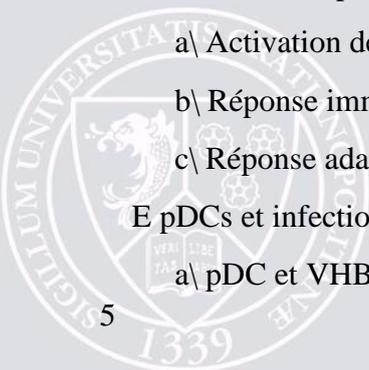
A mes amis de promo de Pharmacie : Ben, Milouz, Tinou, O'rel, Chlo, Mathilde, Sly, Pierre Yves, François, Alexis, Nico et tout ceux que j'oublie. Même si je ne suis plus sur Grenoble j'espère que nous garderons cette amitié pour longtemps.

Aux anciens des bureaux 2010 et 2011 de la FNSIP. Vous m'avez supporté pendant mes années de thèse et toutes les galères qu'on a passées ensemble nous ont liés pour longtemps.

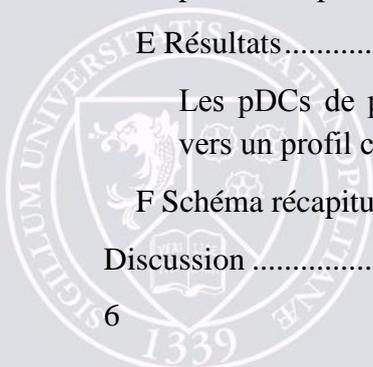


## Sommaire

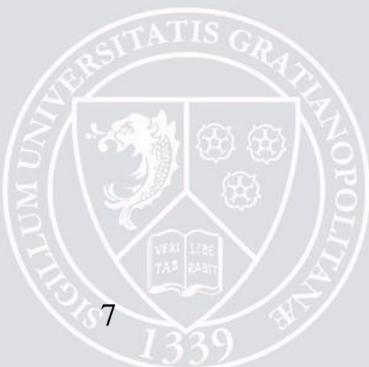
Liste des figures : .....	8
Liste des tableaux : .....	9
Liste des abréviations : .....	10
Introduction .....	12
1 L'hépatite B.....	12
A Description du VHB .....	12
B Epidémiologie.....	15
a\ Epidémiologie Française.....	15
b\ Epidémiologie international.....	15
C Physiopathologie du VHB .....	16
a\ Evolution au cours de l'hépatite B.....	17
b\ La réponse immunitaire au cours de l'hépatite B .....	21
D Thérapeutiques actuelles et en développement .....	26
a\ Traitement prophylactique .....	27
b\ Traitement par IFN $\alpha$ .....	27
c\ Traitements antiviraux .....	27
d\ Immunothérapies en développement .....	28
2 Les cellules dendritiques plasmocytoides .....	30
A Definition.....	30
B Découverte des pDCs .....	30
C Morphologie, phénotype, localisation et migration des pDCs .....	31
a\ Morphologie et phénotype .....	31
b\ Localisation et migration dans l'organisme.....	33
D Fonction des pDCs dans la réponse immune antivirale.....	34
a\ Activation des pDCs .....	34
b\ Réponse immune innée et pDCs .....	36
c\ Réponse adaptative et pDCs .....	41
E pDCs et infections virales .....	49
a\ pDC et VHB.....	49



b\ pDC et VIH.....	51
c\ pDC et VHC.....	52
F. pDCs et thérapie.....	53
a\ Utilisation des ligands des TLR7 et 9.....	53
b\ La stratégie thérapeutique basée sur la lignée de pDC GEN 2.2.....	56
Résultats.....	59
1 Objectifs de l'étude.....	59
2 Article 1. Les pDCs peuvent stimuler efficacement l'immunité antivirale dans le contexte de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B.....	60
A Résumé.....	60
B Article 1 (accepté dans Hepatology).....	64
C Résultats complémentaires.....	78
D Matériel et méthode.....	78
Analyse du taux de lymphocytes T régulateurs dans le sang de patients hépatite B chronique et comparaison entre patients répondeurs et non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC.....	78
E Résultats.....	79
Les patients hépatite B chronique non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC présentent un pourcentage de lymphocytes T régulateurs plus important que les patients répondeurs.....	79
F Schéma récapitulatif.....	80
3 Article 2. Mécanisme de subversion des cellules dendritiques plasmocytoïdes par le VHB au cours de l'infection chronique.....	81
A Résumé.....	81
B Article 2 (soumis à Gastroenterology).....	85
C Résultats complémentaires.....	115
D Matériel et méthode.....	115
Analyse de l'orientation de la réponse lymphocytaire T CD4 par les pDCs issues de patients hépatite B chronique après stimulation.....	115
E Résultats.....	115
Les pDCs de patients hépatite B n'orientent pas les réponses lymphocytaires T CD4 vers un profil cytokinique particulier (Th1, Th2, Treg...) in vitro.....	115
F Schéma récapitulatif.....	117
Discussion.....	119



1 Potentiel thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B .....	119
2 Rôle des pDCs dans la physiopathologie de l'hépatite B.....	123
3 Les pDCs au cours de l'infection par le VHB, rôle protecteur ou délétère ?.....	126
Bibliographie:.....	128



## Liste des figures :

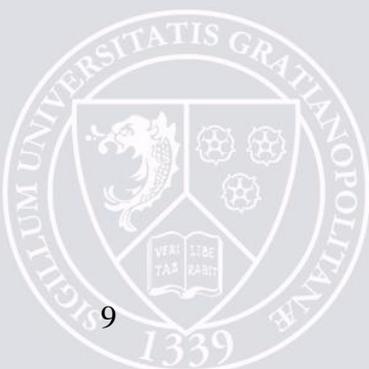
Figure 1. Représentation d'une particule virale du VHB (James A. Prekins, medical and scientific illustrations, 2002).....	13
Figure 2. Cycle de réplication du VHB (Don Ganem, New. Eng. J. Med. 2004).....	14
Figure 3. Prévalence de l'antigène HBs dans le monde en 2006. (CDC, yellowbook 2012) ..	16
Figure 4. Réponse lymphocytaire contre le VHB (Don Ganem, New. Eng. J. Med. 2004) ....	18
Figure 5. Immunopathogénèse des phases aiguës et chroniques du VHB (Rehermann, Nature. Rev. Immunol. 2005) .....	19
Figure 6. Morphologie des pDCs (Liu, Ann rev immunol, 2005) .....	32
Figure 7. Activation et différenciation des pDCs par les ligands des TLR7 et TLR9 .....	36
Figure 8. Exemple de crosstalk PDC/NK.....	40
Figure 9. Les pDCs régulent les fonctions des mDCs et la polarisation des lymphocytes T CD4 (Liu, Ann rev immunol, 2005).....	44
Figure 10. Rôle des pDCs dans l'activation des lymphocytes B en plasmocytes (Jego, Immunity, 2003).....	46
Figure 11. Rôle des pDCs au cours des infections (Colonna, Nature Immunol, 2004) .....	48
Figure 12. Relation entre pDC et VHB au cours de l'hépatite B chronique .....	51
Figure 13. Stratégie thérapeutique d'utilisation de la lignée de pDC Gen 2.2 (Aspord, Rev. Med. Int. 2010).....	57
Figure 14. Plan expérimental en vue d'analyser le potentiel d'amplification des lymphocytes T spécifiques du VHB issus de patients hépatite B chronique par la lignée de pDCs chargée avec des peptides issus d'antigènes du VHB in vitro.....	61
Figure 15. Plan expérimental utilisant un modèle de souris Hepato-HuPBL ayant pour but d'analyser in vivo le potentiel thérapeutique de la ligne de pDC dans l'hépatite B chronique. ....	62
Figure 16. Pourcentage de lymphocytes T régulateurs parmi les lymphocytes T CD4 de patients hépatite B chronique répondeurs ou non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC. ....	79
Figure 17. Potentiel en immunothérapie anti-VHB des pDCs .....	80
Figure 18. Plan expérimental en vue d'analyser l'influence du VHB sur la capacité des pDCs à induire une polarisation des lymphocytes T CD4 et sur le cross-talk pDC/NK.....	82
Figure 19. Plan expérimental en vue d'analyser le rôle de l'IP10 dans la perturbation des fonctions de la pDC par le VHB. ....	83
Figure 20. Rôle physiopathologique des pDCs dans l'infection par le VHB.....	117

**Liste des tableaux :**

Tableau 1. Classification des patients en fonction des différents types d'évolutions après infection par le VHB ..... 20

Tableau 2. Phénotype des mDCs/pDCs humaines (d'après Liu, Ann Rev Immunol, 2005) ... 33

Tableau 3. Expression des TLR par les mDCs/pDCs (d'après Liu, Ann Rev Immunol 2005) 35



## Liste des abréviations :

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNccc**: covalently-closed circular DNA (ADN super enroulé)

**APC**: antigen presenting cell

**ARN**: acide ribonucléique

**BDCA**: blood dendritic cell antigen

**CMH**: complexe majeur d'histocompatibilité

**CpG**: cytosine phospho guanine

**CXCL**: CXC chemokine ligand

**CXCR**: CXC chemokine receptor

**DC**: dendritic cell

**DC-SIGN**: dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

**FITC**: fluoresceine

**Flu**: *influenza* virus

**Foxp3** : forkhead box P3

**HEV**: veinule post-capillaire à endothélium épais

**HSV**: herpes simplex virus

**IDO**: indoléamine 2,3-dioxygénase

**IFN**: interféron

**Ig**: immunoglobuline

**IL**: interleukine

**IRF**: IFN-regulatory factor

**LCMV**: virus de la chorioméningite lymphocytaire

**LIL**: liver infiltrating lymphocytes

**Lin**: lineage

**LPS**: lipopolysaccharide

**mDC**: myeloid dendritic cell

**NK**: natural killer

**ODN**: oligodinuéotides

**OMS**: organisation mondiale de la santé

**PAMP**: pathogen associated molecular pattern

**PBMC**: peripheral blood mononuclear cells

**pDC**: plasmacytoid dendritic cell

**PE**: phycoérythrine

**SIDA**: syndrome d'immunodéficience acquise

**SOCS**: suppressor of cytokine signaling

**STAT**: signal transducer and activator of Transcription

**TCR**: T cell receptor

**TGF- $\beta$** : transforming growth factor  $\beta$

**TLR**: toll like receptor

**TNF**: tumor necrosis factor

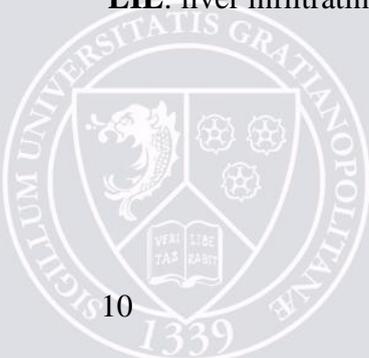
**TRAIL**: TNF-related apoptosis-inducing ligand

**VHB**: virus de l'hépatite B

**VHC**: virus de l'hépatite C

**VIH**: virus de l'immunodéficience acquise

**VSV**: virus de la stomatite vésiculaire



**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**



## Introduction

### 1 L'hépatite B

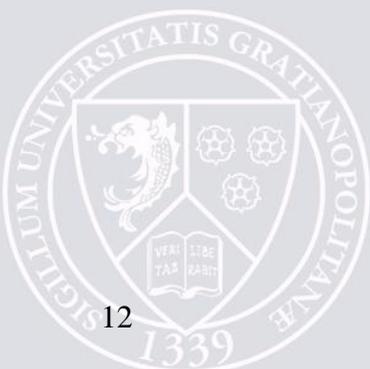
Les hépatites virales correspondent à des inflammations hépatiques plus ou moins sévères liées à une infection virale. Le virus de l'hépatite B (VHB) infecte plus de 350 millions de personnes dans le monde et environ 20% des personnes infectées développent une hépatite chronique, pouvant mener à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire<sup>1</sup>, ce qui représente un problème majeur de santé publique<sup>2</sup>.

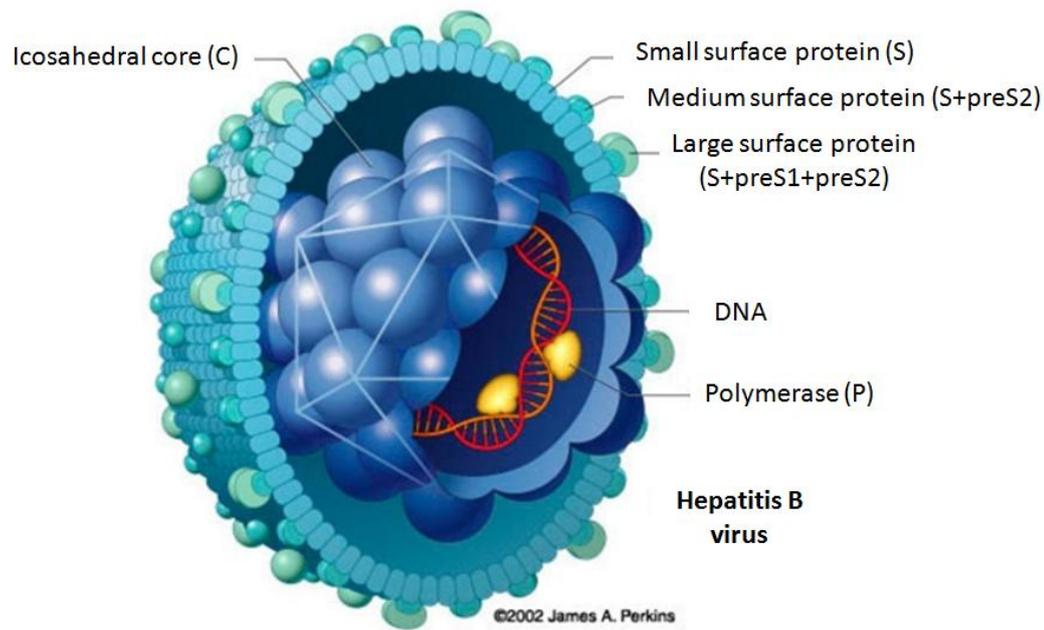
#### A Description du VHB

Le VHB est un virus à ADN partiellement double brin de la famille des hepadnavirus capable d'infecter les hépatocytes humains<sup>3</sup>. Les virions du VHB sont des particules formées d'une enveloppe extérieure de lipoprotéines contenant des antigènes du virus, à l'intérieur de l'enveloppe se trouve la nucléocapside virale contenant l'ADN du VHB et la polymérase (Figure 1)<sup>4,5</sup>.

On retrouve cinq antigènes majeurs composant le VHB :

- HBs retrouvé au niveau de l'enveloppe et codé à partir de la région preS-S<sup>5,6</sup>
- HBc retrouvé dans la capsid et codé à partir de la région preC-C<sup>6</sup>
- HBe qui est principalement sécrété, est codé à partir de la région preC-C<sup>7</sup>.
- La polymérase retrouvée dans la nucléocapside est codée à partir de la région P
- HBx dont le rôle n'est pas complètement défini, codé à partir de la région X<sup>8</sup>





**Figure 1. Représentation d'une particule virale du VHB (James A. Prekins, medical and scientific illustrations, 2002)**

La surface du VHB est formée d'un antigène spécifique (HBs). L'ADN et la polymérase sont enfermés dans la capsid (HBc). Certaines particules de l'enveloppe peuvent être libérées par le virion (HBe).

Le cycle de réplication virale du VHB est très complexe (Figure 2). Ainsi le VHB est l'un des rares non rétrovirus à utiliser une reverse transcriptase lors de sa réplication. Les particules virales en circulation sont capables de se lier à certains récepteurs cellulaires afin d'être internalisées dans les hépatocytes. La nucléocapside se retrouve alors dans le cytoplasme et est transportée vers le noyau où elle libère l'ADN viral qui prend alors une forme d'ADN super enroulé (ADNccc), ce qui représente l'une des particularités du cycle du VHB<sup>9, 10</sup>. L'ADN viral est alors transcrit en ARN et transporté dans le cytoplasme où il est traduit pour former les différentes protéines virales. Au cours de la formation du virion, l'ARN est incorporé dans la nucléocapside puis retro-transcrit en ADN viral<sup>11</sup>. Un certain nombre de ces particules sont capables de retourner dans le noyau pour maintenir un pool conséquent d'ADNccc<sup>12</sup>. Néanmoins, la majorité de ces particules de core vont acquérir une enveloppe et être relarguées dans la circulation afin de pouvoir infecter d'autres cellules. En plus des particules virales, les cellules infectées produisent des particules non infectieuses exprimant l'un des antigènes majeurs (Ag HBs) et composées uniquement de l'enveloppe de

glycoprotéines<sup>5</sup>. Ces particules représentent la majorité des particules virales produites (ratio : 10.000 :1).

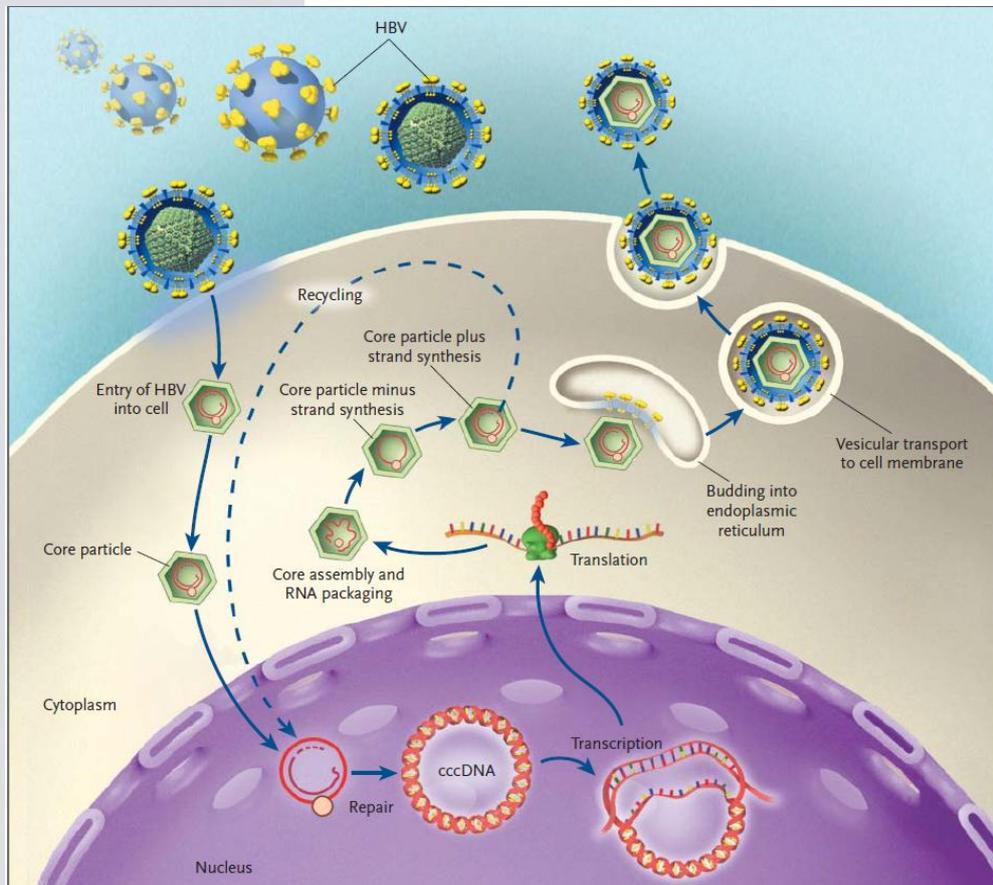


Figure 2. Cycle de réplication du VHB (Don Ganem, New. Eng. J. Med. 2004)

Les virions du VHB sont internalisés par l'intermédiaire de récepteurs à la surface des hépatocytes. Les particules core du virus migrent alors vers le noyau des hépatocytes où leur génome (ADN partiellement double brin) est réparé pour former de l'ADN super enroulé (ADNccc). Cet ADNccc est ensuite transcrit en ARNm (ARN messenger) du virus. L'ARNm virale est ensuite traduit dans le cytoplasme et permet la production des protéines virales (protéines de surface, core, polymérase et protéine X). Ces protéines s'assemblent pour former la capsid virale qui pourra ensuite incorporer l'ARN virale. Cet ARN est alors retro-transcrit en ADN virale. Les particules de core ainsi obtenues pourront, soit migrer vers le réticulum endoplasmique pour être enveloppées et exportées hors de la cellule, soit recyclées dans le noyau afin d'augmenter le pool d'ADNccc disponible dans la cellule.

## B Epidémiologie

### a) Epidémiologie Française

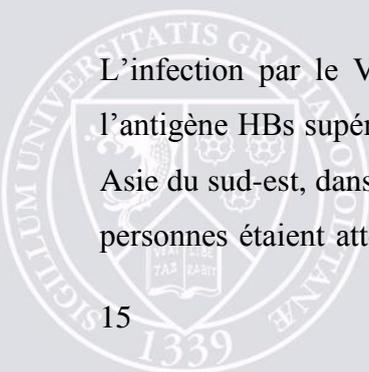
L'hépatite B est un problème de santé publique majeur qui touche environ 3 millions de personnes en France (prévalence de 7,3% de la population française porteuse de l'antigène HBc donc ayant été en contact avec le virus en 2004). Parmi les personnes touchées, environ 10% étaient porteuses de l'antigène HBs et donc atteintes d'hépatite B chronique (prévalence de 0,65% de la population française). La prévalence des cas d'hépatite B chronique a été multipliée par 3 en 10 ans. De plus, plus de la moitié des personnes porteuses de l'antigène HBs ne sont pas au courant de leur infection, de part le caractère masqué de la maladie.

L'incidence de la maladie est plus difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique, son estimation n'étant basée que sur les nouveaux cas symptomatiques (55% des porteurs de l'antigène HBs ne sont pas au courant de leur statut). Il a ainsi pu être évalué une incidence de 4,1 cas pour 100.000 habitants entre 2004 et 2007. Cette incidence semble être en baisse par rapport à celle calculée en 1996 qui était de 6 cas pour 100.000 habitants. Néanmoins, les nombreuses incertitudes liées aux différentes méthodes de calcul ainsi qu'à la difficulté du recueil des données ne permettent pas de conclure de manière précise quant à l'évolution de l'incidence de la maladie.

Un certain nombre de facteurs ont été trouvés comme significativement associés au portage du virus et sont principalement liés au mode de contamination : relations sexuelles à risque (35,7%), voyages en pays de moyenne ou forte endémie (21,9%), exposition familiale (7,7%), vie en institutions sanitaires, sociales ou psychiatriques et usage de drogues (2,3%). Enfin, plus de la moitié des cas notifiés auraient pu être évités par une bonne couverture vaccinale<sup>13</sup>. Ces données montrent bien que malgré l'existence d'un vaccin prophylactique efficace, l'hépatite B reste un problème majeur en France.

### b) Epidémiologie internationale

L'infection par le VHB est endémique dans un grand nombre de régions (prévalence de l'antigène HBs supérieure à 8% dans la population générale) : En Afrique sub-saharienne, en Asie du sud-est, dans les régions du pacifique ouest (Figure 3). Ainsi, environ 340 millions de personnes étaient atteintes d'une hépatite B chronique dans le monde en 2009<sup>14</sup>. L'infection



par le VHB est responsable de 30% des cas de cirrhoses hépatiques et de 53% des hépatocarcinomes dans le monde, représentant 600000 morts par an<sup>15</sup>. De nombreux programmes de vaccinations ont été développés suite aux recommandations de l'OMS d'inclure la vaccination anti-VHB chez l'enfant qui est l'une des populations les plus touchées par le virus. En 2007 environ 67% de la population mondiale était vaccinée. Ce pourcentage varie énormément en fonction des régions, allant de 30% en Asie du sud-est à 90% en Amérique du nord. Ainsi, certaines régions n'ont pas de couvertures vaccinales satisfaisantes, entraînant une incidence de nouveaux cas très forte<sup>16</sup>.



Figure 3. Prévalence de l'antigène HBs dans le monde en 2006. (CDC, yellowbook 2012)

Prévalence de l'antigène HBs, représentant une évaluation de la prévalence de l'hépatite B chronique. On retrouve ainsi des foyers épidémiques en Asie et en Afrique sub-saharienne principalement.

## C Physiopathologie du VHB

Le VHB est un virus non directement cytotoxique. En effet, il a été démontré dans des modèles de chimpanzés infectés par le VHB que lors des phases préliminaires de l'infection, avant l'entrée des lymphocytes T spécifiques dans le foie, aucune lésion hépatique imputable directement au virus n'était détectable<sup>17</sup>. De plus chez des patients atteints d'un déficit immunitaire ou sous immunosuppresseurs, le VHB peut se répliquer fortement sans entraîner de lésions hépatiques<sup>18</sup>. Ces résultats suggèrent que les lésions hépatiques observées au cours

de l'hépatite B chronique ne sont pas directement liées au virus mais à une activation inappropriée de la réponse immunitaire<sup>19,20</sup>.

## a) Evolution au cours de l'hépatite B

Le VHB dès les premières étapes de l'infection reste masqué à l'immunité de son hôte, limitant la réponse innée et retardant de plusieurs semaines l'activation de la réponse immunitaire adaptative<sup>21</sup>. Ainsi lors du cycle de réplication virale, le VHB retient les transcrits viraux dans le noyau, produit des particules virales dont la structure membranaire est proche des structures normales de la cellule infectée et limite la présence de l'ADN viral au niveau cytoplasmique en le conservant au sein de particules de capsid virale<sup>18</sup>.

Suite à l'infection et après une phase aiguë de la maladie, deux types d'évolutions sont possibles:

- Evolution vers l'élimination du virus et la résolution de l'infection
- Evolution en phase chronique retrouvée chez environ 20% des patients et qui peut mener au développement d'une hépatite chronique, à la cirrhose et au développement d'un hépatocarcinome.

### a.1) La phase aiguë de l'infection par le VHB

En phase aiguë, les patients capables d'éliminer le virus et de résoudre l'infection développent une forte réponse immunitaire adaptative. Ainsi, après l'infection, les cellules présentatrices de l'antigène (en particulier les cellules dendritiques) sont capables de reconnaître les antigènes viraux produits par les hépatocytes infectés et d'activer la réponse immunitaire innée et adaptative. En présentant l'antigène aux lymphocytes T CD4 et T CD8 cytotoxiques, elles permettent l'élimination du virus soit par lyse des hépatocytes infectés, soit par production de cytokines antivirales et inflammatoires (IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) (Figure 4). Afin d'évaluer les éléments essentiels de la réponse immunitaire anti-VHB, il a été testé, dans des souris KO pour les différents éléments du système immunitaire, la réponse immunitaire et l'élimination du VHB au sein des hépatocytes transfectés avec un plasmide contenant une copie du génome du virus. Il a ainsi été observé qu'en l'absence de lymphocytes B ou de perforine, le système immunitaire des souris reste capable d'éliminer le virus. D'un autre côté les lymphocytes T (CD4 ou CD8), les cellules NK, l'IFN de type I, l'IFN $\gamma$  et le TNF se sont montrés essentiels pour permettre l'élimination du virus, ce qui prouve le rôle important de la réponse

lymphocytaire T cytotoxique dans le contrôle de l'infection par le VHB<sup>22</sup>. De plus, une forte réponse des lymphocytes T CD8 cytotoxiques est retrouvée chez les patients capables d'éliminer le virus et de résoudre l'infection, ce qui renforce la preuve de leur rôle dans l'immunité anti-VHB<sup>23, 24</sup>. Cette réponse, pour être efficace, est dirigée vers les antigènes majeurs du virus (HBc, HBs, pol, HBx). Parmi ces antigènes, certains ont été décrits comme immunogène, entraînant une forte réponse lymphocytaire dirigée contre leurs peptides dominants (HBc principalement)<sup>25</sup>. Ainsi il a été démontré que les lymphocytes T CD8 anti-HBc (particulièrement ceux dirigés contre le peptide immunodominant HBc 18-27) étaient les plus efficaces pour lyser les hépatocytes infectés et éliminer le virus, bien que des réponses ont aussi été trouvées contre d'autres antigènes viraux (HBs par exemple)<sup>26-30</sup>.

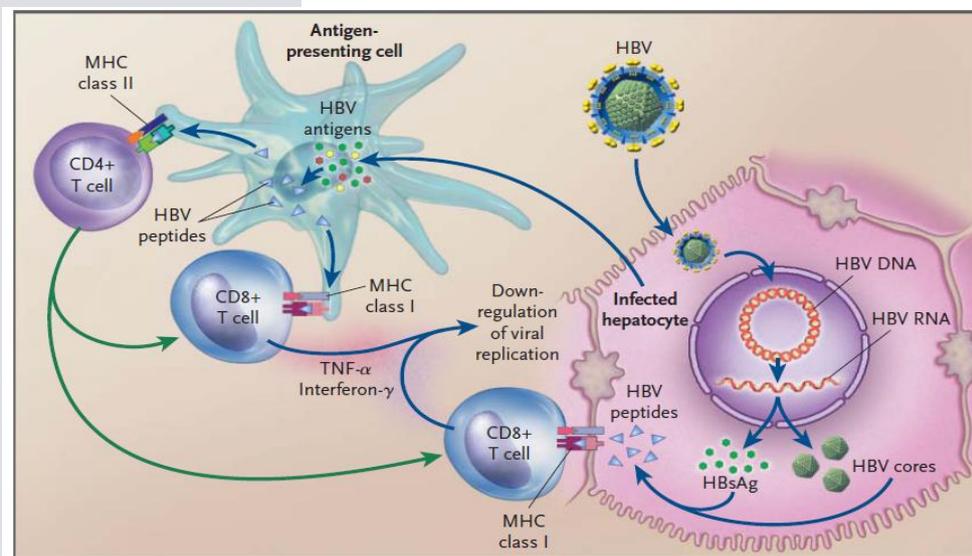


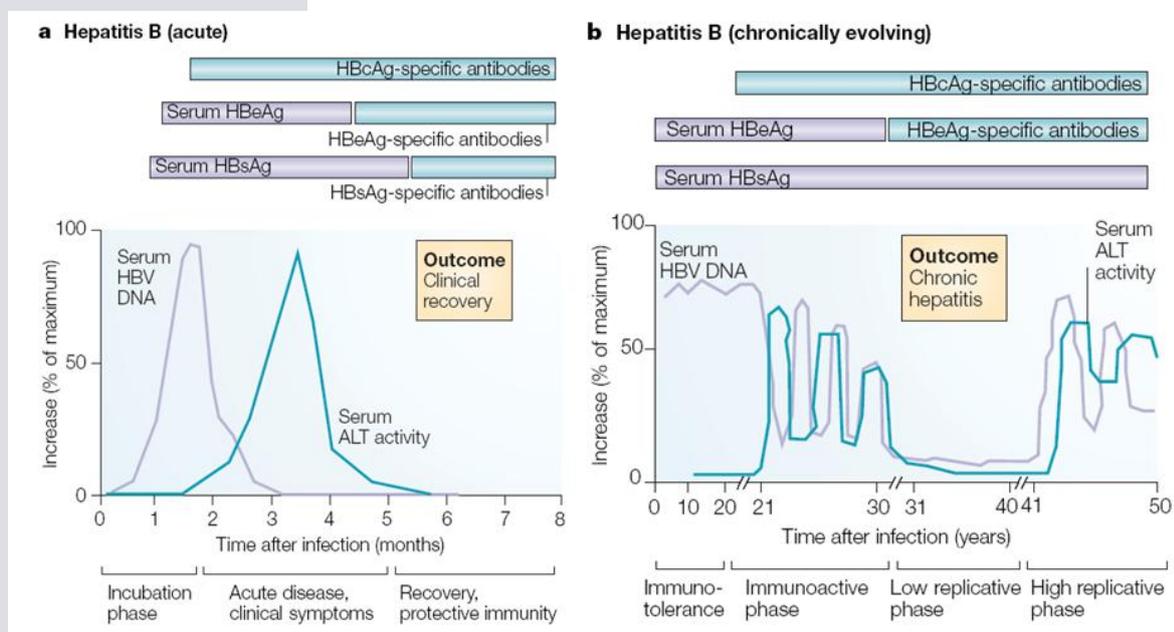
Figure 4. Réponse lymphocytaire contre le VHB (Don Ganem, *New. Eng. J. Med.* 2004)

Le virus est capable de se multiplier dans les hépatocytes, entraînant la production de particules d'Ag HBs et de particules virales complètes. Ces particules peuvent être capturées par les cellules présentatrices de l'antigène qui dégradent les antigènes viraux en peptides. Ces peptides sont ensuite présentés au niveau des molécules CMH de classe I et II aux lymphocytes T CD8 et T CD4. Les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus (avec l'aide des T CD4) ainsi activés peuvent reconnaître les antigènes viraux présentés au niveau du CMH de classe I des hépatocytes infectés. Cette reconnaissance peut entraîner soit la lyse directe de l'hépatocyte, soit la libération d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  capables de bloquer la réplication virale et d'éliminer le virus.

Plus tardivement, la réponse humorale se développe avec la production d'anticorps protecteurs dirigés contre l'antigène HBs<sup>31, 32</sup>. Cette séroconversion signe la fin de la phase aiguë chez les patients capables de résoudre l'infection et permet d'empêcher toute réinfection en bloquant la liaison entre les protéines virales et leurs récepteurs<sup>31</sup> (figure 5a).

### a.2\ La phase chronique de l'infection par le VHB

Environ 20% des patients infectés par le VHB sont incapables d'éliminer le virus et développent une infection chronique. Lors de la phase aiguë, la réponse immune cellulaire est faible et incapable d'éliminer les hépatocytes infectés alors que la réponse humorale protectrice (anticorps anti-HBs) ne se développe pas<sup>19, 33</sup>. Après plusieurs années, les patients vont développer une immunité inadaptée contre le VHB. Cette immunité comprend des lymphocytes T CD8 cytotoxiques incapables d'éliminer le virus (trop peu nombreux ou non spécifiques du virus) mais qui vont entraîner une lyse importante des hépatocytes et une hépatite<sup>17, 24</sup>(Figure 5b).



**Figure 5. Immunopathogénèse des phases aiguës et chroniques du VHB (Rehermann, Nature. Rev. Immunol. 2005)**

Après infection par le VHB, on observe une augmentation de la charge virale, suivie chez les patients capables de résoudre l'infection d'une activation de la réponse lymphocytaire T CD8 anti-VHB qui entraîne une augmentation transitoire des transaminases lors de la lyse des hépatocytes infectés. Les antigènes HBe et HBs sont rapidement retrouvés dans le sérum des patients et disparaissent avec l'apparition plus tardive d'anticorps anti-HBe et HBs protecteurs. Le patient a alors résolu l'infection.

Chez les patients qui ne sont pas capables d'éliminer le VHB, on retrouve après l'infection par le virus une augmentation de la charge virale qui peut persister pendant des années. La réponse lymphocytaire T CD8 ne s'active pas avant plusieurs années mais est incapable d'éliminer le virus, entraînant ainsi l'apparition d'une

hépatite chronique (augmentation des transaminases sur plusieurs mois). Les anticorps anti-HBe peuvent apparaître après plusieurs années mais ne sont pas associés à une résolution de la maladie.

### a.3\ Classification des patients au cours de l'hépatite B chronique

Afin de mieux évaluer le suivi et la thérapeutique des patients hépatite B, Lok et al ont classé les patients hépatite B dans différents groupes correspondant à l'évolution de la maladie en tenant compte du statut sérologique, de la charge virale, de la présence ou non d'une hépatite et des lésions hépatiques<sup>34</sup>. Trois groupes majeurs peuvent ainsi être définis (tableau 1) :

- Les patients porteurs inactifs de la maladie, qui ne présentent pas de lésions hépatiques et se trouvent dans une phase de faible répllication du virus. Ces patients ne présentent pas de signes pathologiques de la maladie mais peuvent évoluer vers les stades plus graves de l'hépatite B

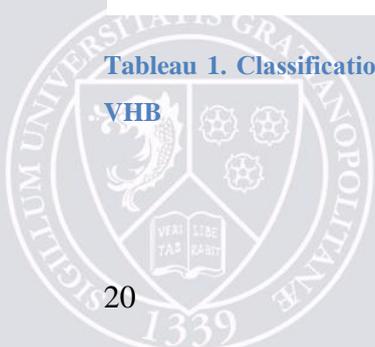
- Les patients hépatite B chronique (HBe positifs ou HBe négatifs), qui ont une hépatite évolutive avec présence de lésions plus ou moins importantes du foie et un risque accru de développer une cirrhose hépatique et un hépatocarcinome. Ces patients sont traités par antiviraux.

- Les patients ayant résolu l'infection, dont l'immunité a réussi à éliminer le virus, ils ne développeront plus la maladie chronique sauf en cas d'immunodépression forte.

Porteur inactif	Hépatite B chronique	Hépatite B résolue
HBs Ag (+) HBs Ac (-) HBe Ag (-) Charge virale < 2000 IU/ml	HBs Ag (+) HBs Ac (-) HBe Ag (+/-) Charge virale > 2000 IU/ml	HBs Ag (-) HBs Ac (+) HBc Ac (+) Charge virale (-)
ALAT normal sur plusieurs prélèvements et absence de lésions hépatiques sur la biopsie	ALAT élevées sur plusieurs prélèvements Ou présence de lésions hépatiques sur la biopsie	

Tableau 1. Classification des patients en fonction des différents types d'évolutions après infection par le

VHB

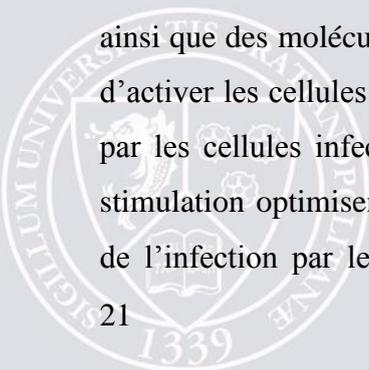


## b\ La réponse immunitaire au cours de l'hépatite B

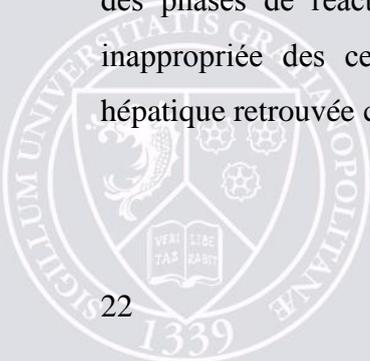
### b.1\ Réponse immunitaire innée

Au cours des infections virales, l'un des éléments majeur de l'immunité correspond à la production d'IFN de type I (comme nous le verrons de manière plus approfondie plus tard). En effet, l'IFN de type I possède une activité antivirale forte et un effet immunorégulateur intéressant en permettant par exemple l'induction des fonctions cytotoxiques des cellules NK<sup>35</sup>. Ainsi l'importance de l'IFN de type I dans le contrôle de la réplication virale a été montrée par l'administration systémique ou l'induction de la production d'IFN de type I par l'injection de poly (I:C) dans des modèles de souris transgéniques VHB<sup>36</sup>. Néanmoins, une étude effectuée sur des chimpanzés a montré en phase aigue de l'infection par le VHB une très faible induction des gènes de réponse à l'IFN de type I au niveau hépatique<sup>21</sup>, ce qui laisse supposer que le virus est capable soit de se répliquer de manière importante sans être détecté par le système immunitaire, soit de bloquer la production d'IFN de type I. Une étude du sérum de patients en phase aigue de la maladie a montré qu'au moment du pic de virémie, la production d'IFN de type I était extrêmement faible. Ce n'est qu'après le pic de virémie au moment de la résolution de la phase aigue que la concentration en IFN de type I augmente, ce qui peut laisser supposer qu'en plus de la capacité de rester masqué au système immunitaire, le VHB est aussi capable d'inhiber la production d'IFN de type I<sup>37</sup>. L'une des principales cellules de l'immunité antivirale capable de produire de l'IFN de type I est la pDC (cellule dendritique plasmocytoïde). Nous verrons plus loin comment le VHB peut moduler la réponse IFN de type I de la pDC. Enfin le VHB semble aussi capable de limiter l'activité antivirale de l'IFN de type I. Dans un modèle de souris chimériques, il a été montré que des hépatocytes humains infectés par le virus n'étaient plus capable de répondre à une stimulation par l'IFN de type I par blocage des voies de signalisation grâce à l'inhibition de la translocation nucléaire de STAT1 ce qui interfère avec la transcription des gènes stimulés par l'IFN<sup>38</sup>.

Les cellules NK peuvent aussi jouer un rôle dans l'immunité anti-VHB, de par leur capacité à reconnaître et lyser les cellules infectées par le virus et à produire certaines cytokines (IFN $\gamma$ ). Plusieurs cytokines produites au cours des infections virales (IFN de type I, IL-12, IL-18) ainsi que des molécules de co-stimulation (Ox40L, 4-1BBL, GITR-L, ICOS-L) sont capables d'activer les cellules NK, alors que la perte de la majorité des molécules de CMH de classe I par les cellules infectées par le virus ainsi que l'expression de certaines molécules de co-stimulation optimisent la reconnaissance de ces cellules par les cellules NK activées<sup>39</sup>. Lors de l'infection par le VHB et bien que la production de cytokines pro-inflammatoires soit



réduite par le virus, le rôle des cellules NK reste essentiel. En effet, les hépatocytes expriment physiologiquement un faible niveau de molécules CMH de classe I, ce qui entraîne, lors de l'infection par le VHB, l'expression de molécules de co-stimulations par les hépatocytes infectés qui devraient être capables d'induire localement l'activation des cellules NK<sup>40, 41</sup>. De plus les cellules NK intra-hépatique sont très abondantes, représentant 30 à 40% des lymphocytes hépatiques. Enfin, chez le chimpanzé, l'élimination du VHB est précédée par l'élévation des concentrations d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  intra-hépatique, cytokines produites entre autre par les cellules NK<sup>42</sup>. Chez des patients en phase aiguë de l'hépatite B, on retrouve une élévation de la proportion de cellules NK circulantes. Néanmoins, ces cellules NK présentent une fonctionnalité diminuée en lien avec la charge virale et une augmentation des concentrations d'IL10, laissant à penser que le VHB pourrait être capable d'inhiber l'activation de ces cellules en phase aiguë<sup>37</sup>. En phase chronique, le rôle des cellules NK semble être plus délétère, associé au développement de la cytolysse hépatique lors de réactivations du VHB<sup>40</sup>. En effet, les cellules NK lors de la phase chronique de l'infection présentent un phénotype particulier avec une diminution de la production de cytokines et une activité cytotoxique maintenue, favorisant la lyse des hépatocytes et le développement d'une hépatite chronique. Outre les cellules NK, d'autres cellules de l'immunité innée semblent impliquées au cours de l'infection par le VHB. Il a été montré que les cellules NKT en relation avec les pDCs étaient capables de contrôler au niveau hépatique les infections virales dans des modèles de souris infectées par LCMV<sup>43</sup>. De plus, il a été observé chez les patients hépatite B chronique active un taux plus faible de cellules NKT dans le sang qui se normalise avec le contrôle du virus<sup>44</sup> alors que dans un modèle de souris transgénique du VHB, l'activation des cellules NKT a permis l'activation des cellules NK et l'élimination du virus<sup>45</sup>. Le VHB semble donc avoir la capacité, aux premiers stades de l'infection, de rester caché de l'immunité innée (cellules présentatrices de l'antigène, cellules NK) et ainsi d'infecter rapidement un grand nombre d'hépatocytes. De plus, cette faible activation initiale de l'immunité innée peut avoir un impact sur l'activation de l'immunité adaptative, ce qui pourrait expliquer le passage en phase chronique chez certains patients infectés<sup>46</sup>. Enfin, lors des phases de réactivation du virus au cours de l'hépatite B chronique, une activation inappropriée des cellules de l'immunité innée pourrait expliquer en partie la cytolysse hépatique retrouvée chez les patients.



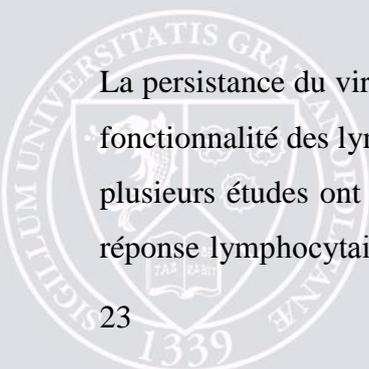
## b.2\ Réponse immunitaire adaptative au cours de l'hépatite B

### b.2.1\ Réponse immunitaire adaptative chez les patients capables de résoudre l'infection par le VHB

La réponse immune adaptative et principalement la réponse lymphocytaire T sont décrites comme essentielles au contrôle et à l'élimination du VHB mais aussi au développement de l'hépatite chronique. En effet, la réponse lymphocytaire T chez les patients capables de résoudre l'infection est forte. Ainsi chez ces patients on retrouve une réponse lymphocytaire T CD4 et CD8 multi-spécifique avec un profil cytokinique de type TH1<sup>47</sup>. Cette réponse devient généralement détectable juste après le début de la phase d'augmentation exponentielle de la charge virale<sup>48</sup>. Chez les patients pouvant contrôler l'infection, on observe alors rapidement une diminution de la charge virale. Lorsque l'infection est contrôlée, une augmentation de l'expression de CD127 et une diminution de l'expression de PD-1 (Programmed Death-1) est observée à la surface des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB, correspondant à la maturation de lymphocytes T mémoire<sup>49</sup>. Au moment du pic de virémie, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB, bien qu'activés, présentent une faible capacité à proliférer et sont peu fonctionnels. Cette inhibition semble être liée à l'apparition d'un pic d'IL-10 retrouvé chez les patients en phase aigüe<sup>37</sup> mais pourrait être aussi due à une augmentation de la libération d'arginase par les hépatocytes lysés. En effet, en depletant l'acide L-arginine (acide aminé essentiel), l'arginase contribue à diminuer l'expression de la chaîne  $\zeta$  du CD3 des lymphocytes T, entraînant une moins bonne efficacité de la reconnaissance par le TCR (récepteur des lymphocytes T) et ainsi une suppression des fonctions du lymphocyte T<sup>50</sup>. Ces mécanismes de régulation, sont présents à la fois chez les patients capables de résoudre l'infection et ceux qui passent en phase chronique. Ils pourraient donc représenter un processus homéostatique commun à plusieurs infections, nécessaire pour limiter le développement d'une immunité excessive pouvant entraîner des lésions hépatiques (hépatite fulminante).

