



HAL
open science

Développement d'immunothérapies du carcinome hépatocellulaire et de l'infection par le virus de l'hépatite C

Céline Leboeuf

► **To cite this version:**

Céline Leboeuf. Développement d'immunothérapies du carcinome hépatocellulaire et de l'infection par le virus de l'hépatite C. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ001 . tel-00922983

HAL Id: tel-00922983

<https://theses.hal.science/tel-00922983>

Submitted on 1 Jan 2014

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

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

THESE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement le 05 mars 2012 par

Céline LEBOEUF

Développement d'immunothérapies du carcinome hépatocellulaire et de l'infection par le virus de l'hépatite C

Membres du jury :

- RAPPORTEUR EXTERNE :** Pr Cyrille FERAY, U948 INSERM, Nantes
RAPPORTEUR EXTERNE : Dr Els VERHOEYEN, U758 INSERM, Lyon
EXAMINATEUR EXTERNE : Pr Pierre TIBERGHYEN, U645 INSERM/EFES, Besançon
EXAMINATEUR INTERNE : Pr Sylvie FOURNEL, UPR9021, Strasbourg
DIRECTEUR DE THESE : Dr Eric ROBINET, U748 INSERM, Strasbourg

A mes parents,

A Jul,

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre.

Aristote

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier chaleureusement le Pr Cyrille Feray, le Dr Els Verhoeyen, le Pr Pierre Tiberghien et le Pr Sylvie Fournel d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Pr Thomas Baumert, directeur de l'UMR_S748, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir soutenue.

Eric, je ne sais pas comment te remercier tant je suis reconnaissante de tout ce que tu m'as apporté. A mon arrivée au laboratoire, ça a été un réel plaisir et une grande source de motivation de mettre en place ces nouveaux projets (je me suis même découvert un talent caché pour la peinture, qui l'aurait cru ? Mais comme tu l'as souvent dit, en recherche il faut savoir tout faire...). Merci pour ta confiance en moi, tes encouragements, ton humour, ton positivisme, et toutes ces discussions scientifiques (ou non !). Et surtout merci d'avoir été tout simplement humain. Merci de m'avoir transmis ta passion pour l'immunologie (malgré son extraordinaire complexité, comme par exemple... l'alloréactivité des NK !!!). Ta passion pour la science n'a fait qu'exacerber la mienne. Je garderai un souvenir ému de ces quatre années, merci pour tout.

Un grand merci à toi Laurent, partenaire dans l'ensemble des projets. J'ai aimé collaborer avec toi, discuter des manips et de tout et de rien. Merci pour tes conseils techniques.

Sarah et Laura, je vous remercie de tout cœur d'avoir contribué ces quelques mois au projet avec motivation et bonne humeur. Merci pour toutes ces discussions, votre soutien, votre implication dans la vie du labo... Et encore merci pour l'expérience « in vive eau » à laquelle j'étais sûrement prédestinée ! Bonne chance à vous pour la suite... au labo comme dans vos vies. Sarah, tu sais que tu pourras venir sonner chez moi dans les moments de blues (on regardera du foot !!!??).

Un merci spécial à toute l'équipe sandwiches ! Merci d'avoir partagé avec moi tant de midis, de super jambon (et même de pâté beurre), de cafés aux moucherons, de thés à la menthe sans vraiment de menthe ni de thé, de discussions, de nois bollywood, de rires (sans oublier les mAnAIAAAs)... Vous êtes devenus bien plus que des collègues.

Alex, du temps est passé depuis nos cours de master ! Nous voilà au bout... Tes conseils cytométrie et autoMACS m'ont été très bénéfiques, ainsi que ta prise en main de mes

problèmes informatiques... Merci pour tes bredalas. Merci de t'être inquiété pour moi dans mes moments de faiblesse ! Et bonne chance pour le futur.

Thomas, un grand merci pour toutes ces discussions et pauses café. Merci de m'avoir formée aux lecteurs de plaque et de m'avoir secouru lors des problèmes de cytomètre ! Il y a une chose dont on peut être sûr : plus jamais je ne RAMENERAI quelque chose !

Julien, ce fut un plaisir de te rencontrer, merci pour tes conseils musicaux, les médiateurs, et surtout bonne chance pour la reprise de tes études.

Valentin, je suis contente d'avoir tenu bon face à tes attaques.

Merci à toi Cathy pour ta disponibilité, ton dynamisme, ton regard expert sur mes lames d'histologie. Merci pour ton soutien dans les moments de stress. Je garderai en mémoire ta passion pour ACDC ! Bonne chance à toi dans ton nouveau boulot, je suis sûre que tu ne pourras que t'y épanouir...

Merci à vous Nicolas et Richard de prendre soin de nos chères souris... Et bonne chance à toi Nicolas pour la relève des tests Elisa !!

Merci à toi Mélanie pour les manips VHCcc, mais aussi et surtout pour toutes nos discussions, tes conseils et ta bonne humeur.

Merci à toi Rémi, notre soutien mutuel dans nos soucis de financement nous a permis de garder le moral... Tu resteras le recordman des thèses écrites et soutenues en un mois ! En tout cas bravo.

Un grand merci à toi Anne pour toutes ces commandes passées et ces contrats gérés...

Merci à toi Sigis pour tes pyramides de cartons Falcon, ta sérénité exemplaire, ta gentillesse, ton expertise informatique et ton dévouement sans faille au bon fonctionnement de ce labo. Je ne peux m'empêcher de finir par... merciment !

Merci à toi Dominique pour ta gestion des problèmes de façon générale!

Merci à toi Jérémy, Mc Gyver de l'unité. Sans toi, pas grand-chose tournerait rond.

Merci à toi Patricia pour toutes ces boîtes d'ependorf remplies et toutes ces pipettes pasteur autoclavées. Une pensée pour Rosalba.

Merci à toi Marina pour tes protocoles CD107a, grâce à toi j'y suis enfin arrivée...

Et merci à tous les autres, Eric S, Marie, Christine, Daniel, Mathieu, Bin, Géraldine, Sylvie, Lamine, Roxane, Isabel, Joachim, Jochen, Nauman, Laetitia, Catherine F, Marine, Mirjam, Fei, Alizée, Michèle, Samira, Evelyne, Christiane, Catherine S et Françoise.

Une pensée aux anciens, Sophie, Thomas C et Vincent...

Merci à toi Gaëtan de m'avoir aidée dans mes missions d'histologie. Merci pour le prêt de matériel, pour tes très nombreux conseils, ta disponibilité, les discussions... Et merci aussi à Fernand de m'avoir toujours bien accueillie !

Je voudrais aussi et surtout remercier ma famille de cœur... Vous faites tellement partie de moi ! Merci pour les soirées tisanes, les surprises d'anniversaire, les concerts, les moments dans le champ de papy et tout le reste.

Caro, merci d'avoir partagé ces premières années strasbourgeoises avec moi (je sais que les racines n'ont maintenant plus de secret pour toi !). Merci pour ton soutien, ta générosité, tous ces moments de rires que l'on a déjà partagés... sans oublier le voyage au Burkina. Je ne peux te souhaiter que du bonheur dans le pays des hommes intègres.

Clel, merci pour ta présence, ta voix bluesy, toutes nos discussions sur la vie, ton soutien dans les moments difficiles...

Lisou, merci pour ton soutien, ton peps, toutes ces petites notes, ça y est on se lance dans une nouvelle aventure ??

Emi, Baptiste et Noé, quel bonheur d'être tata... Je vous souhaite que de la joie dans votre nouveau chez vous.

Noukette, j'espère qu'on ne se perdra plus de vue... et surtout bonne chance pour la suite, j'ai confiance en toi...

Christophe je pense à toi où que tu sois dans le monde, on oubliera jamais les soirées mille-feuilles/fondue dans nos 9m² de Paul Appel n'est-ce pas ? Et ne parlons pas de tous ces moments restos U, de la Java, des rencontres Erasmus... Merci d'avoir partagé ces années étudiantes avec moi. Take care in London !!

Merci la vieille pour ton hospitalité, les yassas poulet et le brame du cerf.

Merci à Aurel pour tous les moments musicaux que l'on a partagé...

Merci à Jérémie et toute l'association No Man's Land, à Greg et au reste de la tribu, Vincent et Céline, David et sa virtuosité guitaristique. Une pensée à nos amis burkinabés, et tout particulièrement à Madou.

Une pensée à mes amis Erasmus, merci d'avoir partagé avec moi cette année de licence un peu folle.

Merci à Brigitte, ma belle maman préférée, ainsi qu'à Christophe. Merci à André et Eléonore pour tous ces pots de miel savoureux, ces légumes du jardin et autres...

Un grand merci à toute la famille Kupferlé-Bugmann pour votre soutien. J'admire votre générosité et votre façon de cultiver le bonheur.

Mamie, merci pour ton soutien, tes rires et ton dynamisme qui n'a rien à envier aux jeunes, sans oublier les pots de confiture et tous ces desserts délicieux...

Nic, merci pour tes sauvetages informatiques de dernière minute et tes précieux conseils !

Maman, je te dédie cette thèse. C'est l'aboutissement de ton travail aussi ! Merci d'avoir pris tant soin de nous, de t'être battue, d'avoir respecté mes choix et de m'avoir toujours soutenue...

Jul, il n'existe pas assez de mots pour te remercier comme je le souhaiterais et pour te dire à quel point tu es essentiel à ma vie. Merci d'avoir été à mes côtés de jour comme de nuit. Merci de m'avoir toujours écoutée, rassurée, fait rire. Merci d'avoir supporté mon mauvais caractère pendant les jours difficiles ! Merci pour tous ces moments de joie au quotidien, et d'avoir fait que je suis aujourd'hui. J'espère que je saurai te soutenir pour ta thèse comme tu l'as fait pour la mienne...

Sommaire

Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	16
Abréviations.....	17
INTRODUCTION.....	19
I. Le virus de l'hépatite C	20
I.1. Classification et variabilité génomique	20
I.2. Structure du virion et circulation dans l'hôte	21
I.3. Le cycle viral	22
I.3.1. L'entrée.....	23
Les GAGs	24
Les lectines de type C	24
Le récepteur des LDLs.....	24
SR-BI	25
CD81	25
Claudine-1	26
Occludine	28
NPC1L1 et CD229	29
Les co-facteurs d'entrée	30
I.3.2. Traduction de l'ARN viral et réplication	30
I.3.3. Assemblage et relarguage des particules virales	32
I.3.4. Voies de transmission du virus	33
I.4. Les modèles d'études <i>in vitro</i>	34
I.4.1. Les réplicons subgénomiques	34
I.4.2. Les pseudo-particules virales (VHCpp).....	35
I.4.3. Le système de culture cellulaire du VHC (VHCcc)	36
I.5. Le foie, organe privilégié de la réplication du VHC.....	37
I.5.1. Fonctions hépatiques.....	37
I.5.2. Structure et populations cellulaires	37
II. L'hépatite chronique C.....	39
II.1. Epidémiologie	39
II.2. Modes de transmission et diagnostic	39
II.3. Physiopathologie	40
II.3.1. L'hépatite aigüe.....	41
II.3.2. L'hépatite chronique.....	42
II.3.3. La fibrose et la cirrhose	45

II.3.4. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)	45
Epidémiologie et facteurs de risque.....	45
Carcinogénèse.....	46
Anatomie pathologique	46
II.4. Traitement standard et thérapies émergentes de l'hépatite chronique C	47
II.4.1. (PEG-IFN)- α et ribavirine	47
II.4.2. Les « Direct-Acting Anti-viral agents » (DAA)	49
II.4.3. Les anticorps neutralisants	51
II.4.4. Les molécules ciblant les facteurs de l'hôte	52
II.5. Stratégies thérapeutiques du CHC.....	53
II.5.1. La résection chirurgicale	53
II.5.2. L'ablation locale percutanée	53
II.5.3. La chimioembolisation transartérielle (TACE).....	54
II.5.4. La transplantation hépatique.....	54
III. Les modèles animaux de l'infection par le VHC.....	55
III.1. Le chimpanzé	55
III.2. Le tupaia	55
III.3. Les modèles murins	56
III.3.1. Les souris transgéniques	56
III.3.2. Les souris humanisées	58
Les souris Alb-uPA/SCID.....	58
Les souris FRG	61
IV. Les Cellules Génétiquement Modifiées exprimant un gène de toxicité conditionnelle ("gène suicide").....	65
IV.1. L'alloréactivité	65
IV.1.1. L'alloréactivité T	65
IV.1.2. L'alloréactivité NK	68
IV.2. Utilisation thérapeutique de l'alloréactivité : l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	71
IV.2.1. CSH et reconstitution hématopoïétique	72
IV.2.2. CSH et alloréactivité.....	72
IV.3. Les Cellules Génétiquement Modifiées exprimant un « gène suicide » : contrôle de l'alloréactivité.....	73
IV.3.1. Stratégie de production des LGM	74
IV.3.2. Différents modes d'activation et de culture.....	74
IV.3.3. Gènes de sélection utilisés	75
IV.3.4. Essais cliniques.....	76

V. Approches d'immunothérapie du CHC et des hépatites virales chroniques	77
V.1. Les cellules CIK	77
V.1.1. Activité anti-tumorale.....	77
V.1.2. Activité anti-virale.....	78
V.2. Les cellules IMAK	79
V.3. Les lymphocytes hépatiques.....	79

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....82

PARTIE I : Immunothérapie du CHC et de l'infection par le VHC par administration de lymphocytes génétiquement modifiés exprimant le gène de toxicité conditionnelle HSV-tk : preuves de concept.....**84**

MATERIEL ET METHODES.....85

I. Les lymphocytes génétiquement modifiées (LGM)	86
I.1. Production du surnageant rétroviral	86
I.2. Activation, transduction et expansion des CMN	86
II. Les lignées cellulaires	88
II.1. Culture.....	88
II.2. Production de lignées exprimant la luciférase	88
III. Cytométrie en flux	88
III.1. Anticorps utilisés	88
III.2. Immunomarquages membranaires	89
III.3. Analyse des résultats	89
IV. Isolement cellulaire par tri immunomagnétique.....	90
IV.1. Purification des cellules transduites	90
IV.2. Isolement des cellules T, NK, NKT.....	91
V. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité cytotoxique des LGM	92
VI. Réaction lymphocytaire mixte (MLR).....	92
VII. Identification des doublets par cytométrie en flux	93
VIII. Test de cytotoxicité par marquage du CD107a	93
IX. Dosage de la production de cytokines par Elisa	94
X. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité cytotoxique des LGM	94
X.1. Etude du tropisme des LGM après injection <i>in vivo</i>	94
X.2. Modèle xénogénique sous-cutané.....	95
X.3. Modèle xénogénique orthotopique.....	95
XI. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-virale des LGM	96
XI.1. Modèle réplicon	96
XI.2. Modèle VHCcc	97

XII. Prévention de l'allo-immunisation <i>in vivo</i>	97
RESULTATS.....	98
Immunothérapie du CHC.....	99
I. Caractérisation des LGM	100
I.1. Sous-populations lymphocytaires.....	100
I.2. « Contrôles qualité »	102
I.2.1. Pureté des LGM après tri immunomagnétique.....	102
I.2.2. Sensibilité des LGM et des sous-populations lymphocytaires au GCV.....	102
II. Propriétés fonctionnelles des LGM <i>in vitro</i>	103
II.1. Activité cytotoxique	104
II.2. Réponse proliférative en réaction lymphocytaire mixte	106
II.3. Production de cytokines.....	108
III. Caractérisation de l'activité cytotoxique des LGM <i>in vitro</i>	110
III.1. L'activation par CD3/IL-2 permet une cytotoxicité maximale.....	110
III.2. La transduction rétrovirale n'affecte pas la cytotoxicité des LGM.....	112
III.3. Le potentiel cytotoxique des LGM est dépendant de l'IL-2.....	113
III.4. Les LGM conservent leur activité cytotoxique pendant 28 jours de culture	114
III.5. L'activité cytotoxique des LGM est non-restreinte par le CMH	115
III.5.1. Validation de l'anticorps anti-HLA cl.I en MLR.....	115
III.5.2. Effet du blocage du CMH de classe I sur la cytotoxicité des LGM.....	116
III.6. Les trois sous-populations lymphocytaires contribuent à l'activité cytotoxique des LGM .	117
III.6.1. Tris immunomagnétiques	117
III.6.2. Test d'attachement.....	118
III.6.3. Test de cytotoxicité par marquage membranaire du CD107a.....	119
III.7. Mécanismes impliqués dans la lyse des cellules cibles par les LGM.....	119
III.8. Les LGM sont similaires aux « Cytokine-Induced Killer cells ».....	121
IV. Activité cytotoxique des LGM <i>in vivo</i>.....	122
IV.1. Modèle sous-cutané	122
IV.2. Modèle orthotopique	123
IV.2.1. Les LGM migrent préférentiellement dans le foie après injection intraveineuse.....	123
IV.2.2. Les LGM ont une activité anti-tumorale <i>in vivo</i>	126
V. Résistance des LGM à la cyclosporine.....	127
Immunothérapie de l'infection par le VHC.....	129
I. Les LGM ont une activité anti-virale vis-à-vis du VHC	130
II. Caractérisation de l'activité anti-virale des LGM.....	135
II.1. L'activité anti-virale des LGM est principalement médiée par l'IFN- γ	135
II.2. Les cellules CD56+ (NK et NKT) participent davantage à l'activité anti-virale des LGM ...	136
II.3. L'activité anti-virale des LGM n'est pas inhibée par les inhibiteurs de calcineurine.....	136

DISCUSSION.....	139
PARTIE II : Prévention <i>in vivo</i> de l'infection par le VHC par l'administration d'un anticorps monoclonal ciblant le récepteur CLDN1.....	151
MATERIEL ET METHODES.....	152
I. Greffe des HPH dans les souris Alb-uPA ^{+/+} /SCID	153
II. Dosage d'albumine	153
III. Anticorps	154
III.1. Provenance des anticorps	154
III.2. Détermination de la pharmacocinétique des anticorps	154
III.2.1. Dosage de l'anticorps anti-CLDN1 par cytométrie en flux	155
III.2.1. Dosage des anticorps par dosage Elisa.....	155
IV. Stratégie de prévention de l'infection par le VHC	155
V. Evaluation de la toxicité hépatique par immunohistochimie.....	156
V.1. Préparation des lames histologiques.....	156
V.2. Coloration hématoxyline-éosine.....	156
V.3. Mise au point des marquages en immunohistochimie.....	156
RESULTATS	160
I. Pharmacocinétique des anticorps <i>in vivo</i>	161
II. L'anticorps monoclonal anti-CLDN1 prévient l'infection <i>in vivo</i> par le VHC.....	162
III. L'administration de l'anticorps anti-CLDN n'est pas toxique pour les hépatocytes humains....	164
DISCUSSION.....	168
DISCUSSION GENERALE.....	172
BIBLIOGRAPHIE.....	175

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des géotypes du VHC.....	20
Figure 2 : Structure du VHC.....	21
Figure 3 : Schéma structural de la lipo-viro-particule (LVP).....	21
Figure 4 : Cycle viral du VHC.....	22
Figure 5 : Modèle de l'entrée du VHC dans les hépatocytes.....	23
Figure 6 : Structure de SR-BI.....	25
Figure 7 : Structure de CD81.....	26
Figure 8 : Structure de CLDN1.....	26
Figure 9 : Les jonctions serrées.....	27
Figure 10 : Structure d'occludine.....	29
Figure 11 : Organisation du génome du VHC et génération des protéines virales.....	31
Figure 12 : Modèle hypothétique de la production des particules virales.....	33
Figure 13 : Modes de transmission du VHC d'une cellule infectée à une cellule naïve.....	34
Figure 14 : Structure du réplicon sub-génomique.....	34
Figure 15 : Stratégie de production des VHCpp.....	36
Figure 16 : Représentation schématique de l'endothélium sinusoidal hépatique... ..	38
Figure 17 : Prévalence mondiale de l'hépatite chronique C.....	39
Figure 18 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	41
Figure 19 : Cinétique des différents marqueurs lors de l'infection aiguë par le VHC.....	42
Figure 20 : Cinétique des différents marqueurs lors de l'infection chronique par le VHC.....	43
Figure 21 : Stratégies d'évasion du VHC au système immunitaire inné.....	44
Figure 22 : Réponses virologiques au traitement (PEG-IFN)- α / ribavirine.....	48
Figure 23 : Rôle de l'enzyme uPA dans la fibrinolyse.....	58
Figure 24 : Etablissement du modèle Alb-uPA ^{+/+} /SCID.....	60
Figure 25 : Dégénérescence hépatique induite par l'absence de l'enzyme Fah.....	62
Figure 26 : Mécanisme de reconnaissance des LTCD4 ⁺ et LTCD8 ⁺	66
Figure 27 : Mécanismes de présentation des alloantigènes aux lymphocytes T... ..	67
Figure 28 : Récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK et leurs ligands ..	69
Figure 29 : Inhibition et activation des cellules NK.....	70
Figure 30 : Les mismatch KIR / KIR-L sont responsables de l'alloréactivité NK.....	71
Figure 31 : Stratégie d'immunothérapie adoptive de l'infection par le VHC lors de la transplantation hépatique par l'utilisation des lymphocytes du greffon.....	80
Figure 32 : Stratégie de production des LGM.....	87
Figure 33 : Exemple de marquage CD3 / CD34 sur des LGM.....	90
Figure 34 : Méthode de tri pour l'isolement des cellules T, NK et T NK-like.....	91

Figure 35 : Expansion relative des-populations T, NK et NKT après 14 jours de culture.....	101
Figure 36 : Efficacité de transduction et pureté des LGM après tri immunomagnétique.....	102
Figure 37 : Sensibilité <i>in vitro</i> des LGM au GCV.....	103
Figure 38 : Activité cytotoxique des LGM vis-à-vis de différentes lignées cellulaires.....	105
Figure 39 : Réponse proliférative des CMN et les LGM suite à la stimulation par différentes lignées cellulaires.....	107
Figure 40 : Production d'IFN- γ et de TNF- α par les CMN et les LGM stimulés par différentes lignées cellulaires.....	109
Figure 41 : Expansion relative des cellules cultivées Co _{CD3+IL-2} , Co _{CD3/CD28+IL-2} , Co _{CD3+IL-7} et Co _{CD3/CD28+IL-7}	111
Figure 42 : Activité cytotoxique de cellules cultivées Co _{CD3+IL-2} , Co _{CD3/CD28+IL-2} , Co _{CD3+IL-7} et Co _{CD3/CD28+IL-7}	111
Figure 43 : Phénotype des cellules Co _{CD3+IL-2} , Co _{CD3/CD28+IL-2} , Co _{CD3+IL-7} et Co _{CD3/CD28+IL-7}	112
Figure 44 : Cytotoxicité des LGM par rapport aux CMN et Co.....	113
Figure 45 : Activité cytotoxique des LGM en présence ou en absence d'IL-2 et d'IL-7.....	114
Figure 46 : Cytotoxicité des LGM après 7, 14, 21 et 28 d'expansion.....	115
Figure 47 : Test de l'anticorps anti-HLA de classe I en MLR.....	116
Figure 48 : Effet de l'anticorps anti-HLA de classe I sur la lyse de Huh7 par les LGM.....	116
Figure 49 : Potentiel cytotoxique des sous-populations lymphocytaires T, NKT et NK.....	117
Figure 50 : Attachement des sous-populations lymphocytaires aux cellules cibles	118
Figure 51 : Test de cytotoxicité par marquage membranaire du CD107a.....	120
Figure 52 : Effet des anticorps bloquants anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-FasL et anti-TRAIL.....	121
Figure 53 : Pourcentage des sous-populations lymphocytaires et activité cytotoxique des Co et des CIK générées selon différents protocoles...	122
Figure 54 : Cytotoxicité des LGM <i>in vivo</i>	124
Figure 55 : Localisation des LGM après injection par voies i.p. et i.v.....	125
Figure 56 : Effet anti-tumoral des LGM.....	127
Figure 57 : Effet de la cyclosporine A sur l'activité cytotoxique des LGM <i>in vitro</i> et sur leur potentiel d'induction de GvHD.....	128
Figure 58 : Activité anti-virale des LGM en co-culture et en transwell, et viabilité des cellules cibles (modèle réplicon).....	132
Figure 59 : Activité anti-virale des LGM et viabilité des cellules cibles (modèle VHCcc).....	133
Figure 60 : Activité anti-virale des LGM activés par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes.....	134

Figure 61 : Effet des anticorps bloquants anti-IFNs sur l'activité anti-virale des LGM en co-culture et en transwell (modèle réplicon).....	135
Figure 62 : Activité anti-virale des LGM CD56- et des CD56+ (modèles réplicon et VHCcc).....	137
Figure 63 : Effet des inhibiteurs de calcineurine CsA et FK506 sur l'activité anti-virale des LGM	138
Figure 64 : Pharmacocinétique de l'anticorps anti-CLDN1 et de l'anticorps témoin.....	161
Figure 65 : Prévention de l'infection VHC <i>in vivo</i> par l'administration de l'anticorps monoclonal anti-CLDN1.....	163
Figure 66 : Dosage de l'albumine humaine dans le sérum des souris traitées.....	164
Figure 67 : Mise au point des marquages des HPH en immunohistochimie.....	166
Figure 68 : Evaluation de la toxicité hépatique de l'anticorps anti-CLDN1 par marquage de la cytokératine 18 en immunohistochimie.....	167

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes de sélection utilisés pour la purification de LGM.....	75
Tableau 2 : Etudes cliniques utilisant les cellules CIK comme traitement adjuvant du CHC.....	78
Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les immunomarquages analysés par cytométrie en flux.....	89
Tableau 4 : Répartition des sous-populations T, NK et NKT parmi les CMN, les Co et les LGM.....	101
Tableau 5 : Déshydratation des échantillons.....	157
Tableau 6 : Déparaffinage des lames.....	157
Tableau 7 : Coloration hématoxyline-éosine.....	158
Tableau 8 : Anticorps utilisés pour les marquages en immunohistochimie.....	159

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
CFSE	Carboxyl Fluorescein Succimidyl Ester
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CIK cells	Cytokine-Induced Killer cells
CLDN1	Claudine-1
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMN	Cellules Mononuclées
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CsA	Cyclosporine A
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
GAGs	Glycosaminoglycanes
GCV	Ganciclovir
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvT	Graft-versus-Tumor
HDL	High-Density Lipoprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPH	Hépatocytes Primaires Humains
HSV-tk	Herpes Simplex Virus thymidine kinase
IFN- α	Interféron-alpha
IFN- β	Interféron-beta
IFN- γ	Interféron-gamma
i.p.	intrapéritonéal
i.v.	intraveineux
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
LAK cells	Lymphokine-Activated Killer cells
LDL	Low-Density Lipoprotein
LGM	Lymphocytes Génétiquement Modifiés
L-SIGN	Liver-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
LT	Lymphocyte
LVP	Lipo-viro-particule
MLR	Réaction Lymphocytaire Mixte

NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NANBH	Non-A Non-B Hepatitis
NASH	Non-Alcoholic SteatoHepatitis
NK cells	Natural Killer cells
NKT cells	Natural Killer T cells
OCLN	Occludine
RE	Réticulum Endoplasmique
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
siARN	ARN interférant
SR-BI	Scavenger Receptor class B type I
TH	Transplantation Hépatique
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
UI	Unités Infectieuses
uPA	urokinase-like Plasminogen Activator
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VHCcc	VHC produit par culture cellulaire
VHCpp	Pseudo-particules du VHC
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein

Introduction

I. Le virus de l'hépatite C

I.1. Classification et variabilité génomique

Les premiers pas vers la découverte du virus de l'hépatite C (VHC) ont eu lieu au milieu des années 70 lorsque Feinstone et al. mettent en évidence l'existence d'un agent infectieux encore méconnu, responsable d'une hépatite qui n'était pas due au virus de l'hépatite A ni à celui de l'hépatite B (Feinstone et al., 1975). Ce n'est que deux décennies plus tard que le virus responsable de cette hépatite initialement appelée non-A non-B (NANBH) est identifié ; en 1989, ses caractéristiques moléculaires ont été mises en évidence à partir de sérums de patients présentant une NANBH (Choo et al., 1989). Par la suite baptisé virus de l'hépatite C (VHC), il appartient au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae* (Moradpour et al., 2007).

Il est réparti en 6 génotypes (1 à 6) dont les séquences nucléotidiques diffèrent de 30-35%, divisés eux-mêmes en sous-types (a, b, c...) qui ont un taux de variation de 20-25% (Figure 1). Les différents génotypes et leurs sous-types sont inégalement répartis au niveau mondial. Les génotypes 1a et 1b sont prédominants en Europe et aux Etats-Unis. Le génotype 2 est majoritaire en Afrique de l'Ouest, les sous-types 2a et 2b étant également fréquents en Europe, en Amérique du Nord et au Japon alors que le sous-type 2c prédomine dans le nord de l'Italie. Le génotype 3 est très répandu en Asie du Sud, le génotype 4 en Egypte, au Moyen Orient et en Afrique Sub-Saharienne, le génotypes 5 en Afrique du Sud et le génotype 6 en Asie du Sud Est (Simmonds, 2004). Par ailleurs, du fait de mutations constantes du génome viral pendant l'infection chronique, de nombreuses quasi-espèces coexistent au sein d'un même individu, ce qui reflète une importante hétérogénéité génétique du virus.

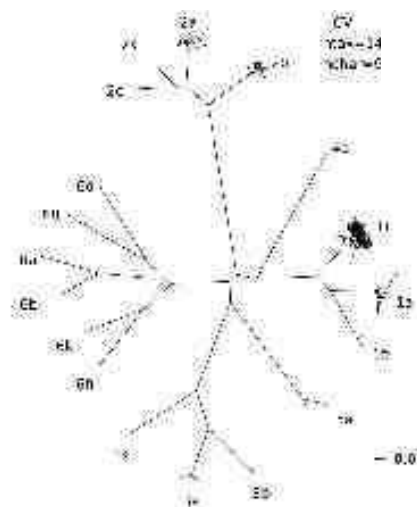


Figure 1 : Arbre phylogénétique des génotypes du VHC. Adapté de Schultz et al., 2006

I.2. Structure du virion et circulation dans l'hôte

D'un diamètre de 55-65 nm, le VHC est entouré d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Figure 2). Cette enveloppe renferme une nucléocapside d'un diamètre de 30-35 nm qui, formée par la protéine Core, contient le génome viral. Ce dernier est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9.6kb.

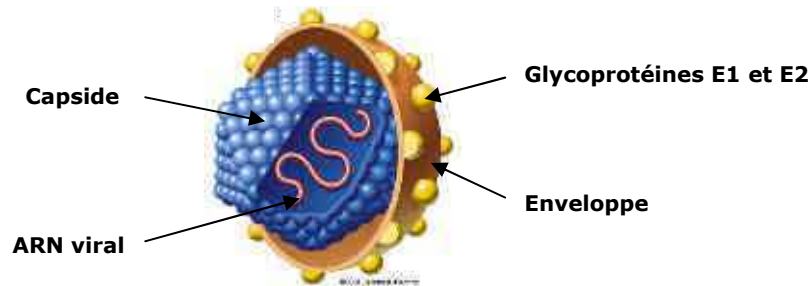


Figure 2 : Structure du VHC.

Le VHC est présent dans la circulation sanguine de l'hôte sous différentes formes ; il peut circuler sous forme libre, mais il est de façon plus fréquente associé à des Low-Density Lipoproteins (LDL), à des Very-Low-Density Lipoproteins (VLDL) ou à des immunoglobulines (Moradpour et al., 2007). En effet, les particules virales circulantes constituent une population hétérogène de virions, qui ont des densités variant de 1,03 à 1,20g/cm³ (Negro, 2010). Les associations virus-LDL ou virus-VLDL, appelées lipo-viro-particules (LVP), sont riches en triglicérides, apolipoprotéines B (apoB), apoE et apoCII et CIII (Figure 3). Elles sont davantage infectieuses que le virus sous forme libre, l'ensemble des étapes du cycle viral du VHC étant étroitement lié au métabolisme lipidique des hépatocytes (Negro, 2010).