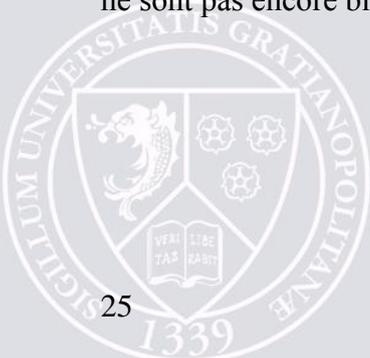
### b.2.2\ Réponse immunitaire adaptative chez les patients en phase chronique de l'infection par le VHB

La persistance du virus et le passage en phase chronique sont toujours associés à un défaut de fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et T CD8. Cette réponse est antigène dépendante, ainsi plusieurs études ont pu relever chez des patients passant en phase chronique une plus faible réponse lymphocytaire T CD8 dirigée contre l'antigène HBc et l'antigène HBe par rapport a



des patients capables de résoudre l'infection<sup>47, 51</sup>. Ces observations ont été confirmées par une étude de la réponse immune anti-VHB dans des modèles de souris KO pour divers éléments du système immunitaire qui ont montré l'importance de la réponse lymphocytaire T<sup>22</sup>. La réponse lymphocytaire T CD8 dirigée contre l'antigène HBs ou l'antigène pol reste par contre faible en phase aigue comme en phase chronique et ne semble pas liée à l'élimination du virus<sup>23, 47</sup>. Une autre étude a montré que chez les patients en phase chronique la réponse lymphocytaire T CD8 contre l'antigène HBc est fortement modulée par la charge virale. Ainsi, en présence d'une charge virale élevée (>10<sup>7</sup> copies/ml), Webster et al ne mesurent plus la présence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène HBc que ce soit en périphérie ou en intra hépatique<sup>23</sup>. Cette relation inverse entre charge virale et réponse lymphocytaire T pourrait s'expliquer par un effet tolérogène du au contact prolongé entre lymphocytes T et antigènes du VHB à forte dose. En parallèle, l'environnement hépatique contribue aussi au maintien de la tolérance immunologique vis-à-vis du VHB. En effet, il a été démontré dans certains modèles animaux que la réponse antivirale lymphocytaire T CD8 était altérée au niveau hépatique<sup>52</sup>. De plus, les hépatocytes n'expriment que faiblement les molécules CMH de classe I et nécessitent donc une concentration cent fois supérieures en peptides viraux par rapport aux autres APC pour stimuler aussi efficacement les lymphocytes T CD8<sup>53</sup>. Ceci suggère que les pathogènes infectant les hépatocytes sont moins bien reconnus par les lymphocytes T CD8. Tout ceci conduit à la diminution des lymphocytes T spécifiques du VHB et à leur exhaustion. Une étude a observé que les lymphocytes T intra-hépatiques au cours de l'infection chronique par le VHB expriment fortement PD-1, qui joue un rôle important dans le mécanisme d'exhaustion des lymphocytes par son interaction avec son ligand PD-L1. De plus, le blocage in vitro de la relation entre PD-1 et PD-L1 entraîne une restauration des fonctionnalités des lymphocytes T issus de patients atteints d'hépatite B chronique (production de cytokines, prolifération), ce qui renforce la preuve de leur rôle dans le mécanisme d'exhaustion au cours de l'infection par le VHB<sup>54</sup>. D'autres éléments peuvent expliquer la faiblesse de la réponse lymphocytaire T spécifique, ainsi l'étude du profil d'expression génique des lymphocytes T en phase chronique de l'infection par le VHB a montré une surexpression de marqueurs d'activation des voies d'apoptose et principalement la protéine pro-apoptotique Bim (médiateur interagissant avec Bcl2). L'activation de cette voie pourrait expliquer en partie la faible réponse lymphocytaire T spécifique retrouvée chez ces patients. De plus, le blocage de cette protéine a permis in vitro et ex vivo la restauration de la réponse lymphocytaire T, confirmant le rôle potentiel de cette protéine dans les mécanismes d'échappement du virus à l'immunité<sup>55</sup>. Parmi les cellules de l'immunité, certaines sont spécialisées dans le contrôle de

la réaction immunitaire. On retrouve tout particulièrement les lymphocytes T régulateurs ( $\text{TCR4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{FoxP3}^+$ ). Au cours de l'infection par le VHB, certaines études ont dosé ces lymphocytes T régulateurs en périphérie ou au niveau intra-hépatique. Ces études donnent des résultats contradictoires, deux d'entre elles retrouvent des taux plus élevés de lymphocytes T régulateurs chez les patients en phase chronique (et particulièrement ceux avec une hépatite avancée) comparés aux donneurs sains<sup>56, 57</sup> alors qu'une autre étude ne voit pas de différence<sup>58</sup>. L'analyse fonctionnelle de ces cellules a démontré qu'en déplétant les lymphocytes T régulateurs d'échantillons de sang issus de patients atteints d'hépatite B chronique, on pouvait restaurer en partie la réponse lymphocytaire T spécifique contre le VHB<sup>56-58</sup>. Il a ainsi été observé un retour de la prolifération lymphocytaire ou de la production spécifique d'IFN $\gamma$ . Ces résultats peuvent laisser supposer que les lymphocytes T régulateurs, particulièrement intra-hépatiques jouent un rôle dans la physiopathologie de la maladie en inhibant la réponse spécifique contre le VHB et en limitant son élimination par les lymphocytes T spécifiques. Certaines protéines virales peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de la réponse lymphocytaire spécifique anti-VHB. L'antigène HBe a été montré comme étant capable de moduler la réponse immunitaire contre le VHB. Ainsi, le taux de lymphocytes T régulateurs chez les patients VHB chroniques est corrélé à leur statut HBe<sup>59</sup>, ce qui peut laisser supposer que l'antigène HBe serait capable de renforcer la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs et ce qui aiderai le VHB a échapper à l'immunité de l'hôte. De plus il a été démontré que bien que les antigènes HBc et HBe ont une réactivité croisée au niveau de leur reconnaissance par le TCR, ils induisent des profils lymphocytaires différents. Dans un modèle de souris, il a ainsi pu être observé que l'antigène HBc induisait un profil plutôt TH1 alors que l'antigène HBe induisait un profil plutôt TH2<sup>60</sup>. Il a pu être observé dans un modèle de souris transgéniques pour les antigènes HBc et HBe, qu'en présence d'antigène HBe, la réponse lymphocytaire T spécifique anti-HBc n'était plus dirigée vers un profil TH1 mais vers un profil TH2<sup>61</sup>. Il est possible que, de par leurs ressemblances structurelles, l'antigène HBe soit capable de moduler la réponse lymphocytaire contre l'antigène HBc. Les capacités de modulation de la réponse immune par l'antigène HBe ne sont pas encore bien définies et nécessitent d'être étudiées de manière plus approfondie.



## b.2.3\ Réponse immunitaire adaptative et lésions hépatiques en phase chronique de l'infection par le VHB

Le VHB est donc capable de limiter la réponse immunitaire spécifique afin d'infecter chroniquement les patients. Bien qu'inefficace pour éliminer le virus, le système immunitaire est continuellement activé par la présence du VHB, entraînant des lésions hépatiques non spécifiques et l'hépatite chronique. De plus, cette activation inappropriée de l'immunité semble être capable d'expliquer en partie l'évolution de la pathologie vers l'hépatocarcinome. Il a pu ainsi être observé dans un modèle de souris transgénique pour le VHB qu'en présence d'une réponse lymphocytaire T anti-VHB chronique, se développe une inflammation hépatique chronique pouvant mener vers le développement d'un hépatocarcinome<sup>62</sup>. Plusieurs facteurs liés au VHB ont montré qu'ils pouvaient mener vers le développement d'un hépatocarcinome (intégration de l'ADN du VHB dans l'ADN de l'hôte, rôle de la protéine HBx...). Il semblerait néanmoins que l'un des éléments majeurs de la pathogenèse du VHB, capable de mener (dans des modèles animaux) seul au développement d'une hépatocarcinome, soit l'induction chronique d'une réponse immune insuffisante pour éliminer le VHB mais suffisante pour entraîner une hépatite chronique<sup>63</sup>.

En considérant l'ensemble de ces données, il semblerait que ce soit l'incapacité du système immunitaire à éliminer le virus ainsi que l'alternance entre phase de lyse des hépatocytes et phase de forte répllication virale qui expliquent la physiopathologie particulière du VHB<sup>20</sup>.

## D Thérapeutiques actuelles et en développement

Un traitement efficace contre le VHB devrait permettre l'élimination du virus et empêcher le développement de lésions hépatiques. Si les traitements actuels sont capables de bloquer la répllication virale et de réduire le risque d'hépatite, ils ne sont pas capables d'éliminer complètement le virus et de résoudre l'infection. C'est pourquoi de nouvelles thérapeutiques sont en développement, basées sur le constat que le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle du VHB et qu'en cas d'infection chronique il est nécessaire de pouvoir le réactiver afin de pouvoir résoudre l'infection.



## a) Traitement prophylactique

Il existe depuis plusieurs années un vaccin prophylactique, composé de l'antigène HBs et d'adjuvants immuno-activateurs (hydroxyde d'aluminium), qui permet de protéger les sujets contre l'infection par le VHB. Néanmoins, malgré l'existence de ce vaccin, l'infection reste présente, soit dans des pays où la vaccination n'est pas possible pour des raisons financières, soit par une couverture vaccinale trop faible liée à une méfiance vis-à-vis de la vaccination anti-HBV <sup>64</sup>. De plus, malgré de nombreux essais, ce vaccin n'a pas démontré d'effet thérapeutique chez les patients en phase chronique que ce soit seul ou combiné à d'autres thérapeutiques antivirales <sup>65-68</sup>.

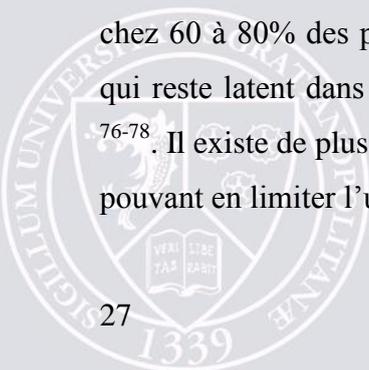
## b) Traitement par IFN $\alpha$

L'IFN $\alpha$  a été pendant des années le traitement de référence dans le traitement contre l'hépatite B jusqu'à l'arrivée des antiviraux. Il permet de réduire la charge virale en bloquant la réplication du virus et en stimulant l'immunité principalement cellulaire contre les hépatocytes infectés <sup>69-72</sup>.

Néanmoins les nombreux effets indésirables (fièvre, myalgies, hépatites aiguës) et sa faible efficacité (30% des patients répondent au traitement, peu d'effet sur l'évolution vers l'hépatocarcinome) ont réduit son utilisation avec l'apparition des antiviraux classiques <sup>73-75</sup>. Il existe depuis quelques années une forme pégylée de l'IFN $\alpha$  qui a permis de simplifier le traitement et de limiter ses effets indésirables.

## c) Traitements antiviraux

Les traitements antiviraux visent à bloquer le cycle de réplication virale en inhibant des étapes clés. Ces traitements correspondent à des analogues nucléosidiques comme la Lamivudine ou l'entécavir, et des analogues nucléotidiques comme le ténofovir ou l'adéfovir, capables d'inhiber la réplication du virus en bloquant l'ADN polymérase virale. Ils entraînent une réduction à la fois de la charge virale et des risques de lésions hépatiques et peuvent entraîner une séroconversion HBe chez un grand nombre de patients (disparition de la charge virale chez 60 à 80% des patients), mais ils ne sont pas capables d'éliminer complètement le virus qui reste latent dans les hépatocytes (résolution de l'infection chez <3% des patients traités) <sup>76-78</sup>. Il existe de plus en plus de cas de développement de résistance du virus à ces traitements, pouvant en limiter l'utilisation sur le long terme <sup>79-81</sup>.



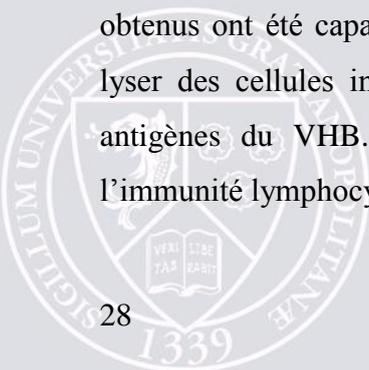
## d\ Immunothérapies en développement

La réponse immunitaire est un élément clef dans la régulation et l'élimination du virus, les patients capables d'éliminer le virus possédant une forte réponse spécifique lymphocytaire T (anti-HBc principalement) et une réponse humorale adaptée. C'est pourquoi un certain nombre d'immunothérapies visant à rétablir la réponse lymphocytaire T CD8 sont en cours de développement.

Les vaccins à ADN ont pour but de générer plusieurs épitopes antigéniques afin d'amplifier une réponse immune poly-spécifique. Ils se présentent sous forme de plasmide codant pour l'ensemble des épitopes d'intérêt du virus. Ils ont été testés in vivo dans des modèles de souris transgéniques permettant de mesurer l'activation des lymphocytes T CD8 ou T CD4 helper. Dans ces modèles on a pu démontrer l'amplification spécifique des lymphocytes T dirigés contre les antigènes d'intérêt. Il a de plus été démontré in vitro par spectrométrie de masse que les cellules transfectées avec le plasmide étaient capables d'apprêter et de présenter correctement les épitopes du VHB au niveau du CMH<sup>82, 83</sup>.

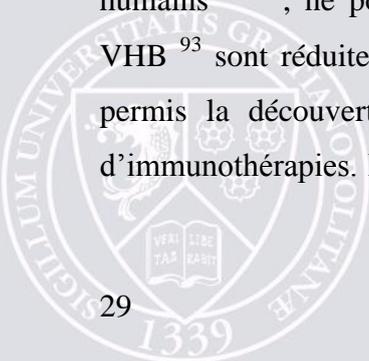
Un vaccin peptidique sous forme de lipopeptides<sup>84, 85</sup> contenant le peptide HBc (18-27) et ayant pour but d'induire une réponse Lymphocytaire T CD8 spécifique anti-HBc a été testé au cours d'un essai clinique chez l'homme et a montré chez environ 30% des patients atteints d'hépatite B chronique une amplification de la réponse lymphocytaire T CD8, fonctionnelle et capable de lyser in vitro des cellules présentant l'antigène HBc à des niveaux comparables à ceux observés chez les patients ayant résolu l'infection. Ce faible pourcentage de patient ayant une réponse thérapeutique semble être expliqué par une activation altérée des lymphocytes T CD4 chez les patients atteints d'hépatite B chronique.

D'autres immunothérapies ont été développées comme les thérapies adoptives à base de lymphocytes T CD8 exprimant un TCR transduit ou chimérique, spécifique des antigènes du VHB<sup>86, 87</sup>. Le modèle de T CD8 exprimant un TCR transduit a été testé in vitro sur des lymphocytes T issus de patients atteints d'hépatite B chronique. Après transduction des TCR spécifiques du VHB ex vivo au niveau des lymphocytes T de patients, il a été retrouvé une forte expression de ces TCR. Les lymphocytes T exprimant un TCR transduit du VHB ainsi obtenus ont été capables après stimulation de produire de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL2, de lyser des cellules infectées par le VHB et des tumeurs d'hépatocarcinome exprimant les antigènes du VHB. Ces cellules pourraient maintenant être utilisées pour reconstituer l'immunité lymphocytaire T anti-VHB.



Enfin, des vaccins utilisant des cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) autologues chargées avec des antigènes viraux (HBc), ont été capables d'induire une réponse cytotoxique spécifique importante. Dans une étude *in vitro*, des cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDC) chargées avec un peptide viral issu de l'antigène HBc ont été capables d'amplifier une réponse lymphocytaire de type TH1 à partir de PBMC de patients atteints d'hépatite B chronique, dans un contexte autologue, permettant d'obtenir des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB (amplification pour 8/11 patients VHB testés avec des pourcentages de lymphocytes T spécifiques allant de 0,56% à 62,4%). Ces lymphocytes sont fonctionnels et capables de lyser en partie spécifiquement des cellules T2 chargées avec le peptide d'intérêt *in vitro*<sup>88</sup>. Plusieurs essais cliniques sur l'utilisation des mDCs autologues dans le traitement de l'hépatite B sont en cours d'investigation. Ainsi Akbar et al ont testé dans un essai de phase I chez 5 patients hépatite B chronique la sécurité de l'utilisation en thérapeutique de mDCs chargées avec l'antigène HBs. Ce traitement n'a pas montré de toxicité particulière chez les patients. De plus, chez 2 patients il a été observé l'apparition d'anticorps anti-HBs et chez 1 patient l'apparition de lymphocytes T spécifiques anti-HBs. Cette première étude préliminaire a permis de s'assurer que ce traitement ne présentait pas de risque particulier et a montré des premiers résultats intéressants en terme d'amélioration de la réponse immune anti-HBV<sup>89</sup>. Un autre essai sur 380 patients atteints d'hépatite B chronique a évalué l'efficacité d'un traitement utilisant des DCs autologues chargées avec le peptide HBc (18-27) et HBV pre S2 (44-53) afin de restaurer l'immunité anti-VHB. Les résultats ont montré une réponse complète (13% des patients HBe positifs et 54% des patients HBe négatifs) ou partielle (73% des patients HBe positifs et 27% des patients HBe négatifs) 48 semaines après le début du traitement (diminution charge virale, séroconversion HBe, réduction des ALAT)<sup>90</sup>. Ces résultats encourageants montrent l'intérêt que peuvent présenter les cellules dendritiques dans la restauration de la réponse immunitaire anti-VHB et l'élimination du virus.

Le développement de nouvelles immunothérapies est particulièrement compliqué à cause du manque de modèle animal pertinent pour mesurer leur efficacité dans un contexte immunitaire humain. Ainsi les modèles de souris trimera et uPA-SCID transplantées avec des hépatocytes humains<sup>91, 92</sup>, ne possèdent pas de système immunitaire humain, les souris transgéniques VHB<sup>93</sup> sont réduites au contexte murin alors que les souris transgéniques HLA-A2<sup>94</sup> ont permis la découverte des épitopes du virus mais ne permettent pas le développement d'immunothérapies. Les autres modèles (canard, marmotte, singe) d'infection naturelle par le



VHB sont compliqués à manipuler et ne permettent pas de tester simplement de nouvelles immunothérapies dans un contexte humanisé<sup>95</sup>.

A l'heure actuelle, bien que certains traitements soient entrés en phase de développement préclinique, il n'existe pas de traitement d'immunothérapie efficace en contexte VHB. Il serait pourtant très intéressant de pouvoir développer une immunothérapie capable d'éliminer le VHB et de résoudre l'infection.

## 2 Les cellules dendritiques plasmocytoides

### A Définition

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle de sentinelles dans l'organisme. Elles sont capables de reconnaître de nombreux agents pathogènes et d'activer à la fois l'immunité innée et adaptative de par leur production de cytokines et leur rôle de cellules présentatrices de l'antigène<sup>96,97</sup>.

Il existe plusieurs sous-types de DCs qui diffèrent par leurs phénotypes, leurs localisations et leurs rôles souvent complémentaires. Nous nous sommes focalisés au cours de cette étude sur les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC) car elles jouent un rôle primordial dans l'immunité antivirale.

### B Découverte des pDCs

Tout d'abord, il a été décrit une sous-population lymphocytaire rare (moins de 1% des PBMCs) chez les donneurs sains, capable de produire de grandes quantités d'IFN de type I (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ) en réponse à une stimulation virale in vitro, exprimant à leur surface des marqueurs du CMH de classe II (HLA-DR)<sup>98</sup>. Ces cellules ont alors été appelées cellules naturelles productrices d'IFN (IPC). Parallèlement, a été décrit la présence de cellules dans les zones T des ganglions lymphatiques lors de lymphadénites non spécifiques. Ces cellules exprimaient le marqueur CD4 et avaient une morphologie de type plasmocytaire. Elles furent ainsi appelées cellules T plasmocytoides (PTC)<sup>99</sup>. Ces cellules ont ensuite été étudiées d'un point de vue phénotypique et il a été retrouvé un certain nombre de marqueurs de la lignée monocytes macrophages (CD31, CD36, CD68, CD123). Elles ont alors été renommées monocytes plasmocytoides. Dans les années 90, plusieurs équipes de recherche ont analysé

ces cellules, démontrant tout d'abord qu'elles pouvaient se différencier in vitro en cellules dendritiques en présence d'IL-3 et de CD40-Ligand<sup>100</sup> et ensuite qu'elles pouvaient produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à une stimulation virale<sup>101</sup>. Regroupant les résultats entre les IPC et les PCT, ces cellules furent classées comme une sous-population de DC, les cellules dendritiques plasmocytoïdes, capables de produire de l'IFN $\alpha$  en grande quantité et de stimuler spécifiquement les lymphocytes T.

## C Morphologie, phénotype, localisation et migration des pDCs

### a) Morphologie et phénotype

Les pDCs, en microscopie électronique à transmission, apparaissent comme des lymphoblastes avec un noyau présentant une hétérochromatine marginale et un cytoplasme contenant un réticulum endoplasmique rugueux développé, un petit appareil de Golgi et beaucoup de mitochondries (Figure 6). En microscopie électronique à balayage, on peut observer que les pDCs au repos se présentent de manière sphérique alors que les pDCs activées par CD40-L ont une morphologie équivalente à celle des DCs.



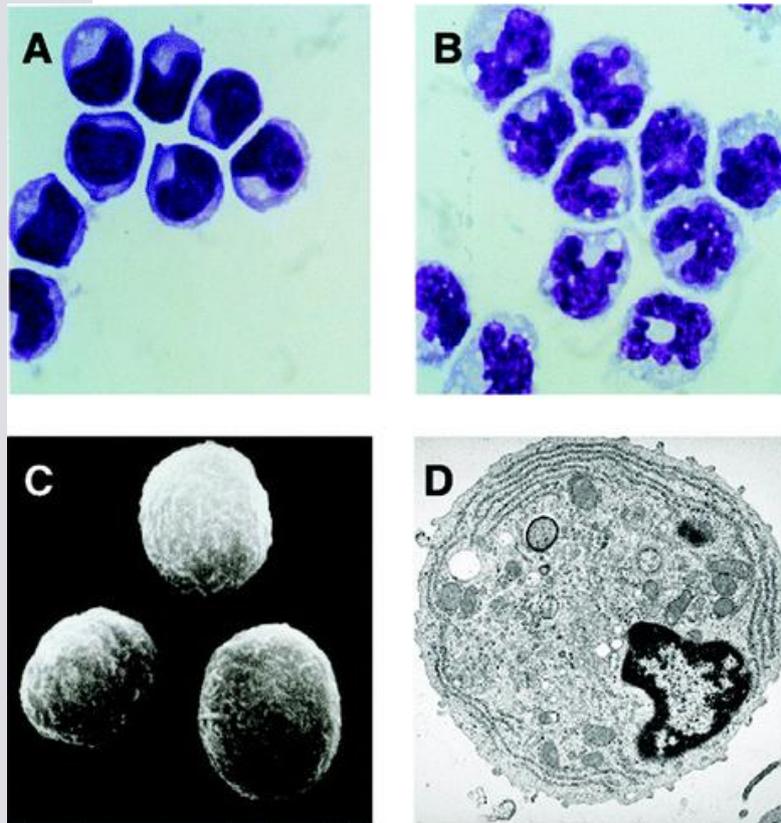


Figure 6. Morphologie des pDCs (Liu, *Ann rev immunol*, 2005)

(A,B) morphologie des pDCs (A) comparée aux macrophages (B) au microscope optique après coloration au Giemsa. (C) pDCs au microscope électronique. (D) pDCs au microscope électronique à transmission.

L'ensemble des DCs humaines n'expriment pas de marqueur spécifique de lignée (lin) tels que les marqueurs des lignées lymphocytaires T (TCR, CD3) ou B (CD19, immunoglobulines cytoplasmiques et de surface), des monocytes (CD14) ou des cellules NK (CD16, CD56) mais expriment à différents niveaux les molécules HLA-DR et CD123. Les pDCs expriment certains marqueurs qui permettent de les différencier des autres sous populations de cellules dendritiques (cellules dendritiques myéloïdes ou mDCs) (Tableau 2). Parmi ces marqueurs on retrouve principalement les antigènes des cellules dendritiques du sang (BDCA1-4). Les marqueurs BDCA2 et BDCA4 sont ainsi spécifiques des pDCs à l'état immature<sup>102</sup>. D'autres marqueurs permettent de caractériser les pDCs par rapport aux mDCs tels que l'absence de CD11c, de marqueurs myéloïdes (CD13) et l'expression du marqueur de progéniteur lymphoïde CD10 est faible. Ces marqueurs spécifiques suggèrent que les pDCs appartiennent à une lignée cellulaire indépendante dans le système immunitaire.

Phénotype	mDC	pDC
CD1a	-	-
CD4	+	++
CD11c	+	-
CD14	-	-
BDCA-1	+	-
BDCA-2	-	+
BDCA-4	-	+
CD116	++	+
CD123	+	++
HLA-DR	++	+

Tableau 2. Phénotype des mDCs/pDCs humaines (d'après Liu, *Ann Rev Immunol*, 2005)

### b) Localisation et migration dans l'organisme

Chez l'adulte, les pDCs sont produites de manière constante dans la moelle osseuse et circulent dans le sang. Elles sont rares dans la circulation sanguine (0,3-0,5% des cellules du sang périphérique) et résident dans les organes lymphoïdes (rate, thymus, ganglions lymphatiques, organes lymphoïdes associés aux muqueuses)<sup>103, 104</sup>. La durée de vie des pDCs n'excède pas 2 semaines chez la souris et un renouvellement continu est nécessaire pour maintenir l'homéostasie des pDCs dans l'organisme<sup>105</sup>.

Le trafic physiologique des pDCs est encore à l'étude. On suppose que les pDCs entrent par les veinules post-capillaires à endothélium épais (HEV) directement dans les ganglions lymphatiques pour s'accumuler dans les zones riches en lymphocytes T du paracortex où nous pouvons les retrouver<sup>101</sup>. Deux éléments exprimés sur la pDCs appuient cette hypothèse. L'expression constitutive de CCR7 qui fixe CCL19 et CCL21, chimiokines produites par les HEV et les cellules stromales du paracortex, et l'expression de CD62L qui joue un rôle dans la transmigration au travers de l'endothélium<sup>106, 107</sup>. Néanmoins certains éléments ne sont pas concordants, ainsi il a été démontré chez la souris que les ganglions lymphatiques non inflammés permettent l'adhérence mais ne permettent pas la transmigration des pDCs, à la

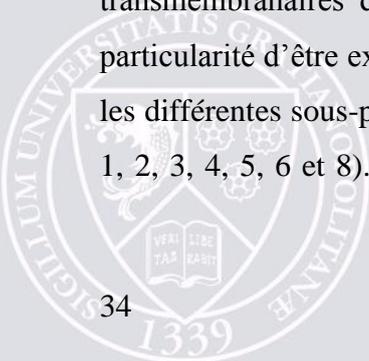
différence des ganglions en situation inflammatoire où s'observe une importante migration à travers les HEV<sup>106, 108</sup>.

A l'exception de certains tissus (foie, intestin grêle) où l'expression du récepteur CCR9 qui reconnaît la chimiokine CCL25 permet un adressage des pDCs<sup>109</sup>, on ne retrouve pas ou peu de pDCs dans les tissus périphériques en situation physiologique. Par contre il a été démontré la présence de grandes quantités de pDCs dans les tissus inflammés comme lors des maladies inflammatoires de la peau<sup>110</sup>. Cette migration vers les tissus inflammés semble être médiée par diverses chimiokines. Ainsi la pDC exprime les récepteurs CCR1, CCR2 et CCR5 pour les chimiokines inflammatoires CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5. Néanmoins, il a été montré que la plus part des récepteurs à chimiokines exprimés par les pDCs en circulation ne sont pas fonctionnels<sup>107</sup>. D'autres modèles ont permis d'émettre l'hypothèse d'une migration des pDCs induite par l'inflammation. Ainsi, le récepteur CXCR3 permettant la migration des pDCs n'est actif qu'après engagement du récepteur CXCR4 par CXCL12 son ligand associé aux tissus et ganglions inflammés<sup>111</sup>. La migration des pDCs vers les tissus en situation pathologique semble donc être le résultat de l'utilisation complexe d'un grand nombre de récepteurs à chimiokines.

## D Fonction des pDCs dans la réponse immune antivirale

### a) Activation des pDCs

Les PAMP (Pathogen associated molecular patterns) sont des motifs microbiens particuliers qui sont capables de stimuler les DCs. Ces PAMP sont reconnus par un ensemble de récepteurs appelés PRR (Pattern-Recognition Receptors). Ces PRR peuvent être retrouvés dans les endosomes (les Toll like récepteur ou TLR) ou dans le cytoplasme (RIG-1 par exemple) pour reconnaître respectivement les pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Les pDCs expriment principalement deux TLR : TLR7 et TLR9 (Tableau 3), capables de reconnaître les génomes viraux (ADN et ARN). Ces TLR sont des protéines transmembranaires de type I de la famille du récepteur à l'IL1. Les TLR 7 et 9 ont la particularité d'être exprimés dans les endosomes/lysosomes de la pDC. De façon intéressante, les différentes sous-populations de DCs expriment différents TLR à leur surface (mDC : TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8). Ainsi, en fonction de ces profils d'expression, les mDCs et monocytes



reconnaîtront préférentiellement les produits bactériens tels que le peptidoglycane et l'acide lipoteichoïque pour TLR2 ou le lipopolysaccharide (TLR4).

Phénotype	mDC	pDC
TLR1	+	+/-
TLR2	+	-
TLR3	++	-
TLR4	+	-
TLR5	+	-
TLR6	+	+
TLR7	-	++
TLR8	++	
TLR9	-	++
TLR10	+	+/-

**Tableau 3. Expression des TLR par les mDCs/pDCs (d'après Liu, Ann Rev Immunol 2005)**

Le TLR7 est capable de reconnaître les virus à ARN comme influenza, le virus de la grippe (Flu) ou le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de l'hépatite C (VHC). Il peut aussi reconnaître des composants synthétiques apparentés aux acides nucléiques de type guanosines comme les imidazoquinolines, la loxoribine<sup>112</sup> ou le composant azoquinoline R848<sup>113</sup>.

Le TLR9 est capable de reconnaître l'ADN bactérien contenant une séquence particulière ou motif CpG formé de dinucléotides non méthylés. Au sein de la pDC, le TLR9 est capable de reconnaître aussi des séquences d'ADN viraux possédant le motif CpG tel que les virus de l'Herpes Simplex (HSV1 et HSV2)<sup>114, 115</sup>. Il existe un certain nombre d'ODN synthétiques contenant les motifs CpG qui permettent de mimer l'action des ADN viraux sur la pDC.

La pDC, une fois activée, produit alors de grandes quantités d'IFN de type I, ce qui en fait une cellule productrice d'IFN de type I professionnelle. De plus, elle peut se différencier en cellule présentatrice d'antigène. Au cours de cette différenciation, sa morphologie évolue, passant d'une forme ronde et lisse au repos, à une forme dendritique après activation. Cette modification morphologique associée à une augmentation de ses capacités de co-stimulation (expression renforcée des molécules de co-stimulation) permet à la pDC de jouer son rôle

dans la stimulation des lymphocytes T. En effet, la morphologie dendritique permet d'augmenter les surfaces de contacts entre la pDC et les lymphocytes T, renforçant la synapse immunologique<sup>116</sup>.

Après activation des TLRs, la pDC est donc capable d'évoluer vers deux voies (Figure 7) : la production d'IFN de type I et la différenciation en cellules dendritiques co-stimulatrices. L'évolution vers ces deux voies peut être induite par différents virus comme le virus influenza ou par des molécules synthétiques comme le CpG de type C<sup>117, 118</sup>. Cependant, certaines molécules peuvent n'induire qu'une seule voie et en particulier certains ligands de TLR9. Ainsi, les ODN CpG de type A induisent une forte production d'IFN de type I avec une faible expression des molécules de co-stimulation alors que les ODN CpG de type B inversement induisent la différenciation de la pDC avec une forte expression des molécules de co-stimulation avec une faible production d'IFN de type I<sup>118, 119</sup>.

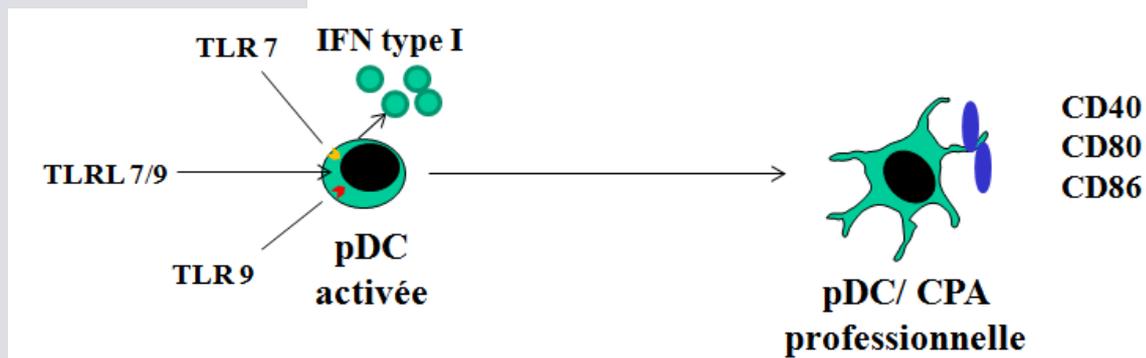


Figure 7. Activation et différenciation des pDCs par les ligands des TLR7 et TLR9

Après activation de TLR7 ou TLR9 par leurs ligands (naturels ou artificiels), les pDCs sont capables de s'activer pour produire de grandes quantités d'IFN de type I et d'autres cytokines (TNF $\alpha$ , IL-12...) ou de se différencier en cellule présentatrice d'antigène en prenant une forme dendritique et en sur-exprimant les principales molécules de co-stimulation.

### b) Réponse immunitaire innée et pDCs

L'un des rôles principaux des pDCs est de contrôler l'infection virale grâce à leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I, suite à une stimulation TLR, ce qui en fait des cellules majeures pour la réponse antivirale. L'IFN de type I a des propriétés antivirales directes, limitant la réplication virale, mais surtout est capable de stimuler et d'entretenir la

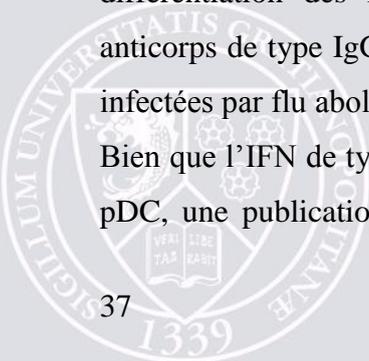
réponse immunitaire<sup>120-122</sup>. Les pDCs sont capables de produire 1 à 2 U d'IFN par cellules, ce qui correspond à une production 100 à 1000 fois plus importante que pour les autres cellules du système immunitaire<sup>123</sup>. Cette production immédiate d'une grande quantité d'IFN de type I s'accompagne d'autres molécules pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'IL6<sup>124</sup>

### **b.1\ Rôle antiviral de l'IFN**

La pDC suite à une stimulation virale est donc capable de produire de grandes quantités d'IFN de type I. Ces IFN jouent un rôle majeur dans l'immunité antivirale, que ce soit directement en bloquant le cycle de réplication virale ou indirectement en activant les voies de signalisation intracellulaires des cellules infectées et en activant les autres cellules du système immunitaire. L'IFN de type I est ainsi capable d'induire l'expression de nombreuses molécules de surfaces comme le CMH de classe I ou des antigènes de surfaces associés aux tumeurs afin d'augmenter la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire. L'IFN de type I est aussi capable d'induire ou d'activer des gènes et des protéines pro-apoptotiques (comme les caspases, Bak, Bax) et de réprimer des gènes anti-apoptotiques (comme Bcl-2) afin de faciliter l'élimination des cellules infectées.

En plus de son rôle direct sur les cellules infectées, l'IFN de type I est capable, en lien avec d'autres cytokines secrétées par la pDC, d'influer sur les cellules de l'immunité innée et adaptative. Ainsi l'IFN de type I en association avec l'IL-12 agit sur de nombreuses fonctions des cellules T tel que l'induction des cellules T mémoires et le maintien de leur survie<sup>125</sup>, l'induction de l'expression par les lymphocytes T du marqueur d'activation CD69, la polarisation des lymphocytes T CD4 vers la voie TH1, l'augmentation de l'activité cytotoxique et de la production d'IFN $\gamma$  des lymphocytes T CD8<sup>126</sup>. L'IFN de type I joue aussi un rôle sur l'activité cytotoxique des cellules NK, qui sera discuté plus tard. L'IFN de type I (et principalement les IFN  $\alpha$  et  $\beta$ ) sont capables de promouvoir la différenciation et la maturation des cellules dendritiques, permettant la présentation et la cross-présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs. Enfin, l'IFN de type I produit par la pDC et l'IL6 induit la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes capables de produire de nombreux anticorps de type IgG<sup>127</sup>. Ainsi, il a été démontré in vitro que la déplétion en pDC de PBMC infectées par flu abolit la production d'anticorps IgG polyclonaux spécifiques du virus<sup>128</sup>.

Bien que l'IFN de type I joue un rôle majeur dans l'activation de l'immunité antivirale par la pDC, une publication récente a démontré in vivo chez la souris que l'IFN de type I était



capable d'activer les voies apoptotiques de la pDC, afin d'en limiter le nombre une fois activée<sup>129</sup>.

### b.2\ Cross-talk pDC et NK

Les cellules NK représentent l'un des types cellulaires majeurs de l'immunité innée de part leurs capacités cytotoxiques (production de perforines/granzymeB) et de production de cytokines inflammatoires (production d'IFN $\gamma$ ) et jouent un rôle majeur dans la surveillance anti tumorale et l'immunité antivirale<sup>35</sup>. Plusieurs études ont démontré que les pDCs seraient capables d'induire la migration et l'activation des cellules NK dans les tissus en situation pathogène (infection, cancer). Les pDCs semblent capables, via la production de molécules chemoattractives, de faire migrer les NKs vers les sites pathogènes. En effet, il a été démontré dans un modèle de souris portant une tumeur cutanée (mélanome B16), que des pDCs activées par des ligands de TLR9 directement injectées dans la tumeur, pouvaient produire des chemokines (CCL3, CCL4 et CCL5) capables d'attirer les NK dans les tissus via leur récepteur CCR5<sup>130</sup>. Dans une autre étude, l'injection en intra-péritonéale dans des souris de pDCs stimulées par des ligands de TLR9 (CpG) entraîne la migration des cellules NK au niveau du site d'injection. Dans des modèles de souris KO pour CD62L ou CXCR3, cette migration est réduite de manière significative, suggérant un rôle de ces protéines membranaires dans la migration des cellules NKs par la pDC<sup>131</sup>. Les pDCs sont capables d'activer les deux fonctions majeures des NK par deux voies bien distinctes, entraînant une dichotomie entre la fonction cytotoxique et la fonction de production de cytokines inflammatoires des NK. L'IFN de type I produit par la pDC après activation est ainsi capable de stimuler l'activité cytotoxique des NK. In vitro, les pDCs activées sont capables d'induire l'activité cytotoxique des NK. En présence d'anticorps bloquant les IFN $\alpha/\beta$ , l'activité cytotoxique des NK est inhibée et peut être restaurée par ajout d'IFN de type I dans le milieu, ce qui prouve bien le rôle de l'IFN de type I produit par la pDC activée sur les NK<sup>132</sup>. D'un autre côté, les pDCs sont capables de moduler la production de cytokines inflammatoires par les cellules NK. Cette modulation se fait principalement par un mécanisme de contact direct<sup>132</sup> utilisant différents récepteurs. Ainsi, Ox40L exprimé par la pDC activée est capable de stimuler les cellules NK via son récepteur Ox40. In vitro, des pDCs issues de souris Ox40L<sup>-/-</sup> en présence de CpG, ne sont pas capables de stimuler la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK à la différence de pDCs issues de souris sauvages<sup>130</sup>. GITRL exprimé sur la pDC peut activer GTR exprimé sur les cellules NK afin de les stimuler. In vitro, une lignée cellulaire

transfectée avec GITRL a ainsi pu activer les cellules NK en présence d'IFN de type I et d'IL2<sup>133</sup>. Le récepteur ICOS présent sur les cellules NK peut après stimulation activer les fonctions cytotoxiques et la production d'IFN $\gamma$  par ces cellules<sup>134</sup>. Les pDCs sont en partie capables d'activer les lymphocytes T par l'interaction entre ICOS-L et ICOS<sup>135</sup>, ce qui peut laisser supposer qu'elles sont aussi capables d'activer les cellules NK de la même façon. D'autres molécules, dont l'expression est amplifiée lors de la stimulation CpG, auraient pu être impliquées et ont été testé, comme 4-1BBL ou TRAIL, mais n'ont pas pu être liées à une amplification de la sécrétion de cytokines par les NKs<sup>130</sup>.

Si les pDCs sont capables de moduler l'activation des NK et leur production de cytokines, les NK sont aussi capables de moduler l'activité des pDCs. Ainsi les NK activés sont capables d'induire une plus forte production d'IFN $\alpha$  par les pDCs activées par du CpG *in vitro*<sup>136</sup>. De plus, les NK activés sont capables d'amplifier la production d'IL-6 par la pDC activée ou non par des CpG. Cette modulation semble être associée à l'activation des NKs par la présence d'IL-12 et d'IL-2<sup>132, 136</sup> et être liée en partie à un contact direct entre la pDC et la cellule NK activée comme le montrent différentes études *in vitro* qui ont été effectuées en transwell<sup>136</sup>.

Les cellules NK, acteurs majeurs de l'immunité innée et les pDCs, cellules spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes et l'activation immunitaire sont liées l'une à l'autre. Les pDCs activées par des ligands de TLR9 sont capables d'activer les fonctions cytotoxiques via l'IFN de type I et la production de cytokines via la relation Ox40L/Ox40 des NKs qui en réponse sont capables d'activer la production d'IFN de type I des pDCs (Figure 8). L'importance de ce cross-talk a été démontrée en situation VIH, où l'inhibition du cross-talk pDC/NK par le virus empêche l'activation efficace des cellules NKs<sup>137</sup>. Chez les patients infectés par le VIH, la production de certaines cytokines est fortement diminuée (IFN type I, TNF $\alpha$ ) alors que les cellules NK ne sont plus capables de répondre à une stimulation par les pDCs<sup>138</sup>. Le virus est ainsi capable de limiter l'activation des cellules NK et son élimination en perturbant le cross-talk pDC/NK.



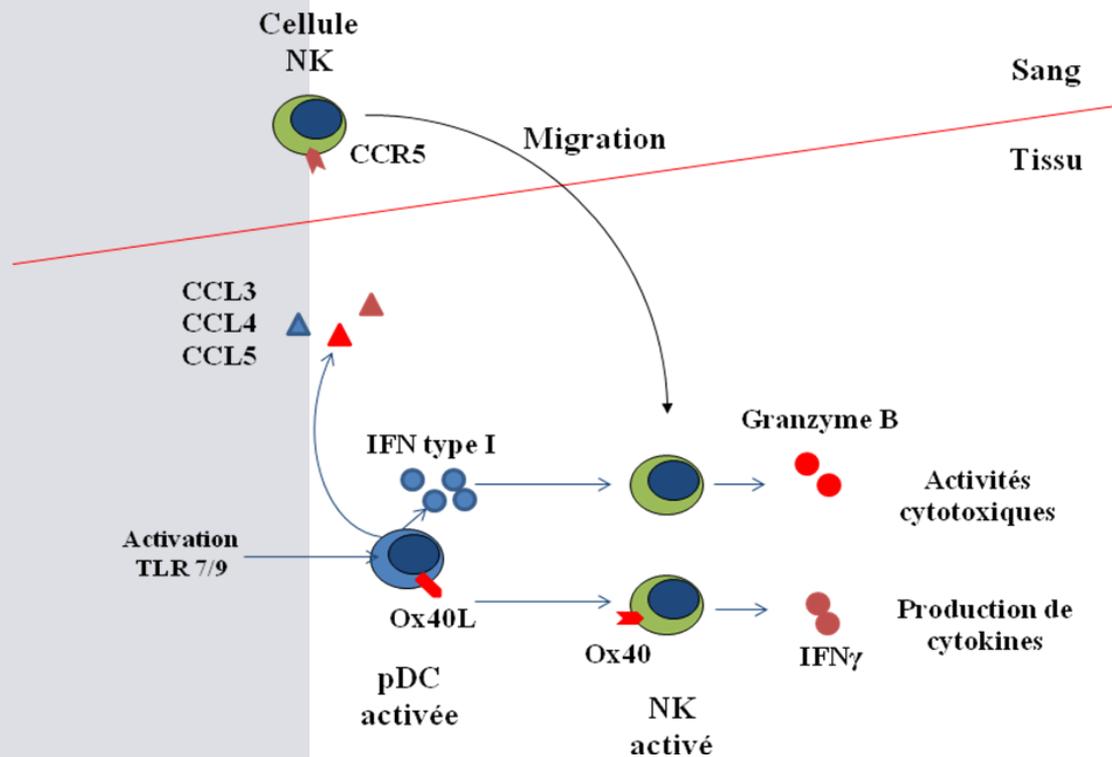


Figure 8. Exemple de crosstalk PDC/NK

Les pDCs une fois activées par les ligands des TLR7 et TLR9, produisent certaines chemokines qui entraînent la migration des cellules NK via CCR5 dans les tissus. Les cellules NK une fois dans les tissus sont activées par la pDC de deux façons. L'IFN de type I produit par la pDC activée, permet d'augmenter l'activité cytotoxique des cellules NK (production de granzyme B). La surexpression d'Ox40L par la pDC activée, entraîne via le récepteur Ox40 des cellules NK la production de cytokines et principalement d'IFN $\gamma$  par la cellule NK. Ces deux mécanismes d'activation distincts, peuvent expliquer en partie la dichotomie qui peut être retrouvée entre l'activité cytotoxique et la production de cytokines par les cellules NK activées.

### b.3\ pDC et mDC

Les pDCs sont capables d'influer autant sur l'activation que sur le type d'immunité mise en place par les mDCs. En effet, des mDCs mis en présence d'IFN de type I sont capables de se différencier plus rapidement<sup>139</sup>. Les pDCs, stimulées par une infection par le VIH, sont capables in vitro de faire maturer les mDCs en produisant de l'IFN de type I et du TNF $\alpha$ <sup>140</sup>. De même, des pDCs issues de patients atteints d'hépatite B chronique sont capable de stimuler in vitro en produisant de l'IFN de type I, des MoDC chargées avec l'antigène HBc et induire ainsi la prolifération de lymphocytes T spécifiques du virus<sup>141</sup>. Enfin, il a pu être démontré in vivo que lors de l'infection à HSV chez la souris, les pDCs, par leur production d'IFN de type I et l'expression de CD40L étaient capables de favoriser une maturation des

mDCs capable d'activer la réponse lymphocytaire T <sup>142</sup>. Les mDCs activées par l'interféron de type I issue des pDCs, produisent alors de l'IL-12, IL-15, IL-18 et IL-23 <sup>143</sup>, et sont capables de mieux cross-présenter leurs antigènes aux lymphocytes T CD8<sup>144</sup>. Les pDCs sont donc capables de stimuler et d'orienter la réponse des mDCs à l'infection.

### c) Réponse adaptative et pDCs

A l'état basal, les pDCs ne sont pas ou peu capables d'influer sur l'activation de la réponse adaptative. Elles produisent de faibles quantités de cytokines (IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ ) et ont un faible niveau d'expression des molécules de co-stimulation (CD86, pas d'expression de CD40, CD80 et CD83). Ainsi par exemple les pDCs à l'état basal ne sont pas capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T naifs et leur différenciation<sup>145</sup>, voire induisent parfois l'anergie des lymphocytes T CD4 <sup>146</sup>. En revanche, une fois activées, les pDCs sont capables de faire le lien entre immunité innée et adaptative <sup>97</sup>. L'IFN $\alpha$ , produit par les pDCs, peut ainsi stimuler les lymphocytes T CD4 naifs, induisant une réponse de type TH1<sup>126, 147</sup>, stimuler les mDCs<sup>140</sup> et activer les lymphocytes B en plasmocytes en association avec l'IL6, induisant ainsi la production d'immunoglobulines<sup>128</sup>.

#### c.1\ Présentation antigénique par la pDC

Afin d'induire une réponse lymphocytaire T spécifique, les cellules dendritiques sont capables de capturer, apprêter et présenter des antigènes aux lymphocytes T. Les pDCs à la différence des autres cellules dendritiques ont une faible capacité de capture et d'apprêtement des antigènes qui peut s'expliquer par l'absence de récepteurs scavengers nécessaires (DC-SIGN, récepteur au mannose)<sup>148</sup>. Néanmoins, la pDC possède certains récepteurs qui lui permettent d'internaliser des antigènes, comme CD32a ou BDCA2. L'activité de ces récepteurs sur la pDC semble dépendre du type d'activation subie par la pDC. Ainsi, en présence de certains ligands de TLR9 capables d'induire une maturation de type dendritique de la pDC (CpG-B ou CpG-C), l'activité d'endocytose des protéines médiée par CD32a est réduite, ce qui n'est pas le cas en présence de ligands de TLR9 induisant la libération d'IFN de type I par la pDC (CpG-A)<sup>149</sup>. Ce mécanisme de blocage de la capture de l'antigène pourrait être un moyen pour la pDC de limiter la présentation d'auto-antigène après activation. Bien qu'étant moins efficaces que les mDCs, les pDCs sont capables de présenter les peptides antigéniques sur leurs molécules CMH de classe II<sup>150</sup>. Néanmoins à la différence des mDCs elles ne sont pas

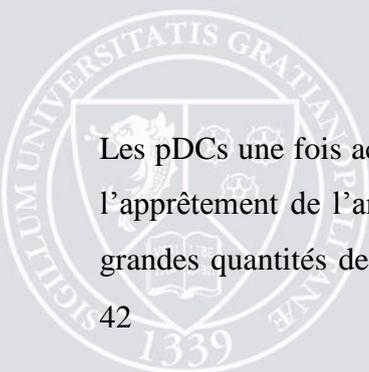
capables de présenter en grandes quantités et sur le long terme des peptides exogènes de par leur fort renouvellement en molécules CMH de classe II après activation<sup>151</sup>. En revanche, elles sont capables de présenter de manière très efficace des peptides endogènes si elles sont infectées par un virus.

L'un des éléments les plus importants pour une présentation efficace des antigènes est la capacité de cross-présentation, c'est-à-dire de présenter des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I (à la différence de la présentation classique par le CMH de classe II). Toutes les cellules dendritiques ne sont pas capables de cross-présenter de manière équivalente<sup>152</sup>. Ainsi la capacité de cross-présentation des pDCs a toujours été controversée. Plusieurs études chez la souris n'ont pas retrouvé de capacité notable de cross-présentation chez la pDC<sup>153, 154</sup>. Néanmoins d'autres études ont pu montrer que dans certaines conditions les pDCs étaient capables de cross-présenter des antigènes, du moins in vitro. Ainsi les pDCs ont pu cross-présenter, par l'intermédiaire de BDCA2, lors d'une étude, des peptides du VIH couplés à un lipopeptide ainsi que des peptides dérivés de cellules infectées en apoptose tout aussi efficacement que des mDCs<sup>155</sup>. Lors de cette étude, les pDCs infectées par flu étaient plus efficace, ce qui pourrait laisser penser que l'IFN de type I serait nécessaire à la cross-présentation. Une autre étude a pu démontrer que des pDCs immatures sont capables de capturer des antigènes à partir de cellules infectées par le virus influenza et de les cross-présenter à des lymphocytes T CD8 spécifiques<sup>148</sup>. Néanmoins, in vivo, aucune étude n'a pour le moment pu démontrer une capacité de cross présentation des pDCs à l'état basal. En revanche, il a été démontré dans un modèle murin au niveau de la rate que les pDCs activées par des ligands des TLRs 7 et 9 étaient capables de cross-présenter des antigènes et d'amplifier les réponses lymphocytaires T CD8<sup>156</sup>. Enfin, il a été démontré dans un modèle murin que les pDCs étaient capables de moduler l'immunité anti-tumorale en activant les cellules NK et les mDCs, ce qui a permis une amplification de la cross-présentation d'antigènes par les mDCs<sup>130</sup>.

Ainsi, les capacités de cross-présentation de la pDCs ne sont pas encore clairement connues ainsi que son mécanisme.

## **c.2) Activation et polarisation des lymphocytes T CD4 par les pDCs**

Les pDCs une fois activées sur-expriment les molécules CMH de classe II, augmentant ainsi l'apprêtement de l'antigène, sur-expriment les molécules de co-stimulation et produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\alpha$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), ce qui leur permet



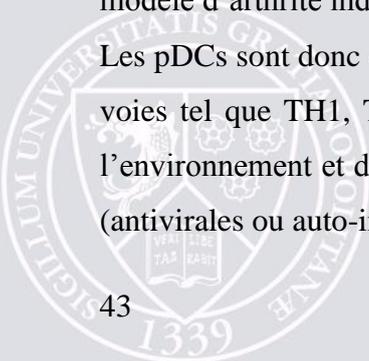
d'influer sur l'activation, la prolifération et la polarisation des réponses lymphocytaires T CD4<sup>100, 145, 157</sup>. Ainsi il a été démontré *in vitro* dans un modèle VIH que les pDCs étaient capables d'activer les lymphocytes T CD4 naïfs<sup>140</sup>. Le profil de différenciation des lymphocytes T CD4 dépend donc en partie de la stimulation par les pDCs. Cette stimulation semble être plus efficace au niveau des ganglions lymphatiques<sup>154</sup>.

Les mDCs sont connues pour être capables d'induire des réponses lymphocytaires de type TH1 par l'intermédiaire de la production d'IL-12. Les pDCs sont elles aussi capables d'induire une polarisation TH1 directement ou indirectement en activant les mDCs comme cela a pu être démontré. Après stimulation par Flu, les pDCs ont été capables d'induire des lymphocytes T de type TH1 produisant de l'IFN $\gamma$ <sup>158</sup>. Cette polarisation semble être liée à la production d'IFN de type I par la pDC et semble synergique avec l'action de l'IL-12<sup>121</sup>.

Outre l'induction de réponses de type TH1 par les lymphocytes T CD4, les pDCs activées par divers CpG sont capables d'induire des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, produisant de l'IL-6, de l'IL-10, du TGF $\beta$  et de l'IFN $\gamma$ <sup>159</sup>. Il a été démontré que cette induction de lymphocytes T régulateurs ne passait pas comme pour les mDCs par la production d'IL-10 ou de TGF $\beta$ <sup>159</sup>. Le mécanisme d'induction de la tolérance par les pDCs est médié par l'expression de l'enzymeIDO capable de catalyser la dégradation du tryptophane<sup>160</sup>. Ainsi dans un modèle d'activation des pDCs par le VIH, l'expression d'IDO est induite au sein des pDCs, entraînant une réduction de l'immunité<sup>161</sup>. L'expression d'IDO au sein de la pDC peut être modulée *in vivo* chez la souris par certaines cytokines comme l'IFN $\gamma$  ou l'IFN de type I et certaines molécules de co-stimulation comme CTLA4, CD200 ou CD28<sup>162</sup>.

En fonction de leur environnement, les pDCs sont capables de polariser une réponse de type TH17 par les lymphocytes T CD4. Cette réponse se manifeste par la production par les lymphocytes TH-17 d'IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-26. Une étude a pu démontrer que les pDCs en présence d'un ligand de TLR7 sont capables d'induire des lymphocytes T auxiliaires produisant de l'IL-10, de l'IL-17A et de l'IFN $\gamma$ <sup>163</sup>. Une autre étude a montré qu'en présence de TGF $\beta$ , les pDCs sont capables d'induire des lymphocytes TH17 *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'arthrite induite par les lymphocytes TH17<sup>164</sup>.

Les pDCs sont donc capables de polariser les réponses lymphocytaires T CD4 vers différentes voies tel que TH1, TH2, Treg ou TH17<sup>147</sup> (Figure 9). Cette polarisation est dépendante de l'environnement et du type d'activation de la pDC et peut produire des réponses T effectrices (antivirales ou auto-immunes) ou des réponses tolérogènes.



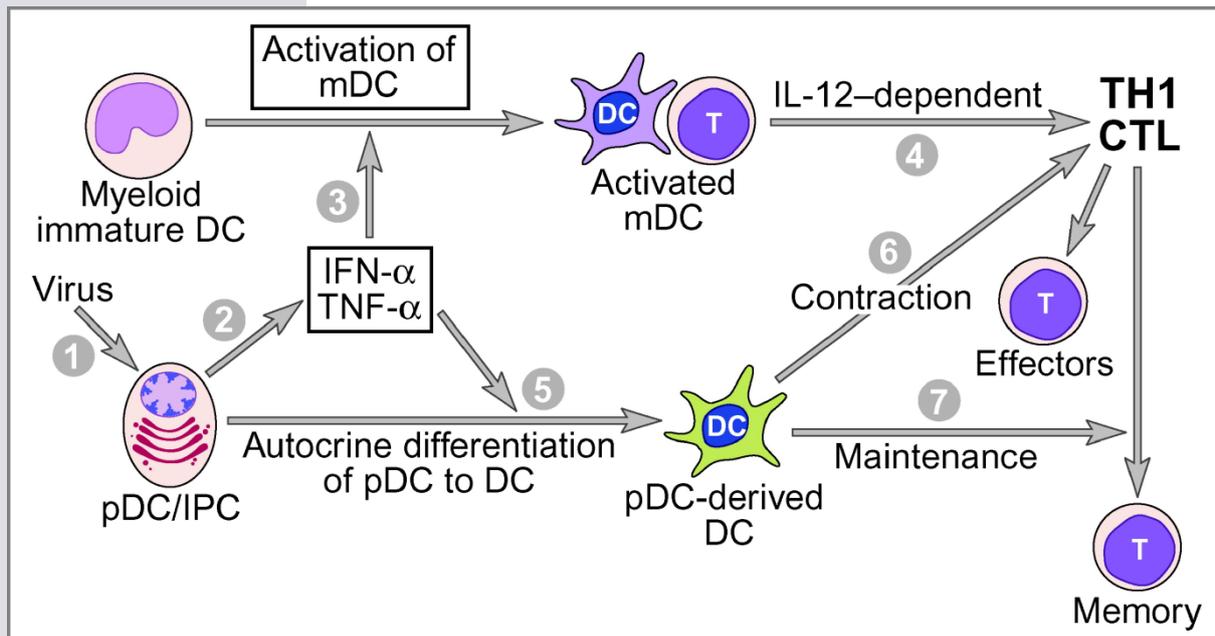


Figure 9. Les pDCs régulent les fonctions des mDCs et la polarisation des lymphocytes T CD4 (Liu, *Ann rev immunol*, 2005)

Après activation par un virus (1), les pDCs produisent de l'IFN de type I et du TNF $\alpha$  (2) qui peuvent activer les monocytes ou les mDCs (3) qui vont alors sur-exprimer leurs molécules de co-stimulations, produire des cytokines (IL12) et induire une réponse lymphocytaire T de type TH1 et une forte réponse lymphocytaire T cytotoxique (4). Les pDCs peuvent aussi se différencier en DCs mature (5) et sont capables de primer des lymphocytes T naïfs qui pourraient alors produire de l'IL10, contribuant ainsi à la contraction de la réponse T (6). Les pDCs peuvent aussi aider à la génération et à la maintenance de la réponse lymphocytaire T mémoire grâce à sa production d'IFN de type I et à d'autres mécanismes encore peu décrits (7).

### c.3\ pDC et réponse lymphocytaire T CD8 cytotoxique

Comme nous l'avons vu, l'activation des pDCs, leur capacité de production d'IFN de type I et de présentation des antigènes peuvent entraîner la stimulation des réponses lymphocytaires T CD4 et T CD8, ces réponses devant permettre l'élimination de l'élément pathogène.

Ainsi plusieurs études ont montré la capacité des IFN de type I à induire la prolifération, la survie et l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques en situation virale<sup>165</sup>. Dans un modèle de souris infectées par LCMV, l'absence de récepteurs à l'IFN $\alpha$  entraîne une réduction de plus de 99% de la capacité des lymphocytes T CD8 à survivre et à produire des lymphocytes T mémoires. De plus, une autre étude a montré dans un modèle de souris infectées par LCMV que l'interféron de type I produit au cours des infections virales était

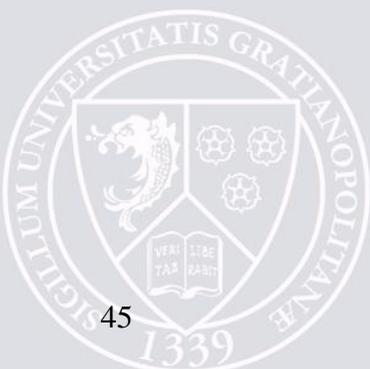
nécessaire pour amplifier le phénomène de cross-présentation permettant d'activer les lymphocytes T CD8 spécifiques<sup>144</sup>.

Les pDCs une fois activées sont capables de présenter des antigènes et d'amplifier les réponses lymphocytaires T CD8 spécifiques<sup>156</sup>. Fonteneau et al ont ainsi démontré que des pDCs mis en présence de flu étaient capables d'activer in vitro les lymphocytes T CD8 spécifiques du virus et d'amplifier leur réponse<sup>166</sup>. Cette propriété d'amplification des réponses T CD8 spécifiques des pDCs activées a été utilisée pour développer de nouvelles stratégies d'immunothérapies comme nous le verrons plus tard.

Les pDCs sont capables de stimuler l'activation des mDCs. Cette stimulation des mDCs permet ainsi d'amplifier la réponse lymphocytaire T CD8 spécifique au cours des infections. Il a par exemple été démontré, dans un modèle de souris C57BL/6 développant une tumeur exprimant l'ovalbumine, que l'injection en préventif de pDCs stimulées contre un peptide de l'ovalbumine permettait d'amplifier la réponse lymphocytaire T CD8 spécifique, cette stimulation de la réponse étant bien plus forte si des mDCs stimulées contre le peptide sont injectées en même temps. Dans ce modèle, la synergie entre pDCs et mDCs serait liée à un contact direct entre ces cellules, les pDCs étant capables de stimuler la capacité de présentation de l'antigène des mDCs aux lymphocytes T CD8<sup>167</sup>.

#### **c.4\ pDC et réponse lymphocytaire B**

En plus de leur capacité à induire une réponse lymphocytaire T, il a été montré que les pDCs étaient aussi nécessaires pour l'induction de la réponse B et la production d'anticorps. En effet, il a été démontré, in vitro que des PBMCs déplétées de leurs pDCs n'étaient plus capable d'induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la production d'anticorps après une stimulation spécifique par le virus influenza<sup>128</sup>. La production d'IFN de type I par la pDC permet aux lymphocytes B de se différencier en plasmoblastes puis l'IL-6 produite par la pDC permet la différenciation des plasmoblastes non sécrétant en plasmocytes capables de sécréter des immunoglobulines (Figure 10).



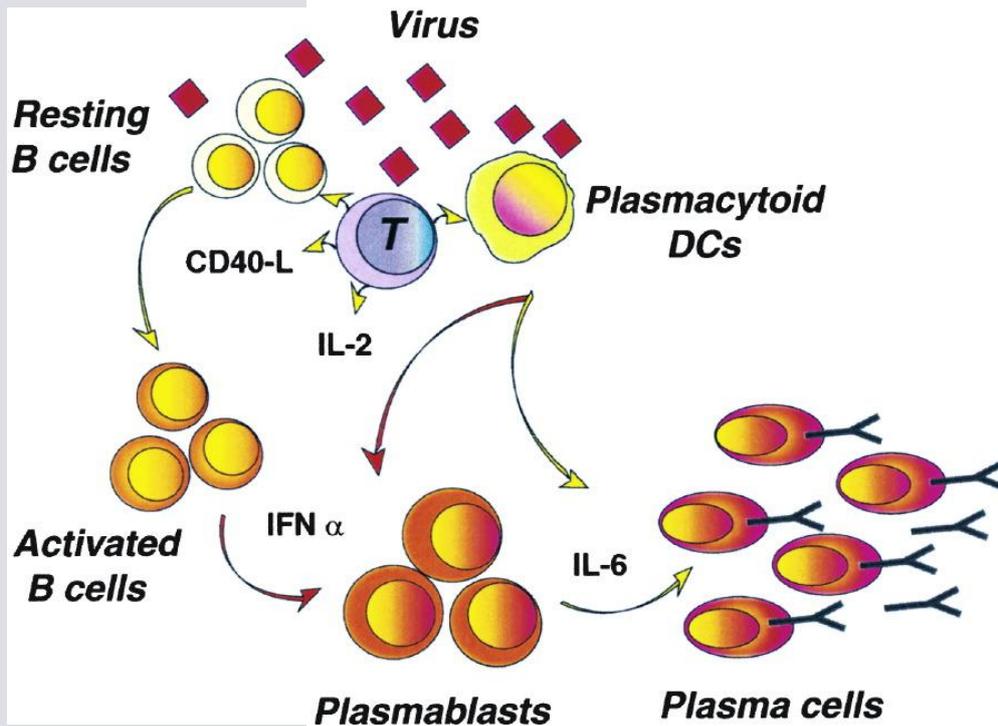


Figure 10. Rôle des pDCs dans l'activation des lymphocytes B en plasmocytes (Jego, Immunity, 2003)

En présence de virus, les pDCs sont activées. Elles secrètent de l'IFN de type I et peuvent se différencier en cellules dendritiques capables de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T CD4, qui secrètent alors de l'IL-2 et expriment CD40-L, ce qui augmente la production d'IL-6 par les pDCs et active les lymphocytes B. Les lymphocytes B activés en présence d'IFN de type I se transforment en plasmoblastes puis en plasmocytes en présence de l'IL-6 sécrétée par la pDC. Les lymphocytes T CD4 activés contribuent eux aussi à cette activation de par leur sécrétion l'IL-2 et d'IL-10 qui, combinées, permettent de générer des plasmocytes CD38<sup>+</sup> à longue durée de vie.

### c.5\ Rôle des pDCs dans l'immunité adaptative antivirale

Comme nous l'avons vu précédemment, un certain nombre d'études *in vitro* ont démontré que les pDCs peuvent jouer un rôle important dans l'activation de l'immunité adaptative (Figure 11). En situation virale, Fonteneau et al ont démontré que les pDCs humaines en présence du virus influenza étaient capables de s'activer (produisant de l'IFN de type I et exprimant diverses chemokines) et d'exprimer CCR7, un récepteur pour des chemokines (CCL19, CCL21) produites au niveau de la zone T des ganglions. Les pDCs une fois activées sont capables de présenter les antigènes viraux et d'induire des réponses lymphocytaires T CD4 et CD8 spécifiques *in vitro*<sup>166</sup>.

Afin de décrire le rôle des pDCs dans l'immunité adaptative et plus particulièrement les réponses lymphocytaires T CD8 cytotoxiques, Yoneyama et al ont utilisé un modèle de souris

infectée avec le virus HSV au niveau cutané. Ils ont pu observer un rôle important des pDCs dans l'induction de l'immunité lymphocytaire T cytotoxique. En effet, dans ce modèle si les pDCs seules ne sont pas capables d'induire une immunité lymphocytaire T cytotoxique, l'absence de pDCs après déplétion spécifique entraîne une diminution significative de la réponse immunitaire spécifique<sup>142</sup>. Au cours de l'infection à HSV chez la souris, les pDCs semblent être nécessaires pour l'induction par les cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques de la réponse lymphocytaire T cytotoxique contre le virus. Cette activation des cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques est dépendante du CD2 et du CD40L ainsi que de l'IFN de type I produit par la pDC au cours de l'infection. C'est pourquoi l'aide fournie par les pDCs aux cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques au cours de l'infection par le virus HSV semble être essentielle à une bonne induction de la réponse lymphocytaire T cytotoxique contre le virus.



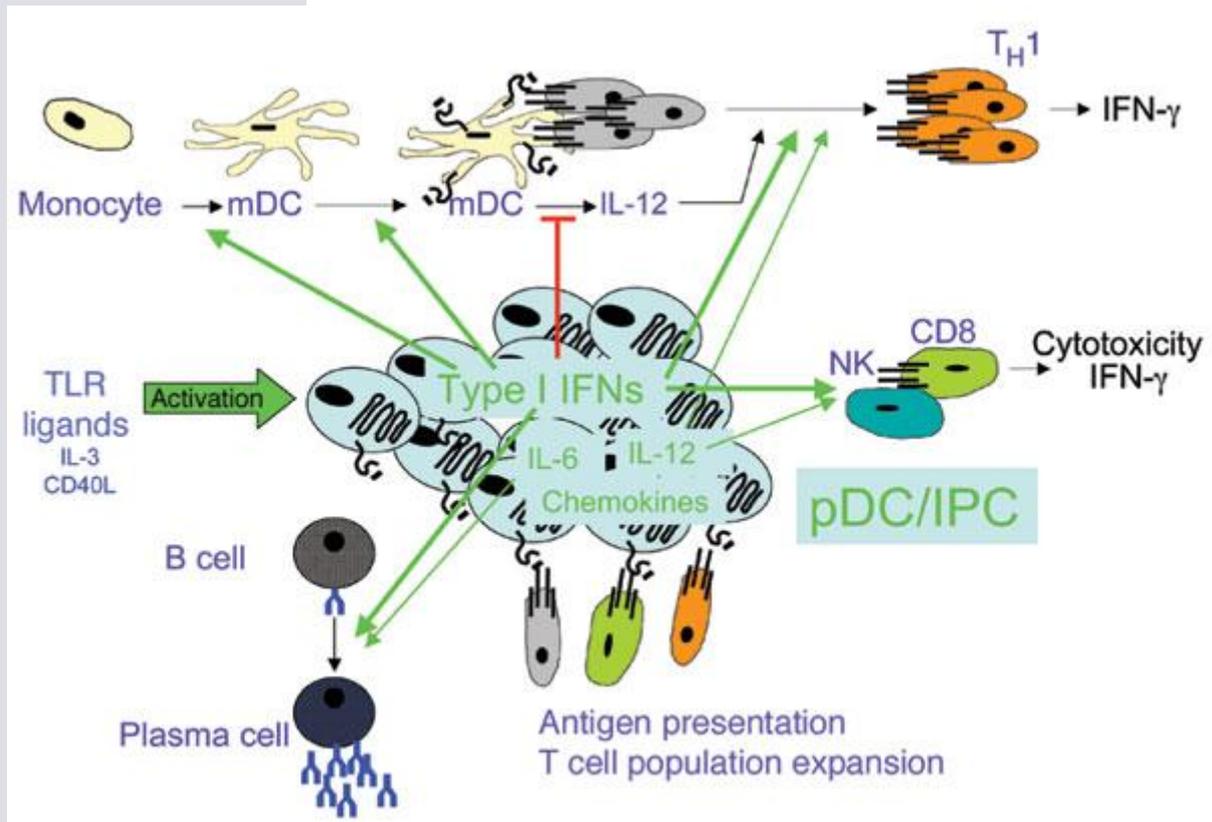


Figure 11. Rôle des pDCs au cours des infections (Colonna, *Nature Immunol*, 2004)

Après activation par des ligands de TLR (virus...) les pDCs produisent de grandes quantités d'IFN de type I ainsi que d'autres cytokines (IL-6, IL-12). Elles sont capables d'activer les mDCs, de présenter les antigènes aux lymphocytes T et d'orienter la réponse lymphocytaire T vers les voies TH1. Elles sont capables d'amplifier les réponses lymphocytaires T cytotoxiques et NK (cytotoxicité et production de cytokines). Les pDCs induisent aussi l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes.

Les pDCs en contexte d'infection virale sont donc capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I ainsi que de présenter les antigènes viraux et d'activer la réponse T CD8 spécifique afin de permettre l'élimination du virus <sup>150</sup>. Il a de plus été récemment démontré que les pDCs étaient capables de cross-présenter les antigènes viraux et d'activer les lymphocytes T spécifiques *in vitro* <sup>148, 150, 155</sup>. Elles sont aussi capables de moduler les réponses mDC ainsi que d'activer les réponses B. Il a de plus été démontré *in vivo* dans le cadre de l'infection à HSV que les pDCs jouaient un rôle majeur <sup>142</sup>. Tout ceci montre le rôle majeur que joue les pDCs dans l'activation du système immunitaire au cours des infections virales.

## E pDCs et infections virales

Les pDCs sont des cellules majeures de l'immunité antivirale de part leur capacité à reconnaître les motifs génomiques viraux, leur rôle important dans la production d'interféron de type I et leur capacité à faire le lien entre immunité innée et adaptative. Ainsi l'un des moyens mis en œuvre par les virus pour échapper à la réponse immunitaire pourrait être d'agir sur les fonctions de la pDC. Nous allons voir le rôle de la pDC et les interactions avec les virus dans différentes pathologies.

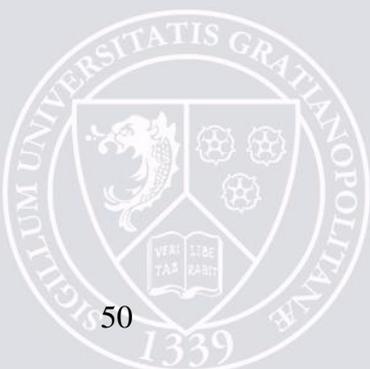
### a) pDC et VHB

Comme nous l'avons vu précédemment, le passage en phase chronique de l'infection par le VHB est fortement associé à un échappement du virus au système immunitaire. De par leur rôle dans l'immunité antivirale, les pDCs pourraient être d'une importance majeure dans l'infection par le VHB. Néanmoins, jusqu'à présent, le rôle des pDCs lors de l'infection chronique par le VHB a été peu étudié. Ainsi, bien que certaines publications<sup>168</sup> ont pu trouver une diminution du nombre de pDC circulantes au cours de l'infection par le VHB, d'autres ne trouvent aucune différences avec des donneurs sains<sup>169</sup>. De plus, une étude portant sur des enfants atteints d'hépatite B a montré une diminution du nombre de pDCs dans le sang périphérique, associée à une accumulation des pDCs au niveau hépatique<sup>170</sup>. Néanmoins, l'analyse des pDCs lors de la phase chronique de l'infection par le VHB a pu montrer que bien que le virus ne semble pas capable d'infecter la pDC, il soit possible d'observer une modulation des fonctions de la pDC. Il a pu être observé chez les patients en phase chronique une diminution de l'expression des molécules de costimulation et de la production d'IFN de type I, de TNF $\alpha$  et d'IP10 en réponse à la stimulation par des ligands de TLR9 (CpGA)<sup>171</sup>. Une étude a montré que le VHB module la pDC par l'intermédiaire des antigènes HBs et HBe (mais pas HBc) à la fois par des études in vitro et une observation des patients HBe positifs<sup>171</sup>. Une publication de Xu et al a de plus démontré que HBs modulerait la pDC par plusieurs mécanismes. Ainsi, la présence de l'antigène HBs induirait l'expression de SOCS-1 un inhibiteur de la sécrétion d'IFN de type I. De plus, l'antigène HBs serait capable de bloquer la voie IRF-7 nécessaire pour l'activation de la sécrétion d'IFN de type I en se liant au récepteur BDCA2 connu pour avoir un effet inhibiteur sur la production d'IFN de type I<sup>172</sup>. Le VHB serait de plus capable de moduler l'expression de TLR9 au niveau de la pDC et des lymphocytes B. En présence du virus, il a été observé in vitro une diminution de la

transcription du gène du TLR9 entraînant une diminution de l'ARNm et de l'expression au niveau protéique<sup>173</sup>. Il a aussi été évoqué un possible rôle des monocytes dans ce mécanisme, qui une fois soumis au virus entraîneraient une diminution de la réponse de la pDC à la stimulation par les ligands de TLR9<sup>171</sup>. Comme vu précédemment, le taux de lymphocytes T régulateurs est plus important chez les patients atteints d'hépatite B chronique. Une étude a montré *in vitro* que les pDCs issues de patients atteints d'hépatite B chronique induisaient une réponse lymphocytaire T régulatrice plus forte que les pDCs issues de donneurs sains ou ayant résolu l'infection, ce qui peut laisser supposer que le VHB est capable d'induire l'activation des lymphocytes T régulateurs par l'intermédiaire des pDCs<sup>174</sup>. Il a enfin été évoqué la possibilité que cette inhibition de la pDC par le VHB puisse jouer sur le cross-talk pDC/NK, entraînant une diminution de l'activité NK contre le virus. Ainsi une étude utilisant des pDCs et des NK issues de donneurs sains en présence de surnageant de la lignée HepG2 2.15 (lignée d'hépatocytes humains transfectée avec le VHB produisant des virions fonctionnels) a montré une diminution de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK après stimulation de la pDC par des ligands de TLR9 (CpG)<sup>175</sup>, renforçant l'hypothèse d'une inhibition du crosstalk pDC/NK par le virus.

Comme vu précédemment, les pDCs ont aussi un rôle positif dans l'immunité antivirale, par exemple en stimulant les mDCs chargées avec des antigènes du VHB afin d'amplifier la réponse lymphocytaire T spécifique et l'élimination du virus<sup>141</sup>.

Bien qu'encore peu étudiée, la relation entre la pDC et le VHB semble être un élément important pour expliquer l'échappement du virus au système immunitaire et le passage en phase chronique chez les patients atteints d'hépatite B (figure 12).



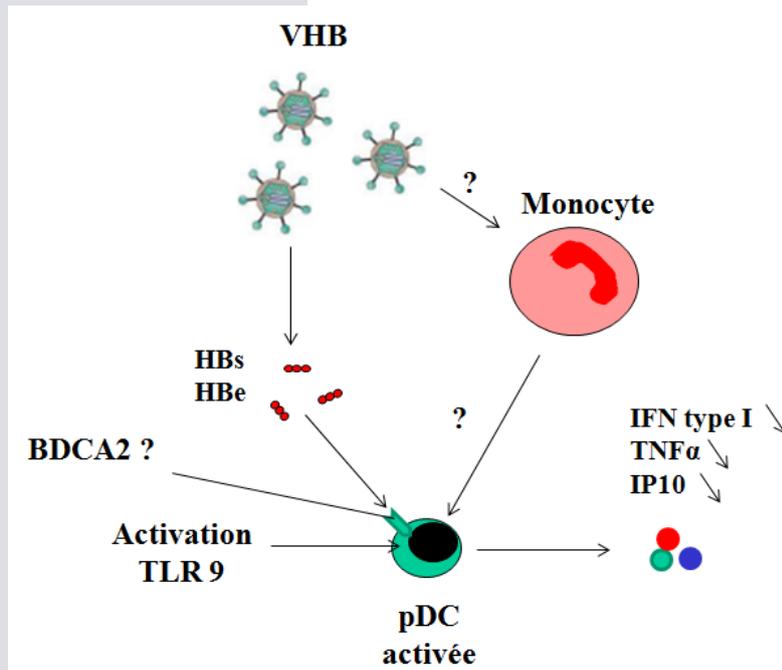


Figure 12. Relation entre pDC et VHB au cours de l'hépatite B chronique

Le VHB semble être capable de moduler l'activation de la pDC par les ligands de TLR9 et de limiter la production de divers cytokines (IFN de type I,  $TNF\alpha$ , IP10). Cette modulation pourrait être médiée par les antigènes HBs et HBe retrouvés au niveau de la pDC et par le récepteur BDCA2 de la pDC. Un autre mécanisme pourrait mettre en jeu une action du virus sur les monocytes qui entrainerait une modulation de la pDC. Tous ces mécanismes d'action sont encore au stade de la recherche et nécessitent d'être confirmés.

### b\ pDC et VIH

Le VIH infecte les cellules immunitaires et entraîne leur destruction progressive. Cette atteinte du système immunitaire à terme entraîne l'apparition d'infections opportunistes, ce qui correspond au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Au cours de l'infection par le VIH, il a été observé une diminution du nombre de pDCs circulantes en corrélation avec la charge virale chez les patients<sup>176, 177</sup>. Cette diminution n'est pas complètement restaurée même chez les patients correctement contrôlés par leur traitement (HAART). L'une des causes de cette altération du nombre de pDCs pourrait être l'infection directe des pDCs par le VIH. En effet, les pDCs expriment les récepteurs du VIH à leur surface : CD4, CXCR4, CCR5<sup>107</sup>. De plus, le VIH peut induire des modifications dans les capacités migratoires des pDCs. En effet, en présence de VIH les pDCs sur-expriment le récepteur CCR7 qui en réponse à CCL19 fait migrer les pDCs au niveau des organes lymphoïdes secondaires où les pDCs entrent en apoptose<sup>178</sup>. Ainsi, au cours de l'infection par

le SIV chez le singe, les pDCs sont réduites en périphérie et retrouvées en apoptose dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>179</sup>.

Les pDCs in vitro sont capables en présence du VIH de produire de grandes quantités d'IFN de type I et de TNF $\alpha$  ainsi que de cross-présenter des antigènes dérivés du virus<sup>180</sup>. L'interféron de type I produit par la pDC a de plus démontré son efficacité pour réduire la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4. Bien que la pDC semble être nécessaire au contrôle de l'infection par le VIH, d'autres études ont montré que l'activation chronique de la pDC pouvait renforcer la pathogenèse du VIH. Ainsi, l'activation des pDCs par le VIH peut entraîner une transmission du virus aux lymphocytes T CD4 participant à la dissémination du VIH dans l'organisme<sup>181</sup>. Un certain nombre d'études ont montré que l'activation prolongée de la pDC et la production d'interféron de type I pouvaient être associées à une surexpression des marqueurs de co-activation des lymphocytes T CD8, la suppression d'une réponse lymphocytaire T fonctionnelle et l'amplification de la réponse T régulatrice. Ainsi les pDCs activées par le VIH produisent de l'IDO et induisent la formation de lymphocytes T régulateurs à partir de lymphocytes T CD4 naïfs capables de bloquer la prolifération des lymphocytes T et la maturation des cellules dendritiques<sup>161, 182</sup>.

Les pDCs au tout début de l'infection sont essentielles pour contenir la réplication virale grâce entre autres à leur production d'interféron de type I. Néanmoins, en situation d'infection chronique par le VIH, l'interféron de type I et l'expression d'IDO par les pDCs pourrait potentialiser la progression de l'infection par un effet délétère sur la réponse lymphocytaire T. Il y a donc au cours de l'infection par le VIH un effet ambigu des pDCs, à la fois pour la mise en place de la réponse immunitaire et la potentialisation de la pathologie.

## c) pDC et VHC

Au cours de l'infection par le VHC, il a été démontré que les pDCs étaient capables de reconnaître le virus par activation du TLR7 par l'ARN du virus<sup>183, 184</sup>. Une fois activée, la pDC produit de l'IFN de type I au niveau du foie infecté mais d'après certaines publications de manière moindre que dans d'autres situations infectieuses<sup>185</sup>. De plus, le profil des pDCs intra-hépatique chez les patients atteints d'hépatite C chronique a été décrit comme immature<sup>186</sup>. Certaines protéines du VHC semblent être impliquées dans cette altération de l'activité des pDCs. Ainsi, la protéine NS5 est capable d'inhiber la production de cytokines par la pDC activée ainsi que ses capacités de co-stimulation<sup>187</sup>, alors que la protéine core du

virus a montré une capacité à inhiber la signalisation TLR7 et la production d'IFN de type I par la pDC<sup>188</sup>. De plus il a été démontré que le virus était capable d'interférer avec TLR7, en inhibant son expression et sa fonction in vitro au niveau de la pDC<sup>189</sup>. La pDC de par son rôle central dans l'activation de l'immunité antivirale est ainsi l'un des éléments ciblé par les mécanismes d'échappement du VHC à l'immunité.

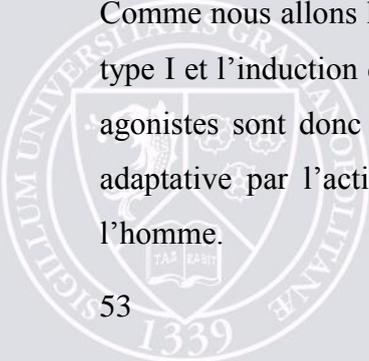
Tout ceci démontre le rôle essentiel des pDCs dans l'immunité antivirale. Les pDCs peuvent donc à la fois activer l'immunité innée et l'immunité adaptative en réponse à une infection virale, induisant l'élimination du virus par leur production d'IFN de type I et l'activation de la réponse T CD8 cytotoxique par leurs propriétés d'APC (Figure 11). Elles sont aussi la cible des mécanismes d'échappement des virus au système immunitaire, ce qui rend leur étude au cours des infections virales très intéressante. Leur rôle est cependant encore mal défini dans de nombreuses pathologies virales humaines, entre autres en situation d'hépatite B chronique. Néanmoins, l'ensemble de ces caractéristiques peut rendre l'utilisation ou la manipulation des pDCs intéressante en vue d'une immunothérapie en contexte d'infection virale chronique.

## F. pDCs et thérapie

De par leur capacité de reconnaissance rapide des virus et d'activation à la fois du système immunitaire inné et adaptatif, l'utilisation des pDCs en thérapeutique semble très intéressante. Plusieurs stratégies ont ainsi été mises au point pour activer les pDCs et utiliser leurs différentes propriétés.

### a) Utilisation des ligands des TLR7 et 9

L'utilisation de molécules synthétiques, agonistes des TLR7 et 9, afin d'activer la pDC au cours ou en prévention des infections a démontré son efficacité dans de nombreuses études. Comme nous allons le voir, lors de ces études, il a été retrouvé une forte production d'IFN de type I et l'induction d'une forte réponse anticorps dans le cadre de protocoles vaccinaux. Ces agonistes sont donc capables d'induire une stimulation de la réponse immunitaire innée et adaptative par l'activation des pDCs et des lymphocytes B qui expriment le TLR9 chez l'homme.



Le TLR7 reconnaît des séquences spécifiques d'ARN simple brin. Les analogues synthétiques des ligands de TLR7 ont donc une structure proche des oligonucléotides de l'ARN comme les imidazoquinolines. L'un de ces agonistes, l'imiquimod, a démontré son efficacité pour activer TLR7 et est utilisé en thérapeutique<sup>190</sup>. Les ligands de TLR7 ont été développés initialement pour traiter les maladies infectieuses, ainsi l'imiquimod ou le resiquimod ont démontré leur efficacité pour traiter les atteintes cutanées causées par les papillomavirus en amplifiant la réponse immunitaire<sup>191</sup>. Le TLR9 reconnaît des séquences ADN contenant le motif, non méthylé, cytosine-phosphate-guanosine (CpG) retrouvé dans les bactéries et les virus à ADN. Les analogues des ligands de TLR9 sont formés de courtes séquences d'oligodeoxynucléotides (CpG ODNs) stabilisés par un squelette phosphorothioate. En fonction de leur taille et de leur séquence, ils sont classés en 3 groupes : CpG-A, CpG-B et CpG-C qui activent la pDC de différentes manières, aboutissant à une production de différentes cytokines. Ainsi les CpG-A induisent la production d'interféron de type I alors que les CpG-B entraînent la maturation de la cellule (surexpression de molécules de co-stimulation) mais pas la production d'interféron de type I. Enfin, les CpG-C peuvent activer les deux voies.

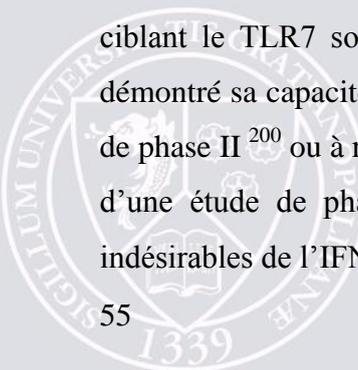
## **a.1\ Utilisation comme adjuvants vaccinaux**

L'utilisation des ligands de TLR comme adjuvants a été très étudiée, particulièrement pour les vaccins qui emploient des antigènes uniques et qui ont une faible immunogénicité à la différence des vaccins utilisant des virus vivants atténués qui sont capables d'activer l'immunité innée nécessaire pour stimuler l'immunité adaptative et les lymphocytes mémoires. Enfin, la capacité des ligands de TLR à activer les réponses TH1 et T CD8 cytotoxiques en activant les DCs en font de très bons candidats comme adjuvants vaccinaux. L'utilisation des ligands de TLR comme adjuvant devrait ainsi permettre de réduire la quantité d'antigène nécessaire lors d'une vaccination en améliorant leur capture et leur présentation aux lymphocytes T. C'est pourquoi un certain nombre d'essais cliniques sont en cours pour évaluer l'intérêt de l'utilisation en vaccination des ligands de TLR et entre autres des ligands de TLR9 au niveau de la pDC, surtout qu'à la différence des adjuvants classiques, les CpGs-ODN se révèlent peu réactogènes<sup>192</sup>. Ainsi le CpG 7909 (VaxImmune) est en cours d'essai en combinaison avec le vaccin BioThrax (vaccin anti-anthrax) dans un nouveau vaccin AV7909. Développée par les sociétés Coley et DARPA, cette association s'est montrée très efficace, en multipliant par 6 le pic d'anticorps protecteur après l'injection. De plus, cette

association a permis de réduire le nombre de doses vaccinales nécessaires pour obtenir un titre d'anticorps protecteur par rapport aux vaccins n'utilisant pas les TLR9 ligands en adjuvant (passage d'un schéma de 3 à 2 doses)<sup>193</sup>. Le même CpG a été utilisé dans des essais de phase I/II en adjuvant du vaccin Engerix-B (vaccin à base d'antigène HBs recombinant utilisé pour vacciné en prophylaxie contre le VHB) et s'est montré plus efficace que le vaccin seul, particulièrement dans une population de patients VIH<sup>194</sup>. D'autres CpG (CpG 1018) ont été utilisés comme adjuvants dans des vaccins contre l'hépatite B et ont montré une réponse plus rapide et de meilleur qualité que les vaccins classiques chez des volontaires sains<sup>195</sup>.

### a.2\ Utilisation comme traitement au cours des infections

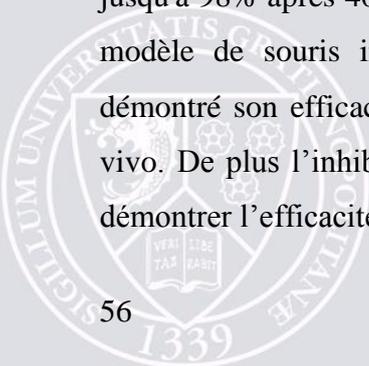
De par sa capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I, l'activation de la pDC par des ligands de TLR est très intéressante dans le cadre des traitements anti-infectieux et plus particulièrement antiviraux. Ainsi de nombreux essais cliniques utilisant des ligands de TLR7 sont en cours. Dans le cadre de l'infection par le VHC par exemple, l'utilisation de ligands des TLR7 ou 9 semble extrêmement prometteuse. En effet, l'un des traitements utilisé pour cette pathologie est l'IFN $\alpha$  utilisé pour ses propriétés antivirales, effet qui pourrait être retrouvé de manière plus physiologique et avec des profils d'effets indésirables moins importants en activant la pDC avec des ligands de TLR. Plusieurs molécules sont en cours d'essai clinique et ont démontré leur efficacité. L'Isatoribine, un ligand de TLR7, a ainsi été utilisé en essai de phase I/II sous forme injectable et a permis de réduire la charge virale chez des patients résistants aux traitements classiques par l'IFN $\alpha$ <sup>196</sup>. Une prodrogue de l'Isatoribine sous forme orale est aussi en cours de développement et a démontré une très bonne biodisponibilité lors d'essais préliminaires. L'Imiquimod, un autre ligand de TLR7 présenté sous forme de crème et qui est sur le marché, a démontré son efficacité dans le traitement des verrues ano-génitales induites par les papillomavirus humains<sup>197, 198</sup>. Il a permis la régression complète des lésions chez plus de 50% des patients après application 3 fois par semaine pendant 16 semaines et a montré son efficacité dans d'autres infections comme l'herpès génital ou les leishmanioses<sup>199</sup>. D'autres molécules de la même famille, ciblant le TLR7 sont aussi en cours d'essai, comme le Resiquimod de prise orale, qui a démontré sa capacité à réduire les réactivations d'herpes génitale au cours d'un essai clinique de phase II<sup>200</sup> ou à réduire la charge virale de patients atteints d'hépatite C chronique au cours d'une étude de phase Ia<sup>201</sup>. Un certain nombre d'effets indésirables associés aux effets indésirables de l'IFN $\alpha$  ont néanmoins entraîné l'arrêt de ces essais.



### b\ La stratégie thérapeutique basée sur la lignée de pDC GEN 2.2

L'étude des pDCs est limitée par leur faible pourcentage en circulation, ce qui rend difficile leur utilisation en immunothérapie. Notre laboratoire a pu mettre au point une lignée de pDC obtenue à partir de pDCs primaires leucémiques issues d'un patient HLA-A\*0201<sup>+</sup> <sup>202</sup>. Ces pDCs leucémiques sont caractérisées par leur expression de CD4, CD56 et CD123 et l'absence des marqueurs de la lignée lymphoïde (CD3, CD8, CD19, CD16, CD20, CD57) et myéloïde (CD13 et CD33). Ces cellules expriment BDCA2 et BDCA4 et après stimulation virale, mûrissent et produisent de l'IFN de type I, de l'IL-6, IL-8 et du TNF $\alpha$  <sup>203</sup>. Elles sont aussi capables d'induire la maturation des lymphocytes T naifs en lymphocytes TH1 et TH2 après activation par Flu et par IL-3 et CD40L. La lignée de pDC GEN 2.2 possède les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que les pDCs primaires et a ainsi pu être utilisée pour mieux étudier les pDCs *in vitro* <sup>161, 204</sup>.

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie basée sur la lignée de pDC a été développée dans le laboratoire. Cette stratégie consiste à charger des peptides immunodominants issus d'antigènes tumoraux ou viraux sur la lignée de pDC irradiée dans un contexte allogénique HLA-A\*0201 restreint afin d'induire des lymphocytes T CD8 spécifiques (Figure 13). Cette stratégie peut être utilisée directement par vaccination avec la lignée de pDC chargée et irradiée ou indirectement par amplification *ex vivo* de lymphocytes T CD8 spécifiques qui seront ensuite injectés au patient. Cette stratégie a déjà été développée avec succès dans le laboratoire, en contexte de cancer (mélanome) <sup>205, 206</sup> et d'infection virale (EBV, CMV) <sup>207</sup>. La lignée de pDC GEN 2.2 est mise en contact avec des peptides issus d'antigènes tumoraux ou viraux, qu'elle présente aux lymphocytes du patient dans un contexte HLA-A\*0201 restreint. Après stimulation, les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'antigène d'intérêt s'amplifient. Elle s'est montrée beaucoup plus efficace que les stratégies utilisant des mDCs *in vitro*. Ainsi, il a été démontré que la stimulation de PBMCs issues de donneurs sains par la lignée Gen2.2 permettait d'amplifier des lymphocytes T spécifiques de 5 à 20% après 7 jours de stimulation jusqu'à 98% après 40 jours de stimulation. La lignée Gen 2.2 a pu être testée *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes reconstituées par des pBMCs humains où elle a démontré son efficacité et sa capacité à induire une réponse lymphocytaire T spécifique *in vivo*. De plus l'inhibition du développement tumoral dans ce modèle de souris a permis de démontrer l'efficacité thérapeutique de la stratégie.