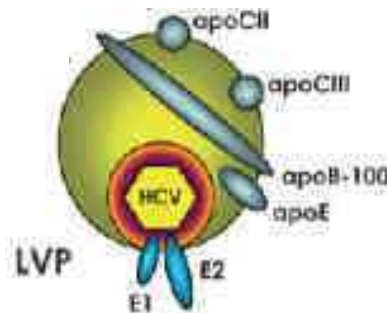


Figure 3 : Schéma structural de la lipo-viro-particule (LVP). D'après Negro et al., 2010

Sous sa forme la plus infectieuse, le VHC est associé à des lipoprotéines (LDL ou VLDL) constituées des apolipoprotéines apoCII, apoCIII, apoB et apoE pour former un complexe appelé une lipo-viro-particule.

I.3. Le cycle viral

Le VHC a un tropisme particulièrement restreint puisque les seules cellules cibles du virus sont les hépatocytes, cellules du foie. D'autres types cellulaires tels que les lymphocytes B et les cellules dendritiques peuvent être des réservoirs du virus mais n'ont pas la capacité de supporter la réplication virale (Dustin and Rice, 2007). Seuls les humains et les chimpanzés peuvent être infectés par le VHC, ce qui reflète l'existence de facteurs de l'hôte spécifiques de l'espèce et indispensables pour l'infection, et cela au niveau de l'ensemble des différentes étapes du cycle viral du VHC. Ceci rend impossible, par exemple, l'infection des hépatocytes murins (Frentzen et al., 2011).

Les étapes clés du cycle viral sont représentées Figure 4. Suite à l'interaction avec des récepteurs membranaires spécifiques, le virus est endocyté dans la cellule cible puis l'ARN viral est relargué dans le cytoplasme après décapsidation. La traduction et la réplication de l'ARN ont lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis les particules virales sont assemblées, maturées dans l'appareil de Golgi avant d'être relarguées à l'extérieur de la cellule. Les virions nouvellement formés peuvent alors infecter de nouvelles cellules cibles.

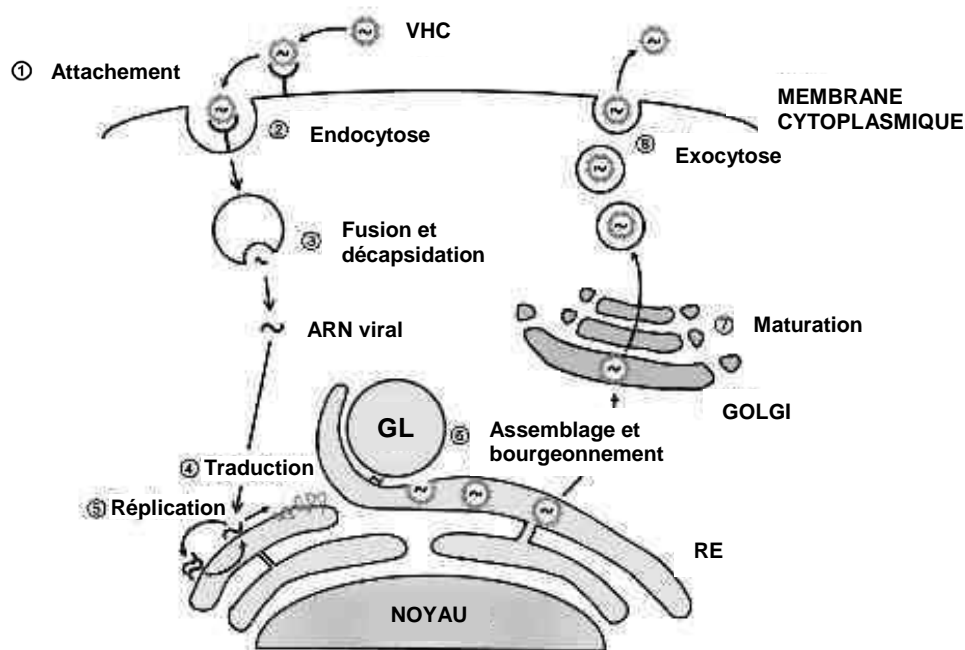


Figure 4 : Cycle viral du VHC. (Fukasawa, 2010)

Après attachement à la cellule cible (1), le VHC interagit avec des récepteurs membranaires pour être endocyté (2). Après décapsidation (3), l'ARN viral est relargué dans le cytoplasme puis traduit (4) et répliqué au niveau du RE (5) où il va être assemblé (6). Sa maturation a lieu dans l'appareil de Golgi (7), puis le virion nouvellement formé est exocyté dans l'espace extracellulaire (8) pour l'infection de nouvelles cellules.

GL, gouttelette lipidique; RE, réticulum endoplasmique

I.3.1. L'entrée

L'entrée du VHC constitue le premier contact entre le virus et la cellule hôte, et initie le cycle viral ; elle est donc indispensable à l'infection. Il s'agit d'un processus complexe nécessitant plusieurs étapes, impliquant de nombreux facteurs de l'hôte et médié principalement par les glycoprotéines virales E1/E2 (Figure 5). Le virus, associé aux lipoprotéines, interagit avec des molécules d'attachement que sont les récepteurs des LDL (LDL-R), des glycosaminoglycanes (GAG) et des lectines de type C, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) et Liver-SIGN (L-SIGN), avant de reconnaître spécifiquement le scavenger récepteur BI (SR-BI) puis le CD81. Suite à ces interactions, le virus est dirigé vers les jonctions serrées formées par les protéines de jonctions Claudine-1 (CLDN1) et Occludine (OCLN). La particule virale est ensuite internalisée par endocytose de façon clathrine-dépendante, et l'acidification de l'endosome précoce entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et la libération de la capside dans le cytoplasme cellulaire (Zeisel et al., 2011).

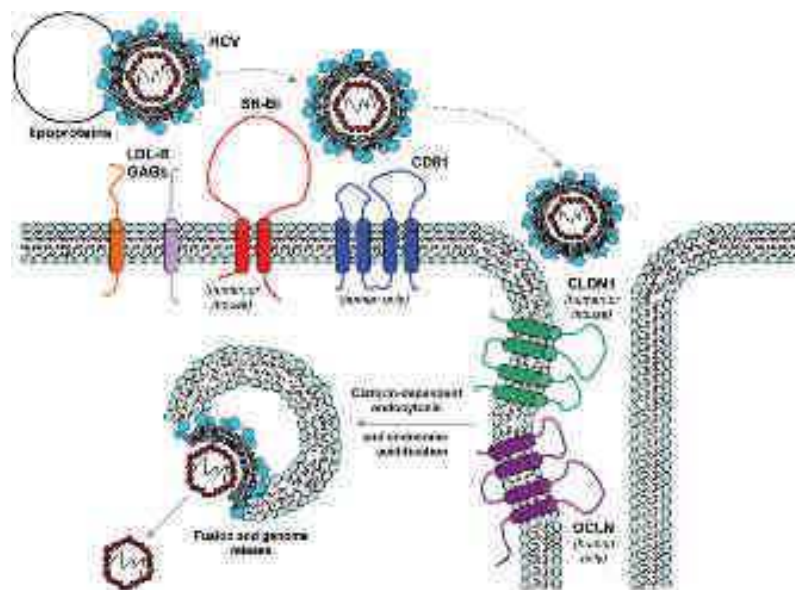


Figure 5 : Modèle de l'entrée du VHC dans les hépatocytes. (Eyre et al., 2009)

Associé aux lipoprotéines, le VHC interagit avec les récepteurs des LDL, les GAGs et les lectines de type C (DC-SIGN et L-SIGN) avant de reconnaître SR-BI et CD81. Le virus est ensuite dirigé vers les jonctions serrées où il interagit avec CLDN1 et OCLN pour être endocyté de façon clathrine-dépendante. L'endosome est acidifié avant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endosome pour le relargage de la capside dans le cytoplasme cellulaire.

LDL, Low-Density Lipoprotéine ; GAGs, Glycosaminoglycanes ; SR-BI, Scavenger Récepteur-BI ; CLDN1, Claudine 1 ; OCLN, Occludine

Les GAGs

Polysaccharides linéaires présents de façon abondante à la surface des cellules, les GAGs sont des récepteurs de faible affinité permettant d'initier l'interaction de nombreux virus avec leur cellules cibles, et notamment le VHC avec les hépatocytes (Burlone and Budkowska, 2009). Plusieurs types de GAGs existent, mais ceux hautement sulfatés tels que les héparanes sulfates semblent davantage impliqués dans l'attachement des virus à leurs cellules cibles. Cependant, des études ont suggéré qu'une interaction avec l'hétérodimère E1/E2 seul ne suffit pas pour permettre l'entrée des particules virales, ce qui laisse supposer que l'attachement aux héparanes sulfates fait intervenir les lipoprotéines auxquelles est lié le virus (Andréo et al., 2007). Le rôle exact des GAGs dans l'entrée du virus reste encore à élucider.

Les lectines de type C

DC-SIGN et L-SIGN sont des protéines membranaires de la famille des lectines de type C, non spécifiques du VHC. En effet, elles ne sont pas exprimées par les hépatocytes mais par les cellules de Kuppfer, les cellules dendritiques et les lymphocytes dans le cas de DC-SIGN, et par les cellules endothéliales sinusoidales du foie dans le cas de L-SIGN. Le rôle de ces lectines consiste initialement à capturer les pathogènes et à les internaliser afin qu'ils soient éliminés. Cependant, certains virus détournent les fonctions des lectines pour les utiliser comme facteurs d'attachement à leur cellule cible. Ainsi, DC-SIGN et L-SIGN capturent le VHC via E2 de façon calcium-dépendante et l'adressent aux hépatocytes (Burlone and Budkowska, 2009). Une contribution importante de ces lectines dans l'infection consisterait donc à concentrer le virus aux abords des hépatocytes.

Le récepteur des LDLs

Le récepteur des LDLs (R-LDL) est impliqué dans l'endocytose du cholestérol dans les hépatocytes. Les LDLs, responsables du transport du cholestérol, sont internalisés dans des puits à clathrine, dirigés vers les endosomes puis dégradés dans les lysosomes pour le relargage du cholestérol dans le cytosol. De plus, le R-LDL est un récepteur spécifique de ApoB et ApoE (Negro, 2010). Ainsi, il a été suggéré que le R-LDL participe à l'entrée du VHC via l'interaction avec les LDL associées aux particules virales avant l'interaction du VHC avec les autres récepteurs. Une voie d'entrée du virus exclusivement médiée par le R-LDL n'est pas exclue (Burlone and Budkowska, 2009).

SR-BI

La glycoprotéine SR-BI est exprimée par divers types cellulaires, mais de façon élevée au niveau du foie, des organes stéroïdogènes et des cellules présentatrices d'antigènes (Zeisel et al., 2007). Il est constitué de deux domaines cytoplasmiques, de deux domaines transmembranaires et d'une grande boucle extracellulaire (Timpe and McKeating, 2008) (Figure 6). SR-BI peut interagir avec plusieurs classes de lipoprotéines, les High-Density Lipoproteins (HDL), les LDL et les VLDL, ainsi qu'avec des formes modifiées telles que les LDL oxydées. Le récepteur est impliqué dans le transport du cholestérol, des HDL vers l'intérieur de la cellule mais également dans le sens inverse (Burlone and Budkowska, 2009).



Figure 6 : Structure de SR-BI. (Timpe and McKeating, 2008)

Il a été identifié en 2002 comme facteur potentiel intervenant dans l'entrée du VHC, grâce à sa capacité de lier la glycoprotéine E2 soluble (Scarselli et al., 2002). L'utilisation d'anticorps bloquants anti-SR-BI ainsi que la diminution de l'expression de SR-BI par des ARN interférants (siARN) inhibent *in vitro* l'infection de cellules par du VHC produit par culture cellulaire (VHCcc) (Zeisel et al., 2007). Ainsi, il joue un rôle majeur dans l'entrée du virus en intervenant après l'étape d'attachement, et cela en association étroite avec le CD81 (Zeisel et al., 2007).

CD81

Le CD81 a été le premier récepteur du VHC à avoir été identifié (Pileri et al., 1998). Membre de la famille des tétraspanines, la molécule CD81 est formée de domaines intracellulaires N- et C-terminaux, de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires, SEL (Small Extracellular Loop) et LEL (Large Extracellular Loop) (Figure 7). CD81 est exprimée de façon ubiquitaire et possède différentes fonctions d'adhésion cellulaire ou de différenciation (Timpe and McKeating, 2008).



Figure 7 : Structure de CD81. (Timpe and McKeating, 2008)

Le rôle majeur de CD81 dans l'entrée du VHC a notamment été montré par le fait que l'induction de l'expression de CD81 par des cellules normalement non-permissives au VHC rend ces cellules susceptibles à l'infection (Lavillette et al., 2005). Par ailleurs, des anticorps CD81 et des siARN bloquant l'expression de CD81 inhibent l'infection *in vitro* d'hépatocytes primaires humains (HPH) par du sérum de patients chroniquement infectés par le VHC, et cela indépendamment du génotype VHC (Molina et al., 2008). De façon très intéressante, des anticorps CD81 peuvent prévenir l'infection *in vivo* par le VHC chez des souris humanisées avec des HPH humains (Meuleman et al., 2008). CD81 interagit avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 à un stade tardif de l'entrée. Le complexe CD81/E2 est dirigé vers les protéines de jonction OCLN et CLDN1, co-récepteurs clés du virus. De plus, l'interaction CD81/E2 déclenche des cascades de signalisation nécessaires au cycle viral (Burlone and Budkowska, 2009).

Claudine-1

Identifiée comme co-récepteur du VHC en 2007 par Evans et al., la protéine Claudine-1 (CLDN1) fait partie de la superfamille des tétraspanines et de la famille des claudines. Elle est constituée de deux domaines intracellulaires N- et C-terminaux, quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires EL1 et EL2 (Evans et al., 2007) (Figure 8).

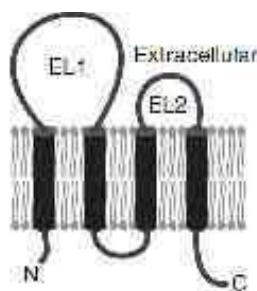


Figure 8 : Structure de CLDN-1. (Evans et al., 2007)

Elle est exprimée de façon importante au niveau du foie, mais également au sein d'autres tissus épithéliaux, principalement le rein (Furuse et al., 1998). Il s'agit d'une protéine entrant dans la composition des jonctions serrées, ces dernières étant localisées au niveau de la partie apicale des membranes latérales cellulaires (Figure 9) (Tsukita et al., 2008). Ces jonctions sont également constituées de la protéine Occludine et de molécules adaptatrices cytoplasmiques (la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM), ZO-1, ZO-2...) permettant un ancrage au cytosquelette d'actine. Les jonctions serrées jouent un rôle important dans la perméabilité et la polarité des hépatocytes, et permettent un transport intercellulaire, passif, médié par des gradients électrochimiques (Will et al., 2008).

En plus de sa présence au sein des jonctions serrées, CLDN1 se localise également au niveau de la surface basolatérale des hépatocytes (Zeisel et al., 2011).

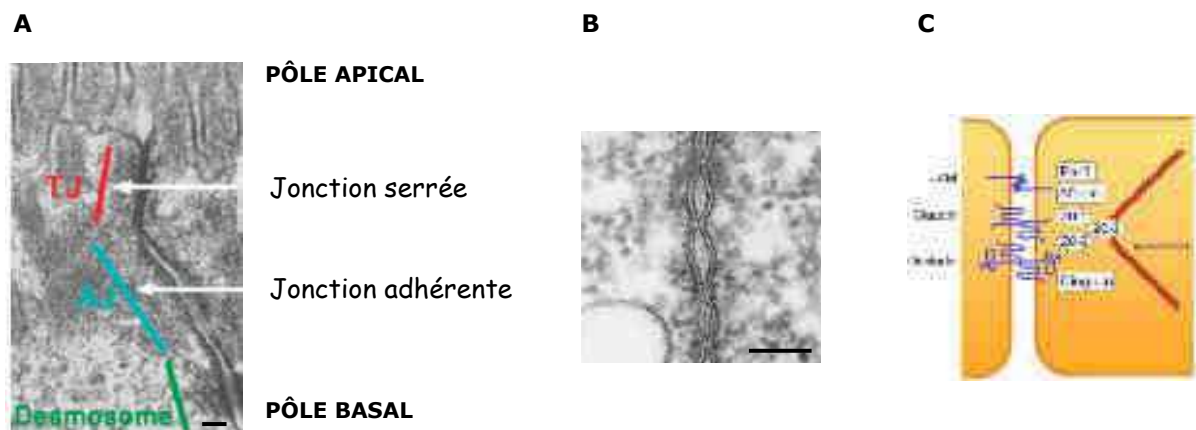


Figure 9 : Les jonctions serrées. (Tsukita et al., 2008; Will et al., 2008).

A : Image de microscopie électronique des jonctions cellulaires (TJ, tight junction ; AJ, adherent junction)

B : Image de microscopie électronique représentant des jonctions serrées

C : Protéines composant les jonctions serrées (JAM, junctional adhesion molecule)

Barres noires = 100nm

Malgré l'absence de contact direct avec le VHC, CLDN1 a été identifiée comme récepteur clé du virus au niveau des jonctions serrées et potentiellement au niveau basolatéral. Elle co-localise au niveau apical et basolatéral avec le CD81, récepteur avec lequel elle forme un complexe permettant l'entrée du virus, et cela à un stade tardif du processus (Evans et al., 2007). Des anticorps dirigés contre un épitope inséré dans EL1 inhibe l'infection par le VHC, indiquant que cette boucle extracellulaire est particulièrement impliqué dans l'entrée (Evans et al., 2007). Krieger et al. sont les premiers à produire et à caractériser des anticorps dirigés contre les boucles

extracellulaires de CLDN1 qui inhibent efficacement l'entrée du VHC (Krieger et al., 2010). Ces anticorps agissent en empêchant l'interaction de E2 avec la surface de la cellule cible, même si aucune interaction de CLDN1 avec E1/E2 n'a pu être mise en évidence, et en induisant la dissociation du complexe CLDN1/CD81 (Krieger et al., 2010). Peu après, la même équipe a produit six anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes conformationnels présents au niveau de EL1 (Fofana et al., 2010). Ces anticorps monoclonaux, et en particulier le clone OM-7D3-B3, inhibent de façon dose-dépendante l'infection de HPH par le VHC *in vitro*, et cela quelque soit le génotype du VHC (1 à 6). Cet effet est obtenu sans toxicité envers les hépatocytes, l'intégrité des jonctions serrées étant préservée (Fofana et al., 2010).

La transplantation hépatique (TH), option thérapeutique de choix pour les patients atteints de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire, se limite chez les patients chroniquement infectés par le VHC par une réinfection extrêmement rapide et systématique du greffon. Des quasi-espèces, ou « variants », présentes avant la greffe deviennent dominantes après la greffe, et échappent aux anticorps neutralisants autologues en plus d'être particulièrement infectieux par rapport aux variants non-sélectionnés (Fafi-Kremer et al., 2010). L'effet de l'anticorps anti-CLDN1 a été étudié sur l'infectiosité de ces variants, et il a été montré qu'il est capable de bloquer l'entrée de variants issus de patients chroniquement infectés et résistants aux anticorps neutralisants autologues (Fofana et al., 2010).

L'expression de CLDN1 dans des cellules non-hépatocytaires rend ces cellules permissives au VHC (Evans et al., 2007). Le remplacement de la CLDN1 humaine par la CLDN1 murine n'affecte que légèrement l'infection des cellules par le VHC, suggérant que CLDN1 n'est pas un facteur majeur responsable de la spécificité d'espèce du VHC (Frentzen et al., 2011).

Deux autres membres de la famille claudine, CLDN-6 et CLDN-9, semblent être impliquées dans l'entrée du VHC (Zheng et al., 2007). Elles possèdent une région EL1 très conservée et ont des fortes homologies de séquence avec CLDN1. Elles sont exprimées par les hépatocytes, mais également par les cellules du sang périphérique ce qui rend possible l'existence d'un réservoir de virus au sein de ces cellules. Comme CLDN1, elles sont capables de médier l'entrée du VHC dans des cellules normalement non-permissives au virus (Zheng et al., 2007).

Occludine

Un autre composant des jonctions serrées a été identifié comme un facteur d'entrée important du VHC, la protéine occludine (OCLN) (Ploss et al., 2009). Elle est

formée de deux domaines intracellulaires N- et C-terminaux, quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires (Figure 10) (Ploss et al., 2009). Contrairement à CLDN1, OCLN semble interagir directement avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 afin de permettre l'entrée du virus (Liu et al., 2009), et cela à un stade tardif de l'entrée. Son expression rend permissives au VHC des cellules normalement non-infectables par le virus, et l'inhibition de son expression empêche l'infection de cellules permissives par VHCpp ou VHCcc (Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009).

La protéine OCLN est responsable, avec le CD81, de la spécificité d'espèce puisqu'il a été montré que l'expression de ces deux facteurs d'entrée humains rend des hépatocytes murins permissifs au VHC, en association avec CLDN1 et SR-BI murins (Ploss et al., 2009). Les taux d'infection des cellules murines par VHCpp sont cependant plus faibles que ceux obtenus avec des cellules humaines.

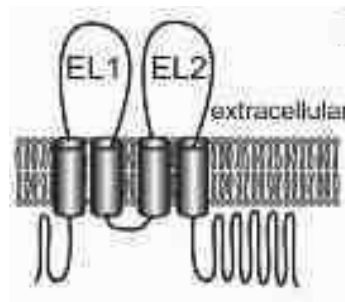


Figure 10 : Structure d'occludine. (Ploss et al., 2009)

NPC1L1 et CD229

Très récemment, deux nouveaux facteurs d'entrée du VHC ont été mis en évidence (18th international symposium on hepatitis C virus and related virus, Seattle, 8-12/09/2011).

Sainz et al. décrivent la protéine Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) qui, impliquée dans le transport du cholestérol, jouerait un rôle dans le processus d'entrée du VHC. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquants ou de siARN permet d'inhiber l'infection de lignées cellulaires par des VHCcc. De plus, un antagoniste de NPC1L1 disponible en clinique, l'ezetimibe, a été testé *in vivo* chez des souris repopulées avec des HPH : cet antagoniste empêche l'apparition d'une infection aiguë lorsqu'il est utilisé en prévention, et induit une diminution de la charge virale en combinaison avec de l'interféron-alpha (IFN- α) chez des animaux chroniquement infectés.

De leur côté, Cartier et al. montrent *in vitro* que le CD229, exprimé à la surface des lymphocytes T et B et jouant un rôle dans la production des IFN de type I et II, serait également exprimé par les hépatocytes et impliqué dans l'entrée du VHC.

Les co-facteurs d'entrée

L'expression hépatique du récepteur SR-BI est principalement régulée de manière post-transcriptionnelle par la protéine adaptatrice PDZK1 (Eyre et al., 2010). L'inhibition de l'expression de PDZK1 induit une baisse de susceptibilité à l'infection VHC, l'effet inverse étant observé en cas de surexpression de la molécule. L'interaction de SR-BI avec PDZK1 au niveau cytoplasmique a ainsi été identifiée comme nécessaire pour une entrée efficace du virus, faisant de PDZK1 un co-facteur d'entrée important pour l'infection par le VHC (Eyre et al., 2010).

Deux co-facteurs ont été plus récemment mis en évidence : Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et Ephrin Receptor A2 (EphA2) (Lupberger et al., 2011). Il s'agit de deux récepteurs à activité tyrosine kinase fortement exprimés au niveau du foie. Alors que EGFR régule la prolifération et la survie cellulaire, la différenciation tissulaire et la carcinogenèse, EphA2 est davantage impliqué dans la morphologie, la polarité et la motilité cellulaire. L'inhibition de leur expression par des siARN induit une diminution importante de l'infection de Huh7.5.1 par des VHCcc, et cela quelque soit le génotype (1a, 1b, 2a, 3 et 4). EGFR et EphA2 sont impliqués dans la mise en place des complexes formés par les différents facteurs d'entrée, et notamment l'association CLDN1 / CD81 qui médie l'entrée du virus. L'activation de EGFR avec son ligand semble être nécessaire pour son rôle dans le processus d'entrée du VHC, alors qu'une voie ligand-dépendante et une voie ligand-indépendante semblent exister pour EphA2. Par conséquent, il s'agit de deux co-facteurs jouant un rôle clé dans l'entrée du virus et représentant de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses, d'autant plus que deux inhibiteurs de protéines kinases, l'erlotinib (inhibiteur de EGFR) et le dasatinib (inhibiteur de EphA2), sont déjà utilisés en clinique pour le traitement du cancer du poumon et induisent une diminution de l'infection par le VHC *in vitro* (erlotinib et dasatinib) et *in vivo* (erlotinib) (Lupberger et al., 2011).

I.3.2. Traduction de l'ARN viral et réplication

Une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte, le virion est décapsidé, libérant ainsi l'ARN viral qui est constitué de trois régions distinctes : 2 régions non-codantes aux

extrémités 5' et 3' (5'-NCR et 3'-NCR) essentielles à la traduction et à la réplication, et un cadre de lecture unique (Open Reading Frame, ORF) codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Figure 11). L'ARN est directement traduit au niveau du réticulum endoplasmique (RE), via un mécanisme dépendant du site interne d'entrée du ribosome (IRES) se trouvant à l'extrémité 5' (Moradpour et al., 2007). La polyprotéine est clivée par des protéases cellulaires et virales, conduisant à la production de trois protéines structurales (E1, E2, Core) et sept non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Les protéines E1, E2, Core et p7 sont clivées par la signal peptidase du RE, alors que les protéines non-structurales sont clivées par la protéase NS2-3 et par la sérine protéase NS3-4A (Moradpour et al., 2007). L'ensemble de ces clivages ont lieu au niveau de la membrane du RE, où les protéines virales vont se localiser.

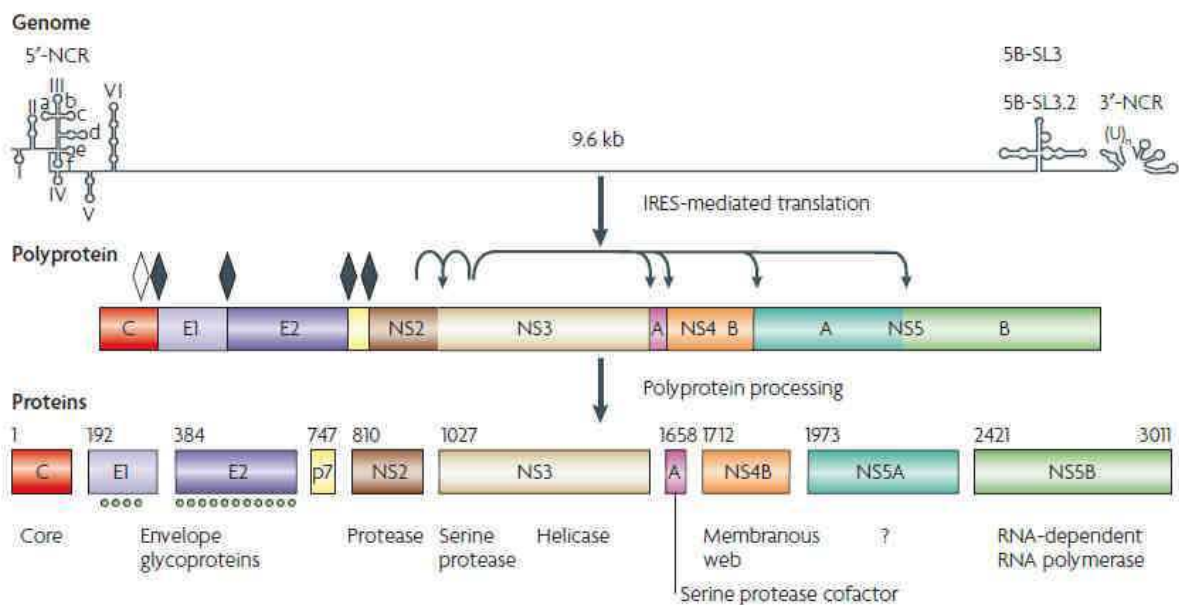


Figure 11 : Organisation du génome du VHC et génération des protéines virales.

(Moradpour et al., 2007)

Le génome du VHC, d'une taille de 9,6kb, est constitué de deux régions non-codantes au niveau 5' et 3' (5'-NCR et 3'-NCR) et d'un cadre de lecture unique codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. Des protéases cellulaires (losanges) et virales (flèches) vont cliver la polyprotéine en protéines structurales qui vont former l'enveloppe virale (E1, E2) et la capsid (Core), et en protéines non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Les positions des acides aminés sont indiquées au dessus de chaque protéine.

Losanges : sites de clivage de la polyprotéine par la signal peptidase du RE (losanges noirs) ou par une signal peptide peptidase (losange blanc)

Ronds : sites de glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Au niveau de la membrane du RE se forme un complexe de réplication (CR), composé de protéines virales non-structurales, de l'ARN en réplication et de membranes cellulaires (Figure 12) (Fukasawa, 2010). Suite à la formation du CR, un réseau membranaire appelé « membranous web » est synthétisé, permettant la concentration de lipides qui facilitent la réplication et l'assemblage (Georgel et al., 2010). La protéine NS5B médie la réplication en catalysant la synthèse d'un ARN complémentaire servant de matrice à un nouveau brin d'ARN. Cette polymérase ne possède pas d'activité correctrice, ou « proof-reading », expliquant la haute variabilité du VHC et la diversité des quasi-espèces au sein d'un même individu (Moradpour et al., 2007).

Plusieurs facteurs cellulaires jouent un rôle dans la traduction et la réplication de l'ARN du VHC. Le micro-ARN-122 (miARN-122) interagit avec 5'-NCR du génome viral et renforce l'association ribosome-ARN viral, ce qui stimule la traduction de la polyprotéine (Henke et al., 2008). De son côté, la cyclophilline A, en interagissant avec NS5B, contribue à l'amplification de l'ARN et à l'assemblage du virion. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique ciblée par la cyclosporine A (CsA) et par son analogue non immunosuppresseur, DEBIO-025, qui sont deux drogues inhibant la réplication du VHC (Kaul et al., 2009).

I.3.3. Assemblage et relarguage des particules virales

Les dernières étapes du cycle viral sont encore très mal connues à ce jour. Il paraît néanmoins que l'assemblage du virus soit effectué par bourgeonnement dans le lumen du RE, suivi d'une étape de maturation au niveau de l'appareil de Golgi avant l'excrétion des particules virales par exocytose (Ploss and Rice, 2009).

Au niveau du RE, NS5A et Core interagissent à la surface des gouttelettes lipidiques, ce qui induit le recrutement des autres protéines non-structurales (Tang and Grisé, 2009). La protéine non-structurale NS2 semble aussi jouer un rôle essentiel dans l'assemblage en se liant aux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et à la viroporine p7 qui est impliquée dans la morphogénèse des virions (Popescu et al., 2011).

Ces étapes apparaissent ainsi étroitement liées au métabolisme lipidique ; en plus d'être le support de l'assemblage des particules virales, les gouttelettes lipidiques fournissent les lipoprotéines qui vont s'associer au virion avant d'être excrétées (Figure 12) (Tang and Grisé, 2009).