La stratégie a aussi été analysée pour 3 infections virales différentes : Flu, EBV et CMV. In vitro 7 jours après une stimulation de PBMC, issues de donneurs sains, par la lignée de pDCs chargée avec les peptides viraux, il a été observé une amplification importante des lymphocytes T spécifiques pour les trois virus testés et jusqu'à 99% après 40 jours de stimulation pour les peptides du CMV. Les lymphocytes T spécifiques obtenus se sont révélés fonctionnels, capables de produire de l'IFN $\gamma$ , d'exprimer CD107 après une stimulation spécifique et de lyser spécifiquement des cellules présentant les différents peptides viraux. In vivo, la vaccination par la lignée de pDC chargée avec des peptides viraux a permis l'amplification de lymphocytes T spécifiques dans un modèle de souris humanisées avec des PBMCs humains. Ces lymphocytes se sont montrés fonctionnels, capables de lyser spécifiquement ex vivo des cellules présentant les antigènes viraux. Après avoir testé in vivo l'immunisation active, il a été testé le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques anti-CMV activés ex vivo par la lignée de pDC dans un modèle de souris immunodéficientes greffées avec des cellules infectées par le CMV. Les lymphocytes T spécifiques injectés ont pu contrôler la croissance tumorale des cellules infectées par le CMV, démontrant ainsi leur efficacité après transfert in vivo.

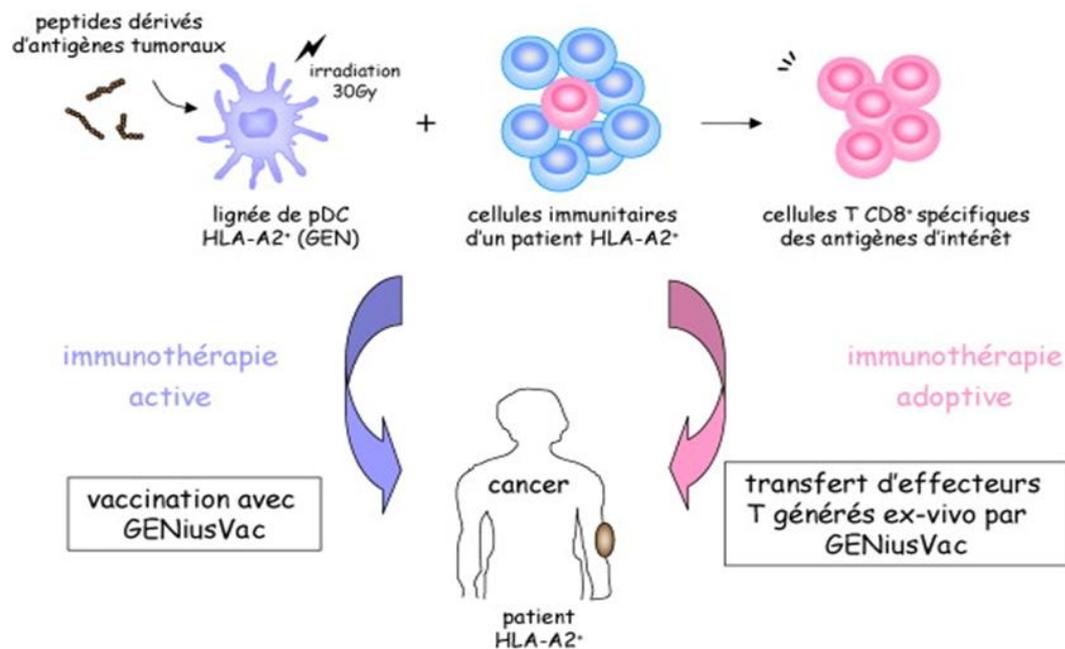


Figure 13. Stratégie thérapeutique d'utilisation de la lignée de pDC Gen 2.2 (Aspard, Rev. Med. Int. 2010)

**RESULTATS**



## Résultats

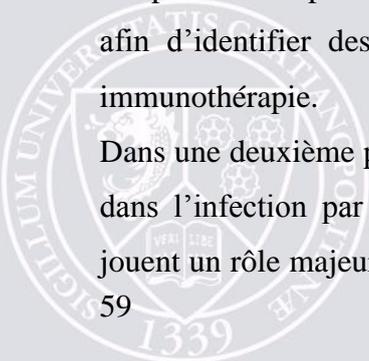
### 1 Objectifs de l'étude

L'infection par HBV est l'une des premières causes d'hépatite dans le monde. Il n'existe pas de traitement curatif capable de résoudre l'infection chronique, alors que les mécanismes physiopathologiques de la maladie et principalement les liens entre le VHB et l'immunité sont encore peu décrits. Les pDCs sont des cellules majeures de l'immunité antivirale, capables une fois activées de produire de l'interféron de type I et de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T afin d'induire une forte réponse immunitaire spécifique du virus.

Dans un premier temps nous avons cherché à analyser le potentiel thérapeutique des pDCs pour restaurer une immunité anti-HBV fonctionnelle en contexte d'hépatite B en utilisant une stratégie d'immunothérapie mise au point au laboratoire basée sur une lignée de pDC irradiée et chargée avec des peptides dérivés d'antigènes d'intérêt (GENiusVac). Cette stratégie a déjà démontré son efficacité au laboratoire pour induire des lymphocytes T spécifiques et fonctionnels en contexte de cancer (mélanome) et d'infection virale aiguë (CMV/EBV). Cette étude a donc pour but d'évaluer l'efficacité de la stratégie d'immunothérapie par les pDCs dans le contexte de l'infection chronique par le VHB.

Pour cela nous avons tout d'abord analysé ex vivo la capacité des pDCs à stimuler une réponse lymphocytaire T spécifique et fonctionnelle à partir de prélèvements sanguins (PBMC) ou de biopsie hépatique (LIL) issus de patients atteints d'hépatite B chronique. Nous avons ensuite évalué l'efficacité thérapeutique in vivo des pDCs dans un nouveau modèle de souris Hepato-HuPBL que nous avons établi (souris immunodéficientes humanisées avec un système immunitaire HLA-A\*0201 (PBMC) et transplantées avec des hépatocytes humains transfectés ou non par le VHB). De plus, nous avons analysé la corrélation entre la capacité des patients à répondre in vitro à la stimulation par la lignée de pDC avec leur statut clinique, afin d'identifier des marqueurs prédictifs de la réponse ou de la résistance à une telle immunothérapie.

Dans une deuxième partie, nous avons cherché à étudier le rôle physiopathologique des pDCs dans l'infection par le VHB. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les pDCs jouent un rôle majeur et précoce dans l'immunité antivirale de par leur capacité à s'activer en



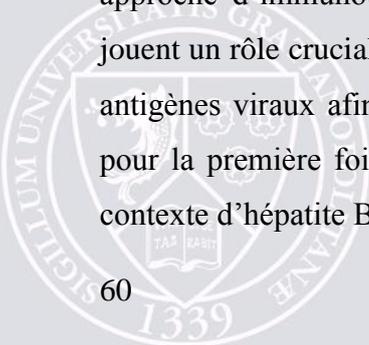
présence de virus et à produire de l'IFN de type I. Certaines publications ont démontré que la fonctionnalité des pDCs était altérée en situation d'hépatite B chronique, pouvant en partie expliquer la capacité du virus à échapper au système immunitaire. Néanmoins les mécanismes par lesquels le virus est capable d'inhiber l'activation des pDCs ainsi que les conséquences de cette inhibition ne sont encore que peu étudiés. Parmi les dysfonctions du système immunitaire au cours de l'infection par le VHB, il a été retrouvé une perturbation de l'activité des cellules NK. En revanche, la relation entre pDCs et cellules NK est bien documentée, les pDCs étant capables d'activer les différentes fonctions effectrices des NK. Un lien pourrait donc exister entre dysfonction de l'activité des pDCs et perturbation des fonctions antivirales des cellules NK au cours de l'infection par le VHB.

Nous avons déterminé le phénotype des pDCs à l'état basal chez les patients hépatite B chronique par rapport aux pDCs chez des donneurs sains. Nous avons ensuite évalué les capacités d'activation des pDCs avec différents ligands de TLR. Nous avons ensuite cherché à connaître le retentissement de ces modifications sur les fonctions des pDCs vis-à-vis de l'orientation des lymphocytes T CD4 ainsi que du cross-talk pDC/NK. Enfin nous avons analysé le mécanisme d'action permettant d'expliquer comment le VHB module les pDCs et en conséquence le cross-talk pDC/NK.

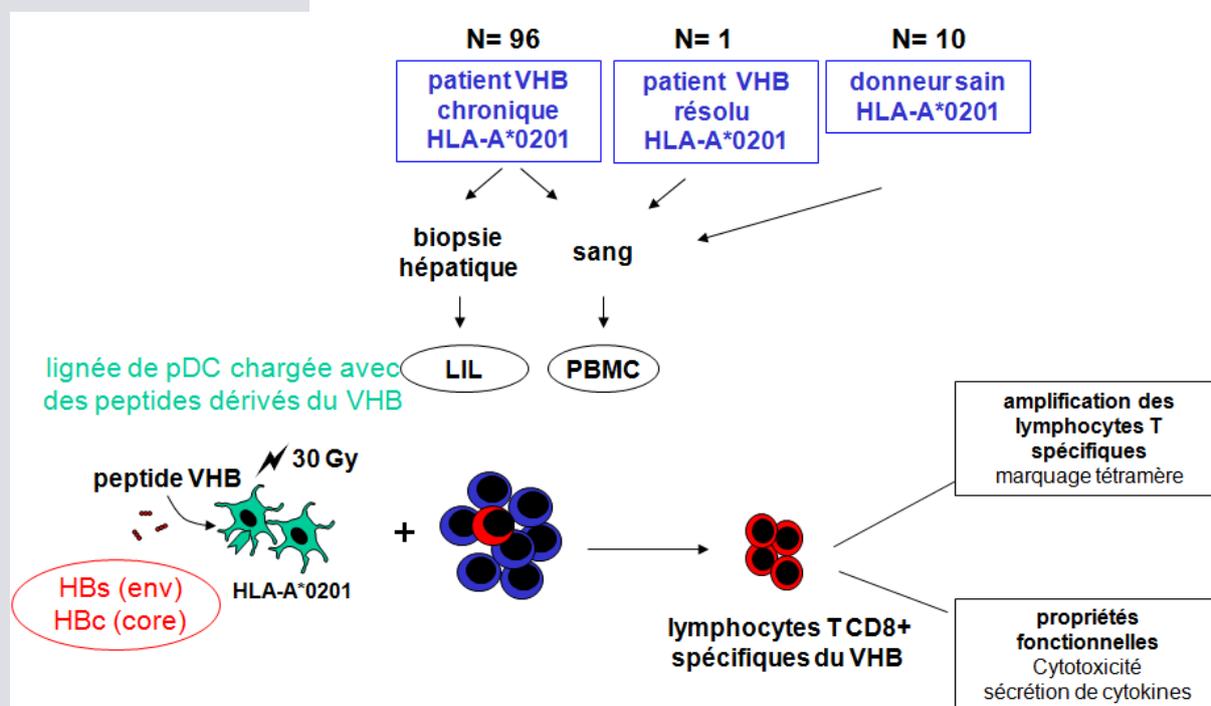
## **2 Article 1. Les pDCs peuvent stimuler efficacement l'immunité antivirale dans le contexte de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B.**

### **A Résumé**

La réponse immune lors d'une infection par le VHB est essentielle pour éliminer le virus. Ainsi, la restauration d'une immunité fonctionnelle anti-VHB pourrait représenter une approche d'immunothérapie très intéressante pour traiter l'infection chronique. Les pDCs jouent un rôle crucial dans l'immunité antivirale de par leur capacité à capturer et apprêter les antigènes viraux afin d'induire une réponse immune adaptative. C'est pourquoi nous avons pour la première fois évalué le potentiel des pDCs pour restaurer l'immunité anti-VHB en contexte d'hépatite B chronique.



Pour cela nous avons utilisé une lignée de pDCs HLA-A\*0201<sup>+</sup> chargée avec des peptides HLA-A\*0201 restreints dérivés des antigènes HBc et HBs du virus afin d'amplifier des lymphocytes T spécifiques ex vivo à partir de PBMC et LIL de patients atteints d'hépatite B chronique (figure 14). Nous avons utilisé des prélèvements issus de patients à différents stades de la maladie (porteurs inactifs, patients hépatite B chronique active exprimant ou non l'antigène HBe, traités ou non). Nous avons pu observer chez 45,8% des patients testés (patients répondeurs) une réponse à la stimulation par la lignée de pDCs avec une amplification de lymphocytes T spécifiques du VHB fonctionnels (capables d'exprimer CD107 après restimulation et de lyser spécifiquement des hépatocytes transfectés par le virus in vitro). En analysant les différents paramètres cliniques des patients testés, nous avons pu observer que la présence d'antigène HBe et/ou d'un fort taux de lymphocytes T régulateurs dans le sang étaient associés à une absence de réponse à la stimulation par la lignée de pDCs.



**Figure 14. Plan expérimental en vue d'analyser le potentiel d'amplification des lymphocytes T spécifiques du VHB issus de patients hépatite B chronique par la lignée de pDCs chargée avec des peptides issus d'antigènes du VHB in vitro.**

Nous avons ensuite analysé l'efficacité thérapeutique du vaccin de pDC dans un modèle de souris immunodéficientes reconstituées avec des PBMC d'un patient ayant résolu l'infection au VHB et xenotransplantées avec une lignée d'hépatocytes humains transfectés ou non par le VHB (HepG2 2.15 et HepG2 respectivement) (Figure 15). La vaccination de ces souris Hepato-HuPBL avec la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs a permis

l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB capables de lyser les hépatocytes infectés in vivo et de réduire la charge virale des souris vaccinées.

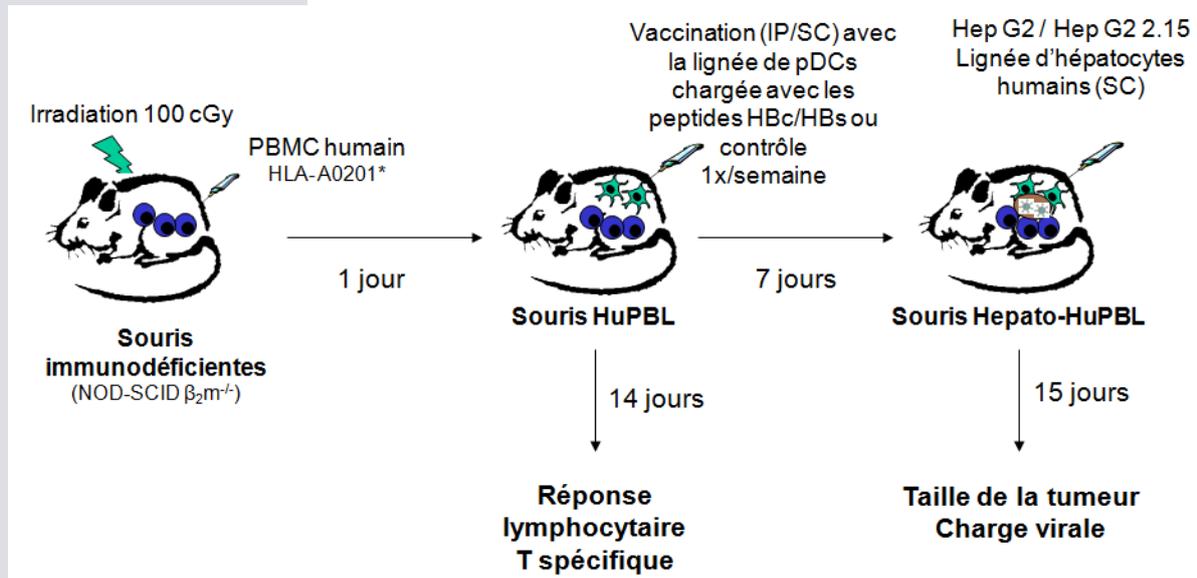


Figure 15. Plan expérimental utilisant un modèle de souris Hepato-HuPBL ayant pour but d'analyser in vivo le potentiel thérapeutique de la ligne de pDC dans l'hépatite B chronique.

Nous avons pu démontrer qu'une stimulation in vitro ou in vivo par la lignée de pDCs pouvait restaurer une immunité anti VHB chez des patients atteints d'hépatite B chronique. L'efficacité de cette stratégie semble être liée au statut clinico-biologique du patient. En effet, si la charge virale n'influe pas sur la réponse à la stimulation par la lignée de pDCs, la présence de l'antigène HBe ainsi que le niveau de lymphocytes T régulateurs semble être important. L'antigène HBe est connu pour être un puissant immunomodulateur capable d'inhiber la réponse immunitaire anti-VHB. Nos résultats pourraient faire suspecter un lien entre le rôle immunomodulateur de l'antigène HBe et la capacité des patients à répondre à la stimulation par les pDCs. Il serait intéressant à l'avenir de se pencher sur ce possible lien. De plus, dans le cadre d'une stratégie thérapeutique, il est toujours intéressant d'avoir des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement. Enfin, ces résultats nous suggèrent qu'il serait intéressant d'essayer de réduire la pression du virus sur le système immunitaire en utilisant par exemple un traitement antiviral classique avant de vacciner avec la lignée de pDCs.

Avant le passage de la stratégie thérapeutique utilisant la lignée de pDC en clinique pour le traitement de l'hépatite B, un certain nombre de points vont devoir être analysés. Ainsi, la question de la toxicité hépatique potentielle de cette stratégie doit être étudiée avant tout essai chez l'homme. Les groupes de patients à tester vont devoir être mieux défini en fonction des

données cliniques et des résultats obtenus ex vivo afin de pouvoir tester cette stratégie chez les patients potentiellement répondeurs. Enfin les doses et le protocole vaccinal vont devoir être mis au point en fonction des données in vivo ainsi que des données d'autres essais utilisant la lignée de pDC dans d'autres pathologies (mélanome) <sup>206</sup>.

En conclusion, la lignée de pDC chargée avec des peptides dérivés du VHB est capable d'amplifier des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB et fonctionnels in vitro et in vivo. Cette nouvelle stratégie d'immunothérapie pourrait donc restaurer une immunité antivirale et permettre l'élimination du virus chez les patients atteints d'hépatite B chronique.



## Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Efficient Stimulation of Antiviral Immunity in the Context of Chronic Hepatitis B Virus Infection

Jeremie Martinet,<sup>1,2,4</sup> Vincent Leroy,<sup>2,3</sup> Tania Dufeu-Duchesne,<sup>2,3</sup> Sylvie Larrat,<sup>5</sup> Marie-Jeanne Richard,<sup>2,4</sup> Fabien Zoulim,<sup>6</sup> Joel Plumas,<sup>1,2,7</sup> and Caroline Aspod<sup>1,2</sup>

The immune control of hepatitis B virus (HBV) infection is essential for viral clearance. Therefore, restoring functional anti-HBV immunity is a promising immunotherapeutic approach to treatment of chronic infection. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) play a crucial role in triggering antiviral immunity through their ability to capture and process viral antigens and subsequently induce adaptive immune responses. We investigated the potential of pDCs to trigger antiviral cellular immunity against HBV. We used a human leukocyte antigen A (HLA-A)\*0201<sup>+</sup> pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted peptides derived from hepatitis B core/hepatitis B surface (HBc/HBs) antigens to amplify specific CD8 T cells *ex vivo* from chronic HBV patients and established a Hepato-HuPBL mouse model to address the therapeutic potential of the strategy *in vivo*. Stimulation of PBMCs or liver-infiltrating lymphocytes from HLA-A\*0201<sup>+</sup> chronic HBV patients by HBc peptide-loaded pDCs elicited up to 23.1% and 76.1% HBV-specific CD8 T cells in 45.8% of cases. The specific T cells from the “responder” group secreted interferon- $\gamma$ , expressed CD107 upon restimulation, and efficiently lysed HBV antigen-expressing hepatocytes. Circulating hepatitis B e antigen (HBeAg) was found to distinguish the group of patients not responding to the pDC stimulation. The therapeutic efficacy of the pDC vaccine was evaluated in immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2m^{-/-}$  mice reconstituted with HBV patients' PBMCs and xenotransplanted with human HBV-transfected hepatocytes. Vaccination of Hepato-HuPBL mice with the HBc/HBs peptide-loaded pDCs elicited HBV-specific T cells able to specifically lyse the transfected hepatocytes and reduce the systemic viral load. **Conclusion:** pDCs loaded with HBV-derived peptides can elicit functional virus-specific T cells. HBeAg appears to be critical in determining the outcome of immunotherapies in chronic HBV patients. A pDC-based immunotherapeutic approach could be of interest in attempts to restore functional antiviral immunity, which is critical for the control of the virus in chronic HBV patients. (HEPATOLOGY 2012;00:000-000)

Despite increasing awareness and extensive vaccination campaigns, chronic hepatitis B infection remains a global health problem.<sup>1</sup> Antiviral drugs such as interferon (IFN)- $\alpha$  and nucleoside/nucleotide analogues efficiently suppress viral replication and reduce hepatic symptoms. However, viral covalently closed circular DNA often persists in

hepatocytes and, combined with viral escape mechanisms,<sup>2</sup> may cause disease relapse. Unfortunately, antiviral therapies are not yet capable of definitive virus eradication.

Interestingly, the pathophysiology of hepatitis B virus (HBV) appears to be closely related to host immunity.<sup>3,4</sup> Patients who manage to clear the virus

*Abbreviations:* ALT, alanine aminotransferase; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; CTL, cytotoxic T lymphocyte; HBeAg, hepatitis B core antigen; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HLA-A, human leukocyte antigen A; IFN, interferon; LIL, liver-infiltrating lymphocyte; mDC, myeloid dendritic cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TCR, T cell receptor.

From the <sup>1</sup>EFS Rhone-Alpes, R&D Laboratory, La Tronche, France; <sup>2</sup>University Joseph Fourier, Grenoble, France; INSERM U823, Immunobiology & Immunotherapy of Cancers, La Tronche, France; <sup>3</sup>Hepato-gastroenterology Unit; <sup>4</sup>Department of Cancerology and Biotherapy, and <sup>5</sup>Virological Laboratory/UMI 3265 CNRS-UJF-EMBL, CHU Grenoble, Michallon Hospital, Grenoble, France; <sup>6</sup>INSERM U871, Molecular Pathobiology and New Treatments of Viral Hepatitis, Lyon, France; and <sup>7</sup>University College London, Cancer Institute, London, UK.

Received February 20, 2012; accepted May 21, 2012.

Supported by the French Blood Service and the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis.

elicit vigorous and efficient multispecific T cell responses. In contrast, patients who evolve toward chronic infection mount only weak and inappropriate immune responses.<sup>5-7</sup> Immune responses are directed toward epitopes located within the major HBV proteins:<sup>8</sup> nucleocapsid HBc and HBs. In particular, HBc-specific cytotoxic T cells play a critical role in controlling the viral infectious cycle through their ability to lyse persistently infected hepatocytes. Their activity has been shown to significantly contribute to virus clearance and resolution of infection.<sup>6,9,10</sup> Resolution of chronic HBV infection has been achieved in patients after adoptive transfer of immunity to HBc antigen.<sup>11</sup> Another approach, involving reversing T cell exhaustion, such as blocking the PD-1 pathway,<sup>12</sup> could also restore functional antiviral immunity. Numerous immunotherapeutic approaches have been developed in attempts to restore functional anti-HBV immunity. In this context, different strategies have been developed to fulfill HBV-specific cellular immune responses, including the HBV-DNA vaccine,<sup>13,14</sup> lipopeptides,<sup>15</sup> and peptide-pulsed myeloid dendritic cells (mDCs).<sup>16</sup> Genetic engineering has also been used to redirect effector T cell specificity, either by transduction with a T cell receptor (TCR)-specific for the immunodominant human leukocyte antigen A (HLA-A)\*0201-restricted HBc<sub>18-27</sub> epitope,<sup>17</sup> or by expressing a chimeric antigen receptor.<sup>18</sup> Despite extensive efforts, most immunotherapeutic approaches are not yet clinically relevant. In addition, their pre-clinical development is limited by a lack of *in vivo* models addressing their efficacy in the context of a human immune system.<sup>19</sup>

Surprisingly, plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which are uniquely specialized in launching antiviral responses,<sup>20,21</sup> have not been used to stimulate antiviral responses against HBV. Due to their ability to detect the presence of single-stranded RNA and CpG-DNA and subsequently produce large quantities of type I IFN and induce adaptive immune responses, pDCs play a crucial role in immunity to viruses. pDCs can cross-present viral antigens following direct infection or after sensing infected cells,<sup>22,23</sup> induce virus-specific adaptive immune responses *in vitro*,<sup>24</sup> and also elicit cytotoxic T lymphocytes (CTLs) *in vivo* following viral infection.<sup>25</sup>

Despite these outstanding properties, the potential of pDCs has not been harnessed to drive immunity against HBV. This is due in part to their scarcity and the difficulty of generating these cells from hematopoietic progenitors. If these difficulties could be overcome, pDCs would be a very promising means of restoring HBV-specific immune responses.

We developed a powerful tool in the form of a unique human HLA-A\*0201<sup>+</sup> pDC line that shares phenotypic and functional features of primary pDCs.<sup>26</sup> This cell line has been used to promote immune responses toward viral- or tumor-specific antigens. The potential of irradiated peptide-loaded pDCs to induce antigen-specific responses in HLA-A\*0201-matched settings has been shown to be effective in the context of melanoma<sup>27</sup> as well as Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections.<sup>28</sup> In the present study, we investigated the potential of pDCs in triggering functional antiviral cellular immunity against HBV *ex vivo* in a large cohort of chronic HBV patients and addressed their therapeutic potential *in vivo* using a Hepato-HuPBL mouse model. The results revealed that hepatitis B e antigen (HBeAg) is a key factor in inducing specific responses irrespective of overall clinical status.

## Patients and Methods

All procedures were approved by the local ethics committee of Grenoble University Hospital and the French Blood Service's Institutional Review Board. The Declaration of Helsinki Principles was followed, and all participants gave written consent for participation in this study. The studies in animals were conducted in accordance with European Union guidelines (86/609/CEE) and French National Chart guidelines, and protocols were approved by the local Ethics Committee for Animal Experimentation of Grenoble (ComEth).

**HBV Patients and Healthy Donors.** Ninety-four HLA-A\*0201<sup>+</sup> chronic HBV-infected patients and one resolved control were studied. HBV patients (Table 1) were classified as inactive carriers (HBeAg-negative, HBV-DNA <2,000 IU/mL, and consistently normal alanine aminotransferase [ALT] for at least 1 year), HBeAg-negative hepatitis, and HBeAg-positive

Address reprint requests to: Caroline Aspod, R&D Laboratory, EFS Rhone-Alpes, 29 Avenue du Maquis Gresivaudan, 38701 La Tronche, France. E-mail: carolineaspod@yahoo.com; fax: (33)-4-76-54-69-18.

Copyright © 2012 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.25879

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Table 1. Clinical Characteristics of the Subgroups of Chronic HBV Patients**

Characteristics	Blood Samples					Liver Biopsies (n = 6)
	Inactive Carriers (n = 17)	Untreated Chronic HBV Patients		Treated HBV Patients		
		HBeAg- (n = 24)	HBeAg+ (n = 5)	HBeAg- (n = 42)	HBeAg+ (n = 6)	
Age, years	45 ± 9	43 ± 13	31 ± 10	55 ± 13	49 ± 21	52 ± 14
Sex, %, M/F	59/41	65/35	60/40	71/29	83/17	60/40
ALT level, IU/L	22 ± 15	44 ± 31	217 ± 400	35 ± 22	49 ± 23	27 ± 7
HBeAg status	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Viral load, log IU/mL	1.51 ± 1.83	6.66 ± 7.35	7.86 ± 8.03	2.86 ± 3.66	3.17 ± 3.54	3.79 ± 4.07
HBsAg, log IU/mL	2.83 ± 1.06	3.78 ± 0.61	4.19 ± 0.38	3.23 ± 0.71	3.68 ± 0.3	—
Cirrhosis, %	0	0	0	7.1	16.7	0

Data are presented as the mean ± SD unless indicated otherwise.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; F, female; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; M, male.

hepatitis. Forty-eight patients were treated (entecavir/tenofovir), and HBV-DNA was undetectable in 83% of these patients. Exclusion criteria included human immunodeficiency virus/hepatitis C virus/hepatitis D virus coinfection, other liver diseases, and treatment with IFN- $\alpha$  or immunosuppressive agents. Serum HBs antigen was quantified using the Abbott Architect HBsAg QT assay (Abbott Diagnostics). Samples were also obtained from HLA-A\*0201<sup>+</sup> healthy donors.

**Cell Preparation.** PBMCs were purified via Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Eurobio). Liver tissues, obtained from six HLA-A\*0201<sup>+</sup> HBV patients (Table 1), were processed to prepare liver-infiltrating lymphocytes (LILs). From all liver biopsies, we obtained  $0.45 \times 10^6$  to  $2.6 \times 10^6$  cells, among which 14.2%-58.2% were CD3<sup>+</sup> T cells and 8.3%-43.3% were CD8<sup>+</sup> T cells.

**Cell Lines and Peptides.** The GEN2.2 pDC line was cultured as described.<sup>26</sup> The HLA-A\*0201<sup>+</sup> hepatocyte line HepG2 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Sigma). HepG2.15 (HepG2 transfected with HBV-DNA) was cultured in William's E, 10% fetal bovine serum, 50 IU/mL penicillin/streptomycin, 2 mM Glutamine (Invitrogen), 5  $\mu$ g/mL insulin (Sigma) and  $5.10^{-5}$  hydrocortisone hemisuccinate (Roche). All other cultures were performed in RPMI1640-Glutamax, 1% nonessential amino acids, 100  $\mu$ g/mL gentamycin, 10% fetal bovine serum (Invitrogen), and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). T2 and K562 lines were purchased from American Type Culture Collection (LGC Standards). We used the following HLA-A\*0201-restricted peptides (NeoMPS) and corresponding HLA-A\*0201 tetramers (Beckman): HBC<sub>18-27</sub> (FLPSDFPSPV; core), HB<sub>s335-343</sub> (WLSLLVPFV; surface), pol<sub>575-583</sub> (FLLSLGIHL; polymerase), and FluM<sub>158-66</sub> (GILGFVFTL; influenza matrix).

**In Vitro Induction of a Specific T Cell Response.** The pDC line was loaded with peptides as described.<sup>26</sup> PBMCs or LILs were cocultured with peptide-loaded pDCs at a 1:10 ratio and restimulated weekly in presence of 200 IU/mL IL-2 (Proleukine, Chiron). In some experiments, PBMCs were directly stimulated with the peptide (1-10  $\mu$ M final) for 10 days. Specific T cell responses were measured via tetramer labeling prior to analysis on a FACSCalibur flow cytometer (BD).

**Proliferation Assay.** PBMCs resuspended at  $1 \times 10^6$  /mL in 96-well plates were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (1  $\mu$ g/mL) or OKT3 (0.1  $\mu$ g/mL) for 5 days. <sup>3</sup>H-thymidine was then added to each well. <sup>3</sup>H-thymidine incorporation was measured on a liquid scintillation counter (TopCount NXT, PerkinElmer) 18 hours later.

**IFN- $\gamma$  Secretion and CD107 Surface Expression by HBV-Specific CD8 T Cells.** T cells were labeled with tetramer before restimulation with peptide-pulsed T2 cells (10:1 ratio) for 5 hours and 30 minutes. To measure IFN- $\gamma$  secretion, 1  $\mu$ L/mL brefeldin A (BD) was added for the last 3 hours. Cells were then labeled with anti-CD3/CD8 antibodies (Beckman) and stained for intracellular IFN- $\gamma$  (BD). To detect CD107, anti-CD107a/b antibodies (10  $\mu$ L/1  $\times 10^6$  cells) (BD) were added in the culture, and GolgiSTOP (0.67  $\mu$ L/mL) was added for the last 4 hours. Cells were then labeled with anti-CD3/CD8 antibodies. IFN- $\gamma$  production was also assessed via cytometric bead array (BD) in culture supernatants 24 hours after stimulation of T cells with T2 cells.

**<sup>51</sup>Cr Cytotoxicity Assay.** Cytotoxicity was measured by performing a standard <sup>51</sup>Cr release assay. Effector T cells were sorted from the coculture using an EasySep human T cell enrichment kit (StemCell) and plated in 96-well plates with <sup>51</sup>Cr-labeled target cells (peptide-pulsed T2 cells, K562) at the indicated E:T ratio.

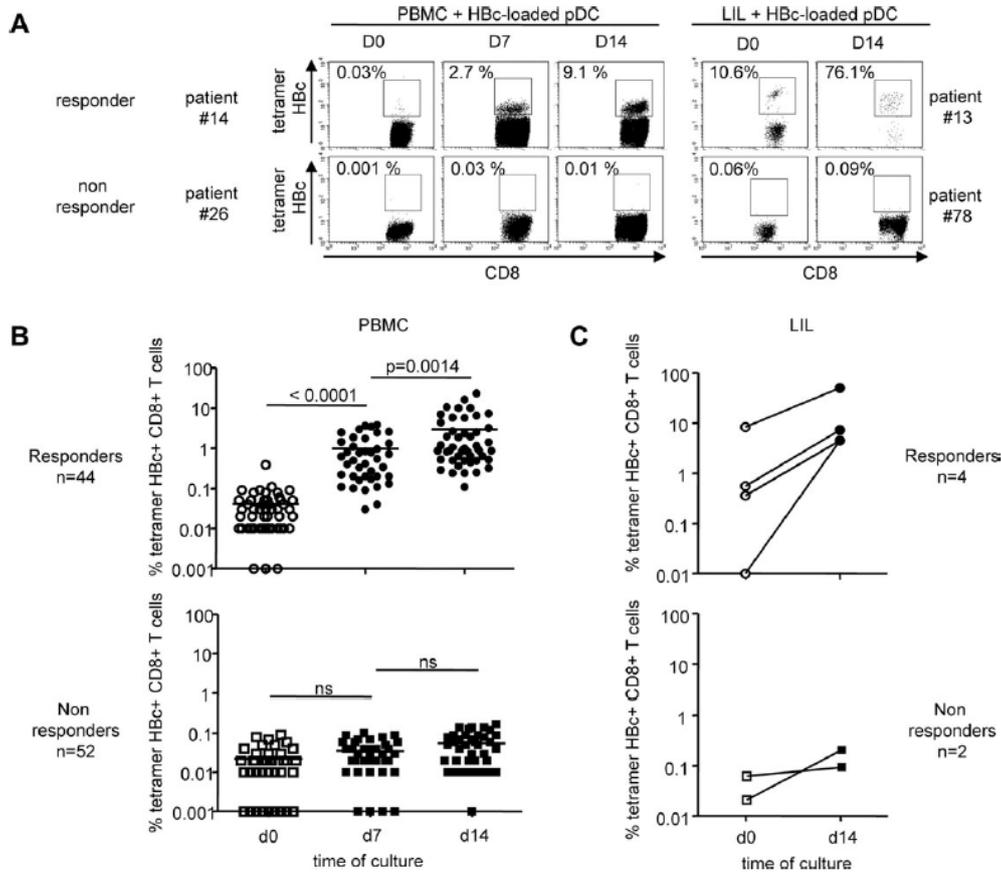


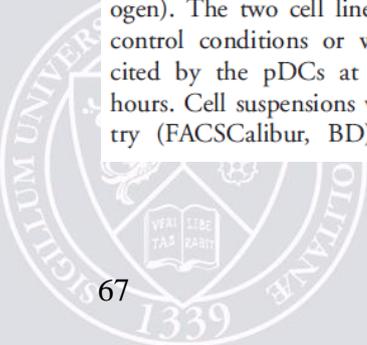
Fig. 1. HBC-loaded pDC line induces HBC-specific T cells from HLA-A\*0201<sup>+</sup> chronic HBV patients *in vitro*. PBMCs or LILs from chronic HBV patients were stimulated once a week with the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted HBC peptide. HBC-specific T cells were analyzed via flow cytometry using HLA-A\*0201-specific tetramers. (A) Tetramer labeling of HBC-specific T cells at day 0 (D0) and at day 7 (D7) and day 14 (D14) of culture (dotplots gated on CD8<sup>+</sup> T cells). One representative responder and nonresponder patient. (B) Evolving percentage of HBC-specific T cells obtained from PBMCs from 94 chronic HBV patients (44 responders and 52 nonresponders) (two patients were performed twice, see Fig. 4) or (C) LILs from six patients (four responders, two nonresponders). ns, not significant.

Radioactivity was measured 4 hours later in supernatants on a scintillation counter Top-Count-NXT (PerkinElmer). Measurements were performed in triplicate and mean values were expressed as a percentage of specific lysis using the following formula:  $100 \times (\text{sample release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release})$ .

**Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester-Based Cytotoxicity Assay Toward Human-Infected Hepatocytes.** HepG2 (control target) and HepG2.15 (specific target) cells were first labeled with low (0.1  $\mu\text{M}$ ) and high (2.5  $\mu\text{M}$ ) carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) concentrations, respectively (Invivogen). The two cell lines were mixed and cultured in control conditions or with HBV-specific T cells elicited by the pDCs at a 1:15 to 1:60 ratio for 24 hours. Cell suspensions were analyzed via flow cytometry (FACSCalibur, BD). The percentage of specific

lysis was calculated using the formula:  $\% \text{ lysis} = 1 - (R1/R2) \times 100$  where  $R1 = \% \text{ specific target} / \% \text{ control target}$  after incubation with effectors and  $R2 = \% \text{ specific target} / \% \text{ control target}$  in absence of effectors.

**In Vivo Functional Assays in Humanized Mice.** Irradiated (120 cGy) immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2\text{m}^{-/-}$  mice (NOD.Cg-Prkdc<sup>SCID</sup> $\beta_2\text{m}^{\text{Tm}1\text{Unc}}$ /J, Jackson-ImmunoResearch Laboratories) were transplanted intraperitoneally with  $50 \times 10^6$  PBMCs from a resolved HLA-A\*0201<sup>+</sup> HBV patient and further vaccinated with  $5 \times 10^6$  irradiated HBC/HBs peptide-pulsed pDCs once a week. A total of  $25 \times 10^6$  human hepatocyte lines were implanted subcutaneously into the flank of the HuPBL mice either 3 days after (prophylactic setting) or 3 days before (therapeutic setting) the first vaccination. Response to vaccination was analyzed in notified organs upon digestion with collagenase D (Roche Diagnostics) and tetramer staining.



Tumor size was monitored every 2-3 days and tumor volume was calculated using the following formula:  $((\text{short diameter})^2 \times \text{long diameter}/2)$ . Viral load was measured in the serum using the COBAS Ampliprep/Taqman HBV test version 2.0 (Roche Diagnostics).

**Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using a Mann-Whitney nonparametric U test, Wilcoxon matched pairs test, and unpaired *t* test using Prism software.

## Results

**Human HLA-Matched Allogeneic pDCs Induce Strong HBc-Specific T Cell Responses *Ex Vivo* from Chronic HBV Patient PBMCs and LILs.** pDCs have never been used to stimulate HBV-specific T cells. As autologous pDCs are rare and difficult to purify or generate *in vitro*, we used a pDC cell line and a protocol that we validated in the context of tumor and viral antigens.<sup>27,28</sup> To investigate the ability of the HLA-A\*0201<sup>+</sup> pDC line to trigger HBc-, HBs-, and pol-specific T cells, PBMCs (n = 94) and LILs (n = 6) purified from HLA-A\*0201<sup>+</sup> chronic HBV patients were stimulated once a week with the irradiated pDC line loaded with the HLA-A\*0201-restricted HBV peptide. Antigen-specific T cell expansion was evaluated after labeling cells with HBV tetramers. No amplification of HBs- and pol-specific T cells could be observed (data not shown). However, potent amplification of the HBc-specific T cells was obtained in 45.8% (PBMCs) and 66.6% (LILs) of cases (Fig. 1A, one representative patient for each condition; Fig. 1B,C, all patients). Thus, we distinguished two groups of patients: the “responders,” who are able to respond to the HBc-loaded pDC stimulation, and the “nonresponders,” who are unable to amplify HBc-specific T cells upon stimulation (level of HBc-specific T cells at day 14 < 0.24%). In the responder group, the level of HBc-specific T cells averaged at 3.2% (range, 0.24%-23.1%) for PBMCs (Fig. 1B) and 16.6% (range, 4.5%-76.1%) for LILs (Fig. 1C) over the 14 days of culture. Up to now, the usual method to generate specific T cells from HBV patients consisted in direct culture with 1-10  $\mu\text{M}$  peptides.<sup>6,8,12</sup> Comparison of the two methods reveals that peptide-loaded pDCs elicited HBc-specific T cells from PBMCs significantly more effectively than peptide alone (Fig. 2). This difference was observed both in terms of percentages (Fig. 2A) and amplification of absolute numbers (Fig. 2B) of HBV-specific T cells. Thus the peptide-loaded pDCs elicit strong HBc-specific T cell responses *ex vivo* from one part of chronic HBV patients.

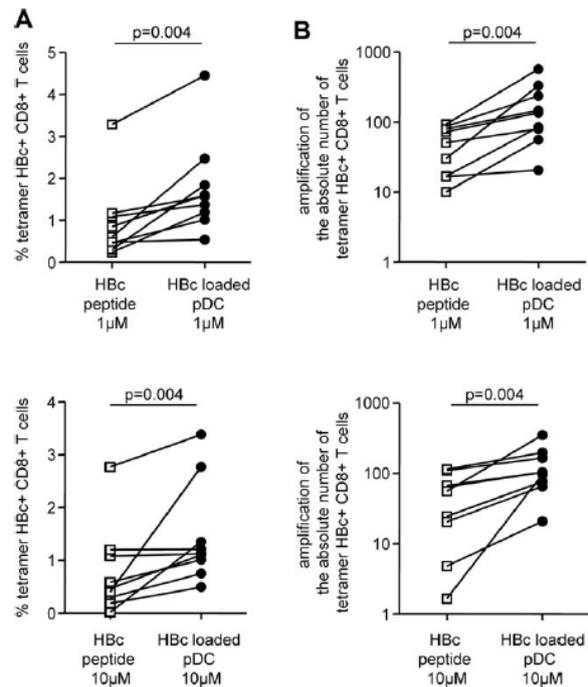


Fig. 2. Comparison of *in vitro* HBc-specific T cell induction from chronic HBV patients using a peptide-loaded pDC line or peptide alone. PBMCs from chronic HBV patients (n = 9) were exposed to the pDC line loaded with HBc peptide (1-10  $\mu\text{M}$ ) or directly to the HBc peptide (1-10  $\mu\text{M}$ ). HBc-specific T cells were analyzed via flow cytometry using HLA-A\*0201-specific tetramer at day 0 and at day 10 of culture. (A) Percentage of HBc-specific T cells at day 10 of culture. (B) Fold amplification of HBc-specific T cell absolute numbers from day 0 to day 10.

**Nonresponse to pDC Stimulation Is Related to the Presence of HBeAg.** To determine the basis for responsiveness of chronic HBV patients to the HBc-loaded pDC stimulation, we first studied the response of PBMCs from our cohorts of responder and nonresponder patients to mitogenic stimulation. The overall proliferative potential, as assessed by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation, following TCR-independent (PHA) or TCR-dependent (OKT3) stimulation was similar for responders, nonresponders, and healthy donors (Fig. 3A). We then analyzed whether the difference between the groups of patients was specific to the HBc antigen. To do so, we used the protocol described above, but with the pDC line loaded with the HLA-A\*0201-restricted influenza peptide. Interestingly, amplification of influenza-specific T cells observed in healthy donors and the responder group was significantly higher than in the nonresponder group of chronic HBV patients (Fig. 3B). This suggests that T lymphocytes from the nonresponder group are generally compromised in their ability to respond to a specific antigen following

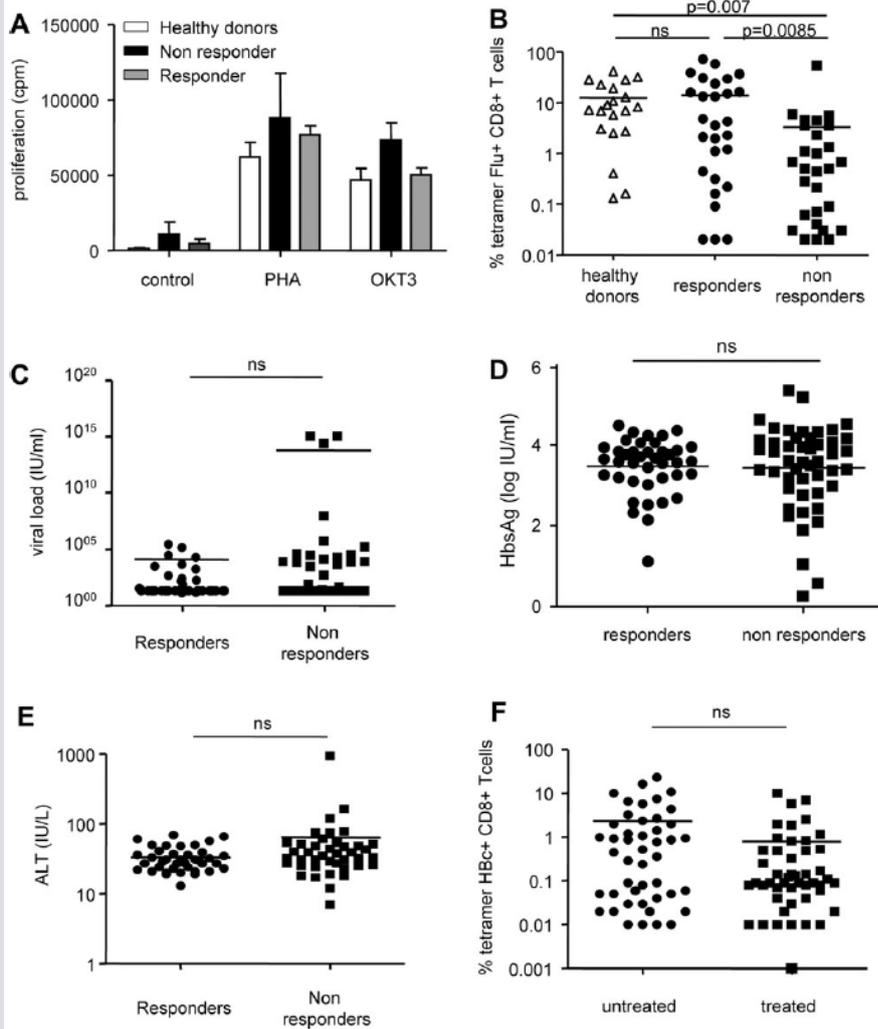


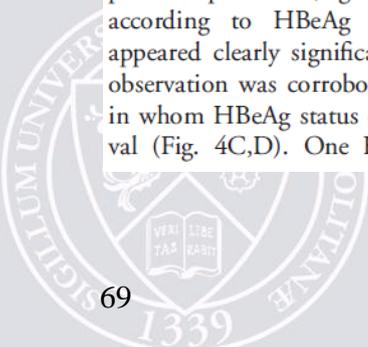
Fig. 3. Proliferative potential and clinical parameters of responder and nonresponder chronic HBV patients. (A) PBMCs from healthy donors (n = 5) and chronic HBV patients (five responders and five nonresponders) were cultured for 5 days in presence of PHA or OKT3. Proliferation was measured using a <sup>3</sup>H-thymidine assay. (B) PBMCs from healthy donors or chronic HBV patients were stimulated once a week with the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted influenza peptide. Influenza-specific T cells were analyzed using HLA-A\*0201-specific tetramer at day 14 of culture in healthy donors (n = 20) and chronic HBV patients (28 responders and 28 nonresponders to the pDC stimulation). (C-E) Comparison of clinical parameters between chronic HBV patients classed as responders and nonresponders to Hbc-loaded pDC stimulation. (C) Blood viral load, (D) HbsAg level in serum, (E) ALT level in blood. (F) Levels of Hbc-specific T cells at day 14 for untreated and treated HBV patients. ns, not significant.

major histocompatibility complex-dependent presentation by an antigen-presenting cell.