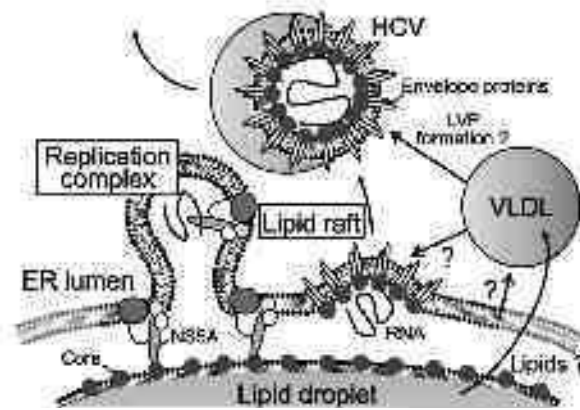


Figure 12 : Modèle hypothétique de la production des particules virales. (Fukasawa, 2010)

Localisée à la surface des gouttelettes lipidiques, la protéine Core interagit avec NS5A, avant le recrutement des autres protéines non-structurales pour la formation d'un complexe de réplication au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Cet environnement riche en lipides est également le lieu de formation des VLDL. Après la réplication, le virus est assemblé et la lipo-viro-particule est formée.

VLDL, Very-Low-Density Lipoprotein; LVP, Lipo-Viro-Particule

I.3.4. Voies de transmission du virus

Il existe deux modes selon lesquelles une cellule naïve peut être infectée par les particules virales nouvellement formées (Figure 13) : la transmission du virus libre (« cell-free » transmission) ou la transmission directe de cellule à cellule (« cell-to-cell » transmission) (Timpe and McKeating, 2008).

Lors de la transmission « cell-free », le virus est exocyté de la cellule infectée et relargué dans l'environnement extracellulaire, puis peut infecter une cellule naïve par un mécanisme d'entrée classique en utilisant les récepteurs spécifiques du virus à la surface de la cellule cible. Lors de la transmission « cell-to-cell », le virus ne transite pas par l'espace extracellulaire mais est transmis directement à la cellule naïve grâce aux jonctions cellulaires. Les récepteurs CD81, SR-BI, CLDN1 et OCDN, qui médient l'entrée du virus dans la transmission « cell-free », semblent également jouer un rôle pour la transmission « cell-to-cell » (Brimacombe et al., 2011). Ce mode de transmission permet au virus d'échapper aux réponses immunitaires et notamment aux anticorps neutralisants, ainsi qu'aux drogues anti-virales ciblant le virus libre présent dans l'espace extracellulaire (Timpe and McKeating, 2008).

Alors que le virus extracellulaire est responsable de la primo-infection par le VHC lors de la transmission entre les hôtes et de la réinfection du greffon hépatique post-transplantation, la transmission « cell-to-cell » serait la voie dominante pour la persistance virale au niveau hépatique chez les patients chroniquement infectés (Brimacombe et al., 2011).

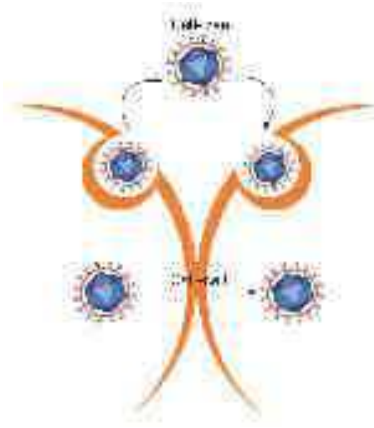


Figure 13 : Modes de transmission du VHC d'une cellule infectée à une cellule naïve. (Timpe and McKeating, 2008)

Deux modes de transmission d'une cellule à une autre ont été rapportés : la transmission du virus libre (« cell-free ») et la transmission directe de cellules à cellules (« cell-to-cell »).

I.4. Les modèles d'études *in vitro*

I.4.1. Les réplicons subgénomiques

L'étude du cycle viral du VHC a longtemps été limitée par l'impossibilité d'infecter des cellules *in vitro*. Dix ans après l'identification du virus grâce au clonage de son ADNc, le développement de réplicons subgénomiques a permis d'étudier la réplication du VHC (Lohmann et al., 1999). Les réplicons sont des ARNs répliatifs bicistroniques dont les portions codant pour les protéines structurales du VHC ont été remplacées par un gène de résistance à un antibiotique, la néomycine (gène *Neo*). Un IRES issu du VHC à l'extrémité 5' permet la traduction du gène *Neo*, qui est suivi d'un IRES provenant du ECMV initiant la traduction des protéines non-structurales, à partir de NS2 ou de NS3 et jusqu'à NS5B (Figure 14).

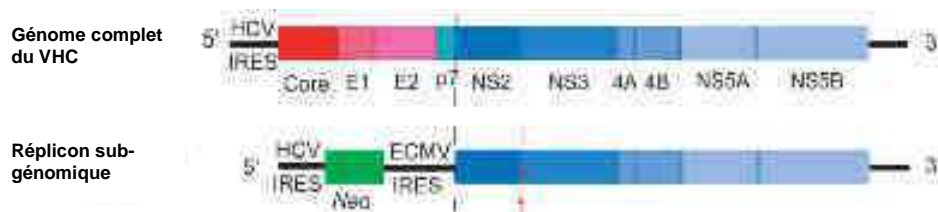


Figure 14 : Structure du réplicon sub-génomique. (Boonstra et al., 2009)

Les réplicons subgénomiques sont constitués du génome du VHC délété des protéines structurales, certains étant aussi délétés pour la protéine non-structurale NS2 (flèche rouge). Ces protéines ont été remplacées par le gène de sélection *Neo*.

IRES, internal ribosome entry site ; Neo, gène de résistance à la néomycine ; ECMV, Encephalomyocarditis virus

Ces ARNs peuvent être transfectés dans des cellules Huh7, lignée de carcinome hépatocellulaire, qui, après sélection à la néomycine, répliquent de façon autonome l'ARN sans toutefois de production de particules virales. Ce modèle permet d'étudier la réplication virale, ainsi que de tester *in vitro* l'efficacité de molécules anti-virales.

L'utilisation de réplicons subgénomiques a permis de sélectionner des lignées cellulaires ayant une forte capacité de répliquer le virus. En effet, des clones dérivés de cellules Huh7 ont été transfectés avec le réplicon, puis traités avec de l'IFN- α . Transfectés à nouveau avec l'ARN viral, elles ont supporté une plus forte réplication du virus par rapport à des Huh7 non-traitées (Blight et al., 2002). Cela a ainsi permis de générer une nouvelle lignée plus permissive à la réplication virale, nommée Huh7.5..

I.4.2. Les pseudo-particules virales (VHCpp)

En 2003, des pseudo-particules du VHC (VHCpp) ont été produites (Bartosch et al., 2003), permettant l'étude des étapes d'entrée du virus. Il s'agit de virus chimériques obtenus après co-transfection de trois vecteurs dans des cellules 293T : un plasmide codant pour les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2 du VHC, un second codant pour les protéines GAG et POL du virus de la leucémie murine (MLV) ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et un troisième codant pour un gène rapporteur tel que la Green Fluorescent Protein (GFP) ou la luciférase (Figure 15). Le surnageant de culture des cellules transfectées, contenant les particules virales sécrétées par les 293T, peut être utilisé pour infecter des cellules naïves, telles que des Huh7 ou des hépatocytes primaires humains (HPH). Le gène rapporteur permet de quantifier l'infection des cellules cibles par les VHCpp.

Les VHCpp infectent les cellules cibles via un mécanisme dépendant des glycoprotéines E1 et E2 du VHC, ce qui permet l'étude des étapes d'entrée du virus et de la capacité d'anticorps neutralisants à empêcher l'infection des cellules cibles. Il est possible de produire des VHCpp à partir de sérums de patients infectés par différents génotypes du VHC, afin d'étudier leur capacité d'entrée et leur susceptibilité à la neutralisation (Lavillette et al., 2005).

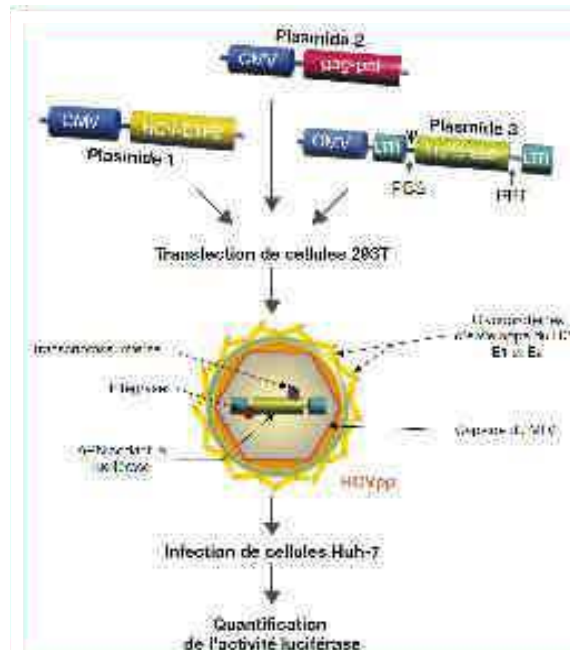


Figure 15 : Stratégie de production des VHCpp. (Voisset and Dubuisson, 2004)

Les VHCpp sont généralement constituées des glycoprotéines d’enveloppes E1 et E2, d’une capsid du MLV (ou du VIH) et d’un gène rapporteur codant pour la luciférase (ou pour la GFP). Après transfection de cellules 293T avec les trois plasmides, les particules virales excrétées sont utilisées pour infecter des cellules Huh7 naïves. L’infection est quantifiée par lecture de l’activité luciférase (ou par analyse de la fluorescence pour la GFP). CMV, promoteur du cytomégalovirus ; LTR, long terminal repeat ; PBS, site de fixation du primer ; PPT, séquence poly-purine

I.4.3. Le système de culture cellulaire du VHC (VHCcc)

En 2001, un clone particulier du VHC de génotype 2a a été isolé à partir d’un patient présentant un cas très rare d’hépatite C fulminante, qui a été dénommé JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1) (Kato et al., 2001). Deux ans plus tard, l’ARN de ce clone a été transfecté dans des Huh7 ; cet ARN viral se réplique sans pression de sélection antibiotique, et permet directement la production de particules virales infectieuses. Le surnageant de culture des cellules transfectées contenant les particules virales peut être récupéré pour infecter des Huh7 naïves (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Ce système, appelé VHCcc (culture cellulaire du VHC), a permis pour la première fois d’étudier le cycle viral complet du VHC. Par la suite, des virus exprimant un gène rapporteur tel que la luciférase ont été produits afin de détecter les cellules infectées. Aussi, des virus chimériques intra- et inter-génotypiques ont été générés (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006). Le principe de ces virus chimériques consiste à remplacer les protéines structurales du JFH1 par des protéines structurales issues d’autres souches de virus, permettant d’une part d’améliorer la

production de particules virales infectieuses et d'autre part de tester l'infectiosité de différents génotypes. Les protéines non-structurales de JFH-1 sont néanmoins nécessaires pour l'obtention d'une infection robuste par ces VHCcc.

Les particules virales générées par le système VHCcc sont infectieuses pour des cellules naïves *in vitro*, mais également *in vivo* chez des chimpanzés et chez des souris partiellement repopulées avec des HPH (Georgel et al., 2010). Cependant, des avancées techniques sont encore nécessaires pour parvenir à infecter de façon efficace les HPH *in vitro*, modèle cellulaire le plus pertinent.

I.5. Le foie, organe privilégié de la réplication du VHC

I.5.1. Fonctions hépatiques

Organe le plus volumineux du corps humain, le foie est aussi l'un des plus complexes. Il assure des fonctions vitales pour l'organisme en jouant un rôle dans le métabolisme glucidique (formation de glycogène et stockage, glycogénolyse et glycogénogenèse) pour la régulation de la glycémie, le métabolisme lipidique (synthèse de cholestérol et formation des lipoprotéines, dégradation du cholestérol en acides biliaires), le métabolisme protéique (synthèse de l'albumine et des facteurs de coagulation), le stockage du fer et de la vitamine B12. Il est responsable de la sécrétion de la bile dans l'intestin et a des fonctions d'épuration qui consistent à médier l'uréogénèse et la métabolisation des diverses toxines ou médicaments. Environ 30% du sang total de l'organisme passe par le foie chaque minute. Il est doté d'une forte capacité de régénération.

I.5.2. Structure et populations cellulaires

Le foie est principalement constitué d'hépatocytes, qui représentent 80% des cellules hépatiques et qui sont responsables de la plupart des fonctions métaboliques du foie. Ce sont de larges cellules épithéliales polyédriques et polarisées, reliées entre elles par des jonctions serrées. Les hépatocytes peuvent comporter un ou plusieurs noyaux, et sont pourvues de nombreux organites intracellulaires tels que des mitochondries, RE et appareil de Golgi, témoignant de leur grande activité métabolique. Ils peuvent être pourvus de grains de lipofuscine constitués de débris lipidiques. Les marqueurs histologiques des hépatocytes sont classiquement l'albumine et la cytokératine 18, cette

dernière étant une protéine cytoplasmique qui constitue les filaments intermédiaires de la cellule.

Les hépatocytes sont organisés en travées séparées par des capillaires sanguins appelés sinusoïdes (Figure 16). Cette organisation repose sur un réseau de réticuline qui forme la matrice extracellulaire. Dans la lumière des sinusoïdes se trouvent les cellules de Kupffer, macrophages qui représentent 2% des cellules du foie. Elles phagocytent les agents pathogènes ou étrangers et interviennent dans la présentation antigénique et la modulation des réponses immunitaires. Les sinusoïdes sont tapissées par des cellules endothéliales sinusoidales (Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LSEC) qui, contrairement aux épithéliums classiques, ne possèdent pas de membrane basale et sont fenestrées. Ces caractéristiques uniques des LSEC assurent aux hépatocytes un accès direct aux nutriments présents dans le sang. L'espace entre les cellules endothéliales et le pôle basolatéral des hépatocytes est appelé « Espace de Disse ». Il joue un rôle important d'échange entre le sang circulant et les hépatocytes. Il contient les cellules stellaires, aussi appelées cellules de Ito, qui stockent la vitamine A, produisent du collagène et sont très riches en lipides.

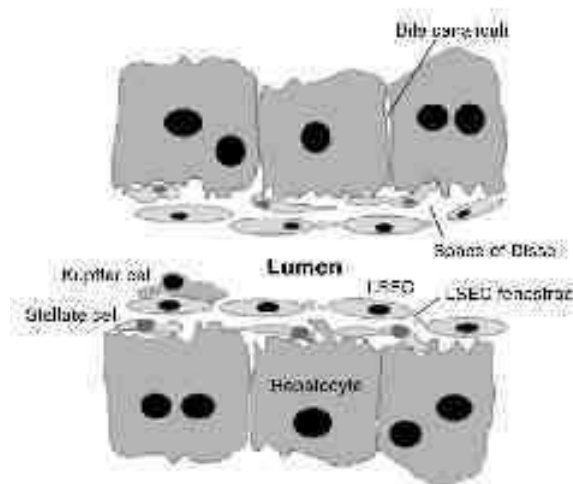


Figure 16 : Représentation schématique de l'endothélium sinusoidal hépatique. (Bertolino et al., 2002)

Les hépatocytes sont organisés en travées séparées par les sinusoïdes. Dans la lumière des sinusoïdes se trouvent des macrophages hépatiques (cellules de Kupffer), des cellules endothéliales et des cellules stellaires hépatiques, ces dernières se localisant dans l'espace de Disse.

LSEC, Liver Sinusoidal Endothelial Cells

II. L'hépatite chronique C

II.1. Epidémiologie

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème majeur de santé publique, puisqu'elle concerne environ 3% de la population mondiale, soit 170 millions d'individus, et 1,1% en France, soit près de 650.000 personnes. La prévalence est cependant très variable selon les zones géographiques ; elle reste assez faible en Europe du Nord, en Amérique du Nord et en Australie (<1%) mais est extrêmement élevée dans de nombreux pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud (parfois >10%) (Figure 17).

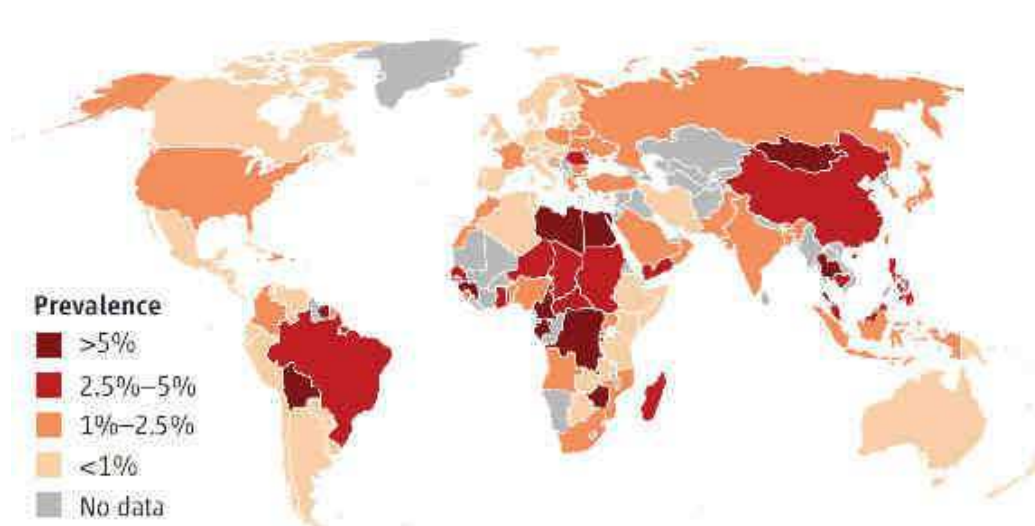


Figure 17 : Prévalence mondiale de l'hépatite chronique C. (Enserink, 2011)

II.2. Modes de transmission et diagnostic

La transmission du VHC se fait principalement par voie parentérale, mais les facteurs de risque diffèrent selon les régions. Dans les pays développés, la consommation de drogue par voie intraveineuse et par voie nasale reste la première source de contamination par le VHC. Alors que la transmission par transfusion sanguine ou transplantation d'organe est presque nulle dans les pays industrialisés depuis le dépistage automatique de tous les produits biologiques, elle reste très importante dans les pays en voie de développement où la prévalence du VHC est particulièrement élevée (Alter, 2007). L'utilisation de matériel chirurgical mal aseptisé est également source de contamination dans ces pays, alors que le piercing et le tatouage sont aussi des facteurs

de risque non-négligeables dans les pays industrialisés (Lavanchy, 2011). Les contaminations mère-enfant et par voie sexuelle sont possibles mais très rares (Alter, 2007).

Le diagnostic de l'infection par le VHC repose sur l'analyse de différents marqueurs présents dans le sérum. Il peut s'agir de tests virologiques permettant la détection directe du virus ou de tests sérologiques mettant en évidence la présence d'anticorps anti-VHC (Chevaliez, 2011).

Les tests ciblant le virus permettent la détection de l'ARN viral ou de l'antigène Core. Dès sept jours après l'infection, l'ARN viral peut être quantifié par RT-PCR afin de déterminer la charge virale, méthode utilisée en routine pour le diagnostic de l'infection. La détection de l'antigène Core par tests immunologiques est facilement réalisable, peu coûteuse mais moins sensible que la quantification de l'ARN viral (Chevaliez, 2011). Les anticorps anti-VHC apparaissent entre deux et huit semaines après le début de l'infection, et peuvent être quantifiés grâce à des tests immunologiques très spécifiques (Chevaliez, 2011). Ils peuvent être complètement automatisés et sont adaptés pour l'analyse de multiples échantillons.

Un génotypage est systématiquement effectué chez les patients candidats à une thérapie anti-virale pour déterminer la dose et la durée du traitement. Deux techniques peuvent être utilisées ; le séquençage direct qui consiste en l'analyse de séquences après amplification de fragments du génome viral par PCR, et l'hybridation inverse qui identifie des nucléotides ou motifs spécifiques à des positions données (Chevaliez, 2011).

II.3. Physiopathologie

L'infection par le VHC conduit dans 10 à 25% des cas à une infection aiguë associée à une guérison spontanée (Figure 18). Cependant, dans la majorité des cas, l'infection devient chronique et peut aboutir à des complications très sévères que sont la cirrhose (20 à 30% des porteurs chroniques) et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (1 à 4% des patients cirrhotiques). La maladie progresse lentement puisqu'un délai de 20 à 30 ans sépare l'infection et la survenue d'un CHC (Pawlotsky, 2004).

Les mécanismes impliqués dans la progression des lésions hépatiques ne sont pas complètement connus. Il est largement admis que le virus n'a pas d'effet cytopathique direct sur les hépatocytes, excepté le phénomène d'accumulation de lipides au sein des cellules hépatocytaires appelé stéatose. Les lésions au niveau du foie sont principalement inflammatoires, résultant d'infiltrations lymphocytaires (Pawlotsky, 2004).

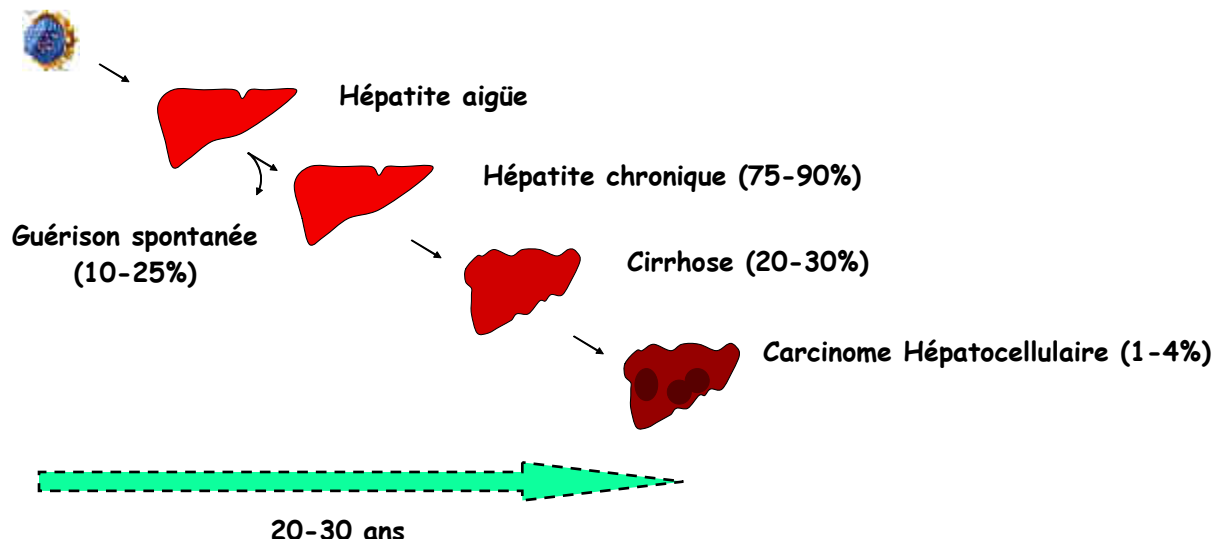


Figure 18 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC.

II.3.1. L'hépatite aiguë

La primo-infection par le VHC est généralement asymptomatique, même si elle peut conduire dans certains cas à des nausées, des vomissements ou un ictère (Post et al., 2009). L'ARN viral peut être détecté dans le sérum en quelques jours, puis un pic de virémie (quantité d'ARN viral dans le sang) est observable après plusieurs semaines. A lieu également une augmentation sérique des transaminases, dont l'alanine amino transférase (ALAT) qui prédomine au niveau du foie, signe d'une atteinte hépatique (Figure 19).

Une baisse extrêmement importante de la virémie a lieu chez une minorité de patients, grâce à l'établissement d'une forte réponse immunitaire. Au niveau des hépatocytes, le Toll-like récepteur-3 (TLR-3) à la surface membranaire et les RIG-I-like récepteurs (RIR) dans le cytoplasme sont stimulés par la reconnaissance de l'ARN viral et induisent une production d'IFNs de type I (IFN- α et IFN- β) et de type II (IFN- γ). Ces IFNs vont activer la voie Jak/STAT, qui va à son tour activer les gènes stimulés par l'IFN (ISGs) qui sont responsables d'un effet anti-viral immédiat (Figure 21) (Dustin and Rice, 2007).

Les cellules présentatrices d'antigènes présentes dans le foie telles que les cellules dendritiques migrent au niveau des ganglions lymphatiques afin d'activer les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ qui induisent une forte réponse anti-virale de part leur production d'IFN- γ et leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules infectées (Georgel et al.,

2010). La mort des hépatocytes infectés active les cellules dendritiques myéloïdes qui stimulent les cellules NK et NKT produisant aussi de grandes quantités d'IFN- γ . Cette forte réponse cellulaire résulte en une résolution spontanée de l'infection, et cela dans les six mois suivant le début de l'infection. Les lymphocytes T spécifiques du virus peuvent être retrouvés encore 20 ans après la résolution de l'infection (Diepolder, 2009).

Une corrélation entre la présence de symptômes et la résolution de l'infection a pu être mise en évidence, certainement en raison de la réponse immunitaire intense qui, responsable de la chute de la virémie, conduit à des lésions fonctionnelles au niveau du foie. Une hépatite fulminante peut survenir lors de la phase aigüe de l'infection mais de manière très exceptionnelle (Post et al., 2009). Des facteurs de l'hôte peuvent influencer la résolution ou non de l'infection tels que la consommation d'alcool, qui semble diminuer les chances de guérison, ou encore l'âge et le sexe, les femmes ayant un taux de résolution de l'infection plus élevé. Enfin, une infection résolue n'empêche pas une réinfection postérieure, même si le risque de développer une infection chronique est plus faible lors de la réexposition au virus (Post et al., 2009).

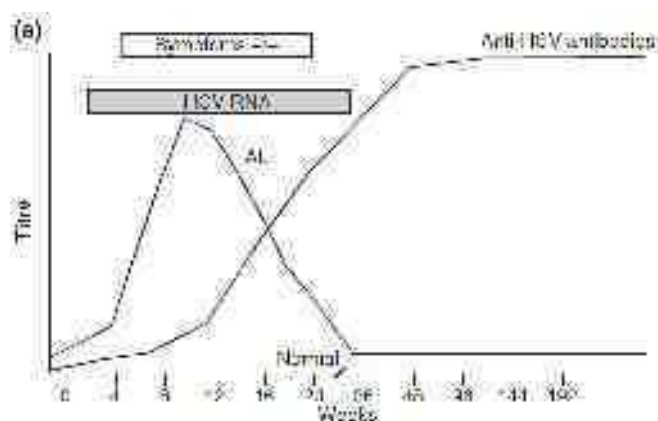


Figure 19 : Cinétique des différents marqueurs lors de l'infection aigüe par le VHC. (Chevaliez, 2011)

L'infection aigüe, caractérisée par la présence l'ARN viral dans le sérum, s'accompagne d'un pic des transaminases (ALT), puis des anticorps anti-VHC spécifiques apparaissent pour persister après la résolution de l'infection.

ALT, Alanine amino Transférase

II.3.2. L'hépatite chronique

Dans la majorité des cas (75-90%), l'ARN viral persiste au delà de 6 mois après le début de l'infection, on parle alors d'hépatite chronique (Figure 20). La charge virale est

généralement stable, et varie selon les individus de 10^4 à 10^7 copies d'ARN par millilitre de sang (Shoukry et al., 2004).

L'hépatite chronique se caractérise par des lésions histologiques au niveau du foie, des ALAT élevées mais est rarement symptomatique, tout comme la phase aigüe de l'infection (Post et al., 2009). Par ailleurs, environ 50% des porteurs chroniques du VHC présentent une stéatose, qui peut être liée à une consommation d'alcool importante, à un fort indice de poids corporel ou encore à un diabète, alors que seul le VHC de génotype 3 peut l'induire directement via la protéine Core (Hwang and Lee, 2011). L'accumulation lipidique semble être corrélée avec une progression vers la fibrose plus rapide et une réponse aux traitements plus faible.

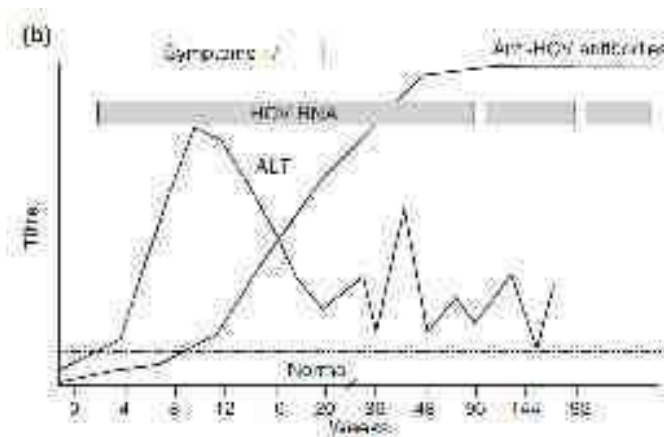


Figure 20 : Cinétique des différents marqueurs lors de l'infection chronique par le VHC. (Chevaliez, 2011)

La primo-infection s'accompagne d'un pic de transaminases qui restent détectables au cours de l'infection. L'ARN viral persiste malgré la présence d'anticorps anti-VHC.

Afin de persister de façon chronique, le virus a développé des stratégies pour échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Au niveau de l'immunité innée, la protéase NS3/4A bloque les voies de signalisation en aval de RIG-1 et du TLR-3, ce qui diminue la production d'IFNs par les hépatocytes. De son côté, la protéine Core altère la fonction de STAT, empêchant l'activation des ISGs (Figure 21) (Georgel et al., 2010).

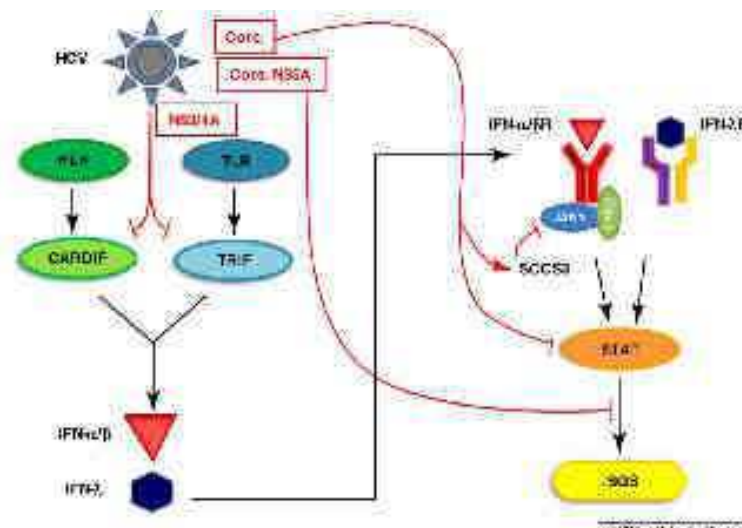


Figure 21 : Stratégies d'évasion du VHC au système immunitaire inné. (Georgel et al., 2010)

Suite à la détection du virus par les TLR et les RLR, des signaux sont transmis par les molécules adaptatrices TRIF et CARDIF qui peuvent être clivées par la protéase NS3/4A. Cela induit une altération de la production des IFNs de type I (IFN- α/β) et de type III (IFN- λ). Le VHC peut aussi agir plus en aval dans la voie de signalisation de l'IFN ; les protéines Core et NS5A peuvent affecter les ISGs en bloquant STAT.

TLR, Toll-like Récepteur ; RLR, RIG-1-like Récepteur ; ISGs, Interferon-Stimulated Genes

Les cellules dendritiques voient leurs fonctions altérées par Core, E1, E2 et NS3, ce qui résulte en une mauvaise présentation des antigènes viraux aux cellules T. La cytotoxicité non-spécifique des cellules NK et leur production d'IFN- γ sont inhibées par E2, suggérant que le VHC agit directement sur la fonctionnalité de ces cellules. La production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, est stimulée par NS3 et NS4 (Hiroishi et al., 2008).

Malgré le fait que les lymphocytes T infiltrent abondamment le foie, ils ne parviennent pas à combattre l'infection, notamment car le virus agit activement pour inhiber les réponses cellulaires de l'hôte. En effet, la protéine Core interagit avec le récepteur du complément gC1q présent à la surface des lymphocytes T intrahépatiques, ce qui induit une surexpression de la molécule Programmed Death-1 (PD-1) à la surface de ces mêmes cellules. Cette surexpression inhibe l'activation des cellules T et induit un épuisement fonctionnel en terme de prolifération et de production de cytokines pro-inflammatoires (Larrubia et al., 2009). Le blocage de l'interaction de PD-1 avec ses ligands, PD-L1 exprimé de façon ubiquitaire et PD-L2 exprimé uniquement par les CPA, permet de restaurer les fonctions des lymphocytes T spécifiques du virus (Golden-Mason et al., 2007).