No significant correlation was found between the inability to respond to the Hbc-loaded pDC stimulation and HBV-DNA levels (Fig. 3C), HBs antigen level (Fig. 3D), ALT measurements (Fig. 3E), or antiviral treatment (Fig. 3F). In contrast, the presence of HBeAg in the serum appeared to differentiate between responder and nonresponder chronic HBV patients (Fig. 4). The Hbc-specific T cell response was much greater in inactive carriers and treated or untreated HBeAg-negative hepatitis patients than in HBeAg-positive patients (Fig. 4A). After pooling patients according to HBeAg status alone, this difference appeared clearly significant (Fig. 4B). This interesting observation was corroborated by data for two patients in whom HBeAg status changed over a 6-month interval (Fig. 4C,D). One HBeAg-positive patient, unex-

pectedly capable of responding to pDC stimulation, achieved HBeAg loss followed by HBeAg seroconversion 6 months later. The other patient, initially HBeAg-negative and capable of responding to Hbc-loaded pDC stimulation, became unresponsive 6 months later during a transient HBeAg-positive peak. Thus, HBeAg status distinguishes between chronic HBV patients capable of responding, or not, to Hbc-loaded pDC stimulation.

*The Hbc-Specific T Cells Elicited by the pDCs Are Functional and Exhibited In Vitro HLA-A\*0201-Restricted Cytotoxic Activity Toward HBV-Transfected Hepatocytes.* To investigate the functionality of HBV-specific T cells generated from responder chronic HBV patients we examined T cell exhaustion and cytotoxic potential. PD1 expression, a marker of T cell exhaustion, was not detected on the Hbc-specific T cells elicited by the pDC line (Supporting



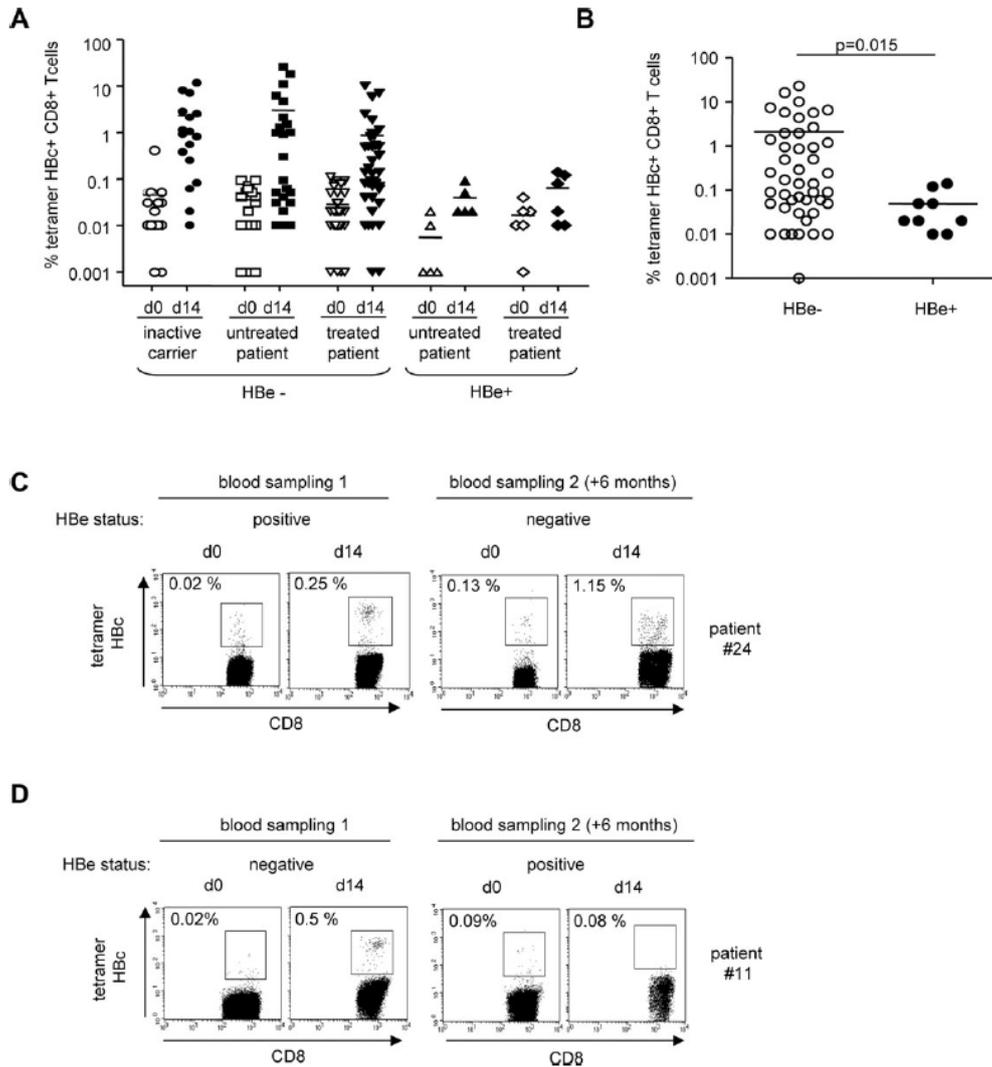
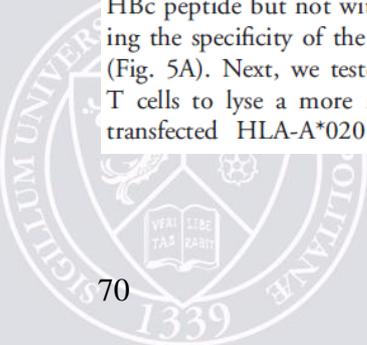


Fig. 4. HBeAg status distinguishes chronic HBV patients according to their ability to respond to HBeAg-loaded pDC stimulation. PBMCs were stimulated once a week with the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted HBe peptide and cultured for 14 days. HBe-specific T cells were analyzed using HLA-A\*0201-specific tetramer at day 0 and day 14 of culture in different subgroups of chronic HBV patients: inactive carrier, treated or untreated patients, HBeAg-negative (HBe-), and HBeAg-positive (HBe+). Bars indicate the mean. (B) Levels of HBe-specific T cells at day 14 in HBeAg-negative (HBe-) and HBeAg-positive (HBe+) HBV patients. (C,D) For two patients, analysis was performed on two different blood samples taken at a 6-month interval, during which HBeAg status changed. (C) Patient positive for HBeAg for the first sample but negative for the second. (D) Patient negative for HBeAg for the first sample but positive for the second.

Fig. 1). The cytotoxic potential of expanded HBV-specific T cells was determined by performing a <sup>51</sup>Cr release assay using peptide-loaded HLA-A\*0201<sup>+</sup> T2 cells as targets. As expected, HBe-specific T cells exhibited a strong cytotoxicity toward T2 cells loaded with HBe peptide but not with an irrelevant peptide, showing the specificity of the HBV-specific T cells function (Fig. 5A). Next, we tested the ability of these specific T cells to lyse a more relevant target, such as HBV-transfected HLA-A\*0201<sup>+</sup> hepatocytes. Due to the

lack of P3 facilities necessary to perform radioactive experiments with virus-producing cells, a CFSE assay was used. This assay consisted of culturing specific T cells with a mixture of two targets labeled with distinct CFSE intensities. The disappearance of the CFSE pic, as measured via flow cytometry, indicates killing of the corresponding cells. For all patients tested, HBe-specific T cells were able to specifically lyse the HBV-transfected HLA-A\*0201<sup>+</sup> hepatocyte cell line HepG2.15, but not the HBV-free HepG2 line



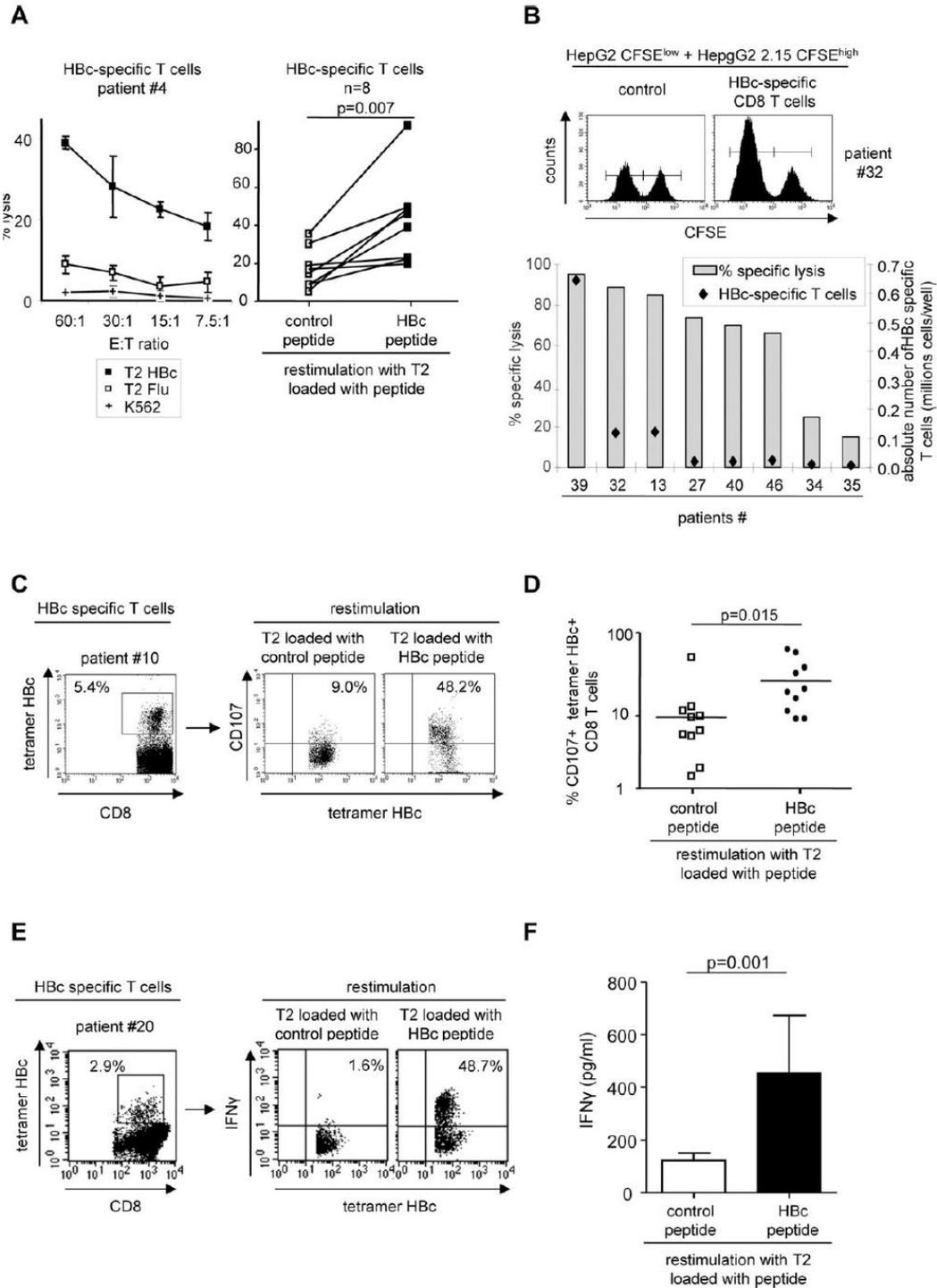


Fig. 5. Functionality of HBC-specific T cells elicited by the pDC line. PBMCs were stimulated once a week with the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted HBC peptide and cultured for 14 days. (A,B) Cytotoxic activity of HBC-specific T cells was measured toward (A) peptide-loaded T2 cells or K562 cells using a <sup>51</sup>Cr release assay; one representative experiment (left panel) and eight experiments (right panel) and (B) HBV-infected human hepatocytes. HBC-specific T cells were incubated in control conditions, or with a mix of CFSE<sup>low</sup>-labeled HepG2 and CFSE<sup>high</sup>-labeled HepG2.2.15; the percentage of each CFSE peak was measured via flow cytometry 24 hours later (upper panel) and the percentage of HepG2.2.15 specific lysis and absolute numbers of HBC-specific T cells calculated (lower panel). (C,D) CD107 surface expression on HBC-specific T cells after restimulation with peptide-loaded T2 cells. (C) One representative patient (upper panel) and (D) 10 patients. (E) IFN- $\gamma$  production assessed by intracellular staining within tetramer<sup>+</sup> CD8 T cells upon restimulation with peptide-loaded T2 cells. (F) IFN- $\gamma$  secretion measured in culture supernatants 24 hours after restimulation of HBC-specific T cells with peptide-loaded T2 cells (n = 11 experiments).

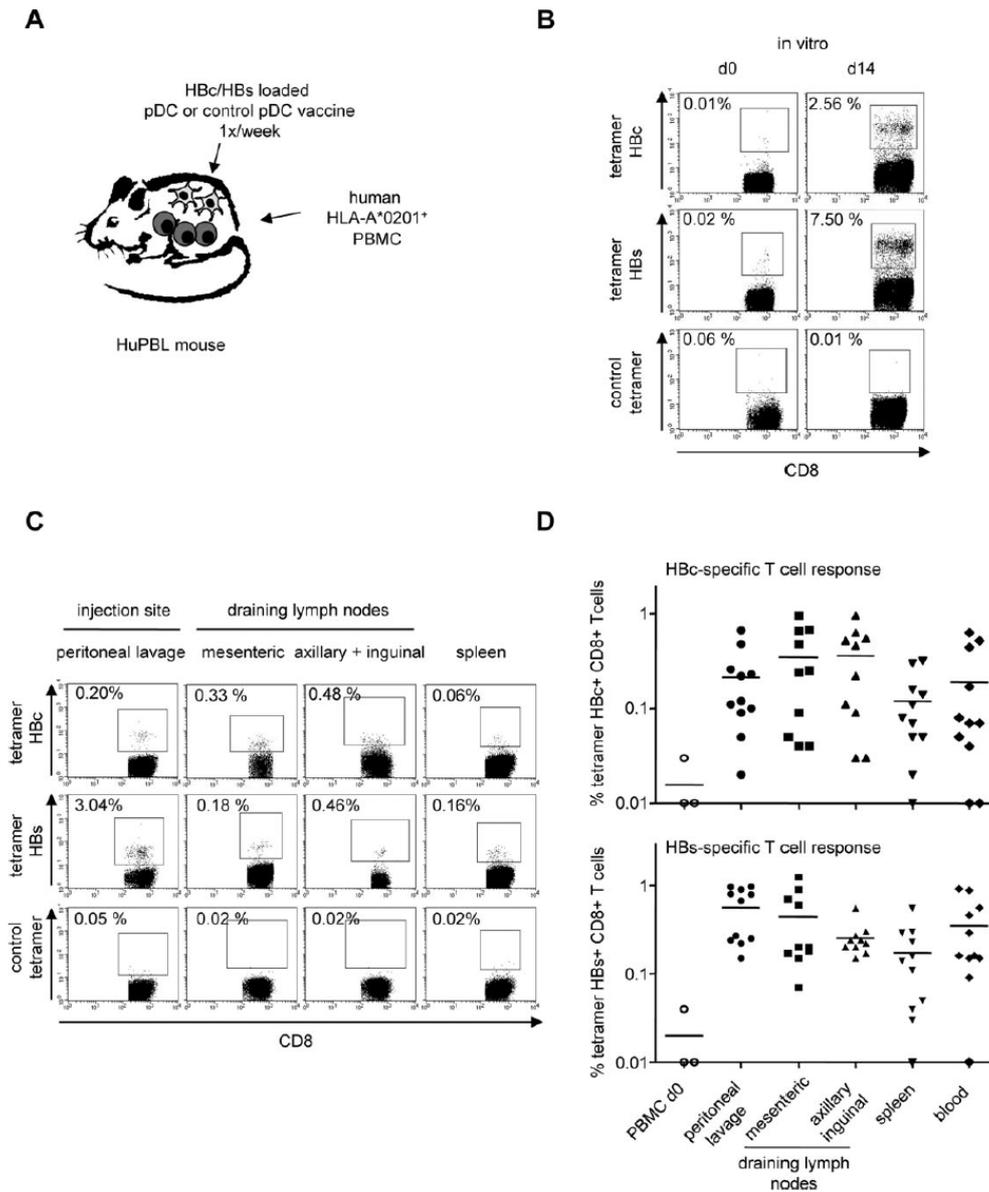
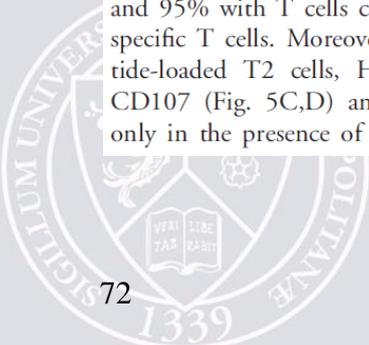


Fig. 6. Induction of HBC- and HBS-specific T cells upon vaccination with the pDC line *in vivo* in a humanized mouse model. (A) Immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2m^{-/-}$  mice were humanized with PBMCs from a resolved HLA-A\*0201-positive patient and treated with the pDC loaded with HLA-A\*0201-restricted HBC/HBs peptides or control peptide once a week. (B) PBMCs from the resolved HBV patient were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted HBC and HBs peptides. HBC- and HBs-specific T cells were analyzed via flow cytometry using HLA-A\*0201-specific tetramer at day 0 (d0) and at day 14 (d14) of culture (dotplots gated on CD8 T cells). Tetramer Pol was used as a control. Data are representative of one experiment. (C,D) After two vaccinations, HBC- and HBs-specific T cells were analyzed via tetramer labeling on cell suspensions at the injection site, in the draining lymph nodes, spleen and blood. Tetramer Pol was used as a control. (C) One representative experiment in HuPBL mice and (D) percentage of HBC- and HBs-specific T cells obtained from 11 vaccinated HuPBL mice.

(Fig. 5B). Specific lysis was measured at between 15% and 95% with T cells containing 0.99%-23.1% HBC-specific T cells. Moreover, when cocultured with peptide-loaded T2 cells, HBC-specific T cells expressed CD107 (Fig. 5C,D) and secreted IFN- $\gamma$  (Fig. 5E,F) only in the presence of HBC but not control peptide.

These results reinforce the full functionality of HBC-specific T cells elicited by peptide-loaded pDCs.

**The HBC- and HBs-Loaded pDC Line Elicited *In Vivo* HBV-Specific T Cell Responses in Humanized Mice.** We further evaluated the capacity of the peptide-loaded pDCs to elicit virus-specific T cell



responses against HBV antigen *in vivo* by using a humanized mouse model constructed by xenotransplanting PBMCs from a patient with resolved HBV infection into immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2m^{-/-}$  mice (HuPBL mouse model, Fig. 6A). HBe- and HBs-specific CD8 T cells could be amplified *in vitro* with the HBe- and HBs-loaded pDC line from PBMCs from the patient with resolved HBV infection (Fig. 6B). Treatment of HuPBL mice with the irradiated HBe- and HBs-loaded pDC line led to the induction of HBe- and HBs-specific T cells at the site of immunization, in the draining lymph nodes but also in the circulation and spleen (Fig. 6C,D). Thus, the HBe- and HBs-loaded pDC line elicited widespread HBe- and HBs-specific T cell responses *in vivo*.

**Treatment with HBe- and HBs-Loaded pDCs Protected Hepato-HuPBL Mice Against HBV Antigen-Expressing Hepatocyte Development.** We next investigated the therapeutic potential of the pDC treatment in humanized mice further xenotransplanted with a HLA-A\*0201<sup>+</sup> hepatocyte cell line transfected with HBV, also referred as Hepato-HuPBL mice. HuPBL mice were weekly treated with the irradiated pDC line loaded with HBe/HBs or control peptides before (Fig. 7) or after (Supporting Fig. 2) being challenged with human hepatocyte cell lines transfected (HepG22.15) or not (HepG2) with HBV. In the prophylactic setting, HBe- and HBs-loaded pDCs inhibited the development of HepG22.15 cells compared with the control pDCs whereas the HepG2 cell development was similar in the two conditions (Fig. 7B,C). Importantly, the HBV viral load in the serum of Hepato-HuPBL mice treated with HBe- and HBs-loaded pDCs was significantly lower than in mice receiving the control pDCs (Fig. 7D). Notably HBV-specific T cells were found at the HepG22.15 site of treated Hepato-HuPBL mice (Fig. 7E), suggesting that the HBV-specific T cells induced by the pDCs were able to migrate to the site of virus expression and kill HBV antigen-expressing hepatocytes. These findings were reproduced in a therapeutic setting (Supporting Fig. 2) demonstrating the efficacy of the pDC vaccine against established HBV infection.

## Discussion

Current antiviral treatments for chronic HBV infection cannot definitively clear the virus. Resolution of HBV infection would require the lysis of persistently infected hepatocytes through the action of HBV-specific T cells. pDCs are important antigen-presenting cells, particularly in the context of infectious diseases.

However, they have never been used in an experimental setting to induce functional HBV-specific T cells. We demonstrate that an irradiated pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted peptides can efficiently trigger functional HBV-specific T cell responses *ex vivo* from HBeAg-negative chronic HBV patients.

High levels of functional HBe-specific T cells that display efficient antigen-restricted functions and are able to lyse HBV-infected hepatocytes could be elicited from both PBMCs and LILs of chronic HBV patients. Intrahepatic HBV-specific T cells are known to be in an exhaustion state.<sup>12</sup> Despite this, specific T cells were strongly amplified from LILs, underlining the potency of the pDC-based strategy. Compared with current strategies developed to amplify HBV-specific T cells (peptides, mDCs), peptide-loaded pDCs induced greater numbers of specific T cells and faster immune responses.<sup>5,16</sup>

HBeAg is known to have an immunoregulatory function in promoting viral persistence through the modulation of the immune response to HBe antigen.<sup>29-31</sup> Indeed, here HBeAg status was found to be a critical factor determining patients' ability to elicit anti-HBV immune responses upon pDC stimulation. Two patients in our cohort switched their ability to respond to pDC stimulation within a 6-month interval. This switch was in line with modification of their HBeAg status. These observations highlight the major role of HBeAg in regulating specific T cell function. In accordance with our findings, mDCs pulsed with HBV-derived peptides elicited a stronger anti-HBV immunity in HBeAg-negative patients than in HBeAg-positive patients.<sup>32</sup> In addition, HBeAg seroconversion has been shown to be associated with the restoration of pDC function in chronic HBV patients underlying IFN- $\alpha$  treatment.<sup>33</sup> The fact that immunity to influenza antigen is also abrogated in nonresponder HBeAg-positive chronic HBV patients suggest that HBeAg not only modulates HBe antigen-specific responses but has wide-ranging effects on an individual's ability to respond to specific immune stimulation. Our observations confirm that HBeAg is a critical factor determining the outcome of immunostimulation which should be taken into consideration when optimizing future approaches to HBV treatment. Moreover, our results demonstrate that other clinical parameters such as viral load, ALT levels, HBs antigen levels, or antiviral treatment are not related to the ability of chronic HBV patients to respond to the pDC stimulation. These observations therefore support the hypothesis that treatment with nucleoside/nucleotide analogues is not associated with reinforced antiviral T cell responses.

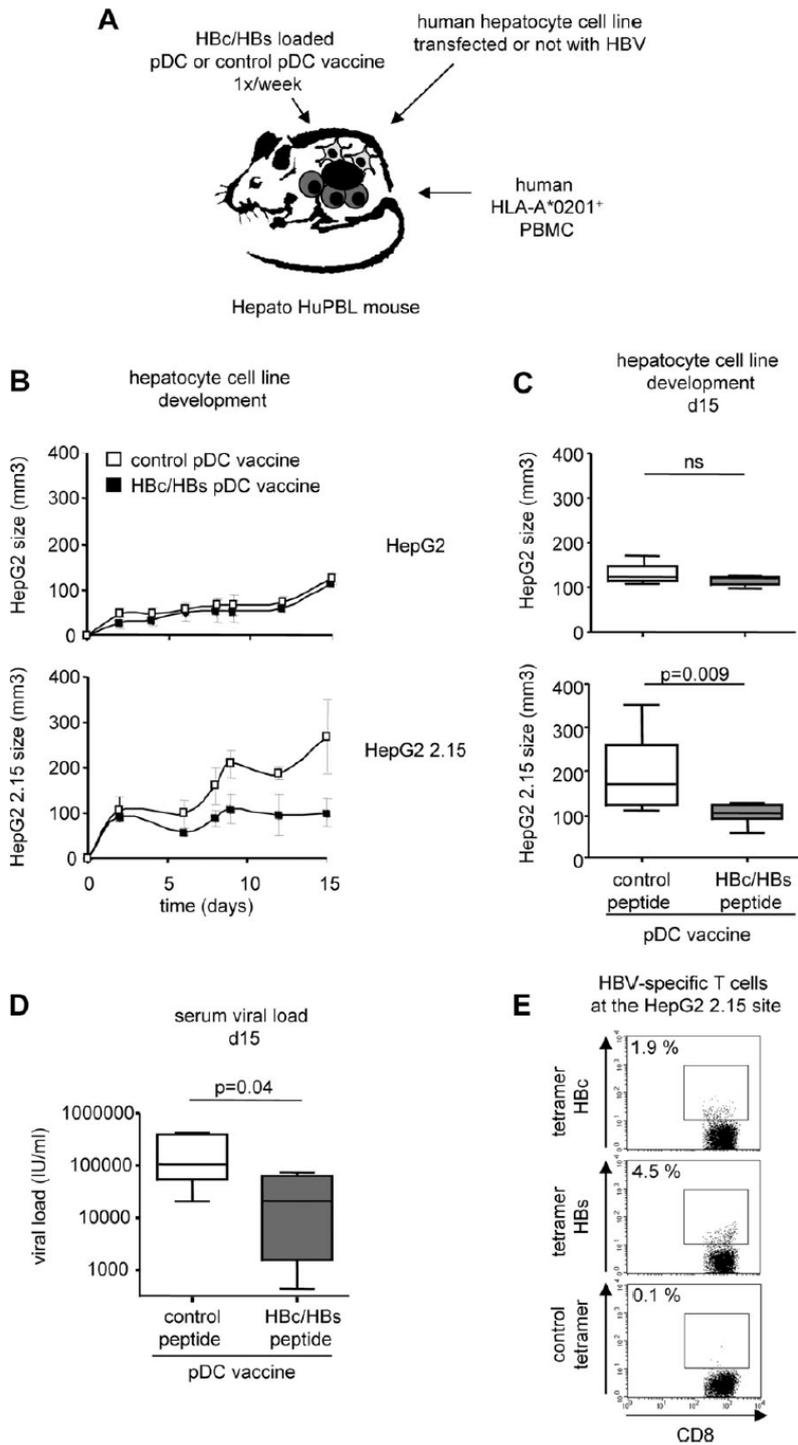
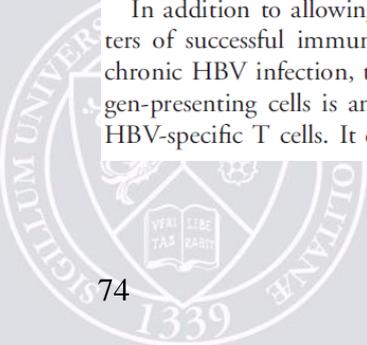


Fig. 7. Therapeutic efficacy of the pDC vaccine *in vivo* in a humanized mouse model toward HBV infection. (A) Immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2m^{-/-}$  mice were humanized with HLA-A\*0201<sup>+</sup> PBMCs and vaccinated once a week with the pDC loaded with HLA-A\*0201-restricted HBC/HBs or control peptides. After one vaccination, HuPBL mice were transplanted subcutaneously with a HLA-A\*0201<sup>+</sup> hepatocyte cell line infected (HepG2.15) or not (HepG2) with HBV. (B) Evolution of the HepG2 or HepG2.15 growth in Hepato-HuPBL mice. (C) Tumor size measured at day 15 (d15). (D) Blood viral load measured at day 15 (d15). Pool of two experiments (n = 7-8 Hepato-HuPBL mice). (E) Analysis of HBC/HBs-specific T cells at the tumor site by tetramer labeling (dotplots gated on CD8 T cells). One representative Hepato-HuPBL mouse.

In addition to allowing the study of critical parameters of successful immune responses in the context of chronic HBV infection, the pDC cell line used as antigen-presenting cells is an interesting new tool to elicit HBV-specific T cells. It could also be used as a poten-

tial cell-based immunotherapeutic strategy in which its potent efficacy and simple design would be ideal. Virus-specific T cell responses are thought to be responsible not only for viral clearance but also for disease pathogenesis during HBV infection. Nevertheless, a



strong cytotoxic response has been described in the absence of liver damage,<sup>5</sup> and the quantity of virus produced within hepatocytes has been shown to influence virus-specific CD8 T cell function.<sup>34</sup> Regulating the viral load using antiviral drugs may help control the balance between the cytotoxic and inflammatory effects of virus-specific T cells. Interestingly, specific T cell responses might even be restored in this setting.<sup>35</sup> In addition, a reduction of HBeAg load could be observed upon antiviral treatments in some patients,<sup>36</sup> and HBs seroconversion has been achieved following mDC-based vaccine.<sup>32</sup> This is important, as we showed here that HBeAg status is critical for successful immunostimulation in chronic HBV patients. The vast majority of HBeAg-negative patients treated with new analogs (entecavir and tenofovir) have undetectable HBV DNA, but have nearly no chance to achieve HBs antigen clearance. These patients, who need to be treated throughout their lives, would be the ideal target for the pDC-based immunotherapy in the future.

The advantage of pDCs over mDCs in eliciting immune responses was clearly demonstrated in our previous work,<sup>27,28</sup> where we directly compared the two cell types and their capacity to elicit immune responses to a variety of tumor and viral antigens. Furthermore, in contrast with autologous mDCs that required patients' cells, the pDC strategy could be directly applied to all HLA-A\*0201<sup>+</sup> patients. These settings have already been shown to be safe in chronic HBV patients.<sup>11,32</sup> Our previous work clearly demonstrates that the pDC strategy generates potent HLA-A0201-restricted antigen-specific cytotoxic T cells without cross-reactivity to different HLA alleles and without bystander alloreactivity.<sup>27,28</sup>

Mutations within HBV antigens have been shown to occur during the progression of HBV infection.<sup>37</sup> However, it appears that T cell escape mutants are not common in chronic HBV patients, as an intact core 18-27 epitope has been described in more than 92% of chronic HBV patients.<sup>38</sup> In addition, CTLs specific for the wild-type HBC<sub>18-27</sub> epitope could still recognize target cells presenting a mutated HBC<sub>18-27</sub> epitope,<sup>37</sup> therefore limiting the complete ineffectiveness of such an immunotherapy. As mutations occur in limited positions, mutated epitopes could also be used to load the pDCs to trigger CTLs toward the mutated epitopes.

We developed a new Hepato-HuPBL mouse model consisting in humanized mice engrafted with HBV-antigen expressing hepatocytes. Indeed, the existing chimeric and transgenic models are not suitable for testing such immunotherapies that required both the

context of a human immune system and HBV antigen-expressing human hepatocytes. The human liver-uPA-SCID model further infected with HBV<sup>39</sup> is devoid of immune cells, the HBV transgenic mouse<sup>40</sup> is restricted to a murine context, and HLA-A2 transgenic mice<sup>13</sup> allow epitope discovery but not therapeutic testing. Considering the huge number of PBMCs required to perform such *in vivo* experiments, PBMCs from chronic HBV-infected patients could not be used due to ethical limitations. Because we observed a similar amplification rate of HBV-specific immunity *in vitro* upon pDC stimulation between chronic HBV-infected patients and patients with resolved HBV infection, we used the latter group to establish our model. Using the Hepato-HuPBL mouse model, we clearly showed that *in vivo*, pDCs can elicit fully functional virus-specific T cells that are able to slow down the development of HBV-transfected hepatocytes and, importantly, reduce the viral load dramatically. This model appears to be helpful to perform preclinical *in vivo* studies of new immunotherapeutic approaches currently developed to fulfill HBV-specific cellular immune responses.

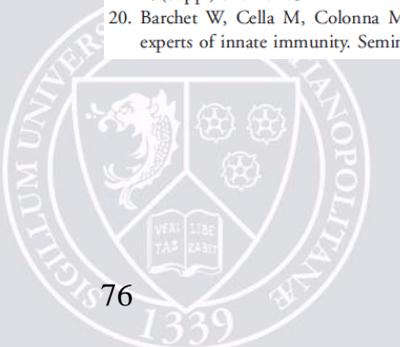
This study demonstrates the potential of pDCs in triggering functional virus-specific T cells from HBeAg-negative chronic HBV patients. It contributes to the identification of critical factors for successful restoration of antiviral immunity and establishes a preclinical model to test anti-HBV immunotherapeutic strategies. Following antiviral treatments, the elimination of persistently infected hepatocytes remains a major therapeutic goal to cure chronic HBV infection. Our strategy, which restores functional anti-HBV effectors critical for the control and clearance of the virus, could be the basis for a potential novel immunotherapeutic approach to treat chronic HBV infection.

**Acknowledgment:** We thank C. Morand, I. Michaud, and F. Bernard from EFS Rhone-Alpes for providing blood samples; F. Blanquet, R. Balouzat, and S. Kamche for expert animal care; F. Herodin for animal irradiation; P. Morand for allowing virological analysis; and A. Marlu for providing clinical data. We thank Abbott Laboratories for providing reagents to perform the Architect HBsAg QT assays. We are grateful to M. K. Maini for helpful discussions. Finally, we thank the patients who consented to participate in this study.

## References

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:245–253.

2. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593–1608.
3. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43–50.
4. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23–61.
5. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269–1280.
6. Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, et al. Longitudinal analysis of CD8+ T-cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004;78:5707–5719.
7. Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1996;97:1655–1665.
8. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T-cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386–1396.
9. Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, et al. HBcAg-specific CD8 T-cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T-cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223–232.
10. Yang PL, Althage A, Chung J, Maier H, Wieland S, Isogawa M, et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:798–802.
11. Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, et al. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002;122:614–624.
12. Fiscaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010;138:682–693.
13. Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML. Multiepitopic HLA-A\*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J Immunol* 2000;165:4748–4755.
14. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, Crimi C, Allosery K, De Brandere V, et al. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *J Virol* 2008;82:435–450.
15. Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, et al. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J Immunol* 1997;159:1383–1392.
16. Chen W, Shi M, Shi F, Mao Y, Tang Z, Zhang B, et al. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Hepatology* 2009;39:355–365.
17. Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, Teoh D, Ruedl C, Chia A, et al. Engineering virus-specific T-cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *J Hepatol* 2010;55:103–110.
18. Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, Wiegmann K, Kurschner T, Schulze A, et al. T-cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008;134:239–247.
19. Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seignerès B, Germon S, Pichoud C, et al. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl):S460–S463.
20. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells—viral experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005;17:253–261.
21. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219–1226.
22. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29:352–361.
23. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One* 2009;4:e7111.
24. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T-cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101:3520–3526.
25. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, Freitas AA, Leclerc C, Dadaglio G. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* 2004;104:1808–1815.
26. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:248–255.
27. Aspod C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L, et al. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A\*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2010;5:e10458.
28. Aspod C, Laurin D, Richard MJ, Vie H, Chaperot L, Plumas J. Induction of antiviral cytotoxic t-cells by plasmacytoid dendritic cells for adoptive immunotherapy of posttransplant diseases. *Am J Transplant* 2011;11:2613–2626.
29. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14913–14918.
30. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013–2021.
31. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *HEPATOLOGY* 2003;38:1075–1086.
32. Luo J, Li J, Chen RL, Nie L, Huang J, Liu ZW, et al. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine* 2010;28:2497–2504.
33. Zhang Z, Zhang H, Chen D, Yao J, Fu J, Jin L, et al. Response to interferon-alpha treatment correlates with recovery of blood plasmacytoid dendritic cells in children with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2007;47:751–759.
34. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-Hoehn E, Lim SG, Wasser S, et al. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 2007;81:2940–2949.
35. Boni C, Penna A, Bertolotti A, Lamonaca V, Rapti I, Missale G, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:595–605.
36. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *HEPATOLOGY* 2007;45:507–539.
37. Bertolotti A, Costanzo A, Chisari FV, Levrero M, Artini M, Sette A, et al. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med* 1994;180:933–943.
38. Rehermann B, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J Clin Invest* 1995;96:1527–1534.
39. Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 2008;80:231–238.
40. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:149–173.

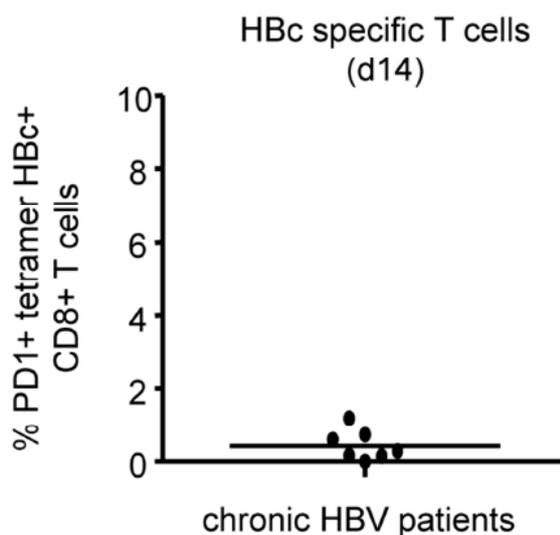


## SUPPORTING FIGURE LEGENDS

**Supporting fig. 1. PD1 expression by HBc-specific T-cells.** PBMC were stimulated once a week by the pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted HBc peptide. Expression of PD1 was assessed on HBc-specific T-cells at d14 of culture.

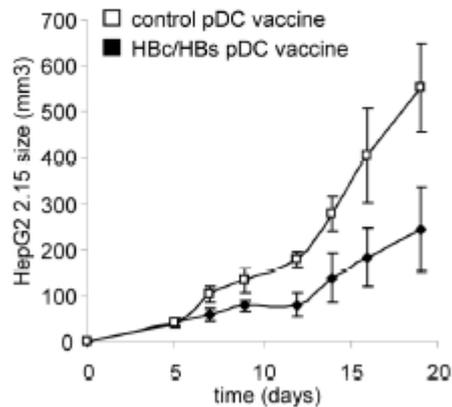
**Supporting fig. 2. Efficacy of the pDC vaccine in the humanized mouse model in a therapeutic setting.** Immunodeficient NOD-SCID  $\beta_2m^{-/}$  mice were humanized with PBMC from a resolved HLA-A\*0201<sup>+</sup> patient and transplanted subcutaneously with a human hepatocyte cell line infected with HBV (HepG22.15). Starting 3 days later, mice were vaccinated once a week with the pDC loaded with HLA-A\*0201-restricted HBc and HBs peptides or control peptide. (A) Evolution of the HepG22.15 growth. (B) Tumor size measured at d19 (5 mice/group).

## Supporting figure 1

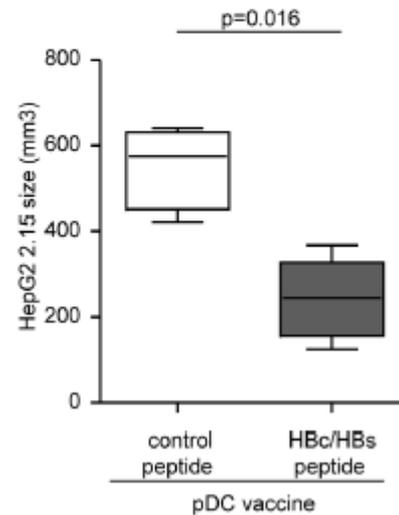


## Supporting figure 2

A



B



### C Résultats complémentaires

Nous avons observé que certains patients hépatite B chronique n'étaient pas capables de répondre à la stimulation par la lignée de pDC. Parmi ces patients, nous avons analysé plusieurs paramètres cliniques qui peuvent être liés à cette absence de réponse, comme la présence de l'antigène HBe dans le sang des patients. Nous avons aussi évalué si le taux de lymphocytes T régulateurs périphérique pouvait être associé aux groupes de patients répondeurs et non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC.

### D Matériel et méthode

#### Analyse du taux de lymphocytes T régulateurs dans le sang de patients hépatite B chronique et comparaison entre patients répondeurs et non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC

Nous avons évalué le pourcentage de lymphocytes T régulateurs par cytométrie de flux en utilisant le « *Human Regulatory T cell Staining kit* » (eBiosciences) qui marque les cellules T FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Nous avons mesuré ce pourcentage parmi les PBMC de 13 patients

répondeurs et 17 patients non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC. Nous avons ensuite comparé ces pourcentages en utilisant un test de Mann-Whitney non paramétrique.

## E Résultats

### Les patients hépatite B chronique non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC présentent un pourcentage de lymphocytes T régulateurs plus important que les patients répondeurs.

Nous avons analysé si le pourcentage de lymphocytes T régulateurs périphériques pouvait affecter la réponse à la stimulation par la lignée de pDC chez les patients hépatite B chronique. Les patients non répondeurs présentent un pourcentage de cellules T régulatrices FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> significativement plus important que les patients répondeurs (Figure 16). Ces résultats pourraient suggérer une relation entre la présence de lymphocytes T régulateurs et l'incapacité des PBMC de patients à répondre à la stimulation par la lignée de pDC.

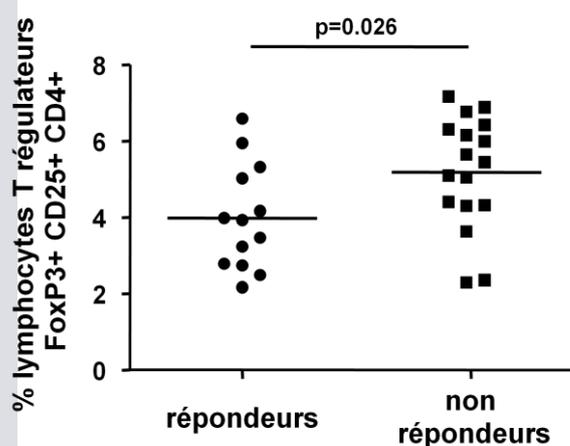


Figure 16. Pourcentage de lymphocytes T régulateurs parmi les lymphocytes T CD4 de patients hépatite B chronique répondeurs ou non répondeurs à la stimulation par la lignée de pDC.

## F Schéma récapitulatif

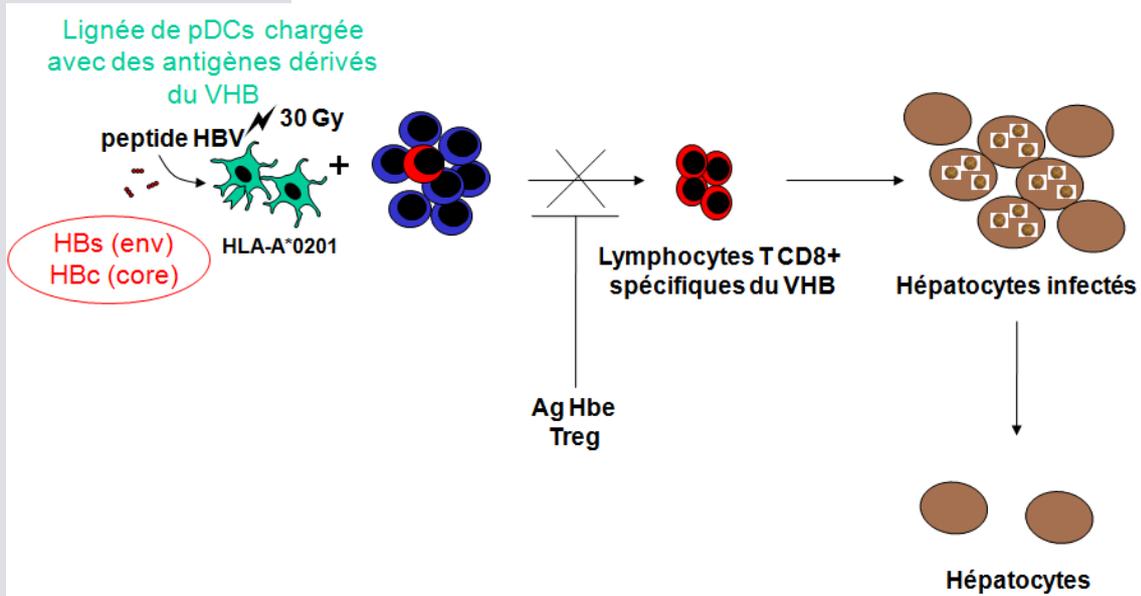


Figure 17. Potentiel en immunothérapie anti-VHB des pDCs

La lignée de pDC HLA-A\*0201 chargée avec les peptides dérivés des antigènes du VHB est capable d'amplifier la réponse lymphocytaire T CD8 spécifique du virus ex vivo à partir de PBMC de patients hépatite B chronique et in vivo dans un modèle de souris Hepato-HuPBL. Ces lymphocytes sont fonctionnels, capables de lyser les hépatocytes infectés et de réduire la charge virale in vivo. Les patients présentant l'antigène HBe en circulation ou un taux de lymphocytes T régulateurs augmenté dans le sang ne sont pas capables de répondre à la stimulation par la lignée de pDC.

### 3 Article 2. Mécanisme de subversion des cellules dendritiques plasmocytoïdes par le VHB au cours de l'infection chronique.