La diversité génétique des différentes quasi-espèces circulant dans l'hôte permet l'échappement aux anticorps neutralisants et aux réponses cellulaires spécifiques. En effet, des changements d'acides aminés dans la région hypervariable 1 (HVR-1) de la glycoprotéine E2 permet l'échappement aux anticorps neutralisants, et des mutations dans des régions immunogènes ont pour conséquence la non-reconnaissance par les cellules T spécifiques du virus (Hiroishi et al., 2008).

II.3.3. La fibrose et la cirrhose

L'infection chronique par le VHC a comme principale complication le développement d'une fibrose qui est directement liée à une inflammation chronique au niveau du foie. La fibrose se caractérise par une accumulation anormale de composants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique (Pawlotsky, 2004). La synthèse de ces composants (collagène, laminine, fibronectine, protéoglycanes), appelée fibrogenèse, est effectuée par des myofibroblastes générés suite à l'activation des cellules stellaires hépatiques (Pawlotsky, 2004).

Le rôle direct du VHC dans la fibrogenèse n'est pas encore établi, mais l'influence de facteurs exogènes a clairement été identifiée. En effet, la consommation d'alcool, l'âge, le diabète, l'obésité, la stéatose ou encore la co-infection avec le VIH sont des facteurs associés à une accélération de la survenue d'une fibrose (Lavanchy, 2011). L'éradication du virus suite à un traitement anti-viral peut conduire à l'inactivation ou à l'apoptose des cellules stellaires hépatiques, ce qui permet au foie fibrotique de retrouver un état sain (Pawlotsky, 2004). Cependant, chez 20 à 30% des patients, les lésions au niveau du foie s'aggravent et évoluent en cirrhose qui se caractérise par une désorganisation du tissu hépatique et de la micro-vascularisation.

II.3.4. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)

Epidémiologie et facteurs de risque

Chez 1 à 4% des patients, la cirrhose peut aboutir au développement d'un CHC, un cancers des plus agressifs (Pang et al., 2008). Parmi les 500 000 nouveaux cas de CHC par année au niveau mondial, 22% (soit plus de 100 000 de cas) sont attribuables au VHC (Lavanchy, 2011). Principale forme de cancer primitif du foie, il est le cinquième cancer le plus fréquent avec plus de 1,3 millions de cas chaque année, et la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde, représentant ainsi un problème majeur de

santé publique (El-Serag and Rudolph, 2007). Son incidence est en nette progression depuis une dizaine d'années, et les prévisions indiquent que le nombre de nouveaux cas par an sera multiplié par 3 d'ici 2020 au niveau mondial. La prévalence du CHC connaît de grandes disparités selon les pays, les régions les plus touchées étant l'Asie (76% des cas), puis l'Afrique Sub-Saharienne et l'Europe (Bosch et al., 2004), et est directement liée à l'épidémiologie des hépatites chroniques B et C qui sont les causes les plus fréquentes de la maladie (Sherman, 2010). La consommation excessive d'alcool, la stéatohépatite non-alcoolique, l'ingestion de toxines (aflatoxines) et certaines maladies métaboliques (hémochromatose, déficit héréditaire en alpha-1 antitrypsine...) sont également des facteurs de risque du CHC. La coexistence de l'ensemble de ces facteurs augmente davantage le risque de développer la maladie.

Carcinogénèse

Dans la grande majorité des cas, le CHC se développe sur un foie cirrhotique. Dans ce contexte, l'inflammation chronique du foie et le stress oxydatif induisent une altération de plusieurs voies de signalisation, ce qui participe au développement d'un CHC. La voie Wnt/ β -catenin, impliquée dans l'homéostasie, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose, est particulièrement altérée, comme c'est le cas dans de nombreux cancers (Aravalli et al., 2008). Les voies de signalisation Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Ras ou encore JAK/STAT semblent également impliquées dans la carcinogénèse (Aravalli et al., 2008).

Par ailleurs, il a été montré que le VHC peut avoir une action directe sur le développement du CHC, et en particulier la protéine Core qui interagit avec de nombreuses protéines cellulaires. Elle induit l'expression de proto-oncogènes, inhibe l'apoptose et interagit avec les gènes suppresseur de tumeur p53, p73 et pRb pour interférer avec leur fonctions (Tsai and Chung, 2010). Elle agit aussi directement sur les voies de signalisation évoquées ci-dessus. Les protéines NS3 et NS5A interagissent également avec p53 afin d'inhiber ses fonctions pro-apoptotiques, et NS5B a la capacité de réduire l'expression de pRb.

Anatomie pathologique

Le CHC se présente le plus souvent sous la forme d'une masse unique, mais peut également être multifocal. Par ailleurs, il peut être nodulaire ou infiltrant ; dans le premier cas, une capsule tumorale est présente autour des nodules, alors que dans le

deuxième cas, le CHC possède des limites floues. Le CHC est assez hétérogène, du fait de zones de fibrose, de nécrose ou d'hémorragie, et les cellules tumorales sont similaires morphologiquement et fonctionnellement aux hépatocytes. La prolifération tumorale se fait selon une architecture similaire à celle du foie, c'est-à-dire en travées, cependant plus épaisses, séparées par des sinusoides. Les tumeurs hépatiques sont très vascularisées, ce qui résulte en un risque important de métastases ainsi que de récurrence après résection chirurgicale (Pang et al., 2008).

II.4. Traitement standard et thérapies émergentes de l'hépatite chronique C

II.4.1. (PEG-IFN)- α et ribavirine

Actuellement, le traitement standard de l'infection chronique par le VHC est l'interféron-alpha pégylé (PEG-IFN)- α , forme stabilisée de l'IFN- α , associé à la ribavirine, analogue nucléosidique. Il est efficace chez seulement 50% des patients infectés par le génotype 1 et chez 80% de ceux infectés par les génotypes 2 et 3.

Plusieurs réponses au traitement peuvent avoir lieu (Figure 22) (Ghany et al., 2009) : suite à l'initiation du traitement, les patients répondeurs peuvent être sujets à deux types de réponses, une réponse virologique rapide (RVR, Rapid Virological Response) caractérisée par une élimination complète du virus après quatre semaines de traitement, ou une réponse virologique précoce (EVR, Early Virological Response) caractérisée par une réduction de la charge virale d'au moins deux log après 12 semaines de traitement et qui devient ensuite indétectable. L'arrêt du traitement conduit également à deux types de réponses (ETR, End-of-Treatment Response) : une réponse virologique soutenue (SVR, Sustained Virological Response) lors de laquelle la charge virale reste négative pendant 6 mois et plus et qui conduit à une guérison dans 99% des cas, ou une rechute qui se traduit par une charge virale détectable et pouvant atteindre des taux similaires à ceux d'avant traitement. Enfin, une réponse partielle se définit par une diminution de la charge virale de 2 log durant le traitement mais qui reste toujours détectable après le traitement, alors que les patients non-répondeurs se caractérisent par une charge virale stable tout au long des 24 ou 48 semaines de traitement.

Ces différentes réponses au traitement peuvent s'expliquer d'une part par le génotype du virus, un virus de génotype 1 étant par exemple plus difficile à éradiquer qu'un virus de génotype 2, et d'autre part par des déterminants de l'hôte. Concernant ce dernier point, un facteur génétique prédictif majeur de réponse au traitement a été décrit ; il s'agit d'un polymorphisme à proximité du gène *IL-28B* codant pour l'IFN- λ -3

qui est fortement associé à une meilleure réponse au traitement chez des patients infectés par le génotype 1 (Ge et al., 2009). Ce même polymorphisme a par ailleurs été identifié comme responsable d'une éradication spontanée du virus chez des patients non traités (Thomas et al., 2009).

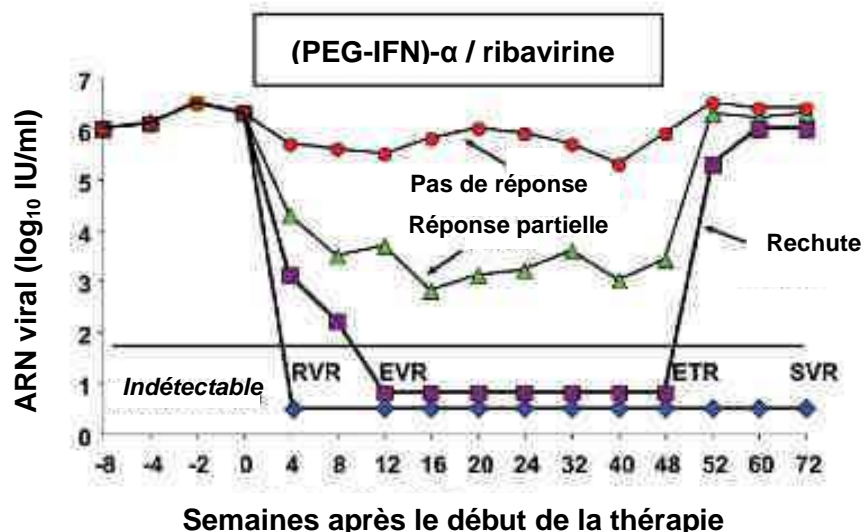


Figure 22 : Réponses virologiques au traitement (PEG-IFN)-α / ribavirine. (adapté de Ghany et al., 2009)

RVR, réponse virologique rapide (élimination du virus après 4 semaines de traitement) ; EVR, réponse virologique précoce (réduction de la charge virale d'au moins 2 log après 12 semaines de traitement) ; ETR, réponse de fin de traitement ; SVR, réponse virologique soutenue (charge virale négative 24 semaines après l'arrêt du traitement) ; rechute (réaugmentation de la charge virale après arrêt du traitement) ; pas de réponse (pas d'élimination du virus après 24 semaines de traitement) ; réponse partielle (diminution de la charge virale de 2 log mais virus toujours détectable après 24 semaines de traitement).

Afin de maximiser ses chances de réussite, cette thérapie par (PEG-IFN)-α et ribavirine doit être suivie sur une longue période (48 semaines pour les génotypes 1 et 4, 24 semaines pour les autres génotypes) et est de ce fait associée à des coûts élevés. Aussi, elle est responsable d'effets secondaires importants tels qu'une pancytopénie, des symptômes grippaux, des nausées ou encore un état dépressif, ce qui conduit souvent à un arrêt prématuré du traitement (Vermehren and Sarrazin, 2011). Elle est également contre-indiquée en cas de grossesse ou d'insuffisance rénale.

Par ailleurs, il n'existe pas de vaccin préventif à ce jour, c'est pourquoi il est urgent de développer de nouveaux traitements contre le VHC.

II.4.2. Les « Direct-Acting Anti-viral agents » (DAA)

Les avancées récentes concernant la compréhension du cycle viral ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de drogues agissant directement sur le virus, molécules appelées « DAA » pour « Direct-Acting Anti-viral agents ».

Deux inhibiteurs de la protéase NS3/4A, empêchant le clivage de la polyprotéine, ont reçu en 2011 une autorisation temporaire d'utilisation en France : le telaprevir et le boceprevir. En monothérapie, ils ont montré leur capacité à induire une diminution importante de la charge virale (2 log en deux semaines), mais celle-ci remonte rapidement du fait de l'émergence de variants résistants au traitement (Sarrazin et al., 2007; Susser et al., 2009). Des mutations, responsables de ces résistances, au niveau du site catalytique de NS3 ont pu être identifiées (Susser et al., 2011). Utilisés en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine, le telaprevir et le boceprevir augmentent le taux de SVR chez des patients infectés par le génotype 1, naïfs de tout traitement ou déjà traités auparavant (Hézode et al., 2009; Kwo et al., 2010; McHutchison et al., 2010). De façon intéressante, il a été récemment montré que, chez des patients infectés par le génotype 1, le telaprevir permet de limiter la période de traitement combinant (PEG-IFN)- α et ribavirine : des SVR sont obtenues chez 75% des patients après 12 semaines de trithérapie suivie de 12 semaines de (PEG-IFN)- α et ribavirine seuls (groupe sans telaprevir, 24 semaines de (PEG-IFN)- α et ribavirine seuls : 44% de SVR) (Jacobson et al., 2011). Parmi les patients répondeurs au telaprevir, 99% ont maintenu une SVR (temps médian de suivi : 21 mois) (Sherman et al., 62^e annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), San Francisco, 4-8/11/2011).

D'autres inhibiteurs de protéase sont actuellement en étude clinique : administré pendant 12 semaines en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine, le danoprevir permet d'obtenir des SVR chez 83% des patients traités, alors que 43% de SVR sont observées chez les patients recevant le placebo (Terrault et al., 62^e annual meeting of the AASLD). Egalement en association avec (PEG-IFN)- α et ribavirine, BI201335 permet une RVR chez 82,1% des patients traités pendant 24 semaines, avec un taux de SVR de 71,8% (Dieterich et al., 62^e annual meeting of the AASLD).

Ciblant l'étape de réplication du VHC, les inhibiteurs de l'ARN-polymérase NS5B se divisent en deux catégories : les analogues nucléosidiques qui sont incorporés dans la chaîne d'ARN pendant l'élongation causant l'arrêt de la synthèse d'ARN, et les analogues non-nucléosidiques qui se lient à l'enzyme empêchant la formation du complexe de réplication et bloquant ainsi l'initiation de la synthèse d'ARN (Vermehren and Sarrazin,

2011). Le site actif de NS5B étant très conservé, ses inhibiteurs ont montré une efficacité similaire contre tous les génotypes du VHC. L'analogue nucléosidique PSI-7977 a un effet anti-viral élevé en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine chez les patients infectés par le génotype 1, 2 ou 3, puisqu'une SVR est observée chez 100% des patients traités pendant 12 semaines (Lalezari et al., 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Berlin, 30/03/2011-03/04/2011). Chez les patients infectés par le génotype 1, PSI-7977 a également un effet très élevé en monothérapie, des charges virales devenant indétectables dès 3 jours de traitement (Lawitz et al., 46th annual meeting of the EASL).

Plusieurs inhibiteurs non-nucléosidiques, qui se lient à des sites différents de l'enzyme, sont actuellement en essai clinique mais sont plus fréquemment responsables de mutations entraînant des résistances que les analogues nucléosidiques car ils se lient à des séquences éloignées du site actif de NS5B. Cependant, l'analogue non-nucléosidique BI207127 permet, en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine, une réduction importante de la charge virale chez patients infectés par le génotype 1 naïfs de tout traitement, et cela sans rechute (Vermehren and Sarrazin, 2011).

Les inhibiteurs de NS5A, potentiellement actifs contre tous les génotypes du VHC, se lient à un domaine de NS5A impliqué dans la réplication, l'assemblage et le relarguage des particules virales. Actuellement en phase II, BMS-790052 a un effet anti-viral rapide en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine, avec des RVR observées chez 92% des patients (Vermehren and Sarrazin, 2011). De son côté, PPI-461 permet une inhibition de la charge virale de 3 à 4 log dans les deux jours après le début du traitement. Cette diminution extrêmement rapide de la charge virale rend prometteurs de futurs essais associant PPI-461 avec d'autres drogues anti-virales (Lalezari et al., 62^e annual meeting of the AASLD).

Les effets secondaires associés à l'IFN- α étant souvent la cause de l'arrêt prématuré des traitements, l'objectif est de s'affranchir de cette molécule. Dans ce but, des combinaisons de DAA sont en étude clinique pour tenter d'obtenir des SVR sans IFN- α , l'association de plusieurs molécules permettant également de limiter les résistances.

Chez des patients infectés par le génotype 1, BI201335 (inhibiteur de NS3/4A) et BI207127 (inhibiteur de NS5B) ont été testés en combinaison avec la ribavirine pendant 4 semaines, avant que BI207127 soit remplacé par (PEG-IFN)- α pour les 20 semaines de traitement qui ont suivies (Zeuzem, 62^e annual meeting of the AASLD). Une RVR a été observée chez 100% des patients après les 4 semaines initiales, sans effets secondaires majeurs ni arrêts de traitement prématurés. Les données concernant les SVR n'ont pas encore été communiquées.

Concernant l'analogue nucléosidique PSI-7977, il a été testé chez des patients infectés par les génotypes 2 et 3 en combinaison avec la ribavirine, avec ou sans (PEG-IFN)- α : tous les patients traités, avec ou sans (PEG-IFN)- α , ont éliminé de façon rapide le virus et cela sans rechute au moment de la communication des résultats (Gane et al. 62^e annual meeting of the AASLD). Une étude de phase III, mettant en œuvre un protocole sans (PEG-IFN)- α , doit être débutée très prochainement.

Le danoprevir, inhibiteur de protéase, et l'analogue nucléosidique RG7128 ont été testés en combinaison chez des patients infectés par le génotype 1. Au bout de 14 jours de traitement, une diminution de 5 log de la charge virale a été observée en moyenne, indiquant qu'il est possible d'obtenir un effet anti-viral important avec des traitements dépourvus de (PEG-IFN)- α (Gane et al., 2010).

II.4.3. Les anticorps neutralisants

Les anticorps neutralisants jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection, les individus qui résolvent spontanément l'infection ayant des réponses immunes médiées par les anticorps neutralisants nettement plus précoces que ceux qui développent une infection chronique (Georgel et al., 2010).

A partir d'un patient chroniquement infecté (patient H) par une souche du VHC isolée en 1977 (H77), des anticorps polyclonaux isolés en 2006 (H06) à partir de ce patient ont montré une forte capacité de cross-neutralisation *in vitro*, mais également *in vivo* en prévenant l'infection de souris humanisées par le virus autologue de génotype 1 mais également par d'autres souches virales de génotypes 4 et 6 du VHC (Meuleman et al., 2011a). L'utilisation de cocktails d'anticorps monoclonaux sélectionnés pour leur forte capacité de neutralisation serait ainsi envisageable en vue du développement d'un vaccin prophylactique.

La région hypervariable 1 (HVR1) de la glycoprotéine E2 est une cible des anticorps neutralisants, mais sa haute variabilité est responsable d'une faible efficacité des anticorps face aux différentes quasi-espèces (Zeisel et al., 2011). Des anticorps monoclonaux anti-E2 reconnaissant des épitopes conservés dans la région N-terminale de E2 ont la capacité de neutraliser différentes souches de VHC et de prévenir l'infection par différentes quasi-espèces dans un modèle de souris humanisée (Law et al., 2008). Par ailleurs, un anticorps polyclonal, le Civacir, est actuellement en phase II, et un anticorps monoclonal ciblant l'apolipoprotéine E nécessaire à l'assemblage des particules virales a été identifié mais ne fait pas encore l'objet d'étude clinique (Zeisel et al., 2011).

II.4.4. Les molécules ciblant les facteurs de l'hôte

Différents facteurs de l'hôte ont été identifiés comme cibles thérapeutiques potentielles. Les molécules ciblant ces facteurs ont l'avantage d'être dotés d'une haute barrière génétique, ce qui signifie qu'un nombre important de mutations par le virus est nécessaire pour l'acquisition d'une résistance à ces molécules. De ce fait, ces drogues induisent peu de résistances.

Étape clé du cycle viral, l'entrée est une cible thérapeutique de choix pour inhiber l'infection par le VHC. Les anticorps reconnaissant les récepteurs du VHC sont de ce fait largement étudiés. Il a été montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre CD81 ont la capacité d'empêcher l'infection par le VHC de génotype 1 et de génotype 4 chez des souris humanisées, mais n'induisent pas de diminution de la charge virale s'ils sont administrés une fois l'infection établie (Meuleman et al., 2008). Des anticorps anti-SR-BI inhibent l'infection de cellules *in vitro* par des VHCcc (Zeisel et al., 2007) et *in vivo* (Meuleman et al., 2011b). Dans cette dernière étude, un anticorps monoclonal anti-SR-BI a été généré et permet, chez des souris humanisées, la prévention de l'infection par du VHC de génotype 1, 4 et 6. Enfin, des anticorps monoclonaux anti-CLDN, en particulier le clone OM-7D3-B3, inhibent efficacement l'infectivité du VHC vis-à-vis de HPH *in vitro*, et bloquent l'entrée de variants issus de patients chroniquement infectés qui sont résistants aux anticorps neutralisants autologues (Fofana et al., 2010). Des anticorps anti-OCLN n'ont pas encore été décrits à ce jour.

Protéines ubiquitaires dans les cellules humaines, les cyclophillines participent à la réplication virale en régulant NS5B. La cyclosporine (CsA), et son analogue Debio 025, se lient avec une forte affinité aux cyclophillines et inhibent la réplication virale. Cependant, la CsA a une fonction immunosuppressive importante en plus de son activité anti-virale, ce qui n'est pas le cas de la molécule Debio 025 (Kaul et al., 2009). Cette dernière a ainsi été utilisée avec succès chez des patients infectés par les génotypes 1 à 4 en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine (Flisiak et al., 2009).

Un antagoniste du miARN-122, miARN présent de façon abondante au niveau du foie, interagissant avec le génome du VHC et nécessaire pour la réplication virale, a été testé chez des chimpanzés infectés par le génotype 1 (Lanford et al., 2010). Cet antagoniste a permis une diminution de la charge virale chez les chimpanzés, de façon prolongée après le traitement. L'étude a montré l'innocuité de molécule ainsi que l'absence de résistance au traitement (Lanford et al., 2010).

II.5. Stratégies thérapeutiques du CHC

L'importante mortalité causée par le CHC est notamment due à un diagnostic trop tardif. En effet, seuls 30 à 40% des patients sont diagnostiqués à un stade précoce et sont alors éligibles pour la résection chirurgicale, l'ablation locale par injection percutanée d'alcool ou par radiofréquence, ou encore pour la transplantation hépatique (TH). La chimioembolisation transartérielle concerne particulièrement les patients présentant un CHC de stade intermédiaire, alors que seule la chimiothérapie s'est révélée efficace chez les patients ayant atteint le stade terminal de la maladie (Worns and Galle, 2010).

II.5.1. La résection chirurgicale

En l'absence de cirrhose, la résection chirurgicale est le traitement standard des CHC peu avancés car le foie résiduel est sain ; il peut se régénérer suite à la résection et être fonctionnel, ce qui n'est pas le cas chez les patients cirrhotiques (El-Serag et al., 2008). Cependant, il est associé à un fort taux de récurrence puisqu'une rechute est observée dans les 5 années qui suivent dans 70% des cas (Worns and Galle, 2010). Le risque de récurrence est notamment dépendant de la taille de la tumeur, du nombre de nodules et des marges de l'exérèse.

II.5.2. L'ablation locale percutanée

Méthode peu invasive, l'ablation locale percutanée consiste à induire une nécrose de la tumeur par injection d'éthanol absolu ou par radiofréquence (El-Serag et al., 2008). Ce traitement est réservé aux patients présentant un CHC de stade précoce mais non-éligibles pour la résection chirurgicale. L'injection d'alcool permet l'élimination de 70 à 80% des tumeurs de moins de 3cm et de 100% des tumeurs de moins de 2 cm. Cependant, cette technique est fréquemment remplacée par la radiofréquence qui permet une ablation complète de la tumeur plus rapidement, et qui est plus efficace pour les tumeurs de plus de 2 cm (El-Serag et al., 2008).

II.5.3. La chimioembolisation transartérielle (TACE)

L'embolisation transartérielle est une technique visant à induire une nécrose de la tumeur par ischémie, c'est-à-dire en obstruant les artères qui l'irriguent. Elle peut être effectuée seule ou en combinaison avec un agent de chimiothérapie (doxorubicine, cisplatine) qui sera alors administré directement au sein de la tumeur (TACE) (El-Serag et al., 2008). Ce traitement concerne les patients présentant un CHC de stade intermédiaire avec des fonctions hépatiques préservées ; il permet l'augmentation de la survie de 16 à 20 mois mais ne constitue pas une approche curative (Worns and Galle, 2010).

II.5.4. La transplantation hépatique

La TH est l'option thérapeutique de choix pour le CHC chez les patients cirrhotiques car elle permet le traitement simultané du CHC et de la cirrhose sous-jacente (El-Serag et al., 2008). Elle est cependant très limitée par la pénurie de greffon. Ainsi, les patients éligibles pour la TH doivent répondre aux critères de Milan (une tumeur inférieure à 5cm ou trois nodules inférieurs à 3cm) afin de privilégier les individus ayant un risque faible de récurrence ou de métastases. Ainsi, chez ces patients, elle permet une survie supérieure à 70% dans les 5 ans post-greffe et moins de 15% de récurrence (Mazzaferro et al., 1996).

Cependant, la TH a une efficacité limitée chez les patients chroniquement infectés par le VHC car le greffon est systématiquement et très rapidement réinfecté par le virus (Peveling-Oberhag et al., 2010). Une hépatite aiguë est observée entre 1 et 3 mois après la greffe, et les lésions hépatiques causées par le VHC progressent très rapidement du fait du contexte d'immunosuppression dans lequel se trouvent les patients transplantés. Une hépatite chronique s'établit dans 70% des cas, et une cirrhose survient dans les 5 ans suivant la greffe chez 30% des patients, les facteurs de risque étant un âge avancé et une charge virale élevée avant la TH (Peveling-Oberhag et al., 2010). La combinaison (PEG-IFN)- α et ribavirine peuvent être utilisés avant ou après la greffe pour diminuer la charge virale, mais une faible tolérance au traitement et une efficacité limitée sont constatées. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à empêcher cette réinfection est indispensable.

III. Les modèles animaux de l'infection par le VHC

III.1. Le chimpanzé

Le VHC a la capacité d'infecter uniquement l'homme et le chimpanzé. Ainsi, ce dernier a été longtemps l'unique modèle d'infection à VHC et a permis des avancées considérables dans la compréhension de la physiopathologie et de l'immunobiologie de la maladie. Le chimpanzé développe une hépatite aiguë, avec des lésions inflammatoires au niveau du foie et des taux sériques élevés d'ALAT, qui peut évoluer en hépatite chronique. Dès trois jours après l'infection, la charge virale augmente de façon exponentielle pour ensuite diminuer légèrement et atteindre un plateau de 10^5 à 10^7 copies / ml (Boonstra et al., 2009). La progression de l'infection chez le chimpanzé étant similaire à celle observée chez l'homme, de nombreux aspects de l'histoire naturelle de la maladie ont pu être décryptés. Aussi, le rôle des réponses immunitaires innées et adaptatives dans la résolution de l'infection a pu être étudié, rendant ce modèle éligible pour tester notamment des vaccins prophylactiques ou thérapeutiques (Bukh, 2004).

Cependant, ce modèle comporte d'importantes limitations ; l'infection chronique se développant chez le chimpanzé est moins sévère que chez l'homme et les réponses immunes plus faibles. Les stades de fibrose et de cirrhose n'ont jamais été reportés, même si un cas de CHC a été décrit (Boonstra et al., 2009). L'entretien de l'animal est difficile, coûte extrêmement cher, et doit se faire dans des locaux appropriés. De façon encore plus importante, il s'agit d'un animal menacé et faisant l'objet d'une protection depuis 1991, d'où des problèmes éthiques majeurs pour son utilisation en laboratoire. Le développement d'autres modèles animaux pour l'étude de l'infection à VHC est ainsi incontournable et représente un challenge de taille.

III.2. Le tupaia

Petit mammifère du sud-est asiatique proche des primates, le tupaia est utilisé depuis les années 90 comme modèle d'étude de différentes maladies infectieuses humaines. Il peut notamment supporter des infections par le virus de l'herpès simplex ou par le VHB (Walter et al., 1996). Plus récemment, il a été montré que des hépatocytes de tupaia peuvent être infectés *in vitro* par du sérum de patients chroniquement infectés par le VHC, et cela grâce à leurs récepteurs CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN qui sont capables de médier l'entrée du VHC comme le font les récepteurs humains (Tong et al., 2011). *In vivo*, le sérum s'est révélé infectieux et capable d'induire une légère hépatite (Tong et

al., 2011). Il s'agit donc d'un modèle prometteur pour l'étude de l'infection à VHC, pouvant être utilisé plus facilement que le chimpanzé.

III.3. Les modèles murins

De part leur petite taille, leur période de gestation courte et leur facilité d'entretien, les souris sont les modèles animaux les plus couramment utilisés. L'obstacle majeur au développement d'un modèle murin d'infection à VHC est l'incapacité du virus à infecter les hépatocytes de souris. En vue de pallier à cette limitation, deux types de modèles ont été mis en place : des modèles de souris transgéniques, afin de rendre les hépatocytes murins susceptibles au VHC, et des modèles de souris chimériques avec un foie humanisé.

III.3.1. Les souris transgéniques

Une des stratégies en vue de l'établissement d'un modèle murin d'infection à VHC consiste à développer des souris transgéniques exprimant les facteurs de l'hôte nécessaires à l'entrée et à la réplication du VHC. Il a été montré que l'expression des récepteurs CD81 et OCLN par des hépatocytes murins rend ces cellules permissives au VHC *in vitro* (Ploss et al., 2009). Cependant, cette stratégie se limite par le fait que les cellules ne peuvent supporter une infection soutenue, en raison d'un défaut de réplication et d'assemblage du virus. Récemment, une étude a montré que l'expression des récepteurs humains CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN ne permet pas aux hépatocytes murins d'être infectés par le VHC *in vivo* (Hikosaka et al., 2011). Les auteurs posent alors deux hypothèses ; des facteurs humains supplémentaires pourraient être requis pour l'obtention d'une infection, ou les hépatocytes murins possèdent des facteurs de restriction dominants empêchant la susceptibilité au VHC.

Cependant, lors d'une autre étude, l'expression des facteurs d'entrée humains a été induite au niveau du foie murin via des vecteurs adénoviraux (Dorner et al., 2011) ; pour la première fois, l'entrée du VHC a pu être observée dans un modèle murin immunocompétent. Différentes combinaisons des récepteurs humains CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN ont été testées, et les auteurs montrent que l'expression de CD81 et OCLN humains est nécessaire et suffisante pour obtenir une infection. De son côté, SR-BI est également nécessaire à l'infection, mais, contrairement à CD81 et OCLN, peut être d'origine murine ou humaine (Dorner et al., 2011). Des anticorps anti-CD81 et anti-E2 inhibent efficacement l'entrée du VHC dans ce modèle de souris transgéniques. Par

ailleurs, du fait de la présence d'un système immunitaire compétent, un vaccin préventif constitué d'un virus recombinant exprimant des protéines du VHC issues du génotype 1a (Core, E1, E2, p7, NS2) a pu être testé et a permis l'induction de fortes concentrations sériques d'anticorps anti-E2, corrélées avec une diminution de la susceptibilité à l'infection par des particules virales exprimant des protéines structurales des génotypes 1b, 2a et 4a (Dorner et al., 2011). Par conséquent, il s'agit du premier modèle murin dans lequel il est possible d'induire une immunisation contre le VHC, et pouvant ainsi être utilisé pour l'étude de vaccins en développement. Ce modèle se limite néanmoins par l'absence de réplication virale au sein des hépatocytes murins, ce qui indique que d'autres facteurs de l'hôte sont nécessaires pour la mise en place d'un cycle viral complet. Le miARN-122, exprimé spécifiquement et abondamment au niveau hépatique, joue un rôle clé dans la réplication virale (Jopling et al., 2005). En effet, l'induction de son expression rend des cellules humaines non-hépatocytaires susceptibles au VHC (Bode et al., 2009). Son absence dans les cellules murines pourrait expliquer l'impossibilité de ces cellules à répliquer le VHC.

Des modèles de souris transgéniques exprimant des protéines virales telles que Core, E1, E2, NS2, NS5A ou même la polyprotéine complète du VHC ont été mis en place. Différentes combinaisons ont été testées, l'expression de ces protéines permettant le développement d'une stéatose ou d'un CHC (Lerat et al., 2002; Moriya et al., 1998; Moriya et al., 1997; Wakita et al., 1998). L'expression des protéines Core ou NS5A induit l'accumulation de lipides au niveau du foie, mimant la survenue d'une stéatose, et a également un effet oncogène qui a pour conséquence le développement d'un CHC spontané (Moriya et al., 1998; Wang et al., 2009). Exprimées conjointement avec Core, les protéines E1 et E2 accélèrent la progression tumorale, ce qui met clairement en évidence leur rôle dans la carcinogenèse hépatique (Kamegaya et al., 2005).

La technique de transgénèse la plus répandue et la mieux caractérisée consiste à induire une expression constitutive du transgène par microinjection embryonnaire. D'autres approches ont pour objectif de maîtriser l'expression du transgène au niveau temporel et spatial. Pour cela, le système Cre-loxP est utilisé ; il permet l'expression spécifique du transgène au niveau du foie après l'administration d'un adénovirus exprimant la recombinaise Cre (Wakita et al., 1998). Ce système offre notamment la possibilité d'étudier les réponses immunes de l'hôte contre les protéines virales du VHC, l'expression de ces protéines pouvant induire des anticorps spécifiques dirigés contre elles et une réponse T (Wakita et al., 2000; Wakita et al., 1998). L'induction de lésions hépatiques par les lymphocytes T cytotoxiques a pu être mise en évidence (Wakita et al., 2000), faisant de cette approche un modèle de pathogenèse du VHC.

III.3.2. Les souris humanisées

Les modèles de souris transgéniques ont pour le moment une limitation majeure : ils ne peuvent supporter une infection soutenue. Ainsi, deux modèles murins humanisés avec des HPH ont été développés afin de permettre une infection par le VHC.

Les souris Alb-uPA/SCID

Les souris Alb-uPA/SCID présentent une immunodéficiences combinée sévère (SCID) et sont porteuses du gène « urokinase-like Plasminogen Activator » (uPA) sous le contrôle d'un promoteur Albumine (Alb-uPA) qui permet l'expression du gène exclusivement au niveau du foie. Le gène uPA induit une toxicité hépatique très sévère dès la naissance. La dégénérescence des hépatocytes murins rend alors possible la transplantation d'hépatocytes humains qui repopulent le foie et qui peuvent supporter une infection par le VHC (Figure 8) (Mercer et al., 2001).

Isolée à l'origine dans l'urine, l'urokinase est également retrouvée dans le sang où elle est impliquée dans un processus inhibant la coagulation appelé fibrinolyse. Il s'agit d'une enzyme activatrice du plasminogène, forme inactive de la plasmine. La plasmine est une protéase clivant la fibrine, résultant en la dissolution des caillots sanguins (Figure 23). En 1991, Sandgren et al. décrivent un modèle murin dans lequel la surexpression du gène uPA sous promoteur Albumine induit une toxicité au niveau du foie : la fibrine dégrade la matrice extracellulaire, ce qui résulte en la mort des hépatocytes murins (Dandri et al., 2001).

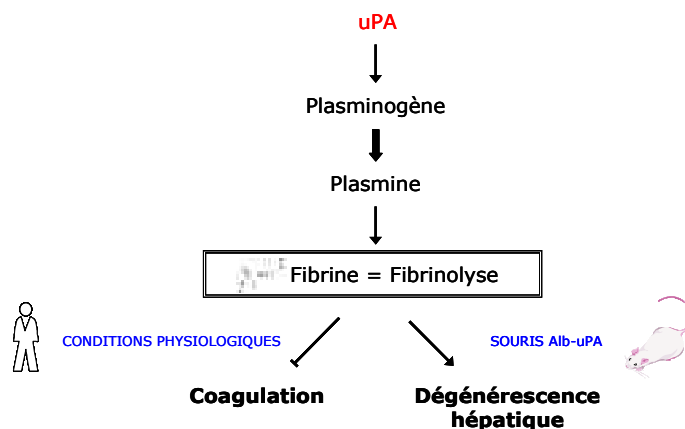


Figure 23 : Rôle de l'enzyme uPA dans la fibrinolyse.

L'enzyme uPA active le plasminogène, qui se transforme en sa forme active, la plasmine. Cette dernière est une protéase qui clive la fibrine, ce qui conduit à l'inhibition de la coagulation par dissolution des caillots sanguins. L'induction de l'expression de l'enzyme uPA au niveau du foie chez la souris entraîne une protéolyse excessive par la fibrine, ce qui conduit à la dégénérescence des hépatocytes murins porteurs du transgène.

La dégénérescence hépatique induite par l'expression du gène uPA crée un environnement favorable pour la greffe et la prolifération d'hépatocytes xénogéniques fonctionnels (Figure 24). Cependant, le système immunitaire de la souris peut rejeter les cellules transplantées, d'où la nécessité de croiser les souris uPA avec des souches de souris immunodéficientes. En 2001, Dandri et al. sont les premiers à reporter une transplantation de HPH chez des souris Alb-uPA/Rag2^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B matures. La repopulation du foie par les HPH atteint un maximum de 15% seulement, les souris utilisées étant hétérozygotes pour le gène uPA (Dandri et al., 2001). Chez des souris Alb-uPA/SCID homozygotes (Alb-uPA^{+/+}/SCID), déficientes en lymphocytes T et B matures, Meuleman et al. parviennent à obtenir jusqu'à 87% de repopulation, traduite par des concentrations sériques d'albumine atteignant un plateau à 7mg/ml environ 7 semaines après la greffe (Meuleman et al., 2005). L'homozygotie est indispensable pour maintenir un niveau élevé de repopulation par les HPH en raison d'une forte pression de sélection. En effet, chez les souris hétérozygotes, des délétions du transgène ont lieu dans une minorité d'hépatocytes qui retrouvent ainsi un phénotype normal. Ces cellules vont alors avoir un avantage sélectif de croissance par rapport aux hépatocytes murins exprimant toujours le transgène et vont entrer en compétition avec les hépatocytes humains greffés (Meuleman and Leroux-Roels, 2008). Des souris Alb-uPA^{+/+} ont été récemment croisées avec des souris immunodéficientes Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}, avec comme principal avantage l'absence de cellules NK grâce à la mutation γ_c (Kremsdorf and Brezillon, 2007). En effet, les cellules NK, toujours présentes au sein des Alb-uPA^{+/+}/SCID, peuvent constituer un obstacle quand à l'obtention d'une bonne prise de greffe.

Environ un mois post-transplantation, le dosage sérique de l'albumine humaine permet d'estimer le niveau de repopulation par les HPH, ainsi que de vérifier l'intégrité et la fonctionnalité des cellules greffées sur le long terme.

Après avoir été transplantées, les souris Alb-uPA^{+/-}/Rag2^{-/-} et Alb-uPA^{+/+}/SCID peuvent être infectées par du VHB (Dandri et al., 2001; Meuleman et al., 2005) ou du VHC (Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005), l'infection par le VHC nécessitant une prise de greffe plus importante que l'infection par le VHB (Meuleman and Leroux-Roels, 2008). L'inoculation du VHC peut se faire soit à partir de VHCcc (Lindenbach et al., 2006), soit grâce à du sérum de chimpanzés (Meuleman et al., 2005) ou de patients chroniquement infectés (Mercer et al., 2001). En quelques semaines, la charge virale peut être de l'ordre ou même excéder celles retrouvées chez les patients (>10⁷ UI/ml), et l'infection est stable pendant au moins quatre mois sans induire d'hépatotoxicité. Le sérum de souris infectées peut être utilisé pour infecter des souris naïves, ce qui donne lieu à des charges virales similaires (Lindenbach et al., 2006).

Ce modèle est à ce jour le mieux caractérisé, et permet d'évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques. Meuleman et al. ont montré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CD81 peut prévenir l'infection par le VHC (Meuleman et al., 2008). Dans cette étude, l'anticorps a été administré 24h avant et 24h après l'inoculation du VHC (génotype 1 et 4) à une dose de 400µg, permettant la prévention complète de l'infection. Cependant, l'administration de l'anticorps après l'établissement de l'infection n'a eu aucun effet. D'autres molécules ont pu être testées dans ce modèle telles que des anticorps neutralisants pour la prévention de l'infection, et des inhibiteurs de protéase ou de polymérase pour son traitement (Meuleman and Leroux-Roels, 2008).

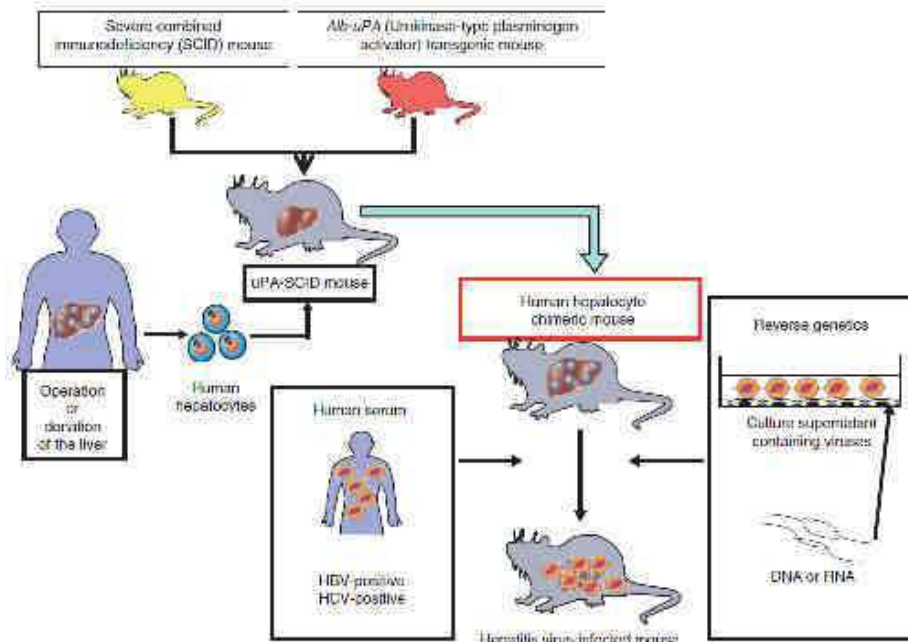


Figure 24 : Etablissement du modèle Alb-uPA^{+/+}/SCID. (Chayama et al., 2011)

Les souris Alb-uPA^{+/+}/SCID, obtenues par croisement de souris immunodéficientes SCID et de souris transgéniques Alb-uPA^{+/+}, ont une dégénérescence hépatique qui permet la greffe de HPH. Les cellules hépatocytaires humaines vont repopuler le foie murin, qu'il est alors possible d'infecter avec du VHCcc ou du sérum de patient chroniquement infecté par le VHB ou le VHC.

Les limitations de ce modèle sont nombreuses. Premièrement, sa mise en place est difficile ; une source de HPH et les compétences nécessaires pour les isoler sont indispensables. De plus, la transplantation est une étape délicate car elle doit être effectuée chez les nouveaux nés, généralement dans les deux à quatre semaines après la

naissance. La mortalité pendant ou après la greffe, notamment causée par des hémorragies, peut être fréquente. Toutes les souris n'atteignent pas un niveau suffisant de repopulation pour être infectées par le VHC.

Par ailleurs, les souris homozygotes pour le gène uPA sont hypofertiles ; des hétérozygotes sont ainsi utilisés pour la reproduction, et un génotypage uPA doit être effectué sur chaque souriceau. Une méthode alternative consiste à greffer des hépatocytes de souris uPA^{-/-} à des Alb-uPA^{+/+}/SCID réservées pour la reproduction, la greffe restaurant une fertilité à peu près normale (Breznillon et al., 2008).

La limitation majeure de ce modèle est l'absence de système immunitaire compétent. Les réponses immunitaires lors de l'infection par le VHC, déterminantes pour la résolution ou non de l'infection, ne peuvent être étudiées. Les stades avancés de l'hépatite chronique que sont la fibrose, la cirrhose et le CHC ne se développent pas chez ces souris en raison de l'absence d'inflammation. Ainsi, le développement d'un modèle murin humanisé immunocompétent représente un enjeu capital.

Les souris FRG

Un modèle de souris déficientes pour l'hydrolase fumarylacetoacetate (Fah) a été décrit en 2004 par Luijterink et al. L'absence de cette enzyme résulte en une accumulation toxique de son substrat, le fumarylacetoacetate (FAA) au niveau du foie (Figure 25). Néanmoins, cette accumulation peut être prévenue par l'administration de 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) qui bloque une enzyme agissant en amont de la Fah, la p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPD) (Luijterink et al., 2004). Les souris Fah^{-/-} sont ainsi des modèles inductibles d'hépatodéficience puisque le NTBC peut être ajouté dans l'eau de boisson, puis retiré pour induire la dégénérescence hépatique.

En 2007, deux groupes (Azuma et al., 2007; Bissig et al., 2007) ont croisé ces souris Fah^{-/-} avec des souris immunodéprimées Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}, déficientes en lymphocytes T, B et NK, pour obtenir des souris pouvant être greffées avec des HPH (souris FRG). De façon similaire aux souris Alb-uPA^{+/+}/SCID, les souris FRG xéno-transplantées sont susceptibles au VHB et au VHC, le VHC nécessitant un niveau plus élevé de repopulation que le VHB (Bissig et al., 2010). De plus, les souris FRG semblent convenir pour l'évaluation de drogues anti-virales puisque Bissig et al. ont mis en évidence l'efficacité du Debio 025 associé au PEG-IFN- α .

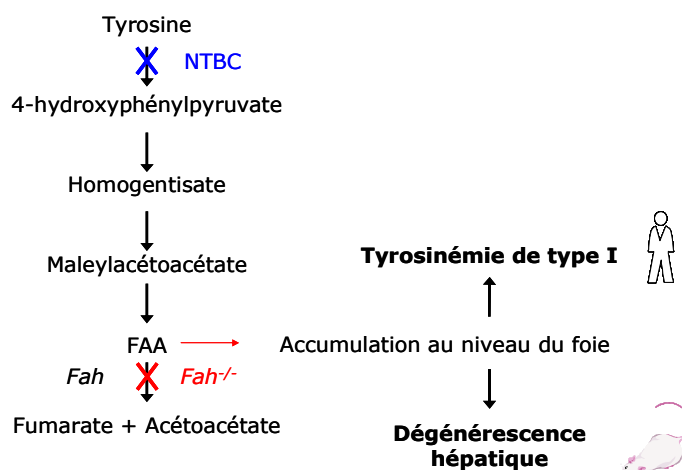


Figure 25 : Dégénérescence hépatique induite par l'absence de l'enzyme Fah.

L'enzyme Fah, impliquée dans la voie catabolique de la tyrosine, permet la transformation de FAA en fumarate et en acétoacétate. Son absence induit une accumulation toxique de FAA au niveau du foie, responsable d'une maladie grave chez l'homme, la tyrosinémie de type I, et de la dégénérescence des hépatocytes murins. Le NTBC bloque l'enzyme hydroxyphénylpyruvate dioxygénase en amont de la Fah, ce qui prévient l'accumulation de FAA et ce qui permet d'induire la dégénérescence hépatique de façon conditionnelle.

Ce modèle présente plusieurs avantages par rapport aux souris Alb-uPA^{+/+}/SCID. La dégénérescence des hépatocytes murins a lieu grâce à une délétion et non à l'expression d'un transgène, ce qui rend impossible le retour au phénotype sauvage par mutation ou délétion du transgène. De plus, la greffe des HPH peut être effectuée quelque soit l'âge de la souris puisque l'hépatotoxicité est inductible par une drogue, ce qui permet de faciliter le geste chirurgical sur souris adulte. Cependant, même si le niveau de repopulation peut être équivalent à celui obtenu chez les souris Alb-uPA^{+/+}/SCID, la transplantation d'un nombre de HPH trois à cinq fois plus important est nécessaire. Aucune maladie hépatique (fibrose, CHC) n'est observée en raison de l'absence de système immunitaire compétent (de Jong et al., 2010). Des études complémentaires sont encore nécessaires pour une meilleure caractérisation du modèle.

Les souris immunocompétentes

Le développement d'un modèle murin humanisé immunocompétent d'infection à VHC constitue un défi majeur. Pour cela, il s'agit d'obtenir des souris entièrement humanisées, c'est-à-dire repopulées avec des hépatocytes humains et reconstituées avec un système immunitaire humain fonctionnel. Idéalement, les hépatocytes et les cellules

immunitaires doivent provenir d'un même donneur pour éviter un éventuel rejet des hépatocytes par le système immunitaire reconstitué. Dans le cadre des modèles immunodéficients décrits ci-dessus, les hépatocytes humains sont obtenus à partir de donneurs adultes subissant une hépatectomie partielle pour le traitement d'une maladie hépatique. Des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pourraient être isolées à partir de la moelle osseuse ou du sang périphérique de ces mêmes donneurs afin de reconstituer un système immunitaire humain chez la souris, mais de tels prélèvements seraient très difficiles à obtenir tant d'un point de vue éthique que logistique. Ainsi, plusieurs stratégies alternatives incluant différentes sources de cellules hépatocytaires et immunitaires ont été envisagées.

En raison de leur pluri- ou multipotence, les cellules souches sont des candidates idéales pour la reconstitution d'un système immunitaire humain et d'un compartiment hépatocyttaire. L'administration de CSH à partir de sang de cordon (Traggiai et al., 2004) ou de foie fœtal (Melkus et al., 2006) à des souris immunodéficientes permet la mise en place d'un système immunitaire humain fonctionnel. Par ailleurs, les CSH issues du sang de cordon peuvent également se différencier en hépatocytes fonctionnels (Moon et al., 2009), de même que les cellules souches embryonnaires (Basma et al., 2009). Des lignées de cellules souches pluripotentes inductibles (induced Pluripotent Stem cells, iPS) sont des fibroblastes matures qui peuvent être reprogrammées pour générer tous les types cellulaires *in vitro* (Sullivan et al., 2010). Ces cellules peuvent ainsi être utilisées pour constituer un compartiment lymphocytaire et des hépatocytes humains (Legrand et al., 2009). Enfin, il a été montré que des monocytes issus de sang périphérique adulte ou de sang de cordon peuvent être dédifférenciées puis redifférenciées en cellules de type hépatocyttaire, alors appelées « néo-hépatocytes » (Ruhnke et al., 2005).

Très récemment, Washburn et al. décrivent le premier modèle murin susceptible au VHC et reconstitué avec un système immunitaire humain (Washburn et al., 2011). Pour cela, les auteurs ont utilisé des souris Balb/c-Rag2^{-/-}γc^{-/-} exprimant la caspase 8 fusionnée à un domaine de liaison au FK506 (FK506 Binding Domain, FKBP). Ce transgène, sous le contrôle d'un promoteur albumine, dimérise en présence de la molécule AP20187 induisant alors l'apoptose des cellules qui l'expriment. Ainsi, les hépatocytes murins dégénèrent de façon inductible, rendant possible la repopulation par des cellules humaines. Des cellules de foie fœtal humain ont été utilisées comme source d'hépatocytes et de cellules immunitaires. Issues du même donneur, les cellules parenchymateuses, précurseurs des hépatocytes, et les CSH exprimant le marqueur CD34, ont été séparées par tri immunomagnétique et co-injectées à des nouveaux nés avant d'administrer le AP20187. Des cellules exprimant l'albumine humaine ont pu être observées au niveau du foie, avec un pourcentage de repopulation d'environ 15%, et des

cellules immunitaires humaines (lymphocytes T, NK et cellules dendritiques) ont été retrouvées dans tous les organes lymphoïdes y compris le foie. Les souris ont été infectées avec du VHC de génotype 1a issu d'un patient infecté, et de l'ARN viral a pu être identifié dans le foie de 50% des animaux infectés mais reste indétectable dans le sérum, probablement en raison d'un taux de repopulation trop faible. Une réponse immunitaire spécifique du VHC a pu être mise en évidence ; les lymphocytes T humains issus de la rate et des ganglions lymphatiques des souris infectées prolifèrent et produisent efficacement des cytokines pro-inflammatoires en réponse à une restimulation *in vitro* par des peptides du VHC. Des infiltrations hépatiques de lymphocytes fonctionnels induisent une inflammation et des lésions hépatiques évoluant jusqu'au stade de fibrose (Washburn et al., 2011).

Ce modèle semble constituer une avancée majeure pour la compréhension des réponses de l'hôte face à l'infection par le VHC. Cependant, il est limité par un faible taux de repopulation par les hépatocytes humains, par le fait que la charge virale ne peut être détectée dans le sérum des souris et par l'absence de réponse humorale.

IV. Les Cellules Génétiquement Modifiées exprimant un gène de toxicité conditionnelle (« gène suicide »)

IV.1. L'alloréactivité

L'alloréactivité est définie classiquement comme la réaction du système immunitaire d'un individu à l'encontre des cellules d'un autre individu. Il s'agit du mécanisme responsable du phénomène de rejet de greffe, les cellules du receveur (« du soi », « autologues ») réagissant face aux cellules du donneur (« du non-soi », « allogéniques ») pour les éliminer. L'alloréactivité peut également avoir lieu dans le sens inverse, à savoir que les lymphocytes présents au sein du greffon peuvent réagir vis-à-vis des tissus du receveur ; on parle alors de « réaction du greffon contre l'hôte » (Graft-versus-Host Disease, GvHD), qui est particulièrement délétère. On l'observe lorsque le receveur est fortement immunodéprimé, surtout après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), mais aussi après greffe de foie. Cependant, l'alloréactivité a été utilisée pour l'obtention d'effets bénéfiques dans le cadre du traitement d'hémopathies malignes grâce à la greffe de CSH. En effet, des études cliniques ont montré que l'allogreffe de CSH est associée, en plus de la reconstitution du système immunitaire, à une activité anti-leucémique très importante du fait de la présence de cellules immunitaires matures au sein du greffon de CSH. L'alloréactivité représente un outil très puissant d'immunothérapie anti-tumorale, médiée par les lymphocytes T (LT) et les cellules NK, qui mettent en jeu des mécanismes différents de reconnaissance des alloantigènes.

IV.1.1. L'alloréactivité T

Acteurs majeurs de l'immunité adaptative, les LT circulent en permanence entre les différents organes lymphoïdes afin de mettre en place une réponse immunitaire rapide en cas de rencontre avec un antigène. Ils se caractérisent par l'expression d'un récepteur spécifique des cellules T (T-Cell Receptor, TCR) contenant deux chaînes extracellulaires de la famille des immunoglobulines, α et β , reliées de façon covalente par un pont disulfure (Figure 26). Chacune comporte une région variable avec trois domaines hypervariables, sites de liaison avec l'antigène, une région constante, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique très courte. Chaque TCR est complexé au CD3 qui a un rôle de transduction du signal. Les LT ne peuvent reconnaître des cellules cibles (cellules étrangères à l'organisme, cellules infectées ou tumorales) de manière

directe ; les antigènes doivent être présentés par des molécules présentes à la surface des cellules cibles, les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Les LT se divisent en deux populations majeures, les LTCD4⁺ et les LTCD8⁺, CD4 et CD8 faisant référence aux co-récepteurs exprimés par ces cellules qui renforcent l'interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH (Figure 26). Les LTCD4⁺ sont des LT appelés auxiliaires (« helper ») car ils initient la réponse immunitaire adaptative. Elles reconnaissent les antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules dendritiques et les macrophages, via les molécules CMH de classe II (CMH-II). Les LTCD8⁺, aussi appelés LT cytotoxiques (CTL), reconnaissent les antigènes présentés par les molécules CMH de classe I (CMH-I) à la surface des CPA ou de cellules anormales (infectées ou tumorales). Elles ont la capacité de détruire des cellules cibles grâce à la production des granules cytotoxiques (perforine / granzyme) et d'IFN- γ .

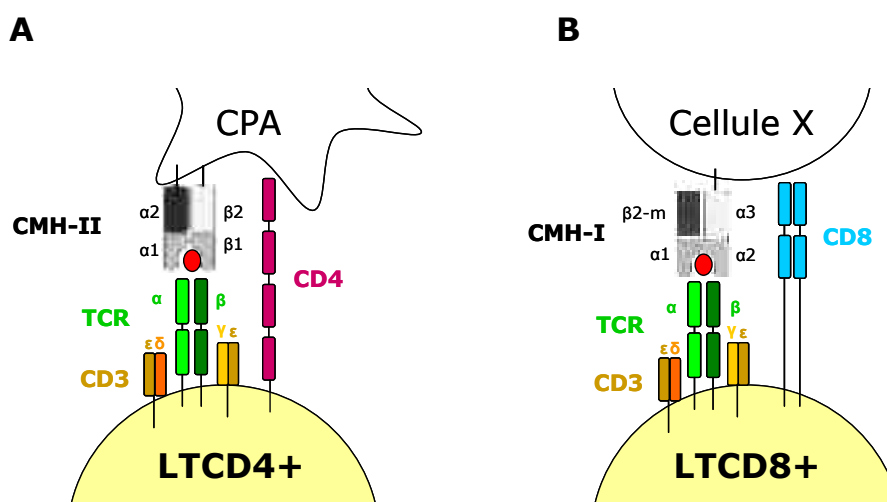


Figure 26 : Mécanisme de reconnaissance des LTCD4⁺ (A) et LTCD8⁺ (B).

Les LTCD4⁺ (A) et les LTCD8⁺ (B) possèdent un TCR formé d'une chaîne α et d'une chaîne β comportant chacune trois domaines hypervariables au niveau des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$, sites de liaison avec l'antigène. Le complexe TCR-CD3 permet la reconnaissance du peptide antigénique présenté par les molécules du CMH de classe I et II, les co-récepteurs CD4 et CD8 renforçant l'interaction du TCR avec les molécules du CMH.

D'une façon générale, un LT reconnaît un peptide antigénique présenté par une molécule du CMH à la surface d'une CPA de manière « restreinte » ; un LT peut reconnaître un antigène uniquement s'il est présenté par une molécule du CMH du soi et par une CPA du soi. Cependant, 1 à 10% des LT sont allogéniques ; ils peuvent réagir avec des molécules du CMH étrangères, et être ainsi activés. Dans le cadre du rejet de greffe, trois modes d'allorecognition ont été identifiés : directe, indirecte et semi-directe (Jiang et al., 2004).

Dans le cas de l'allorecognition directe (Figure 27A), des antigènes du donneur sont présentés par les molécules du CMH-I et du CMH-II du donneur à la surface des CPA du donneur, et reconnus par les LTCD4+ et LTCD8+ du receveur. Cette reconnaissance a lieu en raison de la réactivité croisée du TCR du receveur vis-à-vis des molécules de CMH du soi et du non-soi.

Les CPA du receveur circulent en permanence dans l'organisme et passent inévitablement par le greffon. Elles captent alors des antigènes étrangers, principalement des peptides dérivés des molécules du CMH du donneur, qu'elles présentent aux LTCD4+ via des molécules du CMH-II autologues ; il s'agit de l'allorecognition indirecte (Figure 27B).

Enfin, une troisième voie de reconnaissance a été mise en évidence : l'allorecognition semi-directe (Figure 27C). Dans ce cas, les CPA du receveur acquièrent des molécules de CMH du donneur intactes, soit par fusion de membranes de CPA du donneur et de CPA du receveur, soit par fusion avec des exosomes dérivés des APC du donneur et contenant des molécules de CMH du donneur. Les CPA du receveur présentent ainsi des antigènes aux LT du receveur via des molécules du CMH du donneur.

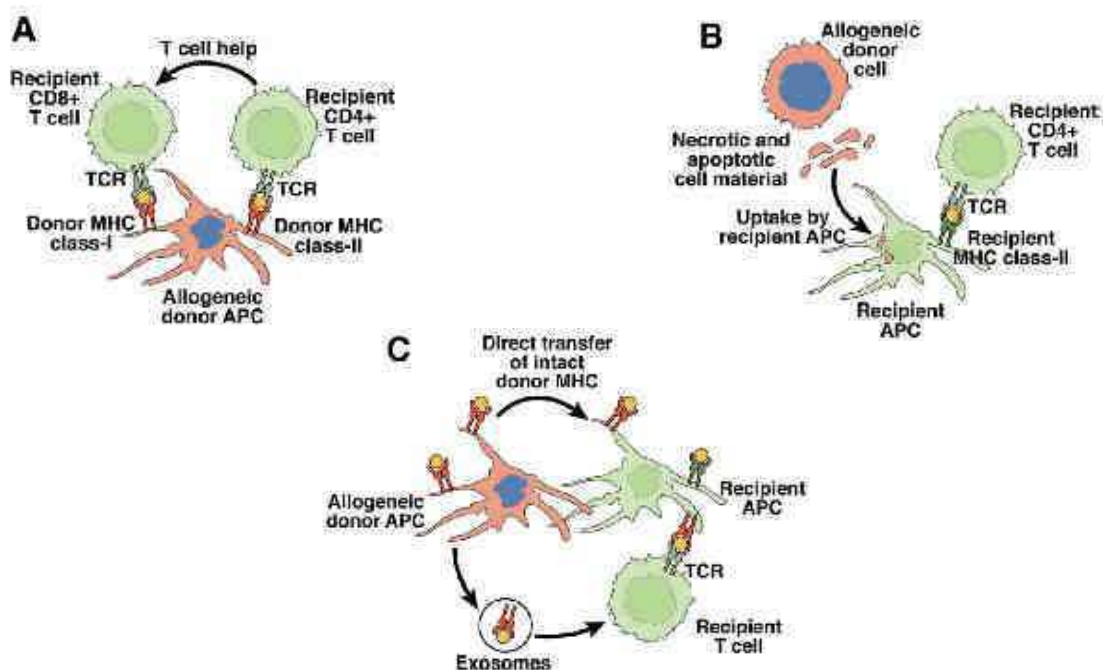


Figure 27 : Mécanismes de présentation des alloantigènes aux lymphocytes T. (Sánchez-Fueyo and Strom, 2011)

Lors de l'allorecognition directe (A), les cellules T du receveur reconnaissent les antigènes du donneur présentés par les CPA du donneur via les molécules du CMH de classe I et II du donneur. Dans la voie indirecte (B), les antigènes sont présentés aux cellules T du receveur par des molécules du CMH de classe II du receveur. Lors de l'allorecognition semi-directe (C), les molécules du CMH du donneur sont transférées sur des CPA du receveur et présentées aux cellules T du receveur via les molécules du CMH du donneur.

IV.1.2. L'alloréactivité NK

Les cellules NK représentent 5 à 10% des lymphocytes du sang et sont présentes de façon abondante dans la rate, le foie et l'utérus. Ce sont de grands lymphocytes granuleux capables de lyser spontanément (« natural killing ») des cellules tumorales ou infectées par un agent pathogène, sans avoir été préalablement en contact avec un antigène spécifique. Ainsi, elles sont considérées comme l'une des premières lignes de défense de l'organisme. Au niveau phénotypique, elles se définissent classiquement par l'expression membranaire du CD56, molécule d'adhérence, et par l'absence des marqueurs des lymphocytes T (CD3, TCR) et B (CD19, B-Cell Receptor (BCR)).

Deux populations distinctes de cellules NK ont pu être identifiées sur la base de l'expression du CD56 et du CD16. La majorité des cellules NK (environ 90%) expriment faiblement le CD56 (CD56^{dim}) et hautement le CD16 (CD16^{high}) alors que 10% des cellules expriment de façon élevée le CD56 (CD56^{bright}) et sont CD16^{low} ou CD16⁻. Les cellules NK CD56^{dim}CD16^{high} sont très cytotoxiques du fait de leur forte expression du CD16, alors que les cellules NK CD56^{bright}CD16^{low} ont davantage un rôle de régulation de la réponse immune par la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Cooper et al., 2001).