#### A Résumé

L'élimination du VHB nécessite une réponse immunitaire forte. Chez les patients évoluant en phase chronique, cette immunité est modulée par le virus qui réussit à échapper à son contrôle. Néanmoins les mécanismes mis en jeu par le VHB pour échapper à l'immunité sont encore peu connus et nécessitent d'être mieux explorés. Les pDCs jouent un rôle essentiel dans l'immunité antivirale de par leur capacité à reconnaître rapidement les infections virales et à activer l'immunité innée et adaptative, c'est pourquoi leur activité pourrait être modulée par le VHB, déterminant l'évolution de la maladie vers le contrôle du virus ou le développement de la phase chronique de la maladie. Au cours de l'hépatite B chronique, plusieurs défauts dans l'immunité innée (pDCs, cellules NK) ou adaptative (lymphocytes T) ont été décrits mais la pertinence par rapport à l'évolution de la maladie vers la résolution ou la chronicité est inconnue. Au cours de cette étude, nous avons analysé le rôle physiopathologique des pDCs au cours de l'infection par le VHB.

Tout d'abord, nous avons analysé le phénotype des pDCs circulantes et intra-hépatiques de patients atteints d'hépatite B chronique par rapport à des sujets contrôles non infectés puis la capacité des pDCs circulantes à répondre à une stimulation par des ligands de TLRs *in vitro*. Les pDCs à l'état basal dans le foie et en périphérie montrent un plus haut niveau d'activation chez les patients par rapport aux donneurs sains (CD40, CD86). De plus, nous avons pu observer que les pDCs de patients atteints d'hépatite B chronique n'étaient plus capables de produire de l'IFN de type I en réponse à une stimulation par un ligand de TLR9.

Afin d'évaluer l'influence des perturbations induites par le VHB sur la pDC chez les patients atteints d'hépatite B chronique, nous avons comparé la capacité des pDCs primaires de patients ou de donneurs sains à induire une réponse T ainsi que le type de réponse induite *in vitro*. Nous avons aussi analysé le cross-talk pDC/NK après stimulation par des ligands de TLR9 en mesurant la capacité des pDCs de patients ou de donneurs sains à activer les cellules NK (induction de la production de cytokines, de l'expression de marqueurs de co-stimulation

ou de l'activité cytotoxique)(figure 18). Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons aussi analysé le cross-talk pDC/NK avec des pDCs de donneurs sains incubées avec du plasma de patient hépatite B chronique aviremique ou virémique ou du plasma de donneur sain. Nous n'avons pas retrouvé l'induction d'une orientation T CD4 Th particulière (TH1, TH2, Tregs...) par les pDCs, en revanche, nous avons retrouvé une perturbation dans le cross-talk pDC/NK. Les pDCs issues de patients hépatite B chronique virémiques ou de donneurs sains en présence de sérums de patients hépatite B virémiques, activées par des ligands de TLR9 ne sont plus capables de stimuler les fonctions cytotoxiques des cellules NK.

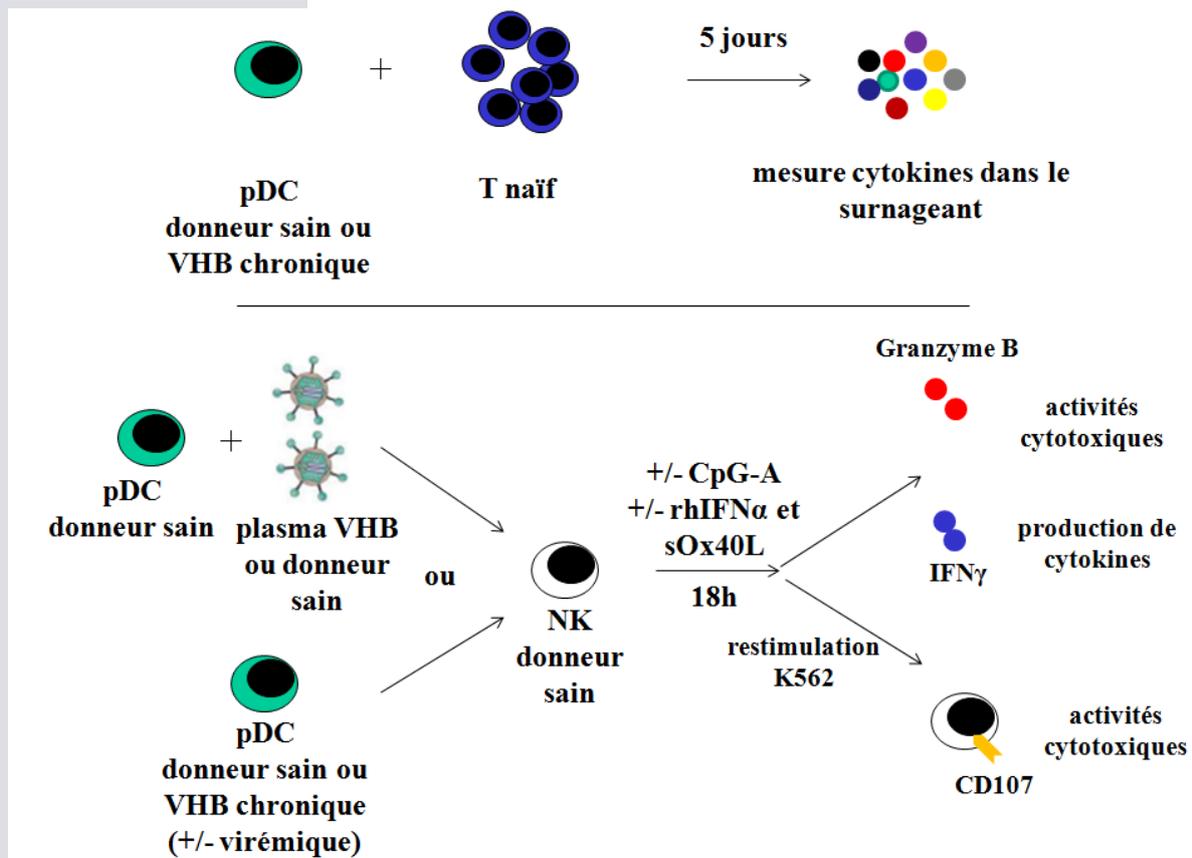
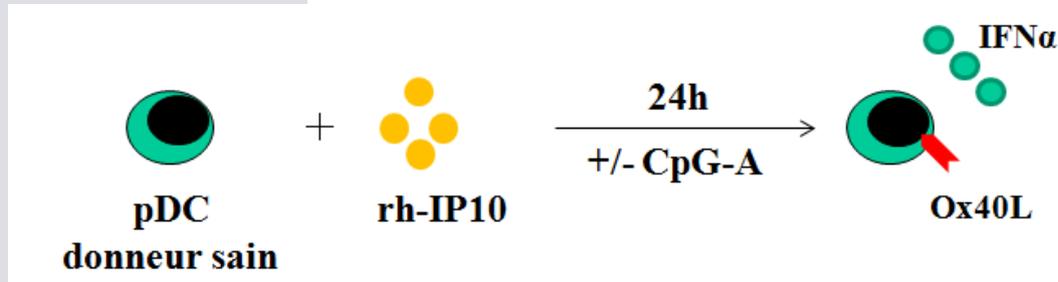


Figure 18. Plan expérimental en vue d'analyser l'influence du VHB sur la capacité des pDCs à induire une polarisation des lymphocytes T CD4 et sur le cross-talk pDC/NK

Afin de mieux comprendre comment le VHB influence sur la relation entre pDCs et cellules NK, nous avons mesuré l'expression des principales molécules sur la pDC, impliquées dans le cross-talk pDC/NK (4-1BBL, ICOS-L, Ox40L, GITRL). A l'état basal, les pDCs de patients virémiques expriment significativement moins la molécule Ox40L par rapport aux pDCs de donneurs sains. L'expression diminuée d'Ox40L à l'état basal et la faible production d'IFN de type I après stimulation par les ligands de TLR9 au niveau de la pDC, pourrait expliquer le

défaut d'activation des cellules NK par la pDC. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons cultivé des pDCs de patients (virémiques ou avirémiques) ou des pDCs de donneurs sains mis en contact avec du plasma de patients virémiques ou de donneurs sains, avec de l'IFN $\alpha$  recombinant (rhIFN $\alpha$ ) et de l'Ox40L soluble (sOx40L) et des cellules NK de donneurs sains (Figure 18). En présence de rhIFN $\alpha$  et de sOx40L, la stimulation des cellules NK par les pDCs issues de patients virémiques était restaurée, les fonctions cytotoxiques des cellules NK étant à nouveau amplifiées en présence de TLR9.

Pour mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre par le VHB pour inhiber le cross-talk pDC/NK, nous avons analysé la présence de cytokines dans le plasma des patients atteints d'hépatite B. Parmi les cytokines analysées, nous avons retrouvé des doses plus importantes d'IP10 dans le plasma des patients comparé aux donneurs sains. Afin de vérifier si la présence de fortes doses d'IP10 pouvait en partie expliquer l'inhibition du cross talk pDC/NK, nous avons cultivé des pDCs de donneurs sains avec de l'IP10 recombinant, nous avons alors analysé l'expression d'Ox40L par les pDCs, puis après stimulation par des ligands de TLR9, nous avons analysé la production d'IFN $\alpha$  (figure 19). Nous avons pu observer une diminution de l'expression d'Ox40L à l'état basal après stimulation par des ligands de TLR9 par les pDCs en présence d'IP10.



**Figure 19. Plan expérimental en vue d'analyser le rôle de l'IP10 dans la perturbation des fonctions de la pDC par le VHB.**

Nous avons pu observer au cours de cette étude que les pDCs de patients hépatite B chronique étaient à l'état basal dans un phénotype plus activé que les pDCs de donneurs sains, mais n'étaient plus capables de produire de l'IFN de type I après stimulation par des ligands de TLR9. Ces perturbations dans la fonctionnalité des pDCs chez les patients hépatite B chronique, associées à une diminution de l'expression d'Ox40L semblent entraîner une modification du cross-talk pDC/NK empêchant l'amplification des fonctions cytotoxiques des cellules NK après stimulation. De plus, ces perturbations du cross-talk pDC/NK semblent être liées à la présence d'IP10 dans le plasma des patients atteints d'hépatite B chronique et sont

dépendantes de la charge virale. Ces résultats nous ont permis de mieux comprendre comment le VHB est capable de moduler l'activité de la pDC afin d'échapper au système immunitaire et pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies pour restaurer l'activité des pDCs chez les patients atteints d'hépatite B chronique.



**B Article 2 (soumis à Gastroenterology)**

Title

*Insights into how HBV manipulates human plasmacytoid DCs to escape anti-viral immunity during chronic infection*

Short title :

*pDCs subversion in chronic HBV infection*

Authors

*Jeremie Martinet<sup>1,2,4</sup>, Tania Dufeu-Duchesne<sup>2,3</sup>, Vincent Leroy<sup>2,3</sup>, Joel Plumas<sup>1,2,5</sup>, Caroline Aspod<sup>1,2</sup>*

Department and Institutions

<sup>1</sup> EFS Rhone-Alpes, R&D Laboratory, La Tronche, F-38701 France

<sup>2</sup> University Joseph Fourier, Grenoble, F-38041 France; INSERM, U823, Immunobiology & Immunotherapy of Cancers, La Tronche, F-38706 France

<sup>3</sup> CHU Grenoble, Michallon Hospital, Hepato-gastroenterology unit, Grenoble, F-38043 France

<sup>4</sup> CHU Grenoble, Michallon Hospital, Cancerology and Biotherapy, Grenoble, F-38043 France

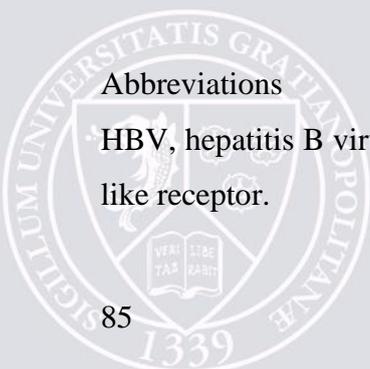
<sup>5</sup> University College London, Cancer Institute, 72 Huntley Street WC1E 6BT, UK

Grant support

Our work was supported by the French Blood Service (EFS) and the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS).

Abbreviations

HBV, hepatitis B virus; NK, natural killer cell; pDC, plasmacytoid Dendritic Cell; TLR, Toll-like receptor.



## Correspondence

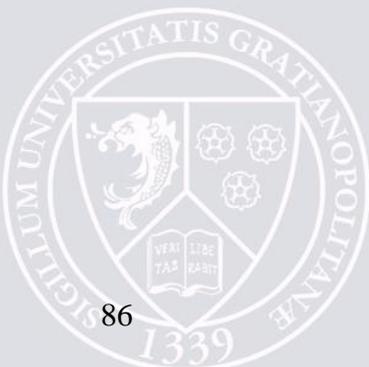
Caroline Aspord, R&D Laboratory EFS Rhone-Alpes, 29 avenue du Maquis Gresivaudan, 38701 La Tronche, France. E-mail : carolineaspord@yahoo.com. Phone : +33 (0) 4 76 42 43 44. FAX : +33 (0) 4 76 54 69 18.

## Disclosures

The authors disclose no conflicts of interest.

## Author Contributions

Design of the study: CA; Acquisition and analysis of data: JM,TDD,CA; Interpretation of data: CA,JM,JP; Material support: VL; Drafting of the manuscript: CA,JM; Revision of the manuscript: JP.



## Abstract

**Background & Aims:** Immune control of chronic HBV infection is essential for viral clearance. HBV modulates the immune system to escape this control, but the mechanisms involved remain largely unknown. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs), critical mediators initiating anti-viral immunity, may determine the outcome of HBV infection, leading to resolution or chronicity. In chronic HBV infection functional defects in both pDC and NK compartments have been reported. However, pDC-NK cross-talk and the mechanisms underlying these dysfunctions have yet to be elucidated. In this study, we investigated the pathophysiological role of pDCs from chronic HBV patients and the functional consequences on pDC-NK cross-talk. **Methods:** We studied the phenotype and function of pDCs from aviremic and viremic chronic HBV patients, and analyzed their ability to activate NK cells. **Results:** Circulating and hepatic pDCs show higher levels of activation in chronic HBV patients than in non-infected donors. pDC response to TLR9-L stimulation is impaired in chronic HBV patients irrespective of viral load. Interestingly, pDCs from viremic chronic HBV patients failed to trigger a normal NK cytolytic function after TLR9-L stimulation. This pDC-dependant NK dysfunction was related to impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs from viremic patients. The pDC subversion was related to high plasma IP-10 levels found in patients and viral load. **Conclusions:** pDCs from viremic chronic HBV patients are impaired at activating the cytolytic function of NK cells through an IP-10/OX40L/IFN $\alpha$ -dependant pathway. Through these insights into the mechanisms involved in immune dysfunction and impaired viral control in chronic HBV infection, we have taken a step closer to get on disease treatment.

**Keywords:** NK cell; OX40L; IP-10

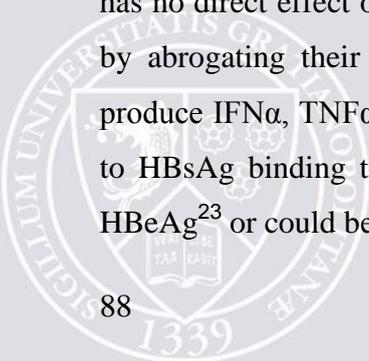


## Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infects about 350 million people worldwide and its control and eradication are considered a major public health challenge<sup>1,2</sup>. The pathophysiology of HBV infection is closely related to host immunity<sup>3-5</sup>. Patients who ultimately clear the virus elicit vigorous and efficient anti-viral immunity, involving multi-specific T-cell responses, a neutralizing humoral response and efficient NK cells. In contrast patients who go on to develop chronic infection only mount weak and dysfunctional immune responses. Immune control of chronic HBV infection appears to be essential for viral clearance and therapeutic success. The pathogenic mechanisms used by HBV to modulate the immune system remain largely unknown. To move closer to successful treatment of this disease, we must first characterize the mechanisms underlying impaired viral control and immunopathogenesis of chronic HBV infection<sup>6</sup>.

In the early stages of viral infection the immune responses elicited are believed to be critical determinants of subsequent disease outcome. Anti-viral immunity is largely controlled by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) through their ability to recognize viruses and activate both innate and adaptive immune responses<sup>7-9</sup>. These unique properties are linked to their ability to sense viral nucleic acids, single stranded RNA and unmethylated DNA motifs, through their expression of Toll-like receptors TLR7 and TLR9<sup>8,10,11</sup>. Following triggering of their TLR, pDCs produce large amounts of type I IFN and pro-inflammatory cytokines which can inhibit viral infection and modulate innate and adaptive anti-viral immunity<sup>12</sup>. In addition to direct detection of viruses, pDCs can capture and cross-present viral antigens from infected cells<sup>13-15</sup>. This allows them to induce virus-specific adaptive immune responses *in vitro*<sup>16</sup> and trigger CTL *in vivo* in response to viral infection<sup>17</sup>.

In many chronic viral infections, these crucial mediators eliciting cytotoxic effectors appeared to be defective<sup>18</sup>. In chronic HBV infection, the role of pDCs remains enigmatic and poorly explored<sup>19</sup> with conflicting results on circulating blood pDC numbers, which are variously shown to be unaffected<sup>20</sup> or decreased<sup>21</sup>. Nevertheless, functional impairments of pDCs in patients with chronic HBV infection have been reported<sup>22</sup>. Most studies indicate that HBV has no direct effect on pDCs. However the virus is suggested to actively alter pDC functions by abrogating their ability to upregulate the expression of co-stimulatory molecules and produce IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  and IP-10 upon stimulation with TLR9-L<sup>23</sup>. These effects could be due to HBsAg binding to the C-type lectin receptor BDCA2 on pDCs<sup>24</sup>, could be induced by HBeAg<sup>23</sup> or could be related to impaired TLR9 expression<sup>25</sup>.



Natural killer (NK) cells also play a pivotal role in anti-viral immunity through killing infected cells and activating other immune pathways<sup>26-28</sup>. In the context of HBV infection, NK cells contribute to controlling the virus in the early phases of infection and inducing subsequent adaptive immune responses through their cytolytic potential and production of cytokines<sup>29-31</sup>. Defects in activation and antiviral functions of NK cells have been described in chronic HBV patients<sup>32,33</sup>. Both could be reversed by reducing the viral load<sup>34</sup> or blocking immunosuppressive cytokines<sup>33</sup>. However, NK have also been shown to contribute to liver damage through TRAIL-mediated apoptosis of hepatocytes<sup>6,35</sup>. The basis for this controversial functional dichotomy of NK cells remains poorly understood<sup>32,36</sup>.

Interestingly, pDCs play an essential role in shaping NK-cell mediated immunity. Through type I IFN production, pDCs modulate NK activation, IFN $\gamma$  production and cytolytic activity<sup>37-39</sup>. TLR9-engaged pDCs have been shown to specifically enhanced NK cell activation and effector functions<sup>40</sup>. pDCs are also able to regulate NK cells activity through cell-cell contacts involving interactions between GITR and GITRL<sup>41</sup> or OX40 and OX40L<sup>42</sup>. NK cell activity can also be regulated through ICOS / ICOSL<sup>43</sup> and 4-1BB / 4-1BBL<sup>44</sup>. Activated NK cells reciprocate to induce pDC maturation and enhance IFN $\alpha$  production<sup>37,38</sup>. How chronic HBV infection affects relations between pDCs and NK cells has not been explored.

Thus pDCs, crucial mediators of effective NK- and CD8 T cell-based immune responses, may orient the outcome of the immune response upon HBV infection, resulting either in resolution or chronicity. It is essential to better understand the role played by pDCs in the development and control of chronic HBV infection if we are to identify the mechanisms used by HBV to escape elimination. Functional defects in both the pDC and NK cell compartments have been reported with HBV infection. However, pDC-NK crosstalk and the mechanisms involved in pDC and NK cell dysfunctions have yet to be addressed. In this article we investigated the pathophysiological role of pDCs from patients with chronic HBV infection for the first time. We also studied the functional consequences of these on subsequent pDC-NK crosstalk. Our results indicate that pDCs from viremic chronic HBV patients are poor activators of the NK cytolytic function through an OX40L/IFN $\alpha$ -dependant pathway. This dysfunction is related to high plasma IP-10 levels and HBV viral load. A better understanding of the mechanisms of immune dysfunction in chronic HBV infection will allow the development of new immunotherapeutic strategies for improved viral control and clearance.

## Experimental procedures

### Cell purification

This study was conducted according to a procedure approved by Grenoble University Teaching Hospital's (CHU-Grenoble) Comite de Protection des Personnes, and the French Blood Service's Institutional Review Board. All participants signed informed consent forms prior to participation. Blood samples were obtained from chronic HBV patients (101 in total, of which 64 were aviremic and 37 were viremic) and from healthy donors (114 in total). Exclusion criteria for this study included HIV, HCV or HDV co-infection, other liver diseases, and current treatment with interferon-alpha or immunosuppressive agents. PBMC were purified by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Eurobio). Sera were collected and stored frozen for later use. pDCs were purified from PBMC using the EasySep Human pDC enrichment kit (StemCell) (purity > 96%). NK cells were purified from PBMC using the EasySep Human NK enrichment kit (StemCell) (purity > 97%). Excess liver tissues not needed for diagnosis were obtained from 6 chronic HBV patients and 8 non-infected controls. Biopsies were reduced to cell suspensions using a potter. Clinical parameters are shown in Table 1.

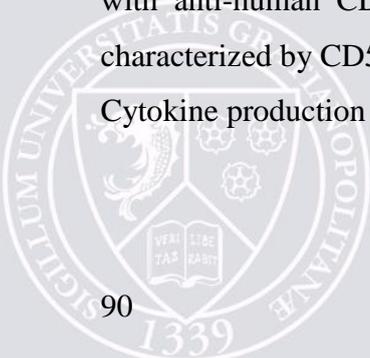
### Cell lines and reagents

All cultures were performed in RPMI1640-Glutamax supplemented with 1% non-essential amino acids, 100 µg/ml gentamycin, 10% FCS (Invitrogen) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). K562 cell line was purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France).

### Phenotypic analysis by flow cytometry

PBMC were stained with fluorochrome-labelled anti-human HLA-DR, Lin, OX40L, 4-1BBL, ICOS-L (BD Biosciences), BDCA2 (Miltenyi Biotec), CD123, CD40, CD86, CD62L (Beckman Coulter), GITR-L (R&D) Abs. Stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur and CellQuest software (BD). Cells derived from liver biopsies were stained with anti-human HLA-DR, BDCA2, CD40, CD86 Abs before flow cytometry analysis using a FACSCanto equipped with Diva software (BD). pDCs were defined as Lin- HLA-DR+ CD123+ cells or as HLA-DR+ BDCA2+ cells. NK cells were determined after staining with anti-human CD16, CD56, CD3 Abs (Beckman Coulter), the NK cell population is characterized by CD56+ CD3- labelling.

### Cytokine production



PBMC were cultured for 24 h with CpG<sub>A</sub> ODN-2336 (10 µg/ml, Coley Pharma) where indicated (see Figures). IFN $\alpha$  production was measured in culture supernatants by a Cytometric Bead Array assay (CBA, BD).

## pDC – NK cocultures and NK function measurements

Freshly purified pDCs from healthy donors or chronic HBV patients were co-cultured for 18 hours with heterologous NK cells purified from healthy donors at a ratio 1:10. CpG<sub>A</sub> ODN-2336 (1.5 µM, TipMolBiol) and/or rhIFN $\alpha$ A/rhIFN $\alpha$ 2 (2000 UI/ml each; PBL) and soluble human OX40L (100 ng/ml; R&D Systems) were added when indicated (see Figures). NK cells were also cultured alone as controls with rhIL-12 and rhIL-18 (50 ng/ml, R&D Systems) where indicated. In some experiments, pDCs purified from healthy donors were pre-incubated for 24 h with medium containing 50% plasma from healthy donors or 50% plasma from chronic HBV patients with a positive viral load ( $>8.6 \times 10^6$  IU/ml). Cytokine production (IFN $\gamma$ , granzyme B) was measured in the supernatants by CBA (BD). NK cell activation was measured by labelling cells with anti-human CD69, CD3, CD16 and CD56 Abs. NK cytotoxic activity was evaluated by CD107 degranulation assay. pDC-NK cocultures were washed, and NK cells were further co-cultured with K562 cells at a 5:1 ratio for 3 h. Anti-human CD107a and CD107b Abs (BD) (5 µl each) were added at the start of restimulation; GolgiSTOP (0.67 µl/ml) was added for the last 2 h. Cells were then labelled with anti-human CD3, CD16 and CD56 Abs before analysis by flow cytometry.

## Plasma cytokine concentrations

Plasma IP-10 concentrations in healthy donors and chronic HBV patients were determined by CBA (BD).

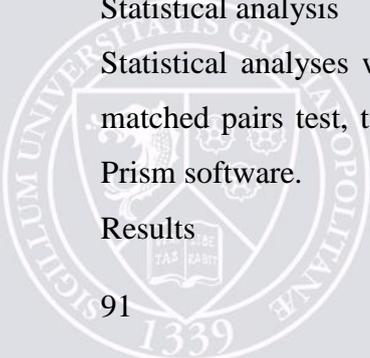
## Effect of IP-10 on pDCs

pDCs purified from healthy donors were cultured for 24 h in the presence or absence of rhIP-10 (R&D Systems) and in the presence of rhIL-3 (10 ng/ml, PeproTech). CXCR3 and OX40L expression on pDCs was assessed by flow cytometry.

## Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Mann-Whitney non parametric U test, Wilcoxon matched pairs test, two-way (RM, row matching) ANOVA and Spearman correlation using Prism software.

## Results



Circulating and hepatic pDCs show higher levels of activation in chronic HBV patients than in non-infected donors

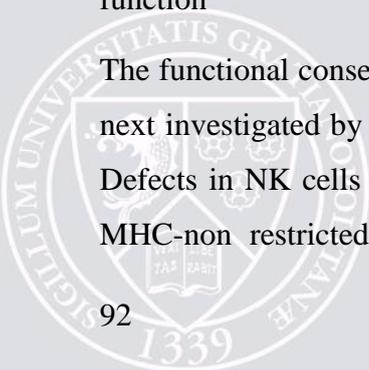
The effect of chronic HBV infection on proportions and activation phenotype for circulating and intra-hepatic pDCs was investigated. pDCs within PBMC and liver biopsies were identified by flow cytometry based on their lack of expression of Lin markers and their positivity for HLA-DR and CD123 or BDCA2 markers (Figure 1A). In terms of pDC proportions, no significant difference was observed between chronic HBV patients and non-infected donors (Figure 1B). However, analysis of co-activation molecules CD40 and CD86 (Figure 1C) showed that pDCs from blood and liver biopsies sampled from chronic HBV patients over-expressed both co-activation molecules compared to the pDCs sampled from non-infected controls (Figures 1D and 1E). Thus chronic HBV infection appears to induce a more activated pDC phenotype than that observed in non-infected donors.

pDC activation following TLR9-L stimulation is impaired in chronic HBV patients irrespective of viral load

The ability of pDCs to respond to TLR9-L stimulation and the influence of viral load on pDC functions were then analyzed. Upon stimulation with CpG-A, pDCs from chronic HBV patients did not upregulate the expression of the co-activation molecule CD40. This is in contrast with pDCs from healthy donors which upregulate CD40 after exposure to CpG-A (not shown). In addition, after the same stimulation protocol, IFN $\alpha$  secretion by pDCs from chronic HBV patients was impaired compared to secretion by pDCs from healthy donors (Figure 2). A similar level of impairment was observed for all viral loads. Thus, despite a higher basal activation status, pDCs from chronic HBV patients, whatever the viral load, have an impaired capacity to respond to TLR9-L stimulation.

CpG-matured pDCs from viremic chronic HBV patients are poor activators of NK cytotoxic function

The functional consequences of pDC differential state on subsequent immune responses were next investigated by assessing how well pDCs from chronic HBV patients activate NK cells. Defects in NK cells have been described in chronic HBV patients and NK cell activation is MHC-non restricted. We therefore used heterologous “healthy” NK cells purified from



healthy donors. NK cells up-regulate CD69 in response to CpGA-activated pDCs. There is no difference in CD69 upregulation when using pDCs isolated from chronic HBV patients or healthy donors (Figures 3A and 3B). Similarly, IFN $\gamma$  production by NK cells was effectively induced by pDCs from chronic HBV patients (Figure 3C, left). However, the cytolytic function of NK cells, as measured by granzyme B secretion (Figure 3C, right) and CD107 surface expression upon co-culture with the NK-sensitive K562 cell line (Figures 3D and 3E), was drastically impaired with pDC isolated from viremic chronic HBV patients compared to pDC from healthy controls and aviremic chronic HBV patients. After CpGA-activated pDCs stimulation, a mean percentage of CD107 surface expression on NK cells of  $28.5\pm 2.8$  was observed with healthy donors, with aviremic chronic HBV patients mean percentages were  $23.2\pm 1.6$ , while with viremic chronic HBV patients mean values were only  $13.2\pm 1.2$ . Thus CpG-matured pDCs from viremic chronic HBV patients activate the cytotoxic function of NK cells poorly.

Impaired OX40L expression by pDCs from chronic HBV patients correlates with the viral load

To further examine the differences between pDCs from chronic HBV patients and healthy donors, we analyzed the expression of co-stimulatory molecules involved in pDC-NK cross-talk or NK modulation, including 4-1BBL, ICOS-L, GITRL and OX40L (Supplementary Figure 1). Only OX40L was down-regulated on pDCs from chronic HBV patients compared to healthy donors (Figure 4A). Interestingly, pDCs from viremic chronic HBV patients had significantly lower OX40L levels than chronic HBV patients with an undetectable viral load (Figure 4A). The level of OX40L expression on pDCs was closely correlated with viral load (Figure 4B). Thus, circulating HBV virus impaired OX40L expression on blood pDCs from chronic HBV patients.

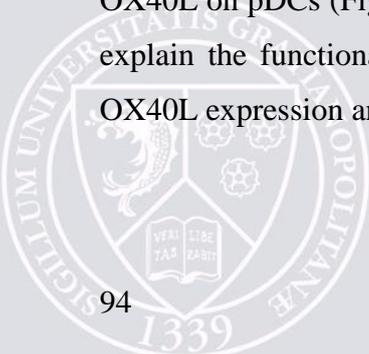
Impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs of chronic HBV patients are responsible for the failure of pDCs to activate NK cell cytotoxicity

To understand whether the defective IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs were responsible for impaired NK cell activation in chronic HBV infection, we performed pDC-NK co-cultures in presence or absence of rhIFN $\alpha$  and sOX40L. The functions of NK cells were then analyzed. NK cells were first stimulated with pDCs isolated from aviremic or viremic chronic HBV patients. rhIFN $\alpha$  and sOX40L added to pDC-NK co-cultures restored NK cell

secretion of granzyme B (Supplementary Figure 2B) and surface expression of CD107 in response to K562 stimulation (Figures 5A and 5B). This restoration was particularly evident when pDCs were isolated from viremic chronic HBV patients. With pDCs from both viremic and aviremic patients, NK cells were already able to secrete IFN $\gamma$  to similar levels; production was potentiated in the presence of rhIFN $\alpha$  and sOX40L (Supplementary Figure 2A). To confirm the importance of viral load in pDC-dependent NK dysfunction, we used “healthy” pDCs isolated from healthy donors. These cells were pre-incubated in the serum of healthy controls, aviremic or viremic chronic HBV patients before mixing with NK cells. In contrast to “healthy” pDCs pre-incubated with control serums, “healthy” pDCs cultured with serum from viremic chronic HBV patients were unable to trigger granzyme B secretion by NK cells (Figure S2D) or degranulation (Figures 5C and 5D). However both properties could be restored by adding rhIFN $\alpha$  and sOX40L to pDC-NK co-cultures (Figure 5). Thus, pDC-dependent NK dysfunction is related to impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs from chronic HBV patients.

High IP-10 levels in chronic HBV patients’ plasma may explain the impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by circulating pDCs

The reason for impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by blood pDCs in chronic HBV infection was further investigated. As “healthy” pDCs incubated in serum from chronic HBV patients with a positive viral load displayed the same behaviour as “chronic HBV” pDCs, we looked for factors present in the plasma that could be responsible for the pDC differential status. Interestingly a significantly higher level of IP-10 was detected in the plasma of chronic HBV patients compared to healthy donors (Figure 6A). To confirm the relationship between IP10 levels and pDC activity, we measured CXCR3 expression on pDCs. pDCs from chronic HBV patients displayed significantly lower CXCR3 levels than pDCs from healthy donors (Figure 6B). To investigate the effects of IP-10 on pDC properties, we cultured pDCs isolated from healthy donors with rhIP-10 and analyzed the modulation of their phenotype. Strikingly, culture with IP-10 caused down-regulation of both CXCR3 and OX40L on pDCs (Figure 6C). Thus high levels of plasma IP-10 in chronic HBV patients may explain the functional pDC defects observed, resulting for viremic patients in an impaired OX40L expression and subsequent defective pDC/NK interplay.



## Discussion

Immune control of chronic HBV infection is essential for viral clearance. But HBV has evolved mechanisms to modulate the immune system to escape this control. These pathogenic mechanisms remain largely unknown. Anti-viral immunity involves a number of cell types, among which pDCs play a critical role. We therefore explored the pathophysiological role of pDCs and the functional consequences on the subsequent pDC-NK cross-talk in chronic HBV infection. Our results reveal that pDCs from viremic chronic HBV patients are impaired at activating the cytolytic function of NK cells through an IP-10/OX40L/IFN $\alpha$ -dependant pathway. Our study provides important insights into HBV pathogenesis and the reasons for failure of effective immune responses.

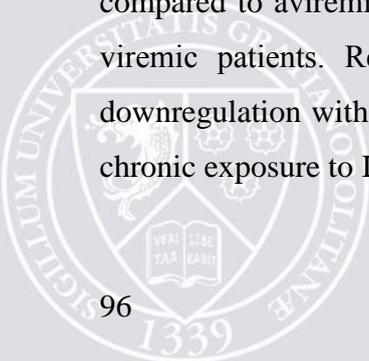
Our first analysis showed that proportions of freshly isolated circulating and intra-hepatic pDCs from chronic HBV patients and non-infected controls were similar. In contrast, the co-activation molecules CD40 and CD86 were over-expressed in chronic HBV patients compared to non-infected controls. This differential activation status was independent of patients' viral load (not shown). This lack of correlation between activation state and viremic status is in line with reports indicating that HBV does not directly activate pDCs<sup>23,24</sup>. Rather activation could be a signature of the primary encounter between pDCs and the virus. During acute HBV infection, pDCs accumulate in large numbers in the liver<sup>45,46</sup>, suggesting that they are involved at early stages of HBV infection. Because the immune responses elicited during the early stages of viral infection are believed to be critical determinants of subsequent disease outcome, the unique ability of pDCs to rapidly sense virus-infected cells and elicit anti-viral effectors also suggests a potential role in determining the outcome of HBV infection.

Functional defects in both the pDC and NK compartments have previously been reported in chronic HBV patients. However, neither the mechanism of these dysfunctions, nor the potential interplay between these two cell types has been fully investigated. In this article we show for the first time that pDCs from viremic chronic HBV patients are impaired at activating the cytolytic function of NK cells through an OX40L/IFN $\alpha$ -dependant pathway. OX40L expression levels on pDCs were strongly correlated with viral load, suggesting that pDC status is tightly linked to viral load. In line with these observations, it has been shown that reduced HBV DNA levels measured during successful treatment of patients with antiviral drugs partially restores numbers and function in circulating pDCs<sup>21</sup>. In cancer, TLR9-L activated pDCs were also shown to drive potent NK cell activation through an OX40L and

IFN $\alpha$  dependant mechanism, leading to T cell cross-priming and effective anti-tumor immune response<sup>42</sup>. In the context of chronic HBV infection, appropriate pDC-NK crosstalk may also be required to initiate the anti-viral response and resolve infection. Interestingly, OX40L and IFN $\alpha$  are also involved in pDC regulation of Th polarization<sup>47</sup>, while plasma cell differentiation and antibody responses are regulated through IFN $\alpha$  and IL6<sup>48</sup>. Defective pDCs from chronic HBV patients may also contribute to the failure to properly elicit other components of adaptive immune responses<sup>49</sup>, which is required for long-term viral control. Skewing pDCs may therefore be a strategy employed by HBV to escape immunity.

We found HBV virus to have no impact on the ability of pDCs to activate and elicit the non-cytolytic functions of NK cells. CD69 expression and IFN $\gamma$  secretion were similar for NK cells following coculture with pDCs from viremic or aviremic HBV patients. In contrast, defects in IFN $\gamma$  secretion but not cytotoxic NK function have been described in chronic HBV patients, when classified as Lo and Hi ALT<sup>32</sup>. The altered pDC-dependant cytotoxic NK function described here was only evident when patients were classed as viremic or aviremic. Thus differences in patients subgrouping may explain this apparent contradiction, as ALT and viral load are not linked. Interestingly, it has been observed that NK dysfunctions could be reversed by reducing viral load<sup>34</sup>. It has also been suggested that the level of HBV antigen may influence the dichotomic cytotoxic versus cytokine function of CD8 T cells<sup>50</sup>. Moreover, altered pDC-NK crosstalk has also been described in HIV1-infected patients<sup>51,52</sup>; like here the dysfunction in these patients is more intense in viremic than aviremic patients<sup>51</sup>.

Notably, seric factors appear to be involved in creating the impaired status of “chronic HBV” pDCs. This skewing could be reproduced by submitting “healthy” pDCs to plasma from viremic chronic HBV patients. Analysis of soluble plasma factors revealed an increased level of IP-10 in plasma and a concomitant decrease in expression of its receptor CXCR3 on pDCs from chronic HBV patients. This suggests that IP-10 may modulate pDCs. Lowered CXCR3 expression may be the result of down-modulation of the receptor due to chronic exposure to its ligand. These effects seem to be related to the viral load, as notable, although not significantly, higher IP-10 and lower CXCR3 levels were observed on pDCs from viremic compared to aviremic chronic HBV patients. OX40L expression was significantly higher in viremic patients. Remarkably, exposure of “healthy” pDCs to IP-10 provokes OX40L downregulation within 24h. This effect probably explains the reason for pDC skewing upon chronic exposure to IP-10 during HBV infection.



Our work reveals that HBV may escape immunity by modulating OX40L expression on pDCs through IP-10 and therefore impairing the subsequent NK cell cytolytic activity. pDCs may be the key controllers of the delicate balance between protective and pathogenic anti-viral responses following HBV infection. Interplay between pDCs and NK cells is likely to be important during the immune response to HBV infection. It may control the outcome of the response, leading either to clearance or chronicity. The data presented here provide new insights into the mechanisms by which HBV escapes antiviral immunity and will be a strong basis for developing novel immunotherapeutic approaches to treat this disease.

#### Figure legends

Figure 1. Higher activation levels in pDCs from blood and liver from chronic HBV patients compared to non-infected donors

pDC proportion and phenotype from PBMC and liver biopsies of chronic HBV patients or non-infected donors was analyzed by flow cytometry. (A) Gating strategy used to distinguish pDCs in blood and liver biopsies. (One representative HBV patient.) (B) Percentage of pDCs in blood and liver biopsies; open circles: non-infected donors (blood, n=25; liver, n=8); filled circles: chronic HBV patients (blood, n=27; liver, n=6). (C) Co-activation molecules CD40 and CD86 on pDCs from blood and liver. One representative HBV patient for each sample (gated on HLA-DR<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup> cells). (D,E) Percentage of pDCs expressing co-activation molecules CD40 and CD86 in blood (D) (non-infected donors, n=22; chronic HBV patients, n=27) and liver (E) (non-infected donors, n=8; chronic HBV patients, n=5). Horizontal bars indicate mean values.

Figure 2. CpG-matured pDCs from viremic chronic HBV patients inefficiently trigger NK cell cytotoxicity

pDCs isolated from healthy donors, aviremic and viremic chronic HBV patients were co-cultured with heterologous NK cells for 18 h in the presence or absence of CpG<sub>A</sub>. (A, B) CD69 expression as measured by flow cytometry on CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells. (A) One representative healthy donor and one representative chronic HBV patient (gated on CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells). (B) Percentage of CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells expressing CD69 (healthy donors,

n=8; aviremic chronic HBV patients n=7; viremic chronic HBV patients, n=5). (C) IFN $\gamma$  and granzyme B secretion as measured by CBA (healthy donors, n=16; aviremic chronic HBV patients, n=34; viremic chronic HBV patients, n=19). (D,E) NK cells were further co-cultured with K562 for 3 h before measuring CD107 surface expression. (D) Representative flow cytometry profiles (gated on CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells). (E) Percentage of CD107<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells (healthy donors, n=16; aviremic chronic HBV patients, n=35; viremic chronic HBV patients, n=18). P values were calculated using the two way RM ANOVA test (straight line) or the Mann-Whitney test (dotted lines).

Figure 3. Impaired pDC activation in response to TLR9-L stimulation in chronic HBV patients irrespective of viral load

PBMC from healthy donors or chronic HBV patients were stimulated with CpG<sub>A</sub> for 24 h. IFN $\alpha$  secretion was measured by CBA in culture supernatants. Open symbols: healthy donors (n=12); Grey symbols: aviremic chronic HBV patients (n=7); Black symbols: viremic chronic HBV patients (n=10). P values were calculated using the two way RM ANOVA test.

Figure 4. Impaired OX40L expression by pDCs from viremic chronic HBV patients correlates with viral load

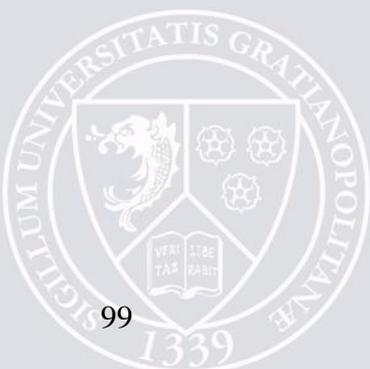
Expression of the co-stimulatory molecules 4-1BBL, ICOS-L, GITRL and OX40L by blood pDCs from healthy donors or chronic HBV patients was determined by flow cytometry. (A) Percentages of pDCs expressing 4-1BBL, ICOS-L, GITRL and OX40L within PBMC. Open circles: healthy donors (n=9); Grey circles: aviremic chronic HBV patients (n=11); Black circles: viremic chronic HBV patients (n=8). P values were calculated using the Mann-Whitney test (dotted lines). (B) Correlation between OX40L expression levels on pDCs and viral load (n=18 chronic HBV patients, Spearman correlation).

Figure 5. IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs mediate activation of NK cell cytotoxicity

(A,B) pDCs purified from aviremic or viremic chronic HBV patients were co-cultured with heterologous NK cells for 18 h. CpG<sub>A</sub> and/or rhIFN $\alpha$  and sOX40L were added to cultures where indicated. NK cells were further co-cultured with K562 for 3 h before measuring CD107 surface expression by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry profiles from aviremic and viremic chronic HBV patients (gated on CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells). (B)

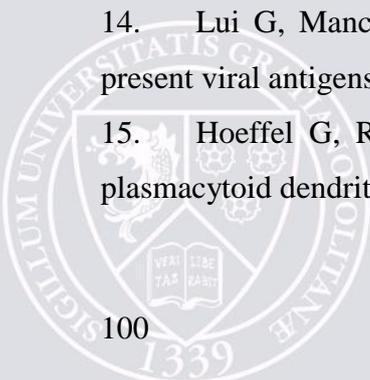
Percentages of CD107<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells obtained in aviremic chronic HBV patients (n=22) and viremic chronic HBV patients (n=10). (C,D) pDCs were purified from healthy donors and incubated for 24 h in the presence of plasma from healthy donors, aviremic or viremic chronic HBV patients. pDCs were then co-cultured with heterologous NK cells for 18 h. CpG<sub>A</sub> and/or rhIFN $\alpha$  and sOX40L were added where indicated. NK cells were further co-cultured with K562 for 3 h before measuring CD107 surface expression by flow cytometry. (C) Representative flow cytometry profiles (gated on CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells). (D) Percentages of CD107<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells obtained with 8-13 healthy donors for each condition. P values were calculated using the two way RM ANOVA test (straight line) or the Mann-Whitney test (dotted lines).

Figure 6. High plasma IP-10 concentrations in viremic chronic HBV patients may explain OX40L downregulation on circulating pDCs and the subsequent impaired pDC/NK interplay (A) Plasma IP-10 concentration was measured in healthy donors (n=25), aviremic chronic HBV patients (n=19) and viremic chronic HBV patients (n=19). P values were calculated by one way ANOVA. (B) CXCR3 expression on pDCs within PBMC from healthy donors (n=14), aviremic chronic HBV patients (n=11) and viremic chronic HBV patients (n=5) was measured by flow cytometry. Statistical significance was determined using Mann-Whitney t test. (C,D) pDCs were purified from healthy donors and cultured for 24 h in the presence of rhIP-10 (0-5000 ng/ml). (C) IFN $\alpha$  and OX40L expression on pDCs measured by flow cytometry, and expressed as a percentage of modulation compared to control conditions (p values calculated using one way ANOVA).

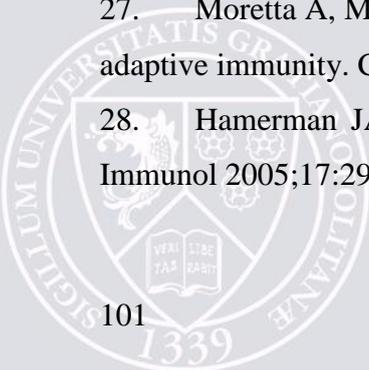


## References

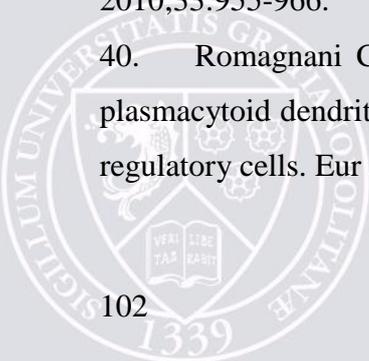
1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:245-253.
2. Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2009;15:3099-3105.
3. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50.
4. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
5. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
6. Das A, Maini MK. Innate and adaptive immune responses in hepatitis B virus infection. *Dig Dis* 2010;28:126-132.
7. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005;17:253-261.
8. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-1226.
9. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011;29:163-183.
10. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594-606.
11. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:221-229.
12. Durbin JE, Fernandez-Sesma A, Lee CK, et al. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol* 2000;164:4220-4228.
13. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29:352-361.
14. Lui G, Manches O, Angel J, et al. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One* 2009;4(9):e7111.
15. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007;27(3):481-92.