Un grand nombre de récepteurs inhibiteurs (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR), NKG2A/CD94...) ou activateurs (Natural Cytotoxicity Receptor (NCR), NKG2D, CD244...) peuvent être exprimés à la surface des cellules NK et ont la capacité de reconnaître spécifiquement une multitude de ligands (Figure 28). Cette reconnaissance va conditionner l'état d'inhibition ou d'activation des cellules NK, les signaux d'inhibition étant prédominants par rapport aux signaux d'activation s'ils sont concomitants (Figure 29). Si des récepteurs inhibiteurs tels que les KIRs ou l'hétérodimère CD94/NKG2A reconnaît de façon spécifique une molécule HLA du soi à la surface d'une cellule normale de l'organisme, la cellule NK est inhibée, empêchant toute cytotoxicité envers les cellules saines de l'organisme. Pour permettre cette tolérance au soi, chaque cellule NK d'un individu possède au moins un récepteur inhibiteur spécifique d'une molécule HLA autologue. Si la cellule NK ne reconnaît aucun HLA du soi à la surface d'une cellule, l'inhibition sera levée ; il s'agit du principe du « soi manquant » (« missing self ») (Velardi et al., 2009). Ainsi, toute cellule étrangère à l'organisme sera éliminée, ainsi que les cellules tumorales ou infectées qui sous-expriment les molécules HLA. Par ailleurs, les récepteurs activateurs peuvent reconnaître des molécules de stress exprimées par des cellules tumorales, telles que les MHC class I-related molecules A/B (MICA/MICB), ou des protéines virales exprimées par des cellules infectées, ce qui

constitue une autre stratégie de reconnaissance permettant le déclenchement des signaux d'activation des cellules NK et la lyse des cellules cibles (Figure 29).

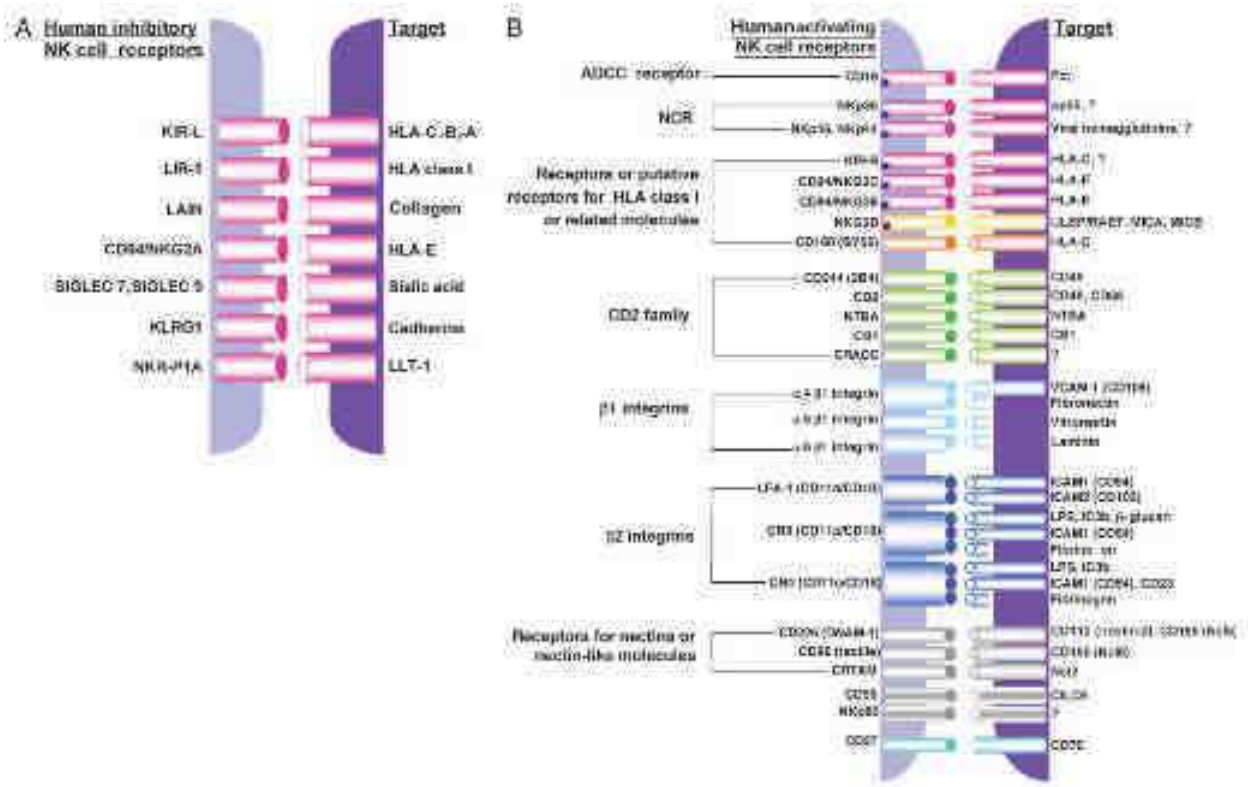


Figure 28 : Récepteurs inhibiteurs (A) et activateurs (B) des cellules NK et leurs ligands.
(Roetyncq et al., 2006)

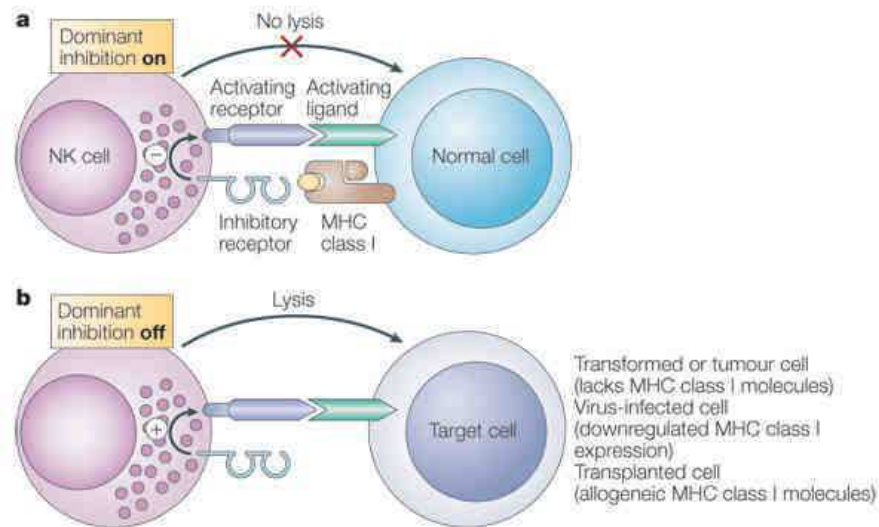


Figure 29 : Inhibition et activation des cellules NK. (Fauci et al., 2005)

La reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK est basée sur le niveau d'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules cibles ; les cellules normales expriment des molécules du CMH de classe I qui sont reconnues par les récepteurs inhibiteurs des cellules NK, ce qui inhibe leur activation. Si une cellule cible (cancéreuse ou infectée) sous-exprime ou n'exprime pas la molécule de CMH que reconnaît le récepteur inhibiteur, les signaux activateurs deviennent dominants et la cellule NK est activée pour la lyse de la cellule cible.

L'importance de l'alloréactivité NK a été mise en évidence dans le cadre des greffes de CSH (Ruggeri et al., 1999). Elle met en jeu les différences d'expression des KIR et de leurs ligands entre le donneur et le receveur. Récepteurs inhibiteurs, les KIR ont pour ligands les molécules du CMH-I (HLA-A, HLA-B ou HLA-C) (Figure 30) qui induisent l'inhibition des cellules NK. Une cellule NK peut exprimer un ou plusieurs KIR, qui fonctionnent indépendamment les uns des autres. Chaque cellule NK au sein d'un individu donné exprime au moins un KIR spécifique d'une molécule HLA autologue, ce qui permet d'éviter toute cytotoxicité envers les cellules autologues normales.

Pour chaque molécule HLA existent différents allèles, répartis en trois groupes majeurs (Figure 30A). En situation de greffe, les cellules NK du donneur qui possèdent un KIR spécifique pour une molécule HLA autologue appartenant à un groupe donné seront alloréactives si aucune molécule HLA de ce groupe n'est présente chez le receveur (Figure 30B).

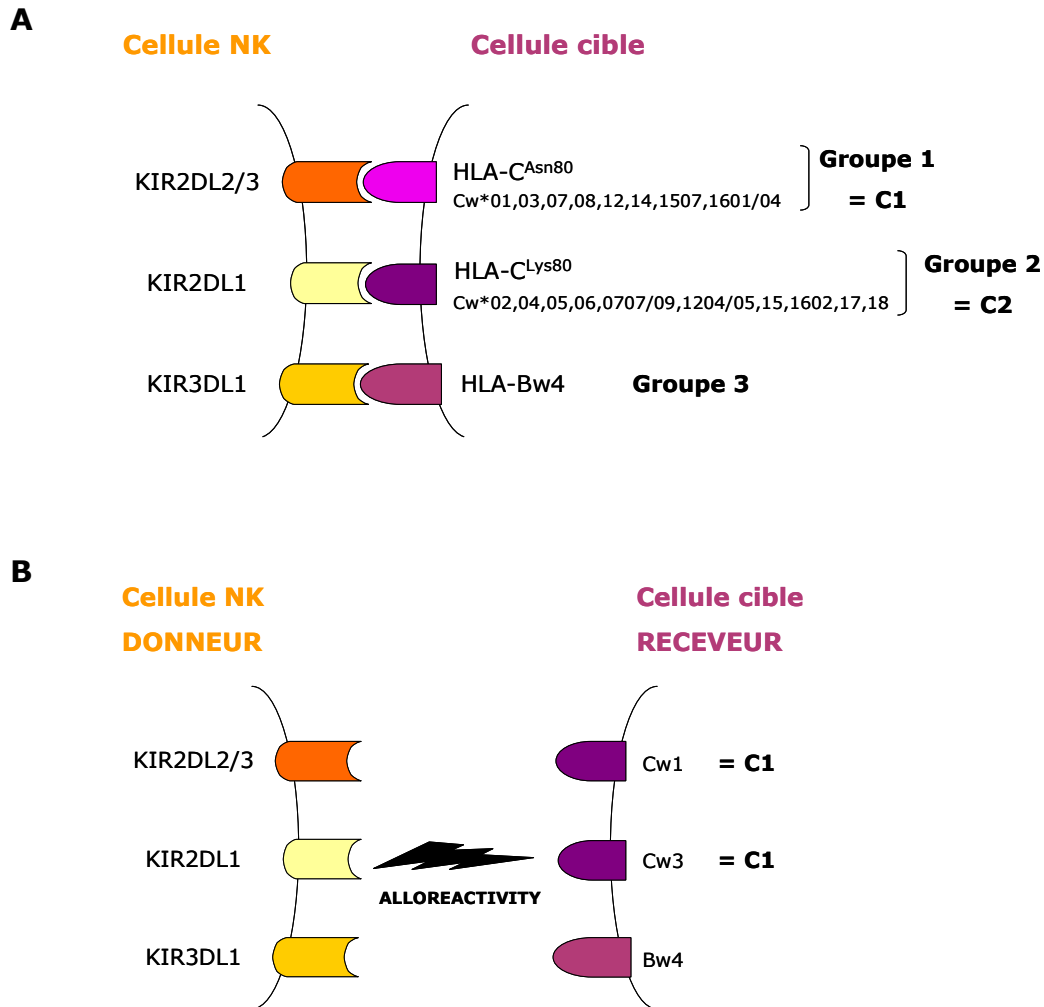


Figure 30 : Les mismatch KIR / KIR-L sont responsables de l'alloréactivité NK.

Il existe trois groupes d'allèles du CMH de classe I (HLA-C^{Asn80}, HLA-C^{Lys80} et HLA-Bw4) reconnus spécifiquement par quatre récepteurs inhibiteurs (A). En situation allogénique, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK du donneur reconnaissent les molécules HLA à la surface des cellules du receveur (B) ; si une molécule HLA appartenant à un groupe d'allèle est absente chez le receveur, les cellules NK du donneur possédant le récepteur inhibiteur ayant pour ligand la molécule HLA absente vont être activées et vont exercer leur alloréactivité.

IV.2. Utilisation thérapeutique de l'alloréactivité : l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe de CSH est utilisée notamment pour le traitement d'hémopathies malignes, en particulier les leucémies aigües, les lymphomes et les myélomes. Elle a deux objectifs majeurs : une reconstitution hématopoïétique et un effet anti-leucémique contre d'éventuelles cellules tumorales résiduelles. Dans ce cadre, il a été montré que l'alloréactivité représente un outil extrêmement puissant d'immunothérapie anti-tumorale.

IV.2.1. CSH et reconstitution hématopoïétique

Les CSH peuvent être issues de trois sources différentes : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang placentaire. La moelle osseuse constitue le réservoir le plus important de CSH, c'est pourquoi elle a longtemps été la principale source de CSH. Cependant, elle se voit progressivement remplacée par le sang périphérique qui contient peu de CSH mais qu'il est possible de mobiliser grâce à des facteurs de croissance hématopoïétiques. Le sang placentaire, issu du sang de cordon ombilical, contient un nombre assez élevé de CSH malgré un faible volume de sang disponible. Les CSH placentaires se trouvent dans un état davantage « naïf » par rapport aux autres CSH, laissant une certaine tolérance quant à la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur. A l'origine réservée à l'enfant, la greffe de CSH placentaires peut être à présent effectuée chez l'adulte grâce à l'utilisation conjointe de plusieurs cordons.

Lors d'une allogreffe de CSH, le donneur est différent du receveur et est sélectionné selon certains critères d'histocompatibilité suite à un typage HLA. Un conditionnement pré-greffe doit être effectué dans le but d'éradiquer la maladie cancéreuse du patient, mais également d'induire un état d'immunosuppression empêchant le rejet du greffon. Le conditionnement met en jeu une chimiothérapie intensive (cyclophosphamide, busulfan, melphalan...) parfois associée à une irradiation corporelle totale.

La reconstitution permet l'établissement d'un nouveau système immunitaire fonctionnel. Les composants de l'immunité innée sont les premiers à être reconstitués ; quelques jours pour les polynucléaires, un mois pour les cellules NK et les monocytes/macrophages et quelques mois pour les cellules dendritiques. Les cellules de l'immunité adaptative atteignent un niveau normal au bout de plusieurs mois pour les lymphocytes B et de quelques mois, voire quelques années pour les lymphocytes T (Seggewiss and Einsele, 2010).

IV.2.2. CSH et alloréactivité

Le potentiel anti-tumoral des cellules alloréactives, appelé l'effet « greffon contre tumeur » (GvT, Graft-versus-Tumeur) dans le cas des tumeurs solides, ou « greffon contre leucémie » (GvL, Graft-versus-Leukemia) dans le cas du traitement des hémopathies malignes, est médié par des lymphocytes allogéniques présents dans le greffon. Ces lymphocytes du donneur reconnaissent les cellules tumorales du receveur

non pas comme étant tumorales mais comme étant allogéniques, via la reconnaissance des différences immunogénétiques (HLA, KIR-L) du receveur. Ils permettent également d'améliorer la prise de greffe en prévenant le rejet du greffon, et ont des effets anti-infectieux (Dazzi and Goldman, 1998) non-négligeables étant donné le contexte d'immunosuppression dans lequel se trouve le patient. Cependant, ces lymphocytes allogéniques sont responsables d'un effet très grave appelé « maladie du greffon contre l'hôte » (GvHD, Graft-versus-Host Disease). Ils vont reconnaître les tissus du receveur comme étant allogéniques et vont induire une toxicité généralisée. La GvHD peut être aiguë (apparition dans les cent jours post-greffe) ou chronique (au-delà). La GvHD aiguë, principalement à médiation cellulaire, se caractérise par des atteintes au niveau de la peau, du foie et du système digestif, alors que la GvHD chronique, principalement à médiation humorale, peut être dommageable pour de multiples sites au sein de l'organisme (Scaife et al., 2009).

Il est possible d'inhiber l'activation des cellules allogéniques par des drogues immunosuppressives afin de prévenir la survenue d'une GvHD mais cette approche est associée à des toxicités cardiaques, rénales et hépatiques sévères (Maraninchi et al., 1987). Une alternative consiste à effectuer une déplétion *ex vivo* des lymphocytes du greffon, mais cela a pour conséquence une prise de greffe moins importante et un taux de rechute leucémique plus élevé (Tiberghien et al., 2001). L'objectif idéal d'une allogreffe de CSH consiste donc à apporter des effets bénéfiques – reconstitution hématopoïétique, effet GvL – tout en limitant la GvHD. Pour cela, des outils innovants ont été développés pour contrôler efficacement la GvHD tout en préservant les effets bénéfiques de la présence des lymphocytes allogéniques au sein du greffon.

IV.3. Les Lymphocytes Génétiquement Modifiés exprimant un « gène suicide » : contrôle de l'alloréactivité

Le système HSV-tk est le premier système de gène de toxicité conditionnelle (« gène suicide ») à avoir été développé pour contrôler l'alloréactivité de lymphocytes alloréactifs lors de greffes de CSH. Il repose sur l'activité enzymatique de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-tk). Cette enzyme phosphoryle le ganciclovir (GCV), analogue nucléosidique de la thymidine utilisé pour le traitement de l'infection herpétique, en GCV monophosphate. Il s'agit d'une étape limitante car les kinases cellulaires ne peuvent pas phosphoryler le GCV. Cependant, les kinases cellulaires peuvent phosphoryler le nucléoside monophosphate, qui devient di- puis triphosphate. Au sein des cellules en division cellulaire, le GCV triphosphate est incorporé dans la chaîne d'ADN, ce qui bloque son élongation et ainsi induit la mort de la cellule.

Une limitation de ce système réside dans le fait qu'environ 10% des particules rétrovirales peuvent subir une délétion dans le transgène HSV-tk sauvage (wtHSV-tk, wild-type HSV-tk), provoquant une résistance au GCV (Garin et al., 2001). Afin de résoudre ce problème, un transgène corrigé ne pouvant subir d'épissage a été développé (Chalmers et al., 2001).

IV.3.1. Stratégie de production des LGM

Afin de ne pas être perdu lors des divisions cellulaires, le transgène HSV-tk doit être intégré de façon stable dans le génome des cellules cibles, c'est pourquoi il doit être introduit grâce à un vecteur rétroviral. L'introduction du transgène par voie rétrovirale dans le génome nécessite que les cellules entrent en division pour perdre la membrane nucléaire, c'est pourquoi les cellules mononuclées (CMN) sont stimulées de manière polyclonale avec un anticorps monoclonal CD3 ou des anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes. Trois jours plus tard, les cellules activées sont transduites avec un vecteur rétroviral codant pour le transgène HSV-tk fusionné à un gène de sélection. Ce dernier peut être soit un marqueur membranaire normalement non exprimé par les lymphocytes adultes, soit un gène de résistance à une drogue toxique. Après un délai de deux jours, nécessaire à l'expression du transgène, les cellules transduites sont isolées grâce au gène de sélection ; elles sont sélectionnées soit par tri immunomagnétique dans le cas d'un gène de sélection codant pour un marqueur membranaire, soit par l'ajout d'une drogue qui va être toxique pour les cellules non-transduites. Les cellules transduites purifiées peuvent ensuite être gardées en culture pour permettre leur expansion avant d'être cryopréservées jusqu'à leur utilisation clinique.

IV.3.2. Différents modes d'activation et de culture

L'activation et la culture des CMN reposent généralement sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal CD3 et de l'IL-2, respectivement. Suite à cette stimulation, les CMN en culture subissent des changements phénotypiques, tels qu'un ratio CD4/CD8 inversé, et fonctionnels avec l'expansion préférentielle de cellules effectrices mémoires sécrétant majoritairement des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL-2) (Sauce et al., 2002). Cependant, leur réponse proliférative *in vitro* et leur production de cytokines sont réduites lors de réactions lymphocytaires mixtes par rapport à des CMN non activées (Sauce et al., 2002), et leur capacité à induire une GvHD *in vivo* est limitée (Contassot et al., 1998a), indiquant que la fonctionnalité des cellules cultivées en terme

d'alloréactivité est particulièrement altérée. Dans le but d'empêcher cette perte d'alloréactivité, l'anticorps monoclonal CD3 a été remplacé par une stimulation basée sur l'utilisation d'anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes. Il a été montré que ce mode d'activation améliore l'efficacité de transduction en induisant une prolifération cellulaire plus importante, empêche l'inversement du ratio CD4/CD8 et induit l'expansion préférentielle des cellules centrales mémoires (phénotype plus « naïf » que les cellules activées par CD3) prévenant ainsi la perte d'alloréactivité des cellules cultivées (Bondanza et al., 2006; Mercier-Letondal et al., 2008). De façon similaire, le remplacement de l'IL-2 par l'IL-7 permet de prévenir la perte d'alloréactivité des cellules pendant leur culture (Mercier-Letondal et al., 2008)

IV.3.3. Gènes de sélection utilisés

Les différents gènes de sélection pouvant être utilisés sont répertoriés dans le tableau 1 (Mailly et al., 2010). Le système de sélection le plus largement utilisé, notamment en clinique, est le gène NeoR qui est un gène de résistance à la néomycine, antibiotique toxique pour les cellules eucaryotes. Il code pour la néomycine phosphotransférase II qui confère une résistance au G418, analogue de la néomycine. L'ajout de G418 dans le milieu de culture permet ainsi d'éliminer les cellules non-transduites pour ne récupérer que les cellules transduites avec succès. Ce système se limite par le fait qu'il affecte le métabolisme des cellules et induit une diminution de l'alloréactivité. Les systèmes de sélection par transduction d'un marqueur membranaire pour la purification des cellules par tri immunomagnétique semblent être une meilleure approche car ils n'induisent pas d'altération fonctionnelle et permettent une sélection rapide. Le récepteur tronqué du Large Nerve Growth Factor (Δ LNNGFR) est pour le moment le seul marqueur de sélection membranaire utilisé en clinique.

Sélection gène	Levantage(s)	Marqueur(s)	Avantage(s)	Inconvénient(s)
Neomycine phosphotransférase II	NeoR	Neomycine phosphotransférase II	Cheap; facile à utiliser	Induction notable d'alloréactivité
Cluster receptor	Cluster	Neomycine phosphotransférase II	Facile à utiliser; clinique	Induction notable d'alloréactivité
CD29	RhD ⁺ mAb	Immuno magnétique sélection	Compatible avec les cellules non transduites	Induction notable d'alloréactivité
Trophoblast human (hTfR)	CD201 mAb	Immuno magnétique sélection	Facile à utiliser; compatible avec les cellules non transduites	Induction notable d'alloréactivité
hTfR2	CD90 mAb	Immuno magnétique sélection	Quasi sélection	Induction notable d'alloréactivité
Δ LNNGFR	CD271 mAb	Immuno magnétique sélection	Facile à utiliser; large compatibilité avec les cellules non transduites	Induction notable d'alloréactivité

mAb: monoclonal antibody
 Δ LNNGFR: Truncated human Large Nerve Growth factor Receptor

Tableau 1 : Gènes de sélection utilisés pour la purification de LGM. (Mailly et al., 2010)

IV.3.4. Essais cliniques

Dans le cadre des greffes de CSH, le principe consiste à isoler les lymphocytes présents dans le greffon et à transférer dans ces cellules le gène codant pour l'enzyme HSV-tk par transduction rétrovirale. Ces lymphocytes génétiquement modifiés (LGM) peuvent être transfusés au patient au moment de la transplantation de CSH précédemment déplétées en lymphocytes T (Tiberghien et al., 2001), ou peuvent être injectées postérieurement, en cas de rechute tumorale ou de développement d'un lymphome induit par le virus de l'Épstein-Barr (EBV). Ce dernier est une complication grave suite à la greffe de CSH en raison du contexte d'immunosuppression dans lequel se trouvent les patients (Bonini et al., 1997). En cas de GvHD, l'administration de GCV permet l'élimination spécifique des LGM allogéniques et ainsi le traitement de la GvHD, sans porter atteinte aux CSH greffées ni aux cellules immunitaires issues de celles-ci. Les deux études cliniques citées précédemment (Bonini et al., 1997; Tiberghien et al., 2001) ont démontré que l'injection de LGM est sûre et que la GvHD peut être efficacement contrôlée par l'administration de GCV. Par ailleurs, une étude clinique plus récente a clairement mis en évidence le potentiel anti-leucémique des LGM allogéniques (Ciceri et al., 2007).

V. Approches d'immunothérapie du CHC et des hépatites virales chroniques

V.1. Les cellules CIK

V.1.1. Activité anti-tumorale

De nombreuses études ont décrit diverses approches d'immunothérapie pour le traitement du CHC. La plupart d'entre elles se sont penchées sur l'utilisation d'un produit de thérapie cellulaire appelé « Cytokines-Induced Killer cells » (cellules CIK). Il s'agit de CMN isolées à partir de patients présentant un CHC, activées par l'anticorps monoclonal CD3 et cultivées en présence d'un cocktail de cytokines, généralement composé d'IL-2, IFN- γ et/ou IL-1 (Kim et al., 2007; Shi et al., 2004; Wang et al., 2002). Ces cellules sont utilisées de façon autologue, et injectées par voie intraveineuse. Elles ont une capacité anti-tumorale très élevée *in vitro* contre des lignées cellulaires de CHC et *in vivo* dans des modèles murins (Kim et al., 2007; Wang et al., 2002), principalement due à une expansion préférentielle de cellules CD3+CD56+ (cellules T NK-like) qui ont une activité cytotoxique non-restreinte par le CMH (Schmidt-Wolf et al., 1993). Ces cellules T NK-like représente 1 à 5% des CMN, mais leur nombre peut augmenter jusqu'à 100 fois grâce à la culture des cellules *ex vivo*. Des études cliniques randomisées ont évalué l'efficacité des CIK suite à une résection chirurgicale (Takayama et al., 2000), ou en combinaison avec des traitements classiques du CHC basés sur la TACE ou l'ablation par radiofréquence (Weng et al., 2008). Il a alors été montré que l'immunothérapie utilisant les CIK permet un taux moins élevé de rechute, un temps médian de rechute plus important et une meilleure survie des patients traités (Tableau 2).

Les CIK étant généralement administrées de façon autologue, il n'y a pas de risque de rejet des cellules par le système immunitaire du receveur comme cela peut être le cas pour les cellules allogéniques. Dans le cadre d'une étude utilisant des modèles murins de greffe de CSH, elles ont été testées en situation allogénique : il a été montré qu'elles produisent des quantités importantes d'IFN- γ , ce qui a une action protectrice vis-à-vis de la survenue d'une GvHD (Baker et al., 2001). Malgré cette faible induction de GvHD, les CIK ont une forte activité anti-tumorale qu'elles exercent via le récepteur NKG2D dont les ligands sont davantage exprimés par les cellules cancéreuses que par les tissus sains (Nishimura et al., 2008).

Production des CIK	Traitement	Résultats	Référence
J0 : OKT3, IL-2	Gpe 1 : RH Gpe 2 : RH + CIK	Survie sans rechute à 3, 5 ans : Gpe 1 : 52%, 62% Gpe 2 : 67%, 78%*	(Takayama et al., 2000)
J0: IFN- γ J1: OKT3, IL-2	Trois injections de CIK	Régression tumorale : 23%	(Shi et al., 2004)
J0: IFN- γ J1: OKT3, IL-1, IL-2	Gpe 1 : TACE + ARF Gpe 2 : TACE + ARF + CIK	Survie sans rechute à 6, 12, 18 mois : Gpe 1 : 90%, 70%, 60% Gpe 2 : 93.3%, 91.1%, 74.4%*	(Weng et al., 2008)
J0 : IFN- γ J1 : OKT3, IL-1, IL-2	Gpe 1 : RH Gpe 2 : RH + 3 injections de CIK Gpe 3 : RH + 6 injections de CIK	Survie sans rechute à 1, 3, 5 ans Gpe 1 : 82.6%, 20.9%, 11.2% Gpe 2 : 83.1%, 31.7%, 23.3%* Gpe 3 : 84.7%, 30.5%, 19.4%*	(Hui et al., 2009)
J0 : IFN- γ J1 : OKT3, IL-1, IL-2	Gpe 1 : TACE Gpe 2 : TACE + CIK	Survie sans rechute à 6, 12, 24 mois : Gpe 1 : 34.8%, 7.7%, 2.6% Gpe 2 : 72.2%, 40.4%, 25.3%*	(Hao et al., 2010)

Tableau 2 : Etudes cliniques utilisant les cellules CIK comme traitement adjuvant du CHC

J, jour ; gpe, groupe ; OKT3, anticorps CD3 ; RH, résection hépatique ; TACE, chimioembolisation transartérielle ; ARF, ablation par radiofréquence

* différences significatives avec le groupe témoin

V.1.2. Activité anti-virale

Une autre application concernant l'utilisation des CIK a été mise en évidence ; une étude clinique a montré que l'infusion de ces cellules à des patients infectés chroniquement par le VHB et résistants aux traitements antiviraux permet une diminution de la charge virale et une amélioration des fonctions hépatiques dans certains cas (Shi et al., 2009). Des cellules spécifiques du VHB au sein de la population CIK ne sont pas détectables, indiquant que l'activité anti-virale des CIK ne dépend pas de cellules T spécifiques du VHB. Elles semblent avoir un effet anti-viral direct grâce à une production importante d'IFN- γ et de TNF- α qui inhibent la réplication virale. Enfin, leur activité anti-virale élevée est favorisée par une sous-expression du récepteur membranaire PD-1 par rapport aux cellules T autologues spécifiques du virus (Shi et al., 2009). En effet, la surexpression de PD-1 est largement étudiée pour son rôle dans l'épuisement fonctionnel des cellules T spécifiques du virus lors de nombreuses infections chroniques incluant les infections par le VHB et le VHC (Barber et al., 2006).

V.2. Les cellules IMAK

Récemment, un essai clinique de phase I s'est penché sur l'utilisation de cellules appelées IMAK pour « intentionally HLA-mismatched IL-2 activated killer cells » ayant pour objectif le traitement de patients présentant des hémopathies malignes (myélome multiple ou lymphome non-Hodgkinien) ou des tumeurs solides métastatiques (cancers du sein, poumon, ovaire, prostate ou pancréas) résistantes à la chimiothérapie conventionnelle (Slavin et al., 2010).

Comme les LGM précédemment décrits, les cellules IMAK ont pour origine le sang périphérique d'un donneur sain et sont donc utilisées en situation allogénique. Elles sont activées *in vitro* pendant 4 jours en présence d'IL-2 puis transfusées au patient auquel est administré de l'IL-2 pendant 5 jours afin de permettre la survie des cellules injectées qui peuvent alors exercer leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Avant de recevoir les cellules, un conditionnement immunomodulateur, basé sur l'administration de fludarabine (25mg/m²) ou de cyclophosphamide (1000mg/m²), est effectué pour éviter leur rejet rapide par le système immunitaire du patient. Les IMAK ne subissent aucun transfert de gène de toxicité conditionnelle, l'innocuité de cette approche reposant sur le rejet anticipé des cellules après qu'elles aient effectué leur effet anti-tumoral. Ainsi, un seul cas de GvHD de grade I a été observé sur 35 patients, démontrant l'absence de toxicité de cette approche d'immunothérapie. Une survie sur le long terme sans progression de la maladie a été observée chez 5 patients sur 21 présentant des tumeurs solides métastatiques (survie de 10 à 96 mois) et chez 4 patients sur 5 présentant une hémopathie maligne (survie de 14 à 88 mois).

V.3. Les lymphocytes hépatiques

Lors de la transplantation hépatique, le greffon est systématiquement réinfecté par le VHC, la charge virale excédant même celle avant la greffe du fait de l'immunosuppression indispensable à la prise de greffe. Des stratégies thérapeutiques sont donc urgemment nécessaires pour empêcher cette réinfection. Une approche originale d'immunothérapie a été mise en œuvre lors d'une étude de phase I réalisée sur sept patients VHC positifs (Ohira et al., 2009). Des lymphocytes issus du greffon hépatique ont été récupérés par perfusion du foie lors de la transplantation, activés durant trois jours par de l'IL-2 en présence d'anticorps CD3 (1µg/ml), puis injectés au patient trois jours après la greffe (Figure 31). Sept patients VHC-positifs transplantés ont été administrés avec des lymphocytes du greffon activés *in vitro* (entre 2.10⁸ et 5.10⁸ cellules par individu). Une diminution de la charge virale a été observée chez quatre

patients traités, dont deux avec une négativation, persistante pour l'un deux (ARN viral absent dans le sérum du patient 20 mois après l'immunothérapie), indiquant la guérison de l'infection chronique. La charge virale de l'autre patient, indétectable après la transplantation, est devenue à nouveau détectable deux mois plus tard. La diminution de la charge virale est d'autant plus importante et persistante que la charge virale pré-greffe est faible. En effet, les trois patients non-répondeurs à l'immunothérapie sont ceux dont la charge virale était la plus élevée avant greffe. Or, lorsque les lymphocytes activés sont injectés au patient, trois jours après la greffe, le greffon est déjà réinfecté. Une administration plus précoce de cellules activées, pendant la transplantation, pourrait donc améliorer l'efficacité thérapeutique d'une telle approche de thérapie cellulaire. L'effet anti-viral des lymphocytes hépatiques activés est dû à une production importante d'IFN- γ par les cellules T, NK et T NK-like.

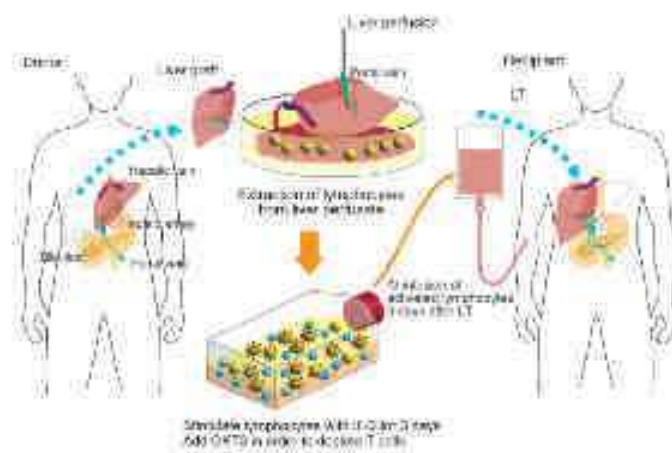


Figure 31 : Stratégie d'immunothérapie adoptive de l'infection par le VHC lors de la transplantation hépatique par l'utilisation des lymphocytes du greffon. (Ohira et al., 2009)

Avant la greffe hépatique, les lymphocytes du greffon sont extraits par perfusion et stimulés pendant 3 jours avec de l'IL-2. L'anticorps OKT3 a été ajouté à une dose immunosuppressive pour les cellules T (1 μ g/ml) deux jours après l'initiation de la culture. Les lymphocytes hépatiques activés ont été administrés au patient trois jours après la greffe par voie intraveineuse.

A partir de sang périphérique de donneurs sains, le même groupe a par la suite tenté d'optimiser leur stratégie de thérapie cellulaire du CHC et de la réinfection du greffon hépatique lors de la transplantation (Daskali et al., 2011). Pour ce faire, des CMN issues de donneurs de sang sain ont été isolées, activées par l'anticorps CD3 et cultivées en présence d'IL-2 pendant 28 jours. Ces cellules, dénommées « LAK » pour « Lymphokine-Activated Killer cells », ont ensuite été testées *in vitro* pour leur propriétés

anti-virales et anti-tumorales. Par rapport aux CMN, les LAK sont hautement cytotoxiques vis-à-vis d'une lignée cellulaire de CHC, notamment grâce à une importante expression membranaire de TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Par ailleurs, elles produisent de grandes quantités d'IFN- γ qui sont responsables d'une activité anti-virale importante envers des cellules exprimant un réplicon VHC. Cette activité est renforcée lorsque les cellules sont à nouveau mises en présence de l'anticorps CD3 vingt-quatre heures avant le test d'activité anti-virale (Dorskali et al., 2011).

Objectifs du travail de thèse

Du fait de la sévérité du CHC et de l'infection par le VHC, de l'efficacité modérée des traitements actuels et du nombre de patients en constante augmentation, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques représente un enjeu crucial. En effet, la transplantation hépatique est le traitement de choix du CHC, mais elle se limite d'une part par une pénurie d'organes, et d'autre part par la réinfection extrêmement rapide et systématique du greffon par le VHC chez les patients chroniquement infectés par le virus. Mon travail de thèse a consisté en le développement d'une approche d'immunothérapie du CHC et de l'infection par le VHC. Parallèlement, j'ai contribué à un autre projet d'immunothérapie de l'infection par le VHC, à savoir la validation *in vivo* d'un anticorps monoclonal ciblant un facteur d'entrée du virus.

L'alloréactivité est décrite comme un outil très puissant d'immunothérapie anti-tumorale, notamment pour le traitement d'hémopathies malignes. Les LGM sont utilisés en clinique depuis plus de 15 ans, leur efficacité et leur innocuité ayant été démontrées dans le cadre des greffes de cellules souches hématopoïétiques. De leur côté, les cellules CIK, utilisées en situation autologue, ont une importante activité anti-tumorale chez des patients atteints de CHC en combinaison avec les traitements actuels, et ont également une activité anti-virale vis-à-vis du VHB.

Notre premier objectif est d'apporter la preuve de concept selon laquelle les LGM, produit de thérapie cellulaire déjà existant, pourraient être utilisés d'une part comme traitement adjuvant du CHC, possiblement en association avec les traitements actuels, et d'autre part pour la prévention de la réinfection du greffon par le VHC lors de la transplantation hépatique. L'étude menée en ce sens est présentée dans la première partie du manuscrit.

L'entrée constitue une étape clé dans le cycle viral du VHC et fait intervenir différents récepteurs à la surface des hépatocytes, qui sont des cibles thérapeutiques potentielles. La protéine des jonctions serrées CLDN1 est un facteur clé dans le processus d'entrée du VHC dans les cellules cibles. Un anticorps monoclonal dirigé contre CLDN1 (clone OM-7D3-B3) a été produit au laboratoire, et il a été montré qu'il prévient l'infection par le virus *in vitro*.

Notre second objectif est d'étudier l'effet de l'anticorps monoclonal dirigé contre CLDN-1 (clone OM-7D3-B3) *in vivo* dans le modèle Alb-uPA^{+/+}/SCID, modèle murin humanisé pouvant soutenir une infection chronique par le VHC. L'anticorps est testé en prévention de l'infection VHC, et son innocuité vis-à-vis des hépatocytes humains vérifiée. Cette étude fait l'objet de la seconde partie du manuscrit.

PARTIE I

Immunothérapie du CHC et de l'infection par
le VHC par administration de lymphocytes
génétiquement modifiés exprimant le gène
de toxicité conditionnelle HSV-tk :
preuves de concept

Matériel et méthodes

I. Les lymphocytes génétiquement modifiés (LGM)

I.1. Production du surnageant rétroviral

La lignée d'emballage PG34TK a été utilisée pour la production du surnageant rétroviral nécessaire à la production des LGM. Cette lignée, issue de la transduction de la lignée PG13 par le vecteur MP71-T34FT, a la capacité de produire des particules rétrovirales codant la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-tk) et la forme tronquée du CD34 humain (Figure 32) (Fehse et al., 2002). Après avoir été décongelées, les cellules ont été cultivées dans du RPMI-1640 (GIBCO®, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). Trois jours plus tard, les cellules ont été incubées pendant la nuit avec du RPMI sans sérum, cette déprivation entraînant un stress cellulaire et une production massive de particules rétrovirales. Puis le surnageant a été congelé et les cellules ont été mises en présence de RPMI 10%SVF pendant 8h. A nouveau le milieu a été remplacé par du milieu sans sérum pendant 12h, la production de surnageant ayant été effectuée comme telle pendant deux semaines. Chaque lot de surnageant a ensuite été testé par transduction de cellules HeLa, centrifugées pendant 3h (1000g, 32°C) dans du surnageant rétroviral supplémenté avec de la protamine sulfate (5 µg/ml). L'efficacité de transduction, définie par le pourcentage de cellules transduites (CD34+), a été vérifiée par marquage membranaire des cellules HeLa avec un anticorps CD34 couplé au fluorochrome PE-Cy7. L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux (cf III. Cytométrie en flux).

I.2. Activation, transduction et expansion des CMN

A partir de prélèvements sanguins issus de donneurs sains (Etablissement Français du Sang Alsace, Strasbourg, France), les cellules mononuclées (CMN) ont été isolées sur gradient de Ficoll, lavées et mises en culture à une concentration de 1.10^6 cellules/ml dans du RPMI-1640 supplémenté de 10% de sérum humain normal (SHN) (EFS Bourgogne/Franche-Comté, Besançon, France). Elles ont ensuite été activées par un anticorps monoclonal soluble CD3 (OKT3, Janssen-Cilag Levallois-Perret, France ; 10ng/ml) et cultivées en présence d'Interleukine-2 (IL-2) recombinante humaine (Proleukin™, Novartis Pharma, Dorval, Québec; 500u/ml) (Mercier-Letondal et al., 2008). Trois jours plus tard, les cellules ont été transduites avec le surnageant rétroviral PG34TK. Pour cela, elles ont été centrifugées pendant 3h (1000g, 32°C) dans du surnageant rétroviral complété avec de l'IL-2 (1000u/ml) et de la protamine sulfate (5

$\mu\text{g/ml}$), puis remises en culture dans du RPMI 10%SHN supplémenté avec de l'IL-2 (500u/ml). Deux ou trois jours plus tard, les cellules transduites (CD34+) ont été sélectionnées par tri immunomagnétique permettant ainsi l'obtention de Lymphocytes Génétiquement Modifiées (LGM) purifiés (cf IV. Isolement cellulaire par tri immunomagnétique). Les cellules ont ensuite été cultivées dans du RPMI 10%SHN supplémenté avec de l'IL-2 jusqu'à J14 (Figure 32). La sensibilité des LGM au ganciclovir (GCV) a été vérifiée par numération des cellules après culture en présence ou en absence de GCV (1 $\mu\text{g/ml}$) pendant une semaine.

Parallèlement, des CMN ont été activées et cultivées pendant 14 jours mais sans transduction et sans sélection, cellules que nous avons identifiées par « Co » et qui ont été utilisées comme témoin lors de différents tests. Lorsque cela est indiqué, l'anticorps monoclonal CD3 a été remplacé par des anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France ; 1 bille pour 1.10⁶ cellules) et l'IL-2 a été remplacé par l'IL-7 (20ng/ml ; Cytheris ; Issy-les-Moulineaux, France). Ainsi, nous avons produit des cellules pour lesquelles nous avons établi la nomenclature suivante : Co_{CD3+IL-2}, Co_{CD3/CD28+IL-2}, Co_{CD3+IL-7} et Co_{CD3/CD28+IL-7}. Des LGM_{CD3/CD28+IL-2} ont également été produites.

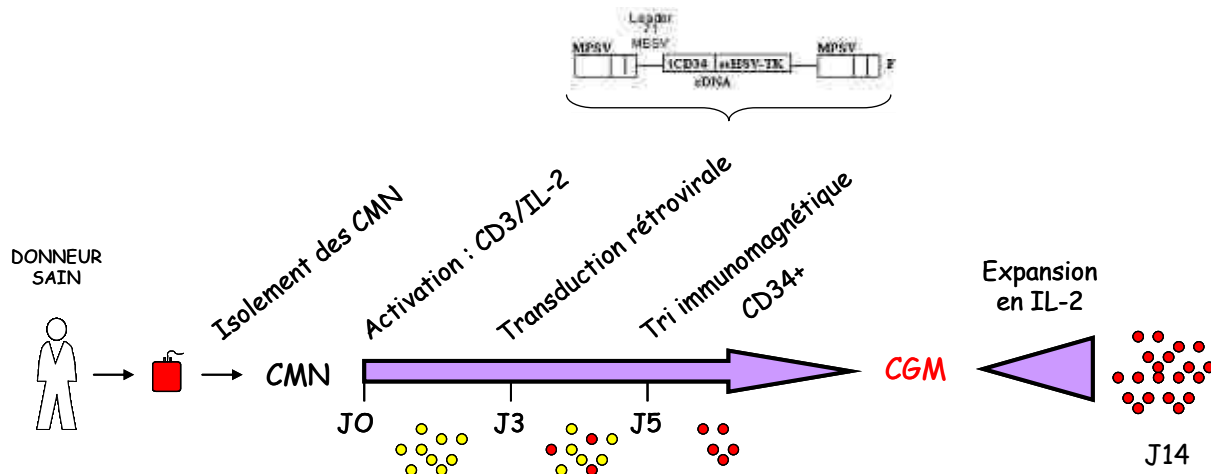


Figure 32 : Stratégie de production des LGM.

Des CMN ont été isolées à partir de prélèvements sanguins de donneurs sains, activées par l'anticorps monoclonal CD3 en présence d'IL-2 recombinante humaine (J0) et transduites trois jours plus tard à l'aide d'un vecteur rétroviral codant pour le gène HSV-tk fusionné au gène CD34 humain tronqué. Deux ou trois jours plus tard, les cellules transduites (CD34+) ont été purifiées par tri immunomagnétique, les LGM sélectionnés étant ensuite cultivés en présence d'IL-2 jusqu'à J14.

II. Les lignées cellulaires

II.1. Culture

Les cellules adhérentes humaines (HeLa, Huh7, Huh7.5.1, HepG2, PLC-PRF-5, SK-Hep1) ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA Laboratories) complété de 10% de SVF, 1% d'acides aminés non-essentiels (GIBCO®) et 10µg/ml de gentamycine (GIBCO®). Les cellules humaines en suspension (B-EBV, K562) ont été cultivées dans du RPMI-1640 supplémenté de 10% de SVF, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été repiquées tous les 3 ou 4 jours.

II.2. Production de lignées exprimant la luciférase

Des cellules humaines HeLa et Huh7 exprimant de façon stable la luciférase ont été produites (HeLa-Luc, Huh7-Luc) après transduction avec un vecteur pCLNCX codant la luciférase (Dr Lorang, NIH, Bethesda, MD, USA) par centrifugation pendant 3h (1000g, 32°C). Elles ont ensuite été clonées par dilutions limites à 10, 3 et 1 cellule(s) par puits (plaque 96 puits) et chaque clone a été testé pour son expression de la luciférase. Le clone exprimant le plus fortement la luciférase a été sélectionné, gardé en culture et cryopréservé.

III. Cytométrie en flux

III.1. Anticorps utilisés

Le tableau 3 présente les anticorps utilisés pour les caractérisations phénotypiques des LGM et des lignées cellulaires utilisés dans les tests fonctionnels.

Antigène	Fluorochrome	Fournisseur	Application
CD34	PE-Cy7	Becton Dickinson (BD), San Diego, CA, USA	Pureté des LGM après tri immunomagnétique
CD3	Pacific blue	BD	Identification des sous-populations de LGM CD3+CD56- (cellules T), CD3-CD56+ (cellules NK) et CD3+CD56+ (cellules T de type NK (T NK-like))
CD56	PE	Miltenyi Biotec SAS, Paris, France	
CD56	PE-Cy7	Beckman Coulter, Marseille, France	
CD4	AF700	BD	Identification des LT CD4+
CD8	APC-Cy7	BD	Identification des LT CD8+
CD45RA	PE-Cy7	BD	Identification des cellules naïves (CD45RA+CD27+), centrales mémoires (CD45RA-CD27+), effectrices mémoires (CD45RA-CD27-) et effectrices (CD45RA+CD27-)
CD27	PE-Cy5	BD	
TCRV α 24	FITC	Beckman Coulter	Identification des NKT invariants (iNKT)
TCRV β 11	APC	Beckman Coulter	
CD107a	PE	BD	Test de cytotoxicité par identification du marqueur de dégranulation CD107a

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les immunomarquages analysés par cytométrie en flux.

PE, Phycoerythrin ; Cy, Cyanine ; AF, Alexa Fluor ; FITC, Fluorescein Isothiocyanate ; APC, Allophycocyanine

III.2. Immunomarquages membranaires

Les cellules ont été lavées, centrifugées et incubées pendant 20 min à 4°C en présence des anticorps décrits ci-dessus. Elles ont été lavées avec du PBS à 4°C puis fixées dans du PBS 2% formaldéhyde. Les immunomarquages ont été analysés à l'aide d'un cytomètre en flux LSRII, 4 lasers, 16 couleurs (BD) et du logiciel Diva (BD).

III.3. Analyse des résultats

La population d'intérêt, en l'occurrence les lymphocytes, est visualisée dans une fenêtre montrant les paramètres Foward Scatter Chanel (FSC) et Side Scatter Chanel (SSC) (Figure 33A), le FCS représentant la taille des cellules et le SSC leur granularité. La population lymphocytaire peut alors être sélectionnée (fenêtre P1) en excluant les débris cellulaires, et l'expression de différents marqueurs par cette population peut être

visualisée, soit en histogramme (Figure 33B), soit en nuages de points (Figure 33C). Des quadrants discriminant les populations positives ou négatives pour les différents marqueurs sont créés avec comme témoin négatif de fluorescence des cellules non marquées et/ou marquées avec un anticorps isotype. Les résultats peuvent être analysés en pourcentage de cellules positives ou en médiane d'intensité de fluorescence (MFI).

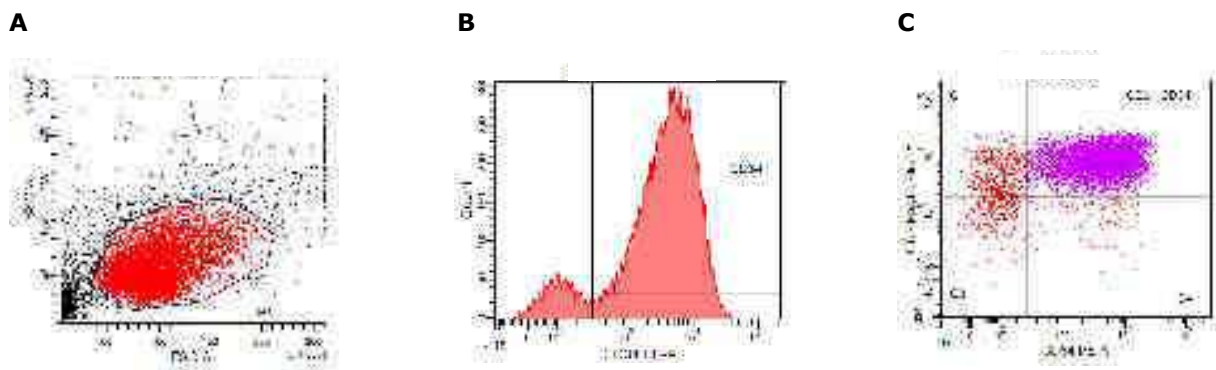


Figure 33 : Exemple de marquage CD3 / CD34 sur des LGM.

Les lymphocytes peuvent être sélectionnés (A) et leur expression du CD34 visualisée en histogramme (B) ou en nuages de points (C) grâce auxquels il est possible de visualiser l'expression de deux marqueurs de manière simultanée (CD34 et CD3 par exemple).

IV. Isolement cellulaire par tri immunomagnétique

IV.1. Purification des cellules transduites

Deux ou trois jours après la transduction rétrovirale, les cellules CD34+ ont été isolées à l'aide d'un kit CD34 Microbeads (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) selon le protocole fourni par Miltenyi. Brièvement, les cellules ont été lavées et marquées avec des microbilles CD34 pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage, elles ont été resuspendues dans du PBS 0,5%SHN supplémenté de 2mM d'EDTA, filtrées puis passées sur colonnes LS (Miltenyi Biotec) fixées sur un aimant, ou triées de façon automatisée à l'aide d'un autoMACS (Miltenyi Biotec). Deux passages sur colonne successifs ont été effectués afin d'améliorer la pureté de la fraction positive. Les cellules ont ensuite été centrifugées puis resuspendues dans le milieu de culture décrit précédemment pour leur expansion jusqu'à J14.

IV.2. Isolement des cellules T, NK, NKT

Après 14 jours de culture, les LGM ont été lavés et marqués avec l'anticorps CD56-PE. Un kit multisort anti-PE (Miltenyi Biotec), utilisé pour séparer les cellules CD56+ (cellules NK et T NK-like) et CD56- (cellules T), permet en un deuxième temps de couper les billes fixées aux cellules CD56+ donnant la possibilité d'effectuer un second tri sur ces mêmes cellules. Un kit CD3 Microbeads (Miltenyi Biotec) a permis ensuite de séparer les cellules CD56+CD3- (cellules NK) et CD56+CD3+ (cellules T NK-like). Les différentes séparations ont été effectuées avec l'autoMACS, en utilisant à chaque étape les programmes indiqués Figure 34. Les étapes 2 et 5 ont été réalisées pour une meilleure pureté des fractions, et l'étape 3 pour s'assurer de l'élimination complète des billes.

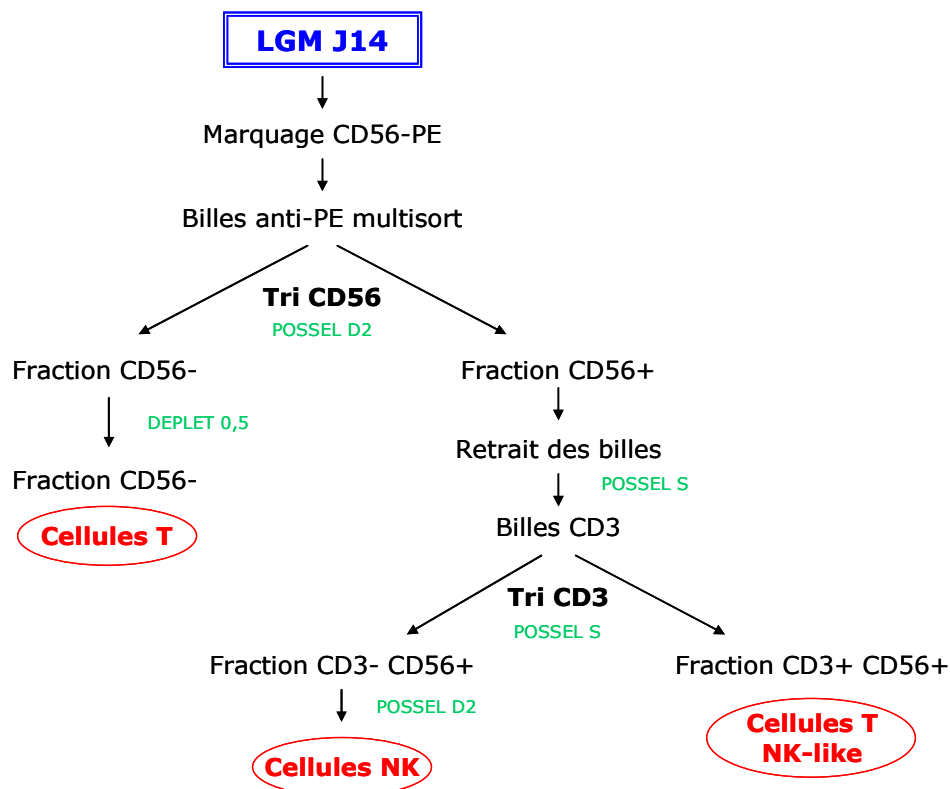


Figure 34 : Méthode de tri pour l'isolement des cellules T, NK et T NK-like.

Programmes utilisés : POSSEL S = Sélection positive
 POSSEL D2 = Sélection positive avec deux passages sur colonne
 DEPLET 0,5 = Déplétion à 0,5ml/minute

V. Evaluation *in vitro* de l'activité cytotoxique des LGM

Des cellules Huh7, PLC-PRF-5 et SK-Hep1, lignées adhérentes de carcinome hépatocellulaire, et des cellules HeLa (témoin positif de sensibilité à la lyse), ont été utilisées comme cellules cibles pour l'évaluation de l'activité cytotoxique des CMN, Co et/ou LGM (cellules effectrices). La cytotoxicité des cellules Co_{CD3/CD28+IL-2}, Co_{CD3+IL-7} et Co_{CD3/CD28+IL-7} a également été testée, de même que celle des fractions purifiées CD3+CD56⁻ (cellules T), CD3-CD56⁺ (cellules NK) et CD3+CD56⁺ (cellules T NK-like).

Un nombre fixe de cellules cibles a été mis en culture en plaque 96 puits à fond plat (HeLa, Huh7 : 1500 cellules par puits ; SK-Hep1 : 2500 cellules par puits ; PLC-PRF-5 : 20000 cellules par puits) puis les cellules effectrices ont été ajoutées à différents ratios effectrices:cibles (E:C) dans du RPMI 10%SHN supplémenté avec 500u/ml d'IL-2 pendant 1, 3 ou 6 jours. Quand cela est indiqué, un anticorps bloquant anti-HLA de classe I (anti-HLA cl.I, 5µg/ml ; Tebu, Le-Perray-en-Yvelines, France), un anticorps isotype (5µg/ml ; Tebu) ou des anticorps bloquants anti-IFN-γ, anti-TNF-α, anti-FasL, anti-TRAIL et isotype (10µg/ml ; eBioscience SAS, Paris, France) ont été ajoutés pendant la co-culture. Après la période de co-incubation, les cellules effectrices et les cellules cibles mortes, non-adhérentes, ont été éliminées par lavage au PBS. Les cellules cibles adhérentes résiduelles, vivantes, ont été colorées au cristal violet (Sigma-Aldrich, Lyon, France) pendant 15 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées avec du PBS, et lysées dans un tampon Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance a été effectuée à 560nm à l'aide d'un lecteur de plaque Mithras LB 940 (Berthold, Thoiry, France). Le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé grâce à des dilutions sériées de cellules cibles incubées sans cellules effectrices. Les données sont exprimées en pourcentage de lyse par rapport aux différents ratios E:C, ou en unités lytiques (UL). Une UL est calculée comme l'inverse du nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser 50% des 1500, 2500 ou 20000 cellules cibles, les résultats étant exprimés en nombre d'UL rapporté à 10⁶ cellules.

VI. Réaction lymphocytaire mixte (MLR)

Les cellules répondantes (CMN ou LGM) ont été marquées au carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE ; Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas) par incubation dans du PBS (10⁷ cellules par ml) contenant du CFSE (5µM) pendant 15 minutes à température ambiante. Le marquage a été arrêté par ajout de deux volumes de SHN puis les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Les cellules stimulantes (B-EBV, HeLa,

Huh7, HepG2, PLC-PRF-5 ou SK-Hep1) ont été irradiées à 60 Gray (Gy) pendant 15 minutes, puis co-cultivées avec les cellules répondantes marquées au CFSE à un rapport stimulantes : répondantes (S:R) de 2:1 ou 4:1.

Six jours plus tard, les cellules répondantes ont été marquées avec les anticorps CD3-PB et CD56-PC5, et leur réponse proliférative a été analysée par cytométrie en flux. Le CFSE se dilue au fur et à mesure des divisions cellulaires : plus les cellules se sont divisées, plus l'intensité de fluorescence du CFSE est faible. Ainsi, le pourcentage de cellules ayant un faible contenu en CFSE nous indique le pourcentage de cellules qui se sont divisées suite à la stimulation allogénique.

VII. Identification des doublets par cytométrie en flux

Les cellules cibles Huh7 ont été lavées dans du PBS et marquées au CFSE comme décrit ci-dessus. Les cellules Huh7 marquées (10^5 cellules) ont été co-incubées à 37°C avec des LGM à un rapport E:C de 10:1 dans des tubes de cytométrie en flux. Comme témoins négatifs, des cellules effectrices seules et des cellules cibles seules ont été incubées en parallèle. Après quatre heures d'incubation, les cellules ont été marquées avec les anticorps CD3-PB et CD56-PE pendant 20 mn à 4°C, puis fixées dans du PBS 2% formaldéhyde. L'acquisition par cytométrie en flux a été réalisée directement, sans aucun lavage. Les doublets cellules effectrices:cellules cibles ont été identifiés comme les événements CD3+CD56-, CD3-CD56- et CD3+CD56+ dénombrés dans la fenêtre des cellules cibles CFSE+.

VIII. Test de cytotoxicité par marquage du CD107a

L'expression membranaire du CD107a permet d'identifier les lymphocytes qui produisent des granules cytotoxiques. Comme témoin de dégranulation et d'expression du CD107a, des cellules LAK ont été produites avant chaque test en activant des PBMC avec de l'IL-2 (1000u/ml) pendant 4 jours. Les cellules effectrices (LAK ou LGM) et les cellules cibles (K562 comme témoin positif de lyse, ou Huh7) ont été co-incubées à 37°C dans du RPMI 10%SHN supplémenté avec 500u/ml d'IL-2 à un rapport E:C de 4:1, en présence de l'anticorps CD107a-PE ou du témoin isotype (10µl pour 10^6 cellules effectrices) dans un volume total de 100µl (plaque 96 puits). Une heure plus tard, du milieu (50µl) contenant de la brefeldine A (10µg/ml) et du Golgi Stop (BD, 4µl pour 6.10^6 cellules) a été ajouté pour une incubation de 3h supplémentaires. Les cellules effectrices

ont ensuite été marquées dans des tubes de cytométrie avec les anticorps CD3-PB et CD56-PC5, lavées, fixées et analysées par cytométrie en flux.

IX. Dosage de la production de cytokines par Elisa

Les surnageants de MLR ont été congelés après trois jours de co-incubation des cellules stimulantes et des cellules répondantes à un rapport S:R de 4:1. Les concentrations d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 ont été déterminées grâce aux kits Human ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience) selon le protocole fourni. Brièvement, des anticorps anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou anti-IL-2 ont été incubés pendant une nuit à 4°C dans une plaque 96 puits Corning Costar 9018 (eBioscience). Une solution de blocage a été ajoutée pendant 1h à température ambiante, puis les surnageants de culture ont été dilués et incubés en duplicata pendant 2h à température ambiante. Une dose-réponse d'IFN- γ , de TNF- α ou d'IL-2 humains de concentrations connues a été effectuée en parallèle pour l'établissement d'une gamme étalon. Un anticorps secondaire biotinylé anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou anti-IL-2 a ensuite été incubé pendant 1h à température ambiante, puis l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP) couplée à l'avidine a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Le substrat de l'enzyme, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), a été ajouté pendant 15 minutes à température ambiante puis la réaction a été arrêtée par ajout de H₂SO₄ à 2M. Cinq lavages ont été effectués entre chaque étape. L'absorbance à 450nm a été lue immédiatement grâce à un lecteur de plaque et les concentrations d'IFN- γ , de TNF- α ou d'IL-2 dans les surnageants de culture ont été déterminées grâce à la gamme étalon.

X. Evaluation *in vivo* de l'activité cytotoxique des LGM

X.1. Etude du tropisme des LGM après injection *in vivo*

Dans le but de suivre la localisation des LGM après leur administration *in vivo*, les cellules ont été marquées au DiR (DiI18(7) tricarboyanine ; Invitrogen) par ajout du marqueur fluorescent à 1,5 μ g/ml directement dans le milieu de culture. Après une incubation d'une heure à 37°C, les cellules ont été lavées au PBS puis injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) à des souris SCID-bg. L'émission de fluorescence a été mesurée *in vivo* avec un IVIS 50 avant et 1h, 3h, 24h et 72h après

l'injection, puis les souris ont été euthanasiées. Le foie, la rate, les intestins et les poumons ont été prélevés pour être testés en fluorescence.

X.2. Modèle xénogénique sous-cutané

Des souris immunodéficientes C57BL/6 Rag2^{-/-}γc^{-/-} ont été injectées en sous-cutané avec 1.10⁶ de cellules HeLa-Luc ou Huh7-Luc. Du PBS (témoin positif de prolifération des cellules cibles) ou des LGM ont été co-administrés avec les cellules HeLa-Luc ou Huh7-Luc à des rapports effectrices:cibles allant de 30:1 à 1:1. Des injections d'IL-2 (10⁶UI/kg) ont été effectuées quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience. La croissance tumorale a été suivie par mesure de l'activité luciférase grâce à une caméra IVIS 50 (Caliper Lifesciences, Roissy, France) après une injection de 150μl de luciférine (20mg/ml ; Caliper Lifesciences) par voie i.p. L'activité luciférase a été mesurée le jour de l'injection des cellules cibles en présence ou en absence des LGM (J0), ainsi que 3, 7 et 14 jours après. La bioluminescence, exprimée en photons/seconde/cm²/stéradian (p/s/cm²/sr) a été analysée par le logiciel Living Image 3.1 (Caliper Lifesciences), et le rapport entre la bioluminescence au jour x et la bioluminescence à J0 a permis d'obtenir une croissance tumorale relative.