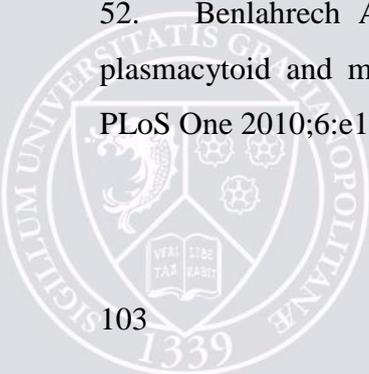
16. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101:3520-3526.
17. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, et al. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* 2004;104:1808-1815.
18. Zhang Z, Wang FS. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2005;2:411-417.
19. Woltman AM, Boonstra A, Janssen HL. Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardian angels? *Gut* 2010;59:115-125.
20. Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, et al. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 2008;151:61-70.
21. Duan XZ, Wang M, Li HW, et al. Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J Clin Immunol* 2004;24:637-646.
22. van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004;40:738-746.
23. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, et al. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011;6:e15324.
24. Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009;46:2640-2646.
25. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2011;6(10):e26315.
26. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* 2008;8:259-268.
27. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, et al. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 2008;15:226-233.
28. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005;17:29-35.



29. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 2009;58:974-982.
30. Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:798-802.
31. Li J, Han Y, Jin K, et al. Dynamic changes of cytotoxic T lymphocytes (CTLs), natural killer (NK) cells, and natural killer T (NKT) cells in patients with acute hepatitis B infection. *Virology* 2011;8:199.
32. Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. *Eur J Clin Invest* 2010;40:851-863.
33. Peppas D, Micco L, Javaid A, et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001227.
34. Tjwa ET, van Oord GW, Hegmans JP, et al. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2010;54:209-218.
35. Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, 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.
36. Chen Y, Wei H, Gao B, et al. Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. *J Viral Hepat* 2005;12:38-45.
37. Della Chiesa M, Romagnani C, Thiel A, et al. Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. *Blood* 2006;108:3851-3858.
38. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 2005;174:727-734.
39. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, et al. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 2010;33:955-966.
40. Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, et al. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2452-2458.



41. Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, et al. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 2006;107:3617-3623.
42. Liu C, Lou Y, Lizee G, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165-1175.
43. Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol* 2002;169:3676-3685.
44. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2010;115:3058-3069.
45. Zhang Z, Chen D, Yao J, et al. Increased infiltration of intrahepatic DC subsets closely correlate with viral control and liver injury in immune active pediatric patients with chronic hepatitis B. *Clin Immunol* 2007;122:173-180.
46. Zhang Z, Zou ZS, Fu JL, et al. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Hepatol* 2008;49:396-406.
47. Ito T, Amakawa R, Inaba M, et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 2004;172:4253-4259.
48. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225-234.
49. Hong J, Gong ZJ. Human plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection induce the generation of a higher proportion of CD4(+) and CD25(+) regulatory T cells compared with healthy patients. *Hepatol Res* 2008;38:362-373.
50. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, et al. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 2007;81(6):2940-9.
51. Reitano KN, Kottlil S, Gille CM, et al. Defective plasmacytoid dendritic cell-NK cell cross-talk in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:1029-1037.
52. Benlahrech A, Gotch F, Kelleher P, et al. Loss of NK stimulatory capacity by plasmacytoid and monocyte-derived DC but not myeloid DC in HIV-1 infected patients. *PLoS One* 2010;6:e17525.



## Acknowledgments

We are grateful to C. Morand, I. Michaud, F. Bernard and their staff at EFS Rhone-Alpes for providing blood samples. We would like to thank A. Cheveau for providing patients clinical data. We are indebted to the healthy volunteers and patients who agreed to participate in this study.

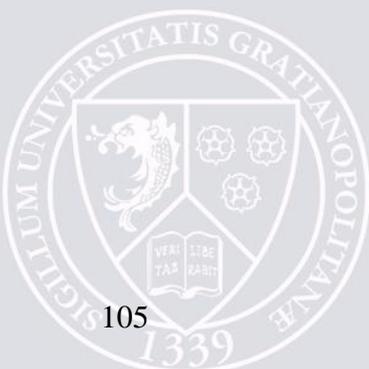


**Supplementary Figure Legends****Supplementary Figure 1. pDC expression of costimulatory molecules**

Expression of the co-stimulatory molecules 4-1BBL, ICOS-L, GITRL, OX40L by pDCs from healthy donors (left panels) or chronic HBV patients (right panels) was measured by flow cytometry (gated on HLA-DR<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup> cells).

**Supplementary Figure 2. IFN $\gamma$  and granzyme B secretion by NK cells in response to pDC stimulation**

(A,B) pDCs purified from aviremic or viremic chronic HBV patients were co-cultured with heterologous NK cells for 18 hours in the presence of CpG<sub>A</sub> and/or rhIFN $\alpha$  and sOX40L where indicated. Supernatants were harvested and assayed by CBA for (A) IFN $\gamma$  and (B) granzyme B. (C,D) pDCs were purified from healthy donors and incubated for 24 h in plasma from healthy donors, aviremic or viremic chronic HBV patients. Cells were then co-cultured with heterologous NK cells for 18 h in the presence of CpG<sub>A</sub> and/or rhIFN $\alpha$  and sOX40L where indicated. Supernatants were harvested and assayed by CBA for (C) IFN $\gamma$  and (D) granzyme B. P values were calculated using the two way RM ANOVA test.



Table

Table 1

Clinical characteristics for the chronic HBV patients used in this study

	PBMC		biopsies
	aviremic	viremic	
n	64	37	6
Age (Years)	53±11	49±11	48±3
Gender (% M/F)	78/22	70/30	60/40
Viral load (IU/ml)	0	$3.6 \times 10^6 \pm 6.3 \times 10^6$	2629±2430
ALT level (IU/ml)	36±10	53±27	47±12

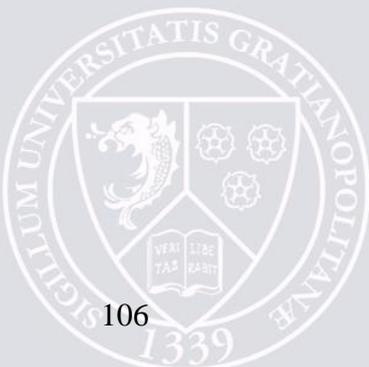
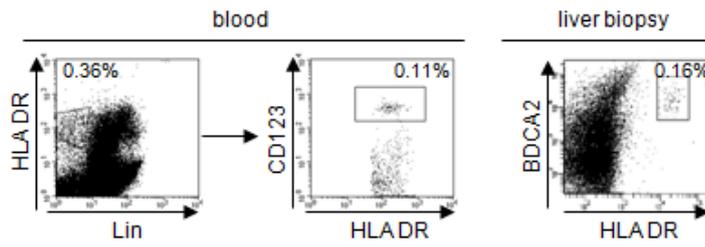
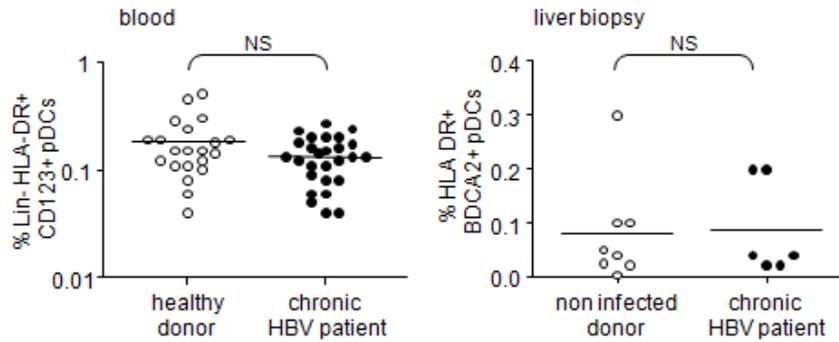


Figure 1

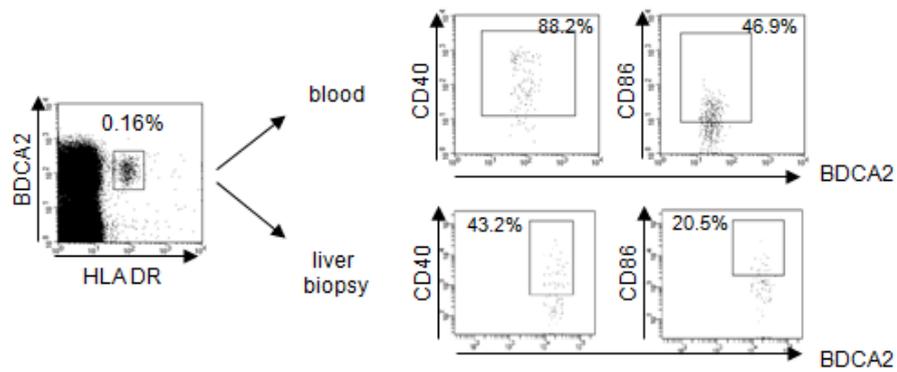
A



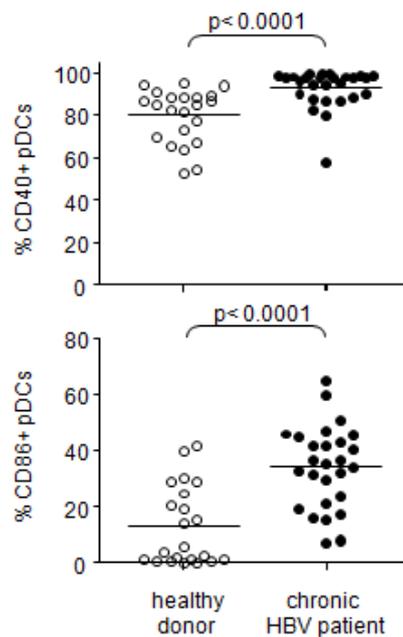
B



C



D



E

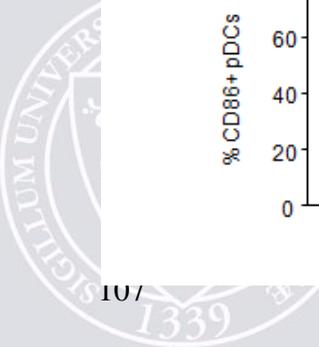
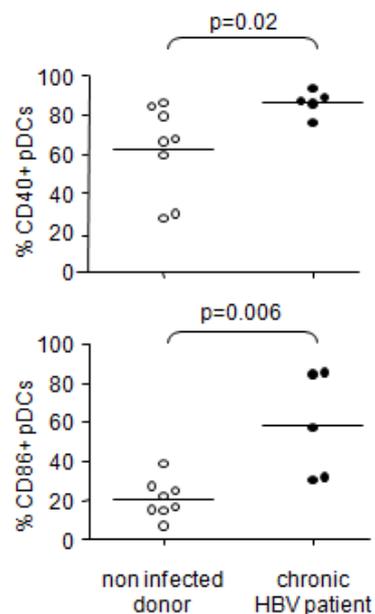


Figure 2

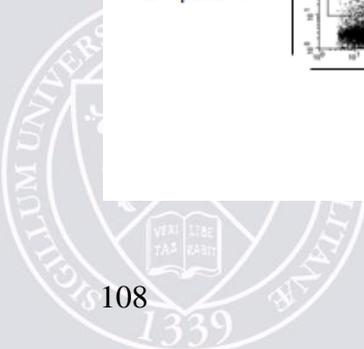
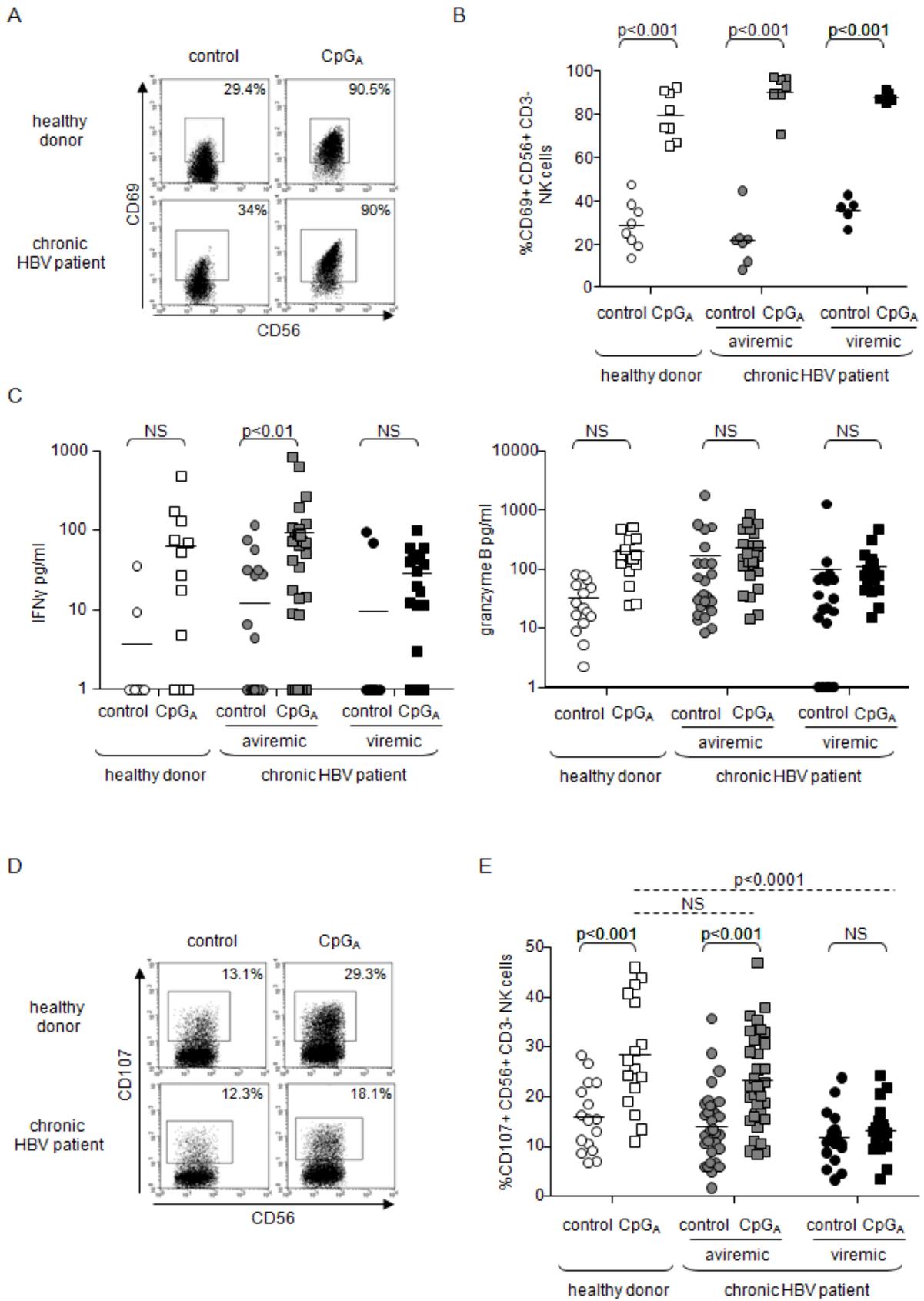
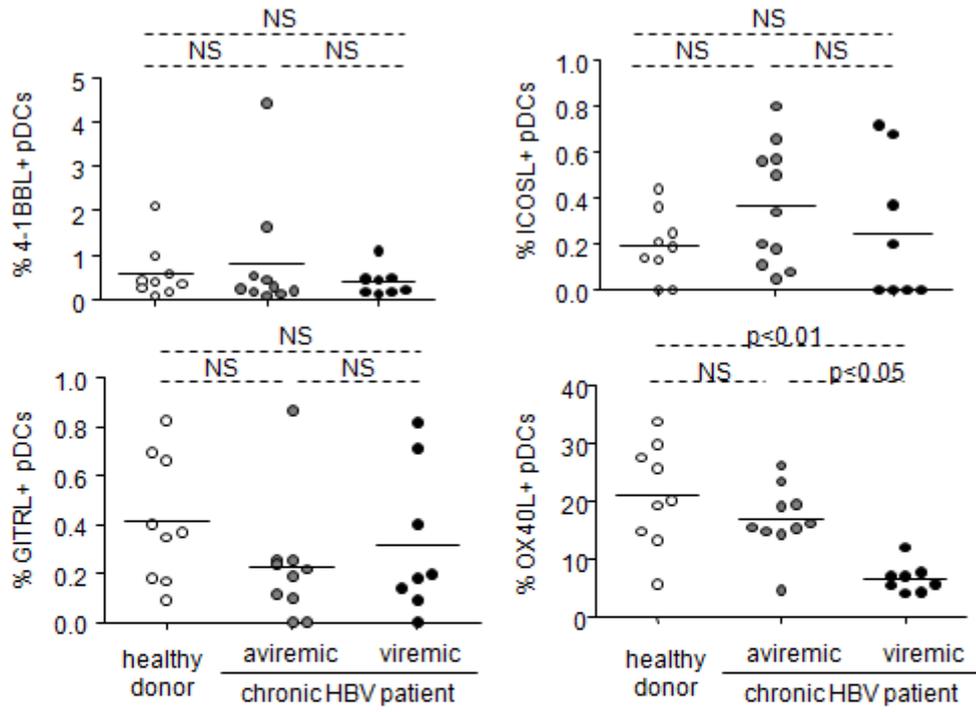




Figure 4

A



B

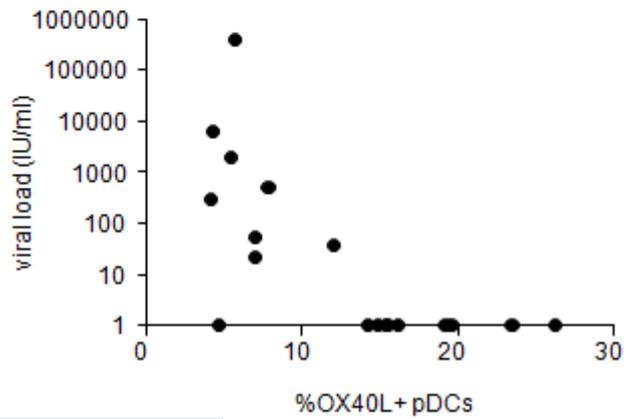
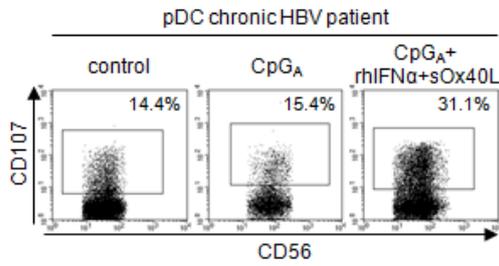
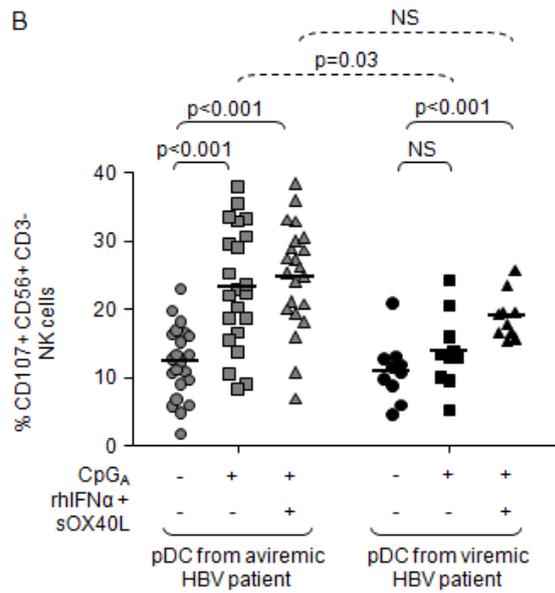


Figure 5

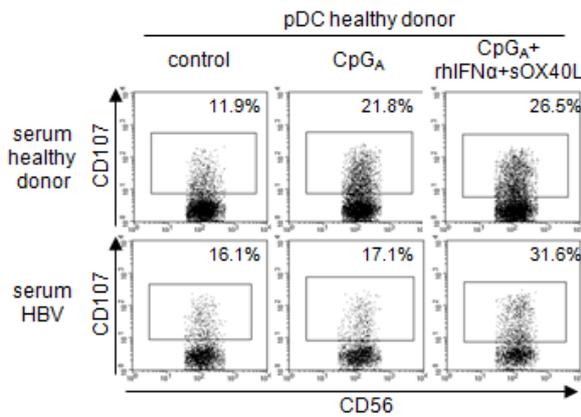
A



B



C



D

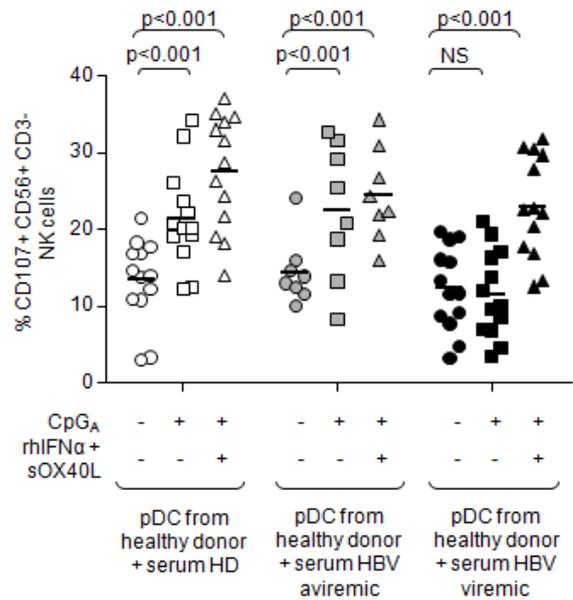
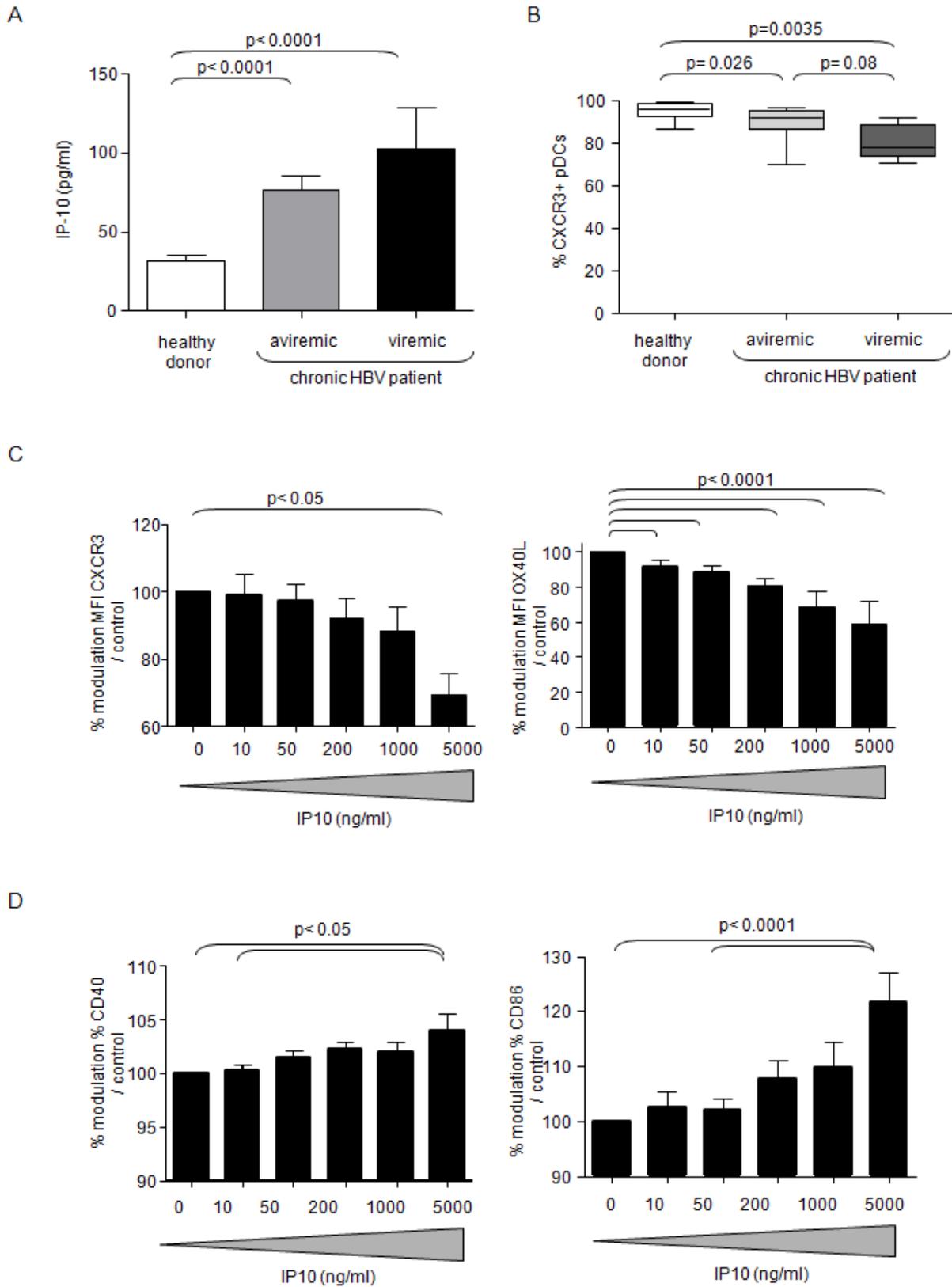
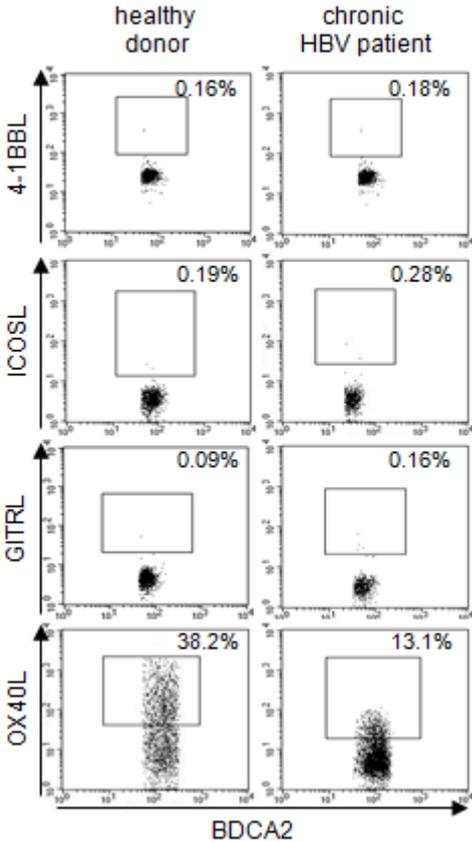


Figure 6

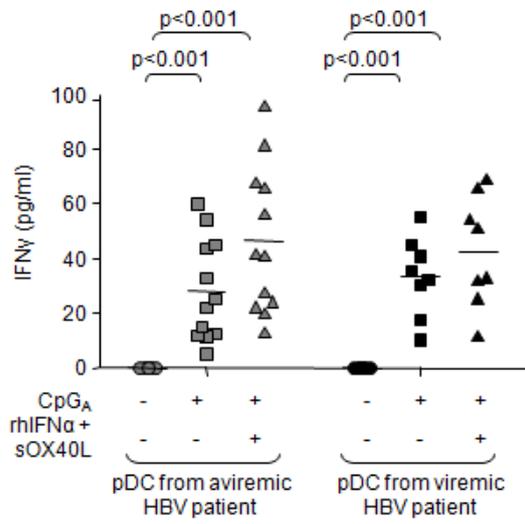


Supplementary figure 1

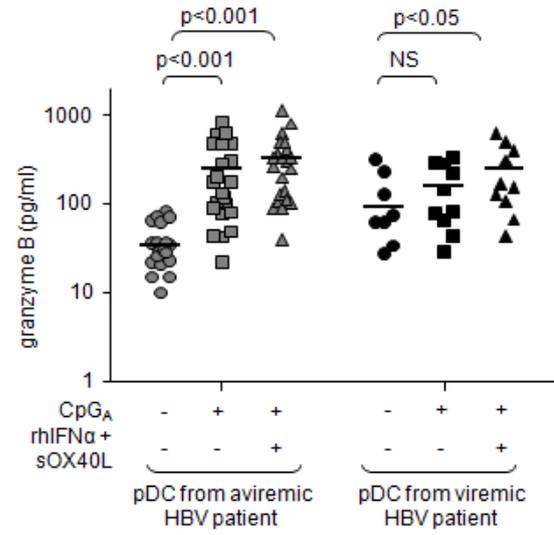


Supplementary figure 2

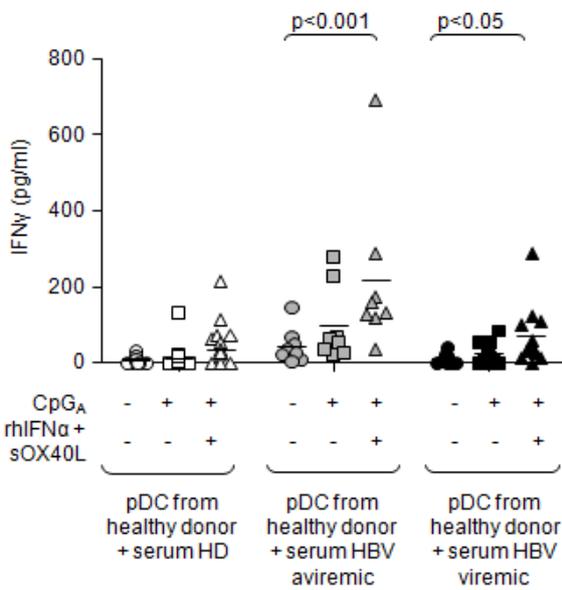
A



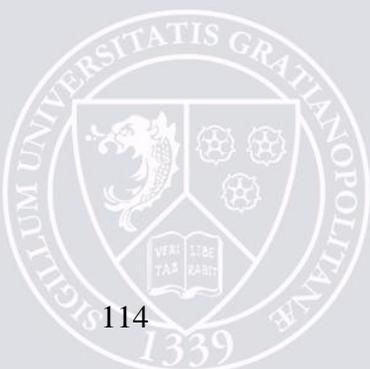
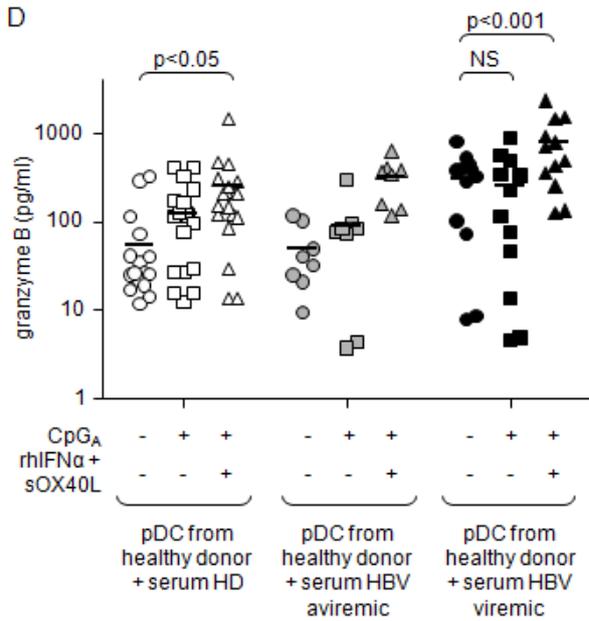
B



C



D



## C Résultats complémentaires

Nous avons démontré que les pDCs de patients hépatite B chronique expriment un niveau d'activation et une capacité à répondre aux ligands de TLR9 modifié par rapport aux pDCs de donneurs sains. Pour mieux comprendre les conséquences de ces modifications de la pDC chez les patients sur le système immunitaire, nous avons évalué si la stimulation des lymphocytes T CD4 par des pDCs de patients pouvait induire une polarisation cytokinique particulière, comme cela a déjà été démontré dans d'autres situations.

## D Matériel et méthode

En plus des différentes expériences décrites dans l'article 2, nous avons effectué les expériences suivantes :

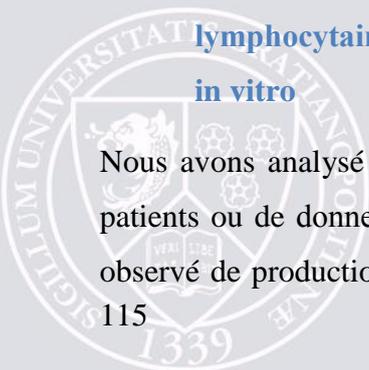
### Analyse de l'orientation de la réponse lymphocytaire T CD4 par les pDCs issues de patients hépatite B chronique après stimulation

Des pDCs de patients hépatite B chronique ou de donneurs sains ont été purifiées selon la technique décrite dans l'article 2 et mis en culture en présence de lymphocytes T CD4 naïfs purifiés à partir de sang de cordon avec le kit *easysep Human naive CD4 T cell* (StemCell) (pureté>96%). Après 5 jours de co-culture, différentes cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) ont été dosées dans le surnageant par la technique Cytometry Bead Array (CBA BD) soit directement soit après restimulation par un mélange de PMA (50ng/ml) et d'Ionomycine (0,5 $\mu$ g/ml) afin de connaître le profil des lymphocytes T (Th1, Th2...).

## E Résultats

### Les pDCs de patients hépatite B n'orientent pas les réponses lymphocytaires T CD4 vers un profil cytokinique particulier (Th1, Th2, Treg...) *in vitro*

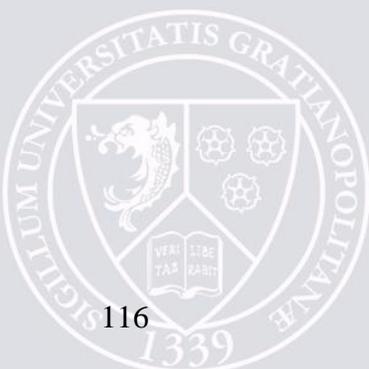
Nous avons analysé le profil cytokinique de lymphocytes T naïfs en présence de pDCs de patients ou de donneurs sains tout d'abord sans stimulation particulière et nous n'avons pas observé de production importante de cytokines dans les deux cas (<100pg/ml en général) ni



de profil particulier. Dans un deuxième temps, nous avons analysé la même expérience après restimulation non spécifique des lymphocytes T naïfs par un mélange PMA/ionomycine. Nous avons observé une augmentation importante de la production des différentes cytokines (à l'exception des IL-5, IL-6 et IL-17) en présence des pDCs de patients et de donneurs sains. Nous n'avons pas observé de différence significative pour les cytokines IL-2, IL-8, IL-10, IL-13, IL-21, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  produites en présence de pDCs issues de patients VHB ou de pDCs issues de donneurs sains ou sans pDCs.

Ces résultats ne nous permettent pas de définir un profil cytokinique particulier des lymphocytes T qui serait induit par la pDC chez les patients atteints d'hépatite B.

Les patients hépatite B chronique ont des pDCs phénotypiquement différentes des donneurs sains. L'une des conséquences possible de la modification des pDCs de patients aurait pu être l'induction d'une réponse lymphocytaire TCD4 particulière (TH1, TH2, Treg) qui aurait pu expliquer en partie comment le VHB parvient à échapper au système immunitaire et à passer en phase chronique. Au vu de nos résultats in vitro, les pDCs de patients hépatite B chronique ne modifient pas la polarisation des lymphocytes T CD4, les modifications sur les pDCs de patients pourraient donc jouer sur d'autres mécanismes comme le cross-talk pDC/NK, les NK de patients hépatite B chronique ayant été décrits comme moins fonctionnels.



## F Schéma récapitulatif

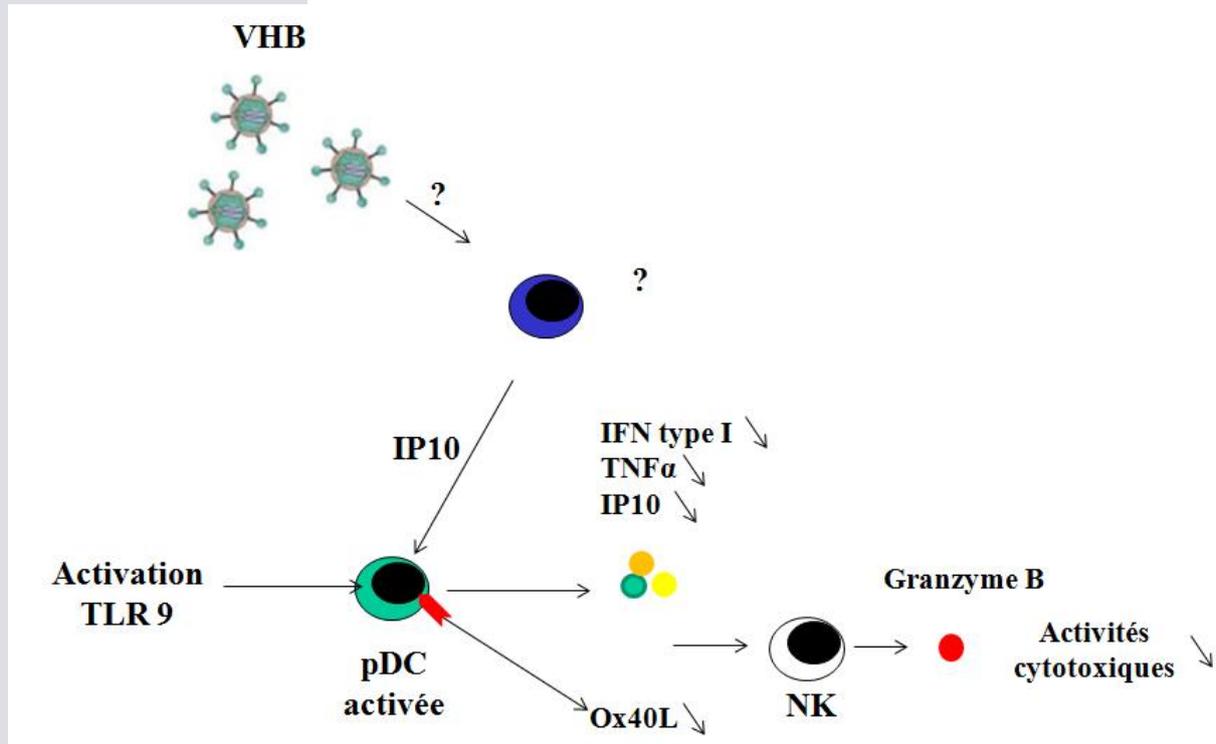


Figure 20. Rôle physiopathologique des pDCs dans l'infection par le VHB.

L'IP10, retrouvé en quantité plus importante dans le plasma des patients atteints d'hépatite B chronique, semble capable de diminuer l'expression d'Ox40L et la production d'IFN de type I par les pDCs. Les pDCs de patients hépatite B chronique ne sont plus capables après une stimulation TLR9 de produire de grandes quantités d'IFN de type I. On retrouve ainsi chez les patients hépatite B chronique une perturbation du cross-talk pDC/NK liée à la diminution de la production d'IFN de type I et la plus faible expression d'Ox40L par la pDC limitant l'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK. Cette perturbation du cross-talk pDC/NK pourrait expliquer en partie comment le VHB est capable d'échapper au système immunitaire.

**DISCUSSION**



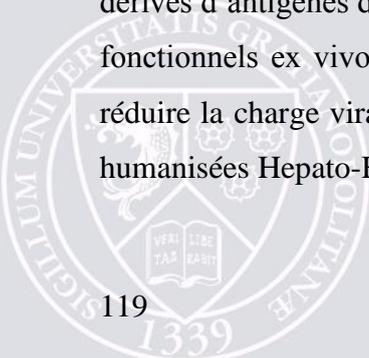
## Discussion

L'hépatite B est une infection virale chronique dont les mécanismes physiopathologiques sont fortement liés à l'immunité de son hôte. Le VHB est capable d'échapper au système immunitaire pour se développer de manière chronique, et les signes cliniques de la maladie sont liés à une activation inappropriée de l'immunité. Les pDCs sont des cellules spécialisées dans l'immunité antivirale de par leurs capacités de reconnaissance des motifs viraux (TLR7 et 9), de production d'IFN de type I et de présentation de l'antigène. Elles jouent un rôle important au cours des infections virales, mais n'ont encore été que peu étudiées au cours du VHB.

Pour mieux comprendre le rôle des pDCs dans l'hépatite B ainsi que leur potentiel thérapeutique, nous avons au cours de cette étude analysé la capacité d'une lignée de pDCs à stimuler l'immunité lymphocytaire T CD8 spécifique du VHB in vitro et in vivo. Nous avons aussi étudié in vitro les interactions entre la pDC et le VHB ainsi que les modulations fonctionnelles des pDC et les conséquences que cela induit, en particulier dans le cross-talk PDC/NK.

### 1 Potentiel thérapeutique des pDCs dans l'hépatite B

Les thérapeutiques antivirales actuelles utilisées dans l'hépatite B ont pour but de réduire la prolifération du virus en ciblant les protéines du cycle virale, mais ne sont pas capables d'éliminer définitivement le virus. La résolution de l'infection par le VHB requiert l'élimination du virus (sous forme de cccDNA) des hépatocytes infectés ou la lyse de ces cellules par les lymphocytes T spécifiques du virus. Les pDCs sont d'importantes cellules présentatrices de l'antigène, et sont surtout capables de produire de grandes quantité d'IFN de type I lors des pathologies virales. Au cours de notre étude, nous avons démontré qu'une lignée de pDC HLA-A\*0201 irradiée et chargée avec des peptides HLA-A\*0201 restreints dérivés d'antigènes du VHB était capable d'amplifier des lymphocytes T spécifiques du virus, fonctionnels ex vivo. De plus, nous avons pu démontrer l'efficacité de la lignée de pDC à réduire la charge virale et éliminer les hépatocytes infectés in vivo dans un modèle de souris humanisées Hepato-HuPBL.



Efficacité de la stratégie basée sur les pDCs par rapport aux stratégies d'immunothérapies existantes

Dans l'article 1, nous avons vu que la lignée de pDC était capable d'amplifier des lymphocytes T spécifiques du VHB ex vivo à partir de PBMC ou de LIL issus de patients atteints d'hépatite B chronique et ce, alors que les lymphocytes T spécifiques du VHB intra-hépatiques ont été décrits comme étant dans un état d'exhaustion chez les patients atteints d'hépatite B chronique<sup>54</sup>. De plus, la lignée de pDC a induit une plus grande amplification de lymphocytes T spécifiques de l'antigène HBc que l'utilisation du peptide HBc seul ex vivo, et une stimulation immunitaire plus rapide que lors de l'utilisation de mDCs où des niveaux similaires de lymphocytes T spécifiques ont été obtenus mais après 3 semaines de stimulation<sup>88</sup>. Nous avons aussi testé la capacité de la lignée de pDC à induire des cellules T CD8 spécifiques d'autres peptides immuno-dominants issus des autres antigènes de HBV : HBs (335-343) et pol (575-583). Nous avons obtenu une amplification de lymphocytes T anti-HBs chez le patient HBV résolu et chez 1 patient HBV chronique sur 65 testés, et nous n'avons pas pu amplifier de cellules T spécifiques de pol dans aucun groupe. Ceci pourrait être lié à un niveau trop faible de précurseurs T spécifiques présents dans les PBMC initiaux. En effet la fréquence basale de lymphocytes T spécifiques de HBc (18-27) chez les patients HBV chroniques est de 0,032% alors qu'elle est de 0,024% pour les lymphocytes T spécifiques de HBs. Afin d'augmenter l'efficacité de la stratégie, nous pourrions la combiner avec le blocage de PD-1, le blocage de la protéine Bim, l'addition d'arginine ou la déplétion des lymphocytes T régulateurs. Comme nous l'avons vu précédemment, tous ces mécanismes sont associés à l'échappement du virus à l'immunité lymphocytaire T, leur blocage pourrait donc renforcer l'amplification des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB par la lignée de pDC.

### **Intérêts et limites du modèle Hepato-HuPBL**

Afin de pouvoir tester la stratégie thérapeutique utilisant la lignée de pDC, nous avons développé un modèle de souris humanisées transplantées avec des hépatocytes humains produisant du VHB. Les modèles existants (souris transgéniques ou chimériques) se révèlent peu adaptés pour tester une immunothérapie. En effet, il est nécessaire d'être dans le contexte d'un système immunitaire humain, dans un modèle d'infection le plus proche possible de celui retrouvé chez l'homme pour obtenir des résultats possiblement le plus transposables à l'homme. Les modèles déjà existants, bien qu'intéressants pour évaluer le virus in vivo, sont limités quand à l'évaluation des immunothérapies. Ainsi, les modèles de souris trimera et

uPA-SCID transplantés avec des hépatocytes humains<sup>91, 92</sup> ne possèdent pas de système immunitaire humain, les souris transgéniques VHB<sup>93</sup> sont réduites au contexte murin alors que les souris transgéniques HLA-A\*0201<sup>94</sup>, bien qu'ayant permis la découverte des épitopes du virus, ne permettent pas l'évaluation d'immunothérapies. Le modèle de souris hepato-HuPBL que nous avons développé nous a permis de démontrer que la stratégie thérapeutique utilisant la lignée de pDCs comme vaccin, permettait de restaurer une immunité lymphocytaire T spécifique contre le VHB et fonctionnelle, capable à la fois de lyser les hépatocytes infectés et de réduire la charge virale dans le contexte d'un système immunitaire humain et d'hépatocytes humains transfectés par le virus. De plus, ce modèle qui a démontré son utilité lors de cette étude, pourrait être utilisé pour permettre le développement d'autres immunothérapies anti-VHB.

Cependant, ce modèle nécessite des quantités importantes de PBMC ( $50.10^6$  par souris). Pour des raisons éthiques, nous avons pu utiliser seulement des PBMC issus de patients HBV résolus. Il aurait été cependant très intéressant de pouvoir tester in vivo la capacité de la lignée de pDC à induire une réponse T spécifique de HBV dans des souris reconstituées avec des PBMC de patients HBV chroniques, HBeAg négatifs ou positifs, afin de valider nos observations in vitro. De plus, pour analyser l'efficacité thérapeutique de la stratégie, nous avons transplanté par voie sous-cutanée une lignée d'hépatocytes humains transfectée ou non avec HBV. Ceci nous a permis de suivre directement le développement de la lignée, cependant cette situation ne reflète pas complètement la situation des patients où les cellules infectées se trouvent dans le foie. Nous n'avons donc pas pu évaluer l'effet bystander toxique des CTL induits sur les hépatocytes environnants normaux.

### **Paramètres cliniques et réponse à l'immunothérapie**

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que le statut HBe et le taux de lymphocytes T régulateurs des patients atteints d'hépatite B chronique jouent un rôle important dans la réponse à la stimulation par la lignée de pDC. Le rôle de l'antigène HBe a été décrit dans la littérature comme celui d'un immunomodulateur capable d'inhiber la réponse lymphocytaire T anti-HBc<sup>208</sup>. Ainsi, dans un autre essai de thérapie anti-VHB utilisant des mDCs comme cellules présentatrices de l'antigène, les réponses lymphocytaires T ont été retrouvées plus forte chez les patients HBe négatifs par rapport aux réponses chez les patients HBe positifs<sup>90</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle dans l'évolution vers la chronicité de l'hépatite B de par leur capacité à inhiber les lymphocytes T spécifiques du virus<sup>58</sup>. Nos résultats vont dans le sens d'un rôle

immunomodulateur de ces deux éléments et confirme que ce sont des facteurs critiques quand à la possible efficacité d'une immunothérapie anti-VHB utilisant les pDCs. Il semble donc qu'une immunothérapie utilisant la lignée de pDC serait le plus efficace chez des patients de statut HBe négatif, possédant un niveau de lymphocytes T régulateurs faible. Il serait au vu de ces résultats très intéressant d'approfondir l'étude des mécanismes par lesquels l'antigène HBe peut moduler l'activation des lymphocytes T par les pDCs. Afin de confirmer le rôle de l'antigène HBe, il serait tout d'abord possible de vérifier si les patients répondeurs deviennent non répondeurs en présence de l'antigène HBe. Il pourrait aussi être intéressant d'évaluer si l'antigène HBe peut modifier la polarisation des lymphocytes T CD4 vers une voie particulière (TH1, TH2, Treg...) ainsi que l'expression des différentes molécules de co-stimulation afin de mieux comprendre comment l'antigène HBe peut inhiber la capacité des lymphocytes T CD8 à répondre à une stimulation par la lignée de pDCs. L'antigène HBe pourrait aussi avoir un effet inhibiteur direct sur la lignée de pDC inhibant ses capacités à induire une réponse T spécifique.

## **Potentiel d'utilisation de GENiusVac en thérapie chez les patients atteints d'hépatite B chronique**

Nous avons donc pu démontrer que la lignée de pDC pouvait être utilisée comme immunothérapie dans un modèle expérimental d'infection par le VHB. Ce type d'immunothérapie ayant pour but de restaurer l'immunité lymphocytaire anti-VHB a déjà été testé avec des mDCs et a montré son innocuité<sup>90</sup>. La réponse lymphocytaire T est décrite comme nécessaire pour l'élimination du VHB, mais aussi comme étant à l'origine de la lyse hépatique lors de l'hépatite B, ce qui pourrait conduire à un effet délétère de l'immunothérapie. Néanmoins, il a été décrit dans certaines situations une forte réponse lymphocytaire T cytotoxique sans lésions hépatiques<sup>24</sup> qui semble être liée à la charge virale, le taux de VHB semblant être capable de moduler la fonctionnalité des lymphocytes T anti-VHB<sup>53</sup>. Afin de réduire le risque de lésions hépatiques lors de la thérapie, il pourrait donc être intéressant de prétraiter les patients avec un traitement antiviral classique, afin de réduire le nombre d'hépatocytes infectés cibles de la lyse lymphocytaire. De plus, ces traitements antiviraux peuvent dans certains cas changer le statut HBe des patients<sup>34</sup>, ce qui au vu des résultats précédents pourrait améliorer l'élimination du VHB au cours de l'immunothérapie. Le risque de cytotoxicité hépatique doit ainsi être évalué avant de passer cette immunothérapie en clinique avec ou sans l'utilisation d'un traitement antiviral préalable afin de pouvoir définir le schéma thérapeutique le plus efficace et le moins risqué pour le patient.

## 2 Rôle des pDCs dans la physiopathologie de l'hépatite B

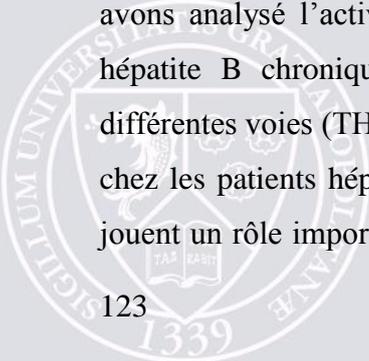
Les pDCs jouent un rôle important dans l'immunité antivirale. Le VHB est capable de moduler cette immunité grâce à divers mécanismes plus ou moins connus entraînant ainsi le développement de l'hépatite B chronique. Lors de ce travail, nous avons analysé si le VHB était capable de moduler l'activité des pDCs vis-à-vis du système immunitaire. Nous avons pu démontrer qu'en présence du virus, le cross-talk pDC/NK était perturbé, les pDCs n'étant plus capable d'activer correctement l'activité cytotoxique des cellules NK par l'intermédiaire d'un mécanisme mettant en œuvre l'IP10, Ox40L et l'IFN $\alpha$ . Ces résultats pourraient expliquer en partie les mécanismes d'échappement du VHB à l'immunité de son hôte.

### **Phénotype des pDCs chez les patients hépatite B chronique**

Nous avons tout d'abord pu observer qu'il n'y avait pas de différence en terme de proportion de pDC dans le sang ou au niveau hépatique entre des patients atteints d'hépatite B chronique et des donneurs sains. En revanche, nous avons pu observer que les pDCs de patients VHB présentaient un phénotype basal plus activé (CD40, CD86) que les donneurs sains. Ces résultats ne semblent pas corrélés avec la charge virale, confirmant des publications précédentes qui ne montrent pas de rôle direct du virus sur la pDC<sup>171, 172</sup>. Au cours de la phase aiguë de la maladie, les pDCs s'accumulent au niveau hépatique, suggérant qu'elles jouent un rôle dans l'orientation de la réponse immune vers la résolution de l'infection ou le passage en phase chronique<sup>170</sup>. Le défaut d'activation de la pDC aux ligands de TLR9 chez les patients hépatite B chronique est désormais bien décrit<sup>171-173</sup> et nous l'avons retrouvé au cours de cette étude (défaut de production d'IFN $\alpha$  par exemple).

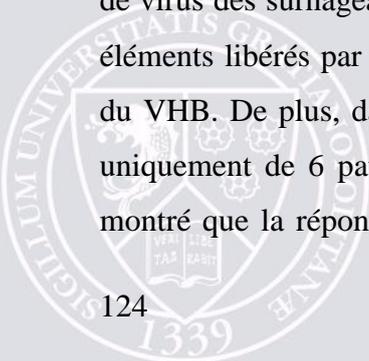
### **Implication des modifications induites par l'infection par le VHB sur la fonctionnalité des pDCs (orientation des réponses lymphocytaires et cross-talk pDC/NK)**

Les pDCs sont capables d'activer et d'orienter les réponses lymphocytaires T CD4 or, un défaut d'activation pourrait expliquer l'échappement du VHB au système immunitaire. Nous avons analysé l'activation de lymphocytes T CD4 de donneurs par des pDCs de patients hépatite B chronique et n'avons pas retrouvé d'orientation particulière vers l'une des différentes voies (TH1, TH2, Treg, TH17...). Les cellules NK sont décrites comme perturbées chez les patients hépatite B chronique, or comme nous l'avons vu précédemment, les pDCs jouent un rôle important dans l'activation de ces cellules. Le cross-talk PDC/NK en contexte



d'hépatite B n'a été que peu décrit pour le moment<sup>175</sup>. Au cours de ce travail, nous avons pu démontrer que les pDCs de patients atteints d'hépatite B chronique n'étaient plus capable d'activer les fonctions cytotoxiques des cellules NK après stimulation TLR9 par un mécanisme lié a un déficit d'expression en Ox40L et de production d'IFN $\alpha$ . Ainsi l'expression d'Ox40L par la pDC était fortement liée à la charge virale chez les patients, mettant en lien expression du virus et statut de la pDC. Il a été démontré que chez les patients dont la charge virale diminue sous traitement, les fonctionnalités des pDCs circulantes sont restaurées<sup>168</sup>. Ce cross-talk PDC/NK pourrait être nécessaire pour l'élimination du virus. En effet, lors des cancers, l'activation de la pDC par des ligands de TLR9 entraine l'activation des cellules NK grâce à l'expression d'Ox40L et la production d'IFN $\alpha$ , ce qui aide au cross-priming des lymphocytes T et à l'activation de l'immunité<sup>130</sup>. De plus, Ox40L et l'IFN $\alpha$  sont aussi associés à la polarisation des lymphocytes T par les pDCs<sup>147</sup>. Ce défaut d'activation des pDCs pourrait toucher, outre les cellules NK, d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T régulateurs ou les lymphocytes B<sup>174</sup>. Il serait intéressant d'étudier également la relation entre pDCs et lymphocytes B ou lymphocytes T régulateurs. Un défaut de l'immunité lymphocytaire B, associée à l'absence de production des anticorps protecteurs anti-HBs explique aussi en partie l'échappement du virus et le passage en phase chronique. Le défaut de production d'IFN $\alpha$  des pDCs primaires de patients hépatite B chronique pourrait expliquer en partie le défaut de production d'anticorps protecteurs<sup>128</sup>? C'est pourquoi il serait intéressant d'analyser si des pDCs de patients sont toujours capables de stimuler la transformation des lymphocytes B en plasmocytes.

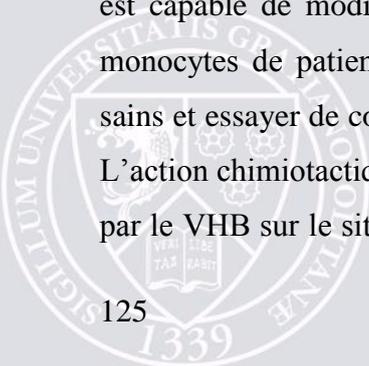
Le VHB entraine un défaut d'activation de la pDC qui limite sa capacité à stimuler les fonctions cytotoxiques des cellules NK. Néanmoins, l'activation des autres fonctions des cellules NK n'est pas modifiée par le virus. L'expression de CD69 ou la production d'IFN $\gamma$  sont bien stimulées par la pDC activée en présence de virus. Une autre étude<sup>175</sup> a trouvé des résultats opposés avec une inhibition de la stimulation de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK plutôt qu'une inhibition de l'activité cytotoxique. Néanmoins, une grande partie de cette étude a été réalisée avec des pDCs et cellules NK de donneurs sains, et a utilisé comme source de virus des surnageant de la lignée HepG22.15. Or ces surnageant contiennent de nombreux éléments libérés par la lignée qui peuvent affecter la pDC et la cellule NK indépendamment du VHB. De plus, dans cette publication des essais ont été fait en utilisant des pDCs issues uniquement de 6 patients hépatite B chronique, hors dans une autre publication<sup>209</sup> il a été montré que la réponse des cellules NK était dépendante du statut des ALAT, et dans notre



étude la charge virale semble aussi avoir une influence, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre ces différentes études. En lien avec nos résultats, il a ainsi été observé que les dysfonctions des cellules NK pouvaient être rétablies chez les patients dont la charge virale diminue<sup>210</sup>. De plus, ce type de dysfonctionnement a déjà pu être observé dans d'autres pathologies virales comme le VIH avec un défaut dans le crosstalk pDC/NK dépendant de la charge virale<sup>137, 138</sup>. En complément de notre étude, il pourrait être intéressant d'évaluer si d'autres paramètres cliniques que la charge virale (ALAT, traitement, antigène HBe, concentration d'antigène HBs) sont associés à un défaut de fonctionnalité des pDCs et du cross-talk pDC/NK afin de pouvoir mettre en corrélation nos résultats avec ceux des études précédentes et peut être mettre en évidence de nouveaux mécanismes pouvant expliquer ces défauts.

### **Rôle de l'IP10 dans le défaut du cross-talk pDC/NK au cours de l'hépatite B**

Le défaut dans le crosstalk pDC/NK est observé lorsque nous mettons des pDCs et des cellules NK de donneurs en présence du plasma de patients VHB, plusieurs publications ont montré que le virus n'a pas d'effet direct sur la pDC, ce qui tendrait à montrer qu'un autre élément dans le plasma de ces patients est en cause. Après analyse, nous avons trouvé chez les patients hépatite B une augmentation de la concentration d'IP10 dans le plasma associée à une diminution de l'expression de son récepteur (CXCR3) sur les pDCs de patients hépatite B chronique par rapport aux donneurs sains, ce qui suggère que l'IP10 pourrait moduler l'activité de la pDC. En effet, la baisse de l'expression de CXCR3 pourrait être due à une internalisation du récepteur à cause de l'exposition chronique à de fortes doses d'IP10. De manière très intéressante, des pDCs de donneurs sains mises en présence de fortes doses d'IP10 diminuent leur expression d'Ox40L en fonction de la dose d'IP10, renforçant l'hypothèse que le VHB module la pDC et le crosstalk pDC/NK par l'intermédiaire de la production d'IP10. De plus, nous avons pu observer que les niveaux de production d'IP10 et d'expression d'Ox40L semblaient être liés à la charge virale chez les patients hépatite B chronique. Parmi l'ensemble des cellules capables de produire de l'IP10, les monocytes pourraient être une cible intéressante à étudier, Woltman et al ayant déjà montré que le VHB est capable de modifier la relation entre monocytes et pDCs<sup>171</sup>. Il faudrait analyser si les monocytes de patients hépatite B chronique produisent plus d'IP10 que ceux de donneurs sains et essayer de comprendre par quels mécanismes le VHB peut modifier cette production. L'action chimiotactique de l'IP-10 pourrait de plus permettre de recruter les cellules modulées par le VHB sur le site d'infection et ainsi faciliter l'échappement du virus. Ces résultats nous

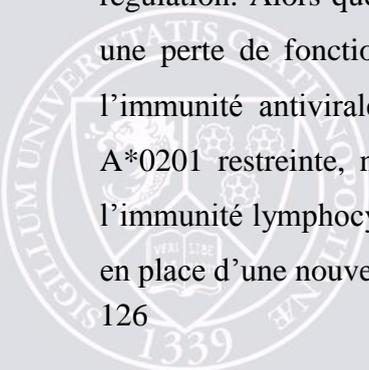


permettent de supposer que la production d'IP10 chez les patients hépatite B permet au VHB de moduler le crosstalk pDC/NK et d'expliquer en partie l'échappement du virus à la réponse immunitaire antivirale.

Le cross-talk pDC/NK est bidirectionnel, les cellules NK étant capables comme nous l'avons vu précédemment de moduler la réponse des pDCs<sup>132, 136</sup>. Il serait intéressant d'étudier comment les cellules NK régulent la fonction des pDCs en contexte d'infection hépatite B chronique. Pour cela, l'étude de la capacité des cellules NK issues de patients atteints d'hépatite B chronique à moduler la fonctionnalité des pDCs de donneurs sains pourrait nous permettre de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes associés au défaut du cross-talk bidirectionnel pDC/NK au cours de l'infection par le VHB.

### 3 Les pDCs au cours de l'infection par le VHB, rôle protecteur ou délétère ?

Les pDCs, au vu des résultats de cette étude, jouent un rôle important dans la pathogénie de l'infection par le VHB. Le virus est capable de moduler leur réponse à une stimulation par les ligands de TLR9 et d'inhiber l'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK par les pDCs. Ce mécanisme d'échappement passerait par la production de grandes quantités d'IP10 capables de moduler la production d'IFN de type I et l'expression d'Ox40L par les pDCs qui sont nécessaires à son action sur les cellules NK. Néanmoins, nous avons aussi pu montrer que l'utilisation d'une lignée de pDCs en condition allogénique HLA-A\*0201 restreinte et irradiée, peut restaurer une réponse lymphocytaire T CD8 cytotoxique spécifique du VHB à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris Hepato-HuPBL et pourrait être utilisée pour restaurer l'immunité antivirale chez les patients hépatite B chronique. Ces caractéristiques apparemment opposées peuvent être expliquées par l'extrême modularité des pDCs, qui peuvent à la fois activer l'immunité antivirale et jouer un rôle dans les mécanismes de tolérance et de régulation. Alors que pour les pDCs primaires de patients hépatite B chronique, on observe une perte de fonctionnalité au niveau du cross-talk pDC/NK et un dysfonctionnement de l'immunité antivirale, l'utilisation d'une lignée de pDCs en condition allogénique HLA-A\*0201 restreinte, non subvertie par le VHB et correctement activée permet de restaurer l'immunité lymphocytaire T CD8 spécifique du virus, laissant entrevoir la possibilité de mise en place d'une nouvelle immunothérapie anti-VHB.



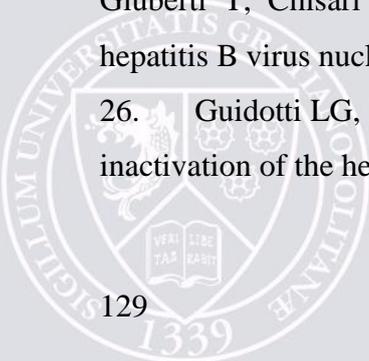
**BIBLIOGRAPHIE**



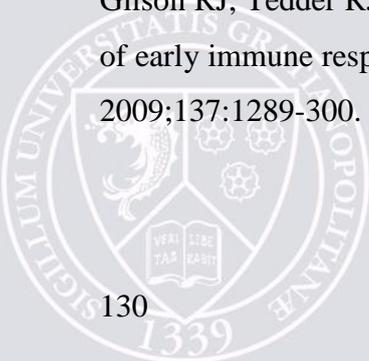
## Bibliographie:

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:245-53.
2. Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2009;15:3099-105.
3. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:4597-601.
4. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970;1:695-8.
5. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med* 1976;295:1168-75.
6. Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;168:61-83.
7. Takahashi K, Machida A, Funatsu G, Nomura M, Usuda S, Aoyagi S, Tachibana K, Miyamoto H, Imai M, Nakamura T, Miyakawa Y, Mayumi M. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol* 1983;130:2903-7.
8. Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 2009;103:75-109.
9. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982;29:403-15.
10. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:581-92.
11. Pollack JR, Ganem D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol* 1994;68:5579-87.
12. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986;47:451-60.
13. INVS. Surveillance et prévention des hépatites B et C en France: bilan et perspectives. *BEH Thématique* 2009;20-21.

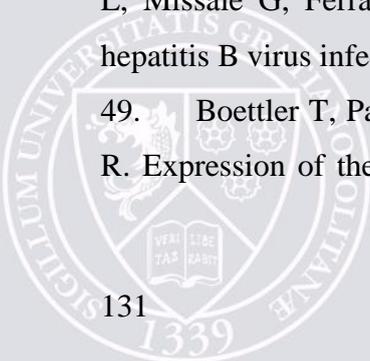
14. Lok AS. Practices guidelines. AASLD 2009.
15. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:529-38.
16. OMS. Vaccination. OMS 2007.
17. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76.
18. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-29.
19. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
20. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
21. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6669-74.
22. Yang PL, Althage A, Chung J, Maier H, Wieland S, Isogawa M, Chisari FV. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:798-802.
23. Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertoletti A. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004;78:5707-19.
24. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-80.
25. Ferrari C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Valli A, Missale G, Pilli M, Fowler P, Giuberti T, Chisari FV, et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 1991;88:214-22.
26. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.



27. Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-96.
28. Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991;174:1565-70.
29. Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-32.
30. Webster G, Bertoletti A. Quantity and quality of virus-specific CD8 cell response: relevance to the design of a therapeutic vaccine for chronic HBV infection. *Mol Immunol* 2001;38:467-73.
31. Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The hepatitis B virus. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1990;4:721-47.
32. Wang L, Lin SJ, Tsai JH, Tsai CH, Tsai CC, Yang CC. Anti-hepatitis B surface antigen IgG1 subclass is predominant in individuals who have recovered from hepatitis B virus infection, chronic carriers, and vaccinees. *Med Microbiol Immunol* 2005;194:33-8.
33. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50.
34. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-39.
35. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* 2008;8:259-68.
36. Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-73.
37. Dunn C, Peppas D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, Lascar RM, Brown D, Gilson RJ, Tedder RJ, Dusheiko GM, Jacobs M, Klenerman P, Maini MK. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2009;137:1289-300.



38. Lutgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, Allweiss L, Bockmann JH, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Dandri M. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology* 2011;140:2074-83, 2083 e1-2.
39. Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 2001;13:458-64.
40. 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;137:1151-60, 1160 e1-7.
41. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:16-23.
42. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-9.
43. Diana J, Griseri T, Lagaye S, Beaudoin L, Autrusseau E, Gautron AS, Tomkiewicz C, Herbelin A, Barouki R, von Herrath M, Dalod M, Lehuen A. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 2009;30:289-99.
44. Jiang X, Zhang M, Lai Q, Huang X, Li Y, Sun J, Abbott WG, Ma S, Hou J. Restored circulating invariant NKT cells are associated with viral control in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2011;6:e28871.
45. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192:921-30.
46. Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010;2:1394-410.
47. Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachoval R, Eisenburg J, Eichenlaub D, Riethmuller G, Paumgartner G, Ziegler-Heitbrock HW, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1991;13:310-7.
48. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, Orlandini A, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 2009;58:974-82.
49. Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T



cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006;80:3532-40.

50. Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PT, Alexander G, Finney H, Lawson A, Plunkett FJ, Bertoletti A, Akbar AN, Maini MK. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2008;205:2111-24.

51. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990;145:3442-9.

52. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701-12.

53. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-'t Hoen E, Lim SG, Wasser S, Selden C, Maini MK, Davis DM, Nassal M, Bertoletti A. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 2007;81:2940-9.

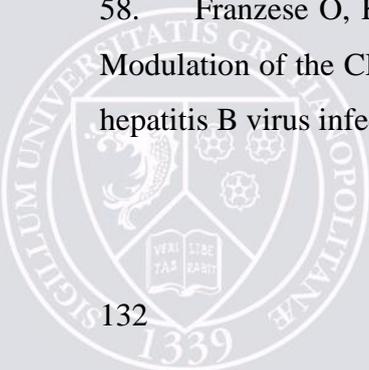
54. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010;138:682-93, 693 e1-4.

55. Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, Peppas D, Gilson RJ, Gehring A, Bertoletti A, Maini MK. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest* 2008;118:1835-45.

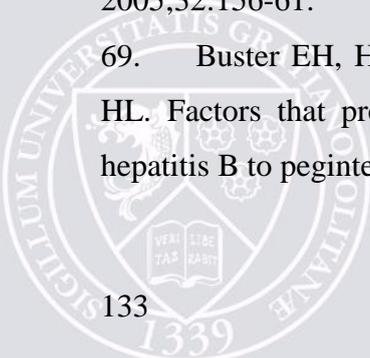
56. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;41:771-8.

57. Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006;177:739-47.

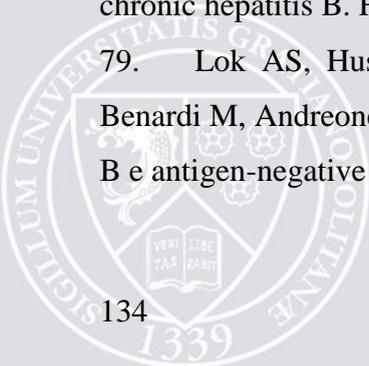
58. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Modulation of the CD8+ T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005;79:3322-8.



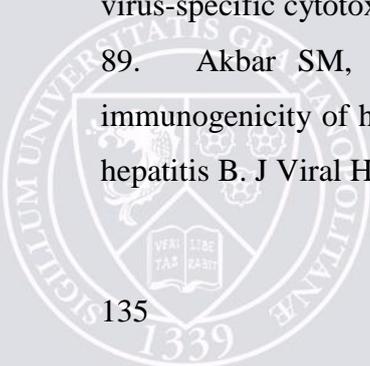
59. Yang G, Liu A, Xie Q, Guo TB, Wan B, Zhou B, Zhang JZ. Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. *Int Immunol* 2007;19:133-40.
60. Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol* 1997;71:2192-201.
61. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-21.
62. Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P, Chisari FV. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 1998;188:341-50.
63. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:258-66.
64. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329-39.
65. Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;34:917-21.
66. Yalcin K, Acar M, Degertekin H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. *Infection* 2003;31:221-5.
67. Jung MC, Gruner N, Zachoval R, Schraut W, Gerlach T, Diepolder H, Schirren CA, Page M, Bailey J, Birtles E, Whitehead E, Trojan J, Zeuzem S, Pape GR. Immunological monitoring during therapeutic vaccination as a prerequisite for the design of new effective therapies: induction of a vaccine-specific CD4+ T-cell proliferative response in chronic hepatitis B carriers. *Vaccine* 2002;20:3598-612.
68. Horiike N, Fazle Akbar SM, Michitaka K, Joukou K, Yamamoto K, Kojima N, Hiasa Y, Abe M, Onji M. In vivo immunization by vaccine therapy following virus suppression by lamivudine: a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005;32:156-61.
69. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, Janssen HL. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology* 2009;137:2002-9.



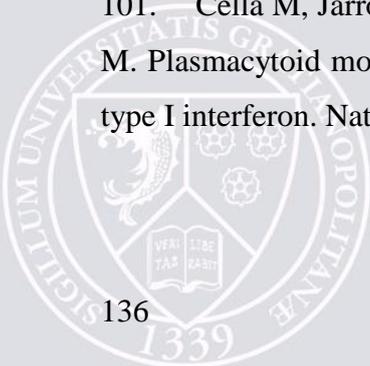
70. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005;365:123-9.
71. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-17.
72. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006;44:675-84.
73. Senturk H, Baysal B, Tahan V, Zerdali H, Ozaras R, Tabak F, Mert A, Canbakan B, Tabak O, Ozbay G. Long-term effect of interferon therapy in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B infection. *Dig Dis Sci* 2010;56:208-12.
74. Fattovich G, Betterle C, Brollo L, Pedini B, Giustina G, Realdi G, Alberti A, Ruol A. Autoantibodies during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1991;34:132-5.
75. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group. *Lancet* 1998;351:1535-9.
76. Takkenberg RB, Weegink CJ, Zaaier HL, Reesink HW. New developments in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Vox Sang* 2010;98:481-94.
77. Yao GB, Zhu M, Cui ZY, Wang BE, Yao JL, Zeng MD. A 7-year study of lamivudine therapy for hepatitis B virus e antigen-positive chronic hepatitis B patients in China. *J Dig Dis* 2009;10:131-7.
78. Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, Kowdley KV, Willems B, Plisek S, Woessner M, Gardner S, Schiff E. Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003;37:748-55.
79. Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E, Benardi M, Andreone P. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;32:1145-53.



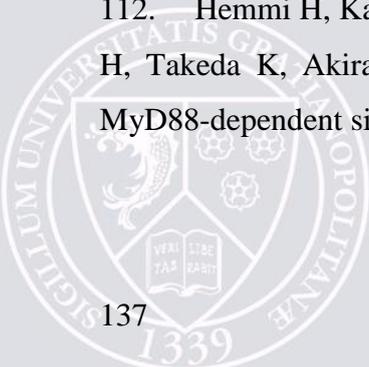
80. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009;137:1593-608 e1-2.
81. Lee YS, Suh DJ, Lim YS, Jung SW, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Yoo W, Kim SO. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 2006;43:1385-91.
82. Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML. Multiepitopic HLA-A\*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J Immunol* 2000;165:4748-55.
83. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, Crimi C, Allosery K, De Brabandere V, Krakover J, Murthy S, Huang M, Power S, Babe L, Dahlberg C, McKinney D, Sette A, Southwood S, Philip R, Newman MJ, Meheus L. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *J Virol* 2008;82:435-50.
84. Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Chesnut RW, Sette A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J Immunol* 1997;159:1383-92.
85. Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-7.
86. Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, Wiegmann K, Kurschner T, Schulze A, Urban S, Kronke M, Abken H, Protzer U. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008;134:239-47.
87. Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, Teoh D, Ruedl C, Chia A, Koh S, Lim SG, Maini MK, Stauss H, Bertoletti A. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *J Hepatol* 2010;55:103-10.
88. Chen W, Shi M, Shi F, Mao Y, Tang Z, Zhang B, Zhang H, Chen L, Xin S, Wang FS. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Hepatol Res* 2009;39:355-65.
89. Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2011;18:408-14.



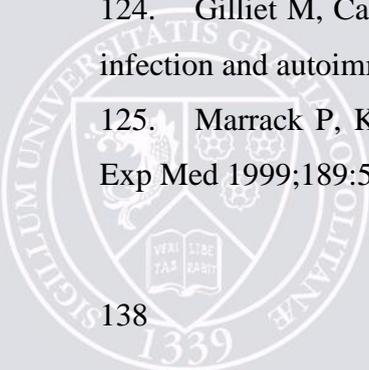
90. Luo J, Li J, Chen RL, Nie L, Huang J, Liu ZW, Luo L, Yan XJ. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine* 2010;28:2497-504.
91. Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, Zauberman A, Eren R, Lubin I, Neville L, Ben-Moshe O, Kischitzky A, Litchi A, Margalit I, Gopher J, Mounir S, Cai W, Daudi N, Eid A, Jurim O, Czerniak A, Galun E, Dagan S. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* 2002;185:153-61.
92. Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 2008;80:231-8.
93. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:149-73.
94. Shi TD, Wu YZ, Jia ZC, Zhou W, Zou LY. Therapeutic polypeptides based on HBcAg(18-27) CTL epitope can induce antigen-specific CD(8)(+) CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2 transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004;10:1222-6.
95. Roggendorf M, Schulte I, Xu Y, Lu M. Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck model. *J Viral Hepat* 2007;14 Suppl 1:51-7.
96. 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.
97. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-26.
98. Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1985;4:120-37.
99. Vollenweider R, Lennert K. Plasmacytoid T-cell clusters in non-specific lymphadenitis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1983;44:1-14.
100. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-11.
101. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-23.



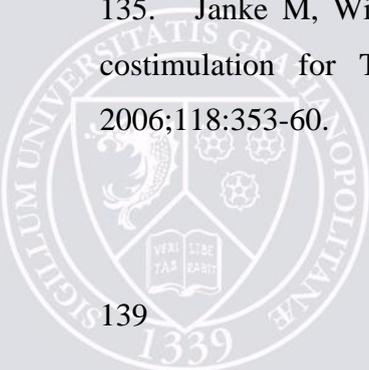
102. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037-46.
103. Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* 2010;31:270-7.
104. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008;26:293-316.
105. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009;113:3418-27.
106. Diacovo TG, Blasius AL, Mak TW, Cella M, Colonna M. Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 2005;202:687-96.
107. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:1862-6.
108. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004;16:915-28.
109. Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, Forster R. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6347-52.
110. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 2005;201:509-15.
111. Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, Trinchieri G, Caux C. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003;198:823-30.
112. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.



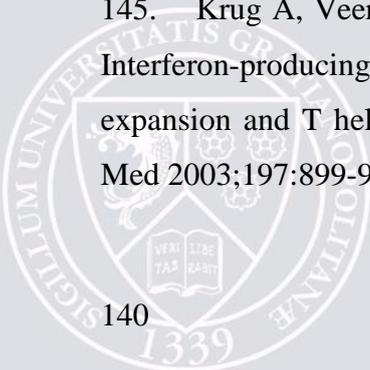
113. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499.
114. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433-7.
115. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
116. Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 2002;186:68-82.
117. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002;63:1111-9.
118. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-63.
119. Jaehn PS, Zaenker KS, Schmitz J, Dzionek A. Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur J Immunol* 2008;38:1822-32.
120. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002;14:432-6.
121. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000;192:219-26.
122. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 2005;17:253-61.
123. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-7.
124. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594-606.
125. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999;189:521-30.



126. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147-61.
127. Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004;103:3058-64.
128. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225-34.
129. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, Colonna M. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* 2011;208:2367-74.
130. Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, Kim GJ, Wang YH, Ye Y, Sikora AG, Overwijk WW, Liu YJ, Wang G, Hwu P. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165-75.
131. Persson CM, Chambers BJ. Plasmacytoid dendritic cell-induced migration and activation of NK cells in vivo. *Eur J Immunol* 2011;40:2155-64.
132. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 2005;174:727-34.
133. Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, Wang YH, Ito T, Shaw J, Cao W, Qin FX, Liu YJ. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 2006;107:3617-23.
134. Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J Immunol* 2002;169:3676-85.
135. Janke M, Witsch EJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 2006;118:353-60.



136. Della Chiesa M, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. *Blood* 2006;108:3851-8.
137. Benlahrech A, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. Loss of NK stimulatory capacity by plasmacytoid and monocyte-derived DC but not myeloid DC in HIV-1 infected patients. *PLoS One* 2011;6:e17525.
138. Reitano KN, Kottlilil S, Gille CM, Zhang X, Yan M, O'Shea MA, Roby G, Hallahan CW, Yang J, Lempicki RA, Arthos J, Fauci AS. Defective plasmacytoid dendritic cell-NK cell cross-talk in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:1029-37.
139. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998;161:1947-53.
140. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 2004;78:5223-32.
141. Chen W, Zhang Z, Shi M, Chen L, Fu J, Shi F, Zhang B, Zhang H, Jin L, Wang FS. Activated plasmacytoid dendritic cells act synergistically with hepatitis B core antigen-pulsed monocyte-derived dendritic cells in the induction of hepatitis B virus-specific CD8 T-cell response. *Clin Immunol* 2008;129:295-303.
142. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A, Narumi S, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med* 2005;202:425-35.
143. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000;191:1777-88.
144. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003;4:1009-15.
145. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 2003;197:899-906.

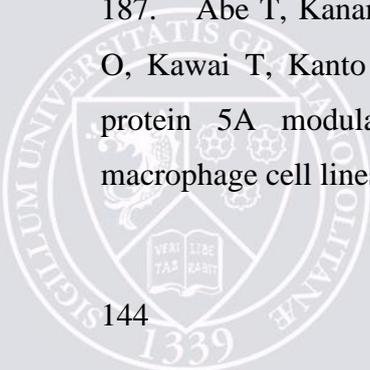


146. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 2002;63:1156-63.
147. Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, Nakamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K, Fukuhara S. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 2004;172:4253-9.
148. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One* 2009;4:e7111.
149. Benitez-Ribas D, Tacken P, Punt CJ, de Vries IJ, Figdor CG. Activation of human plasmacytoid dendritic cells by TLR9 impairs Fc gammaRII-mediated uptake of immune complexes and presentation by MHC class II. *J Immunol* 2008;181:5219-24.
150. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29:352-61.
151. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keeffe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2008;9:1244-52.
152. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7:543-55.
153. Salio M, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 2004;199:567-79.
154. Sapozhnikov A, Fischer JA, Zaft T, Krauthgamer R, Dzionek A, Jung S. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:1923-33.
155. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, Heshmati F, Guillet JG, Gannage M, Caillat-Zucman S, Casartelli N, Schwartz O, De la Salle H, Hanau D, Hosmalin A, Maranon C. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007;27:481-92.
156. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 2008;112:3713-22.

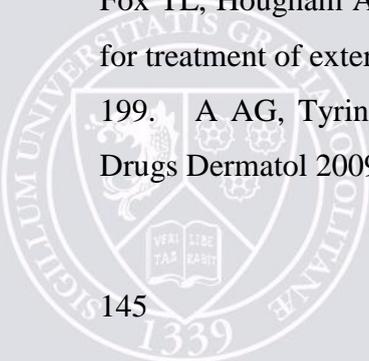
157. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001;2:585-9.
158. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000;1:305-10.
159. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173:4433-42.
160. Fallarino F, Gizzi S, Mosci P, Grohmann U, Puccetti P. Tryptophan catabolism in IDO+ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab* 2007;8:209-16.
161. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2008;118:3431-9.
162. Fallarino F, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Asselin-Paturel C, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P. Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol* 2005;17:1429-38.
163. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. *J Immunol* 2009;182:3372-9.
164. Bonnefoy F, Couturier M, Clauzon A, Remy-Martin JP, Gaugler B, Tiberghien P, Chen W, Saas P, Perruche S. TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 2011;186:6157-64.
165. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 2005;202:637-50.
166. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003;101:3520-6.
167. Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 2007;178:1534-41.

168. Duan XZ, Wang M, Li HW, Zhuang H, Xu D, Wang FS. Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J Clin Immunol* 2004;24:637-46.
169. Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, Glebe D, Grun S, Strand D, Urban S, Gehring A, Galle PR, Bocher WO. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 2008;151:61-70.
170. Zhang Z, Chen D, Yao J, Zhang H, Jin L, Shi M, Zhang H, Wang FS. Increased infiltration of intrahepatic DC subsets closely correlate with viral control and liver injury in immune active pediatric patients with chronic hepatitis B. *Clin Immunol* 2007;122:173-80.
171. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HL. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011;6:e15324.
172. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z, Shen F, Zhang Q, Sun S, Yuan Z. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009;46:2640-6.
173. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, Zoulim F, Tommasino M, Trepo C, Hasan U, Chemin I. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2011;6:e26315.
174. Hong J, Gong ZJ. Human plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection induce the generation of a higher proportion of CD4(+) and CD25(+) regulatory T cells compared with healthy patients. *Hepatology Res* 2008;38:362-73.
175. Shi CC, Tjwa ET, Biesta PJ, Boonstra A, Xie Q, Janssen HL, Woltman AM. Hepatitis B virus suppresses the functional interaction between natural killer cells and plasmacytoid dendritic cells. *J Viral Hepat* 2012;19:e26-33.
176. Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Papasavvas E, Jerandi G, Mounzer K, Kostman J, Trinchieri G, Montaner LJ. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002;168:4796-801.
177. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003;187:26-37.

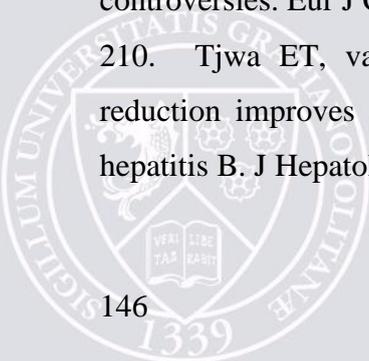
178. Fiorentini S, Riboldi E, Facchetti F, Avolio M, Fabbri M, Tosti G, Becker PD, Guzman CA, Sozzani S, Caruso A. HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3867-72.
179. Brown KN, Wijewardana V, Liu X, Barratt-Boyes SM. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000413.
180. Lehmann C, Harper JM, Taubert D, Hartmann P, Fatkenheuer G, Jung N, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Gallo RC, Romerio F. Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48:522-30.
181. Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 2005;201:2023-33.
182. Boasso A, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Shearer GM. HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation. *PLoS One* 2008;3:e2961.
183. Zhang YL, Guo YJ, Bin L, Sun SH. Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7. *J Hepatol* 2009;51:29-38.
184. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, Chisari FV. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7431-6.
185. Gondois-Rey F, Dental C, Halfon P, Baumert TF, Olive D, Hirsch I. Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS One* 2009;4:e4319.
186. Lai WK, Curbishley SM, Goddard S, Alabraba E, Shaw J, Youster J, McKeating J, Adams DH. Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function. *J Hepatol* 2007;47:338-47.
187. 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;81:8953-66.



188. Liang H, Russell RS, Yonkers NL, McDonald D, Rodriguez B, Harding CV, Anthony DD. Differential effects of hepatitis C virus JFH1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 2009;83:5693-707.
189. Chang S, Kodys K, Szabo G. Impaired expression and function of toll-like receptor 7 in hepatitis C virus infection in human hepatoma cells. *Hepatology* 2010;51:35-42.
190. Gearing AJ. Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches. *Immunol Cell Biol* 2007;85:490-4.
191. Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007;12:80-7.
192. Gupta K, Cooper C. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R D* 2008;9:137-45.
193. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13:552-9.
194. Cooper CL, Angel JB, Seguin I, Davis HL, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis* 2008;46:1310-4.
195. Halperin SA, Dobson S, McNeil S, Langley JM, Smith B, McCall-Sani R, Levitt D, Nest GV, Gennevois D, Eiden JJ. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine* 2006;24:20-6.
196. Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2005;42:724-31.
197. Diamantis ML, Bartlett BL, Tying SK. Safety, efficacy & recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin Therapy Lett* 2009;14:1-3, 5.
198. Beutner KR, Tying SK, Trofatter KF, Jr., Douglas JM, Jr., Spruance S, Owens ML, Fox TL, Hougham AJ, Schmitt KA. Imiquimod, a patient-applied immune-response modifier for treatment of external genital warts. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:789-94.
199. A AG, Tying SK, Rosen T. Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy. *J Drugs Dermatol* 2009;8:467-74.



200. Spruance SL, Tyring SK, Smith MH, Meng TC. Application of a topical immune response modifier, resiquimod gel, to modify the recurrence rate of recurrent genital herpes: a pilot study. *J Infect Dis* 2001;184:196-200.
201. Pockros PJ, Guyader D, Patton H, Tong MJ, Wright T, McHutchison JG, Meng TC. Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. *J Hepatol* 2007;47:174-82.
202. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, Plumas J. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:248-55.
203. Chaperot L, Perrot I, Jacob MC, Blanchard D, Salaun V, Deneys V, Lebecque S, Briere F, Bensa JC, Plumas J. Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur J Immunol* 2004;34:418-26.
204. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood* 2009;114:1794-802.
205. Aspard C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L, Plumas J. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A\*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2010;5:e10458.
206. Aspard C, Leccia MT, Salameire D, Laurin D, Chaperot L, Charles J, Plumas J. HLA-A(\*)0201(+) Plasmacytoid Dendritic Cells Provide a Cell-Based Immunotherapy for Melanoma Patients. *J Invest Dermatol* 2012.
207. Aspard C, Laurin D, Richard MJ, Vie H, Chaperot L, Plumas J. Induction of Antiviral Cytotoxic T Cells by Plasmacytoid Dendritic Cells for Adoptive Immunotherapy of Posttransplant Diseases. *Am J Transplant* 2011.
208. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14913-8.
209. Mondelli MU, Varchetta S, Oliviero B. Natural killer cells in viral hepatitis: facts and controversies. *Eur J Clin Invest* 2010;40:851-63.
210. 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* 2010;54:209-18.



**Résumé :**

La réponse immune lors d'une infection par le VHB est essentielle pour éliminer le virus. Ainsi la restauration d'une immunité fonctionnelle anti-VHB pourrait représenter une approche d'immunothérapie très intéressante. Les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC) jouent un rôle crucial dans l'immunité antivirale de par leur capacité à capturer et apprêter les antigènes viraux afin d'induire une réponse immune adaptative. C'est pourquoi nous avons pour la première fois évalué le potentiel des pDCs à restaurer l'immunité anti-VHB en contexte d'hépatite B chronique. Nous avons utilisé une lignée de pDCs HLA-A\*0201<sup>+</sup> chargée avec des peptides HLA-A\*0201 restreints dérivés des antigènes HBc et HBs du virus afin d'amplifier des lymphocytes T spécifiques ex vivo à partir de patients atteints d'hépatite B chronique. Nous avons ensuite établi un modèle de souris humanisées (Hepato-HuPBL) afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de la stratégie in vivo. La stimulation de PBMC ou de lymphocytes infiltrant le foie (LIL) issus de patients HLA-A\*0201<sup>+</sup> par la lignée de pDC chargée avec le peptide HBc a pu amplifier une réponse lymphocyte T spécifique dans 45,8% des cas. Les lymphocytes T spécifiques amplifiés dans le groupe répondeur étaient fonctionnels. Le groupe de non répondeurs était caractérisé par la présence d'Ag HBe et un plus fort niveau de lymphocytes T régulateurs. L'efficacité thérapeutique du vaccin de pDC a été évaluée dans le modèle de souris Hepato-HuPBL avec des PBMC issues d'un patient ayant résolu l'infection au VHB. La vaccination de ces souris avec la lignée de pDC chargée avec les peptides HBc et HBs a permis l'amplification de lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB capables de lyser spécifiquement les hépatocytes infectés in vivo. Ainsi, la lignée de pDC chargée avec des peptides dérivés du VHB est capable d'amplifier des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHB et fonctionnels in vitro et in vivo. Cette nouvelle stratégie d'immunothérapie pourrait donc restaurer une immunité antivirale et permettre l'élimination du virus chez les patients atteints d'hépatite B chronique. D'un autre côté, le VHB est capable d'échapper au système immunitaire. Le mécanisme par lequel le virus peut moduler l'immunité est encore mal connu. Les pDCs pourraient être impliquées tout comme les cellules NK dont les fonctions sont réduites au cours de l'infection chronique. C'est pourquoi nous avons investigué le rôle physiopathologique des pDCs au cours de l'infection chronique par le VHB et les conséquences fonctionnelles sur le cross-talk pDC/NK. Nous avons étudié le phénotype et la capacité de répondre à une stimulation TLR des pDCs de patients comparé aux pDCs de donneur sain puis nous avons étudié les conséquences sur le cross-talk entre pDCs de patients (virémiques ou avirémiques) et cellules NK de donneur sain. Les pDCs de patients montrent un phénotype plus activé que les pDCs de donneurs sains mais ne sont pas capables de répondre (IFN $\alpha$ ) à une stimulation TLR9. Les pDCs de patients virémiques ne sont pas capables d'activer les fonctions cytotoxiques des cellules NK. Cette perturbation du cross-talk pDC/NK semble liée à une faible production d'IFN $\alpha$  et expression d'Ox40L par les pDCs de patients virémiques. La présence d'une quantité importante d'IP10 semble liée à ce défaut du cross-talk pDC/NK. En conclusion, les pDCs en contexte VHB semblent être à la fois capable d'éliminer le virus dans un contexte de lignée non subvertie par l'infection et correctement activées et être un des éléments permettant l'échappement du VHB à l'immunité par perturbation du cross-talk pDC/NK.

**Abstract:**

The immune control of HBV infection is essential for viral clearance. Restoring functional anti-HBV immunity is therefore a promising immunotherapeutic approach. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) play a crucial role in anti-viral immunity due to their ability to capture and process viral antigens and subsequently induce adaptive immune responses. We therefore investigated for the first time the potential of pDCs in triggering anti-viral immunity against HBV. We used a HLA-A\*0201<sup>+</sup> pDC line loaded with HLA-A\*0201-restricted peptides derived from HBc/HBs antigens to amplify specific T cells ex-vivo from chronic HBV patients and established an Hepato-HuPBL humanized mouse model to address the therapeutic potential of the strategy in vivo. Stimulation of PBMC or liver-infiltrated lymphocytes from HLA-A\*0201<sup>+</sup> chronic HBV patients by the HBc peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific CD8 T cells in 45.8% of cases. The specific T cells of the "responder" group were functional. The "non-responder" group of patients was characterised by the presence of HBeAg or higher level of regulatory T cells. The therapeutic efficacy of the pDC-vaccine was evaluated in immunodeficient NOD-SCID $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> mice reconstituted with HBV patients' PBMC and xenotransplanted with human HBV-infected hepatocytes. Vaccination of Hepato-HuPBL mice with the HBc/HBs peptide-loaded pDC line elicited HBV-specific T cells in-vivo able to specifically lyse infected hepatocytes. pDCs loaded with HBV-derived peptides can elicit functional virus-specific T cells in-vitro and in-vivo. This new cell-based immunotherapeutic strategy could restore functional anti-viral immunity and clear the virus in chronic HBV patients. On the other hand, HBV modulates the immune system to escape this control, but the mechanisms involved remain largely unknown. PDCs and NK cells whose functions are reduced during chronic infection could be involved. So, we investigated the pathophysiological role of pDCs from chronic HBV patients and the functional consequences on pDC-NK cross-talk. We studied the phenotype and the ability to respond to a TLR stimulation of the pDCs from patients and healthy donors, then we investigated the consequences on the cross-talk between patients (viremic or aviremic) pDCs and healthy donors NK cells. Circulating and hepatic pDCs show higher levels of activation in chronic HBV patients than in non-infected donors but are not able to respond (IFN $\alpha$ ) to TLR9-L stimulation. PDCs from viremic chronic HBV patients failed to trigger a normal NK cytolytic function after TLR9-L stimulation. This pDC-dependant NK dysfunction was related to impaired IFN $\alpha$  secretion and OX40L expression by pDCs from viremic patients. The pDC subversion was related to high plasma IP-10 levels found in patients and viral load. In conclusion, pDCs during HBV chronic infection seems to be able to clear the virus in a context of a non infected and activated pDC cell line but they also seems to be one of the elements of the HBV escape from the immune response.