X.3. Modèle xénogénique orthotopique

Des souris SCID-bg ont été injectées par voie intrasplénique avec 1.10⁶ de cellules Huh7-Luc, ce qui a permis la migration des cellules au niveau du foie. La bioluminescence a été déterminée quatre jours plus tard comme décrit ci-dessus. Seules les souris montrant une localisation des cellules Huh7-Luc, HepG2-Luc ou PLC-PRF-5-Luc au niveau du foie ont été sélectionnées pour l'expérience. Elles ont été injectées avec 200.10⁶ de LGM dans 100μL de PBS par voie i.v. (J0) et avec de l'IL-2 (10⁶IU/ml) de façon quotidienne. L'activité luciférase a été mesurée 3 et 7 jours après l'injection des LGM comme décrit précédemment.

Pour l'ensemble des expériences *in vivo* décrites ci-dessus, l'injection des cellules (cellules tumorales, LGM), le suivi de la bioluminescence et l'analyse des résultats ont été effectués par les Drs Laurent Mailly et Dr Eric Robinet.

XI. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-virale des LGM

XI.1. Modèle réplicon

Des cellules Huh7.5.1 ont été électroporées (5 pulses, 99µsec, 820V) avec un réplicon VHC (génotype 2a, isolat JFH1) délété des protéines d'enveloppe E1/E2 et codant pour la luciférase (JFH1ΔE1E2-luc). Les cellules ont été co-cultivées avec des LGM à des rapports effectrices:cibles (E:C) allant de 0,125:1 à 2:1, soit de façon séparée (« transwells » ; = absence de contacts entre effectrices et cibles) soit de façon conjointe dans le même puits (= présence de contacts entre effectrices et cibles). Des cellules Huh7.5.1 seules ont été mises en présence d'IFN-γ (100ng/ml) comme témoin positif d'inhibition de la réplication virale. Trois jours plus tard, les LGM, non adhérents, ont été éliminés par lavage, et les cellules Huh7.5.1, adhérentes, ont été lysées. L'ajout de luciférine a permis de mesurer l'activité luciférase qui reflète la réplication virale au sein des cellules Huh7.5.1.

L'activité anti-virale des LGM activés par CD3/CD28 a également été testée à différents rapports E:C.

Afin d'identifier quel facteur soluble est impliqué dans l'activité anti-virale des LGM, des anticorps bloquants anti-IFN-α (Abcam, Paris, France), anti-IFN-β (Abcam), anti-IFN-γ (eBioscience) ou un anticorps isotype (eBioscience) ont été ajoutés à une concentration finale de 5µg/ml pendant la co-incubation des LGM et des cellules cibles, en co-culture à un rapport E:C de 0,5:1 ou en transwell à un rapport E:C de 2:1.

Aussi, l'activité anti-virale des fractions CD56⁻ (cellules T) et CD56⁺ (cellules NK et NKT) a été testée à différents rapports E:C après avoir effectué un tri immunomagnétique des LGM comme décrit précédemment. Enfin, en raison du contexte d'immunosuppression dans lequel nous projetons d'utiliser nos LGM, la résistance de nos cellules à des inhibiteurs de calcineurine a été testée. Ainsi, les cellules Huh7.5.1 et les LGM ont été co-cultivés à un rapport E:C de 0,5:1 en présence de différentes concentrations de cyclosporine A (CsA) et de FK506 (Tacrolimus).

Pour l'ensemble des tests, des co-cultures de LGM et de cellules Huh7.5.1 ont été effectuées en parallèle afin de vérifier la viabilité des cellules cibles. Pour cela, après trois jours de co-culture, les cellules effectrices ainsi que les cellules cibles mortes ont été éliminées par lavage, puis les cellules adhérentes ont été marquées au cristal violet et l'absorbance analysée comme décrit précédemment.

XI.2. Modèle VHCcc

Le système de culture cellulaire pour le VHC (VHCcc) permettant la production des particules virales infectieuses a également été utilisé. Des cellules Huh7.5.1 ont été infectées avec du virus recombinant VHCcc Jc-1 exprimant la luciférase et des LGM ont été ajoutés, à des rapports E:C de 0,5:1 et 2:1, à différents jours post-infection. Trois jours après l'ajout des LGM, les cellules Huh7.5.1 ont été lysées et testées en activité luciférase. La viabilité des cellules Huh7.5.1 a été évaluée par marquage au cristal violet comme décrit précédemment. L'activité anti-virale des LGM activés par CD3/CD28 et des fractions CD56⁻ / CD56⁺ a également été testée dans ce système à des rapports E:C de 0,5:1 et de 2:1, ainsi que la résistance des LGM aux inhibiteurs de calcineurine CsA et FK506.

XII. Prévention de l'allo-immunisation *in vivo*

Afin d'étudier si l'immunosuppression induite par la CsA interfère *in vivo* avec l'alloréactivité des LGM, des splénocytes de souris FvB-Luc exprimant stablement la luciférase ont été cultivés dans du RPMI 10% SVF contenant 5µg/mL de concanavaleine A (ConA), 500U/mL d'IL-2 et 50µM de B-mercaptoéthanol, pendant 14 jours. Dix millions de ces cellules ont été injectées par voie i.p. à des souris Balb/c immunocompétentes qui ont reçu quotidiennement soit du PBS soit de la CsA (50mg/kg) ainsi que de l'IL-2 (10⁶ UI/kg). La présence des cellules injectées est observée par mesure de bioluminescence *in vivo* 7 jours après l'injection, comme décrit précédemment. Parallèlement, le grade de la GvHD a été déterminé en aveugle deux fois par semaine, sur la base de cinq paramètres que sont le poids, l'intégrité de la peau, la texture du poil, l'activité et la posture des animaux (Cooke et al., 1996).

La culture des splénocytes, leur injection, le suivi de la bioluminescence et l'analyse des résultats ont été réalisés par Dr Laurent Mailly. Le grade de la GvHD a été déterminé en aveugle par Nicolas Brignon, technicien animalier.

Résultats

Immunothérapie du CHC

L'alloréactivité a été décrite comme un outil extrêmement puissant d'immunothérapie anti-tumorale dans le cadre d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement des hémopathies malignes (Welniak et al., 2007). Les LGM allogéniques exprimant le gène de toxicité conditionnelle HSV-tk constituent un produit de thérapie génique (PTG) efficace en terme d'activité anti-leucémique (Ciceri et al., 2007). Extrêmement bien caractérisé et testé en clinique chez l'homme depuis près de 15 ans, son innocuité a été également pu être montrée (Bonini et al., 1997; Tiberghien et al., 2001). L'expérience clinique dont font l'objet les LGM constitue un atout majeur pour leur utilisation dans le cadre d'autres indications.

La faisabilité d'une immunothérapie cellulaire du CHC a été clairement montrée par l'utilisation d'un autre produit de thérapie cellulaire, les CIK. Ces cellules, utilisées en situation autologue, ont un effet anti-tumoral très élevé en combinaison avec les autres traitements du CHC actuellement disponibles (Takayama et al., 2000; Weng et al., 2008). Cependant, les approches autologues nécessitent une production de cellules au « cas par cas », qui est peu rentable en termes de coût et d'accessibilité du produit à grande échelle.

Notre objectif consiste à apporter la preuve de concept que les LGM allogéniques présentent une activité anti-tumorale qui en font un PTG intéressant pour le traitement du CHC, dans le but de créer une banque de LGM allogéniques « prêts-à-l'emploi ».

I. Caractérisation des LGM

I.1. Sous-populations lymphocytaires

Pour initier notre étude, nous avons caractérisé nos LGM d'un point de vue phénotypique, en utilisant les marqueurs CD3 et CD56 qui permettent de mettre en évidence les cellules T (CD3+ CD56-), les cellules T NK-like (CD3+ CD56+) et les cellules NK (CD3- CD56+). Les cellules T NK-like, que l'on désignera par « cellules NKT », sont des lymphocytes T qui expriment des marqueurs des cellules NK tels que le CD56 et des récepteurs NK. De façon similaire aux lymphocytes T classiques, elles expriment le CD3 et sont pourvues d'un TCR α/β . Il s'agit de ne pas les confondre avec les NKT invariants (iNKT), qui ont un TCR formé de chaînes α et β invariantes (telles que Va24-J α 18-V β 11 reconnaissant des lipides et glycolipides présentés par la molécule CD1d qui est analogue aux protéines du CMH-I).

La population T est la population majoritaire au sein des LGM, suivie par les NKT et enfin par les NK (Tableau 4). On observe une proportion plus élevée de NKT parmi les

LGM que parmi les CMN, ce qui peut s'expliquer par une expansion légèrement plus importante des NKT par rapport aux autres sous-populations (Figure 35), ou par l'acquisition du CD56 par les cellules T au cours de la culture, comme cela l'a été montré précédemment (Kim et al., 2007; Wang et al., 2002). Les cellules NK sont plus rares parmi les LGM que parmi les CMN, leur expansion au cours de la culture étant plus faible que celle des NKT. Des immunomarquages avec des anticorps anti-TCRV α 24 et anti-TCRV β 11 ont montré que les NKT présents dans les populations Co ou LGM ne résultent pas de l'expansion de NKT invariants (résultats non montrés).

En accord avec de précédentes études (Mercier-Letondal et al., 2008; Sauce et al., 2002), les LGM présentent un ratio CD4/CD8 inversé par rapport aux CMN. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sont majoritaires parmi les CMN, alors que les LGM comprennent davantage de lymphocytes T CD8⁺ (résultats non montrés).

	CMN	Co	LGM
T	65,5 +/- 1,8	88,1 +/- 2,2	77,3 +/- 3,2
NKT	7,2 +/- 1,1	6,6 +/- 2,7	11,1 +/- 1,6
NK	11,2 +/- 1,0	1,0 +/- 0,2	5,3 +/- 2,0

Tableau 4 : Répartition des sous-populations T, NK et NKT parmi les CMN, les Co et les LGM.

CMN : moyenne \pm SE de 15 expériences indépendantes

Co : moyenne \pm SE de 3 expériences indépendantes

LGM : moyenne \pm SE de 19 expériences indépendantes

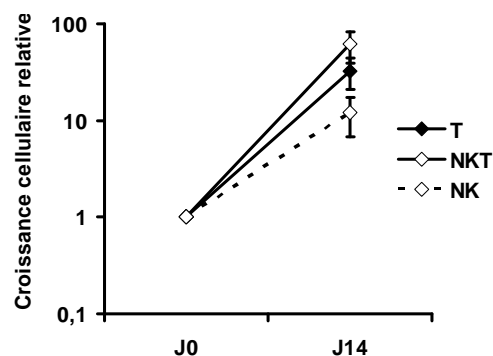


Figure 35 : Expansion relative des-populations T, NK et NKT après 14 jours de culture.

A J0 (CMN) et à J14 (LGM), une numération cellulaire au bleu trypan et un marquage CD3/CD56 ont été réalisés pour le calcul de l'expansion relative de chaque sous-population lymphocytaire.

Moyenne \pm SE de 13 expériences indépendantes

I.2. « Contrôles qualité »

I.2.1. Pureté des LGM après tri immunomagnétique

Le gène suicide HSV-tk est fusionné au gène codant pour le marqueur membranaire CD34 normalement non-exprimé par les lymphocytes adultes. Par conséquent, le pourcentage de cellules transduites avant et après sélection peut être déterminé par marquage CD34 (Figures 36A et 36B).

Nous avons obtenu en moyenne une efficacité de transduction de $9.1 \pm 0.8\%$ (moyenne \pm erreur standard (ES)) et une pureté après tri immunomagnétique de $89.4 \pm 1.2\%$ (moyenne \pm ES) ($n=23$). Afin de s'assurer que les cellules T, NK et NKT soient transduites de façon équivalente, un marquage CD34 a été effectué et les pourcentages de cellules T, NK et NKT ont été déterminés soit dans l'ensemble de la population lymphocytaire (Figure 36C, barres noires), soit parmi les cellules CD34+ (Figure 36C, barres violettes). On observe que les pourcentages sont similaires, indiquant que les trois sous-populations sont transduites de manière efficace.

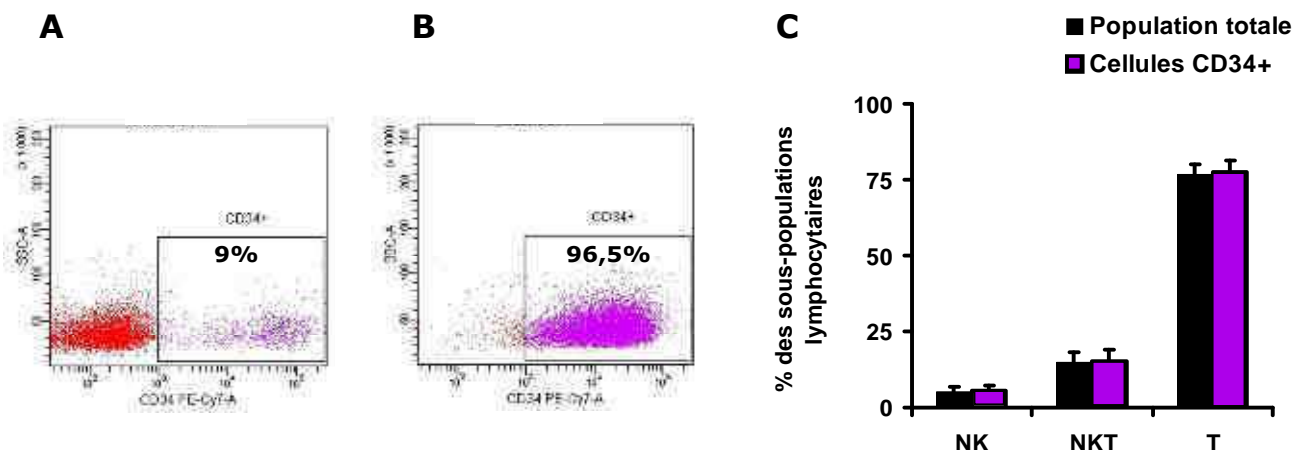


Figure 36 : Efficacité de transduction et pureté des LGM après tri immunomagnétique.

Deux ou trois jours après transduction, un marquage CD34 a été effectué avant (efficacité de transduction, A) et après (pureté des LGM, B) le tri immunomagnétique. Des co-marquages CD34 et CD3/CD56 ont été réalisés afin de déterminer l'efficacité de transduction de chaque sous-population lymphocytaire.

A, B : expérience représentative de 23 expériences indépendantes

C : moyenne \pm ES de 6 expériences indépendantes

I.2.2. Sensibilité des LGM et des sous-populations lymphocytaires au GCV

L'avantage de notre approche repose sur le fait de pouvoir éliminer les LGM allogéniques en cas de GvHD. Nous avons testé la susceptibilité des LGM au GCV en les

cultivant pendant une semaine en présence de la prodrogue à 1µg/ml. Des cellules Co (CMN activées et cultivées en parallèle mais non-transduites et non-sélectionnées) ont servi de témoin négatif.

Des numérations au bleu trypan montrent une diminution de la croissance cellulaire relative de plus de 95% en une semaine en présence de GCV, par rapport au témoin de culture sans GCV, alors que le GCV n'a pas d'effet significatif sur la croissance relative des Co (Figure 37A). De plus, le GCV permet d'inhiber de façon efficace la croissance relative des NK, NKT et T (Figure 37B).

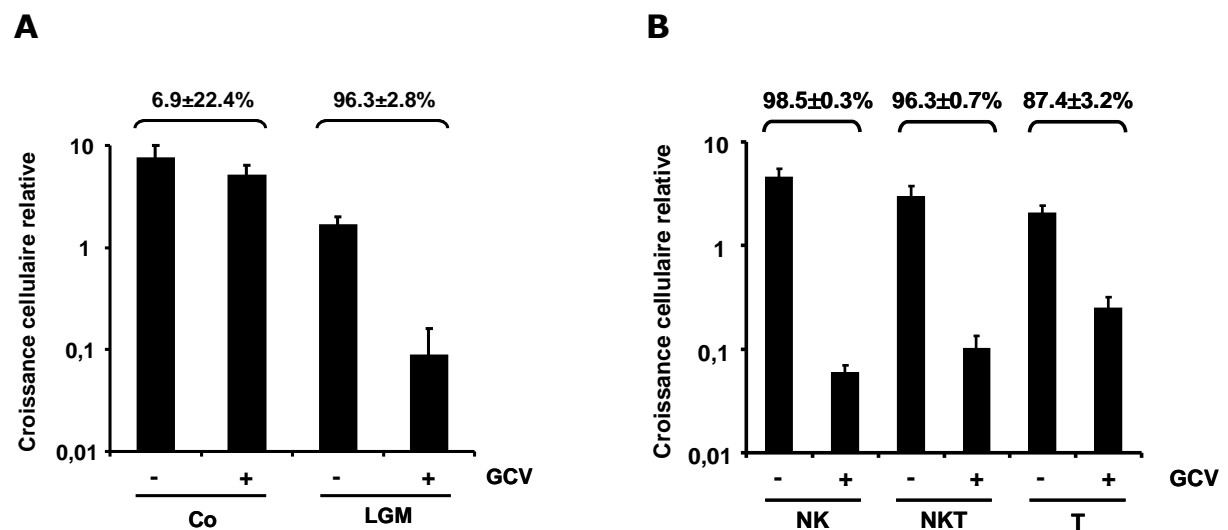


Figure 37 : Sensibilité *in vitro* des LGM au GCV.

Après 14 jours de culture, les LGM et les Co (A) ont été cultivés en absence ou en présence de GCV (1µg/ml). A J3 et à J7 après le début du traitement GCV, des numérations au bleu trypan ont été effectuées et la croissance cellulaire relative calculée. Après trois jours de traitement GCV, l'expression des marqueurs CD3 et CD56 par les LGM a été déterminée (B), permettant de calculer la croissance cellulaire relative des différentes sous-populations lymphocytaires en présence ou en absence de GCV. L'inhibition de la croissance cellulaire relative par le GCV (moyenne±ES) est indiquée pour les Co, les LGM, les NK, les NKT et les T (A, B).

A : moyenne±ES de 4 expériences indépendantes

B : moyenne±ES de 6 expériences indépendantes

II. Propriétés fonctionnelles des LGM *in vitro*

Afin de déterminer si l'utilisation de LGM en tant que traitement adjuvant du CHC constituerait une approche efficace, nous avons testé l'activité cytotoxique des LGM vis-à-vis de différentes lignées adhérentes, des cellules HeLa (témoin positif de sensibilité à la lyse) et des lignées de CHC (Huh7, HepG2, SK-Hep1, PLC-PRF-5). Lors de précédentes

études sur les aspects fonctionnels des LGM, il a été montré que ces cellules ont une alloréactivité diminuée par rapport aux CMN non manipulées en termes de réponse proliférative par stimulation B-EBV en MLR et de production de cytokines pro-inflammatoires (Mercier-Letondal et al., 2008; Sauce et al., 2002). Ainsi, nous avons voulu tester, en parallèle du potentiel cytotoxique des LGM, la réponse proliférative et la production d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α des LGM suite à une stimulation par les différentes lignées de CHC en comparaison avec une stimulation B-EBV.

II.1. Activité cytotoxique

Les cellules effectrices (CMN ou LGM) et les cellules cibles (HeLa ou lignées de CHC) ont été co-cultivées pendant 6 jours à différents rapports effectrices:cibles (E:C). Les résultats sont exprimés soit en pourcentage de cytotoxicité (Figure 38A), soit en unités lytiques 50% (UL50, Figure 38B).

Les LGM sont hautement cytotoxiques vis-à-vis des cellules Huh7 (Figure 38A) ainsi qu'à l'encontre des autres lignées de CHC (Figure 38B), cette activité cytotoxique dépassant même celle observée vis-à-vis des cellules HeLa. La lignée HepG2 n'a pas pu être utilisée pour ce test en raison d'un défaut d'adhérence dans les plaques utilisées. Tous les tests ayant été réalisés en présence d'IL-2 (sauf indication contraire), les CMN ont également une activité cytotoxique importante étant donné qu'elles peuvent, dans ce cas, être comparées à des LAK. Elles ont cependant un potentiel de lyse très faible en l'absence d'IL-2 (résultats non montrés).

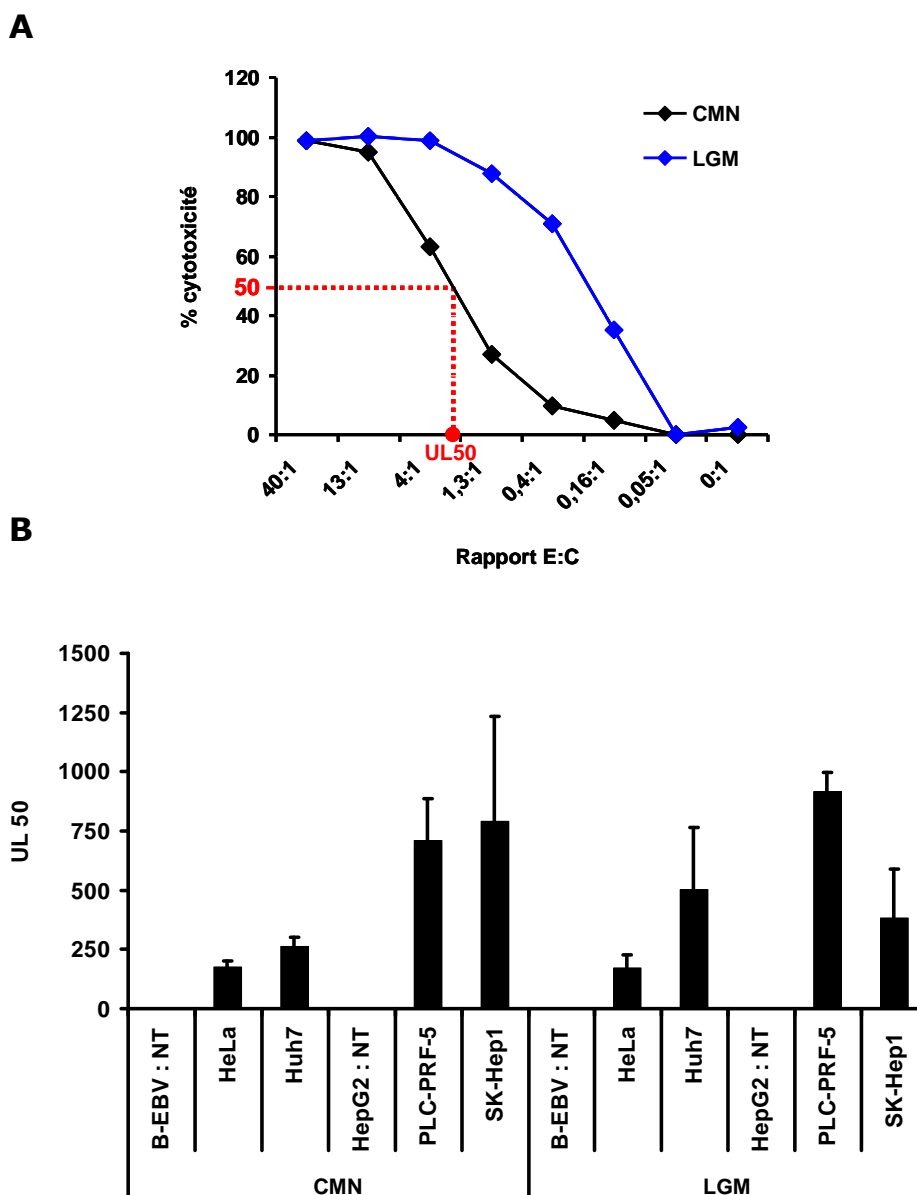


Figure 38 : Activité cytotoxique des LGM vis-à-vis de différentes lignées cellulaires.

Les lignées cellulaires ont été co-cultivées avec des CMN ou des LGM pendant 6 jours à différents rapports effectrices:cibles (E:C). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité (A) ou en unités lytiques 50% (UL50, B). Une UL50 est calculée comme l'inverse du nombre de cellules effectrices nécessaire pour lyser 50% des 1500 (HeLa, Huh7), 2500 (SK-Hep1) ou 20000 (PLC-PRF-5) cellules cibles, les résultats étant exprimés en nombre d'UL50 rapporté à 10^6 cellules. NT = non-testé

A : expérience représentative de 11 expériences indépendantes

B : moyenne \pm ES de 6 expériences indépendantes

II.2. Réponse proliférative en réaction lymphocytaire mixte

D'autres aspects fonctionnels ont également été testés, et notamment la réponse proliférative en réaction lymphocytaire mixte (MLR). Pour cela, les cellules stimulantes (HeLa, B-EBV ou lignées de CHC) ont été irradiées à 60Gy et co-incubées pendant 6 jours avec les cellules répondantes (CMN et LGM) préalablement marquées au CFSE à un rapport répondantes:stimulantes (R:S) de 4:1. Le CFSE est un marqueur fluorescent qui se dilue dans les cellules filles au fur et à mesure des divisions cellulaires. Ainsi, la réponse proliférative des cellules répondantes peut être estimée par le pourcentage de cellules ayant un contenu en CFSE diminué (% cellules CFSE low). La lignée B-EBV a été utilisée en tant que témoin positif de stimulation.

Comme attendu, les cellules B-EBV induisent une importante réponse proliférative des CMN et des LGM en terme de pourcentage de cellules qui se divisent (Figure 39A). En revanche, si l'on considère la médiane de fluorescence (MFI) qui reflète le nombre de divisions cellulaires, on observe que les LGM prolifèrent de façon moins importante que les CMN. En effet, dans cet exemple représentatif (Figure 39B), le rapport de MFI (MFI des cellules ayant un contenu élevé en CFSE (CFSE high) / MFI des cellules ayant un faible contenu en CFSE (CFSE low)) est de 115.6 pour les CMN et de 20.3 pour les LGM.

Les lignées de CHC induisent une réponse proliférative moins importante de la part des CMN et des LGM par rapport aux cellules B-EBV, indiquant qu'elles sont de moins bonnes stimulantes (Figure 39A).

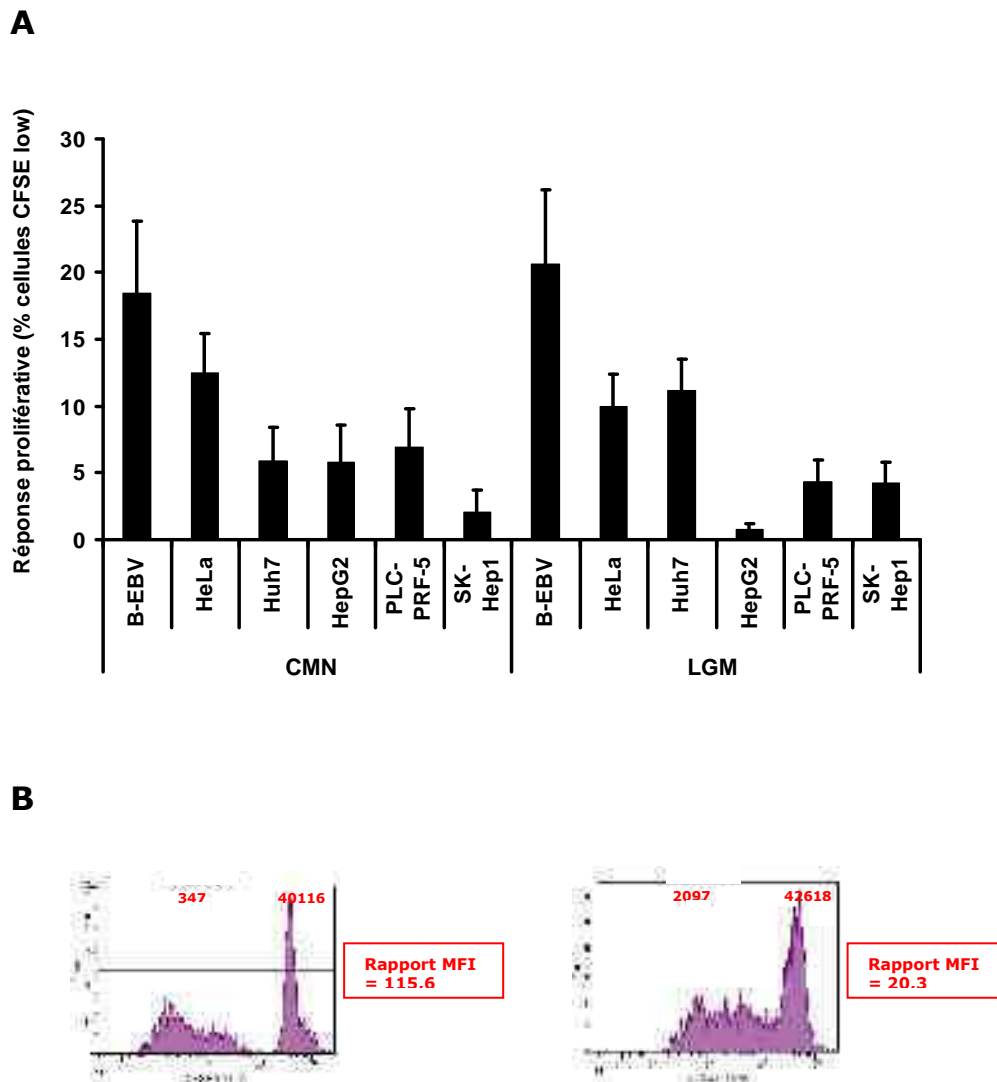


Figure 39 : Réponse proliférative des CMN et les LGM suite à la stimulation par différentes lignées cellulaires.

Des LGM et des CMN, marqués au CFSE, ont été co-cultivés pendant 6 jours avec les différentes lignées cellulaires irradiées, à un rapport répondantes:stimulantes (R:S) de 4:1 et en présence d'IL-2 à 500u/ml. Les cellules ont ensuite été fixées et leur contenu en CFSE analysé par cytométrie en flux.

A : moyenne±ES de 6 expériences indépendantes

B : CMN (panel de gauche) et LGM (panel de droite) stimulées par B-EBV (B). Le CFSE est analysé parmi l'ensemble des lymphocytes. Les médianes de fluorescence (MFI) ainsi que les rapports MFI (MFI cellules CFSE high / MFI cellules CFSE low) sont indiqués dans chaque panel. Expérience représentative de 6 expériences indépendantes.

II.3. Production de cytokines

La production d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 par les CMN et les LGM en réponse à une stimulation allogénique par les cellules B-EBV et par les différentes lignées de CHC a été quantifiée par dosage Elisa. Les cellules répondantes et stimulantes ont été co-cultivées pendant 3 jours à un rapport R:S de 4:1 en présence (dosage IFN- γ et TNF- α) ou en absence (dosage IL-2) d'IL-2 avant la congélation des surnageants de culture.

Les CMN produisent des quantités importantes d'IFN- γ , quelque soit la stimulation, alors que les LGM en produisent davantage lorsqu'elles sont stimulées par B-EBV plutôt que par les autres lignées (Figure 40A). Les quantités de TNF- α produites sont nettement plus faibles, et sont détectables uniquement dans le cas des CMN (Figure 40B).

La production d'IL-2 a également été mesurée par dosage Elisa (résultats non montrés), mais elle n'est détectable que dans les surnageants de culture de CMN stimulées par B-EBV. De plus, l'IL-2 n'est pas détectable dans les surnageants de culture de LGM, quelque soit les lignées stimulantes utilisées. Ces résultats sont en corrélation avec le fait que les CMN prolifèrent davantage en réponse à une stimulation B-EBV qu'en réponse aux autres stimulations, et de façon plus importante que les LGM.

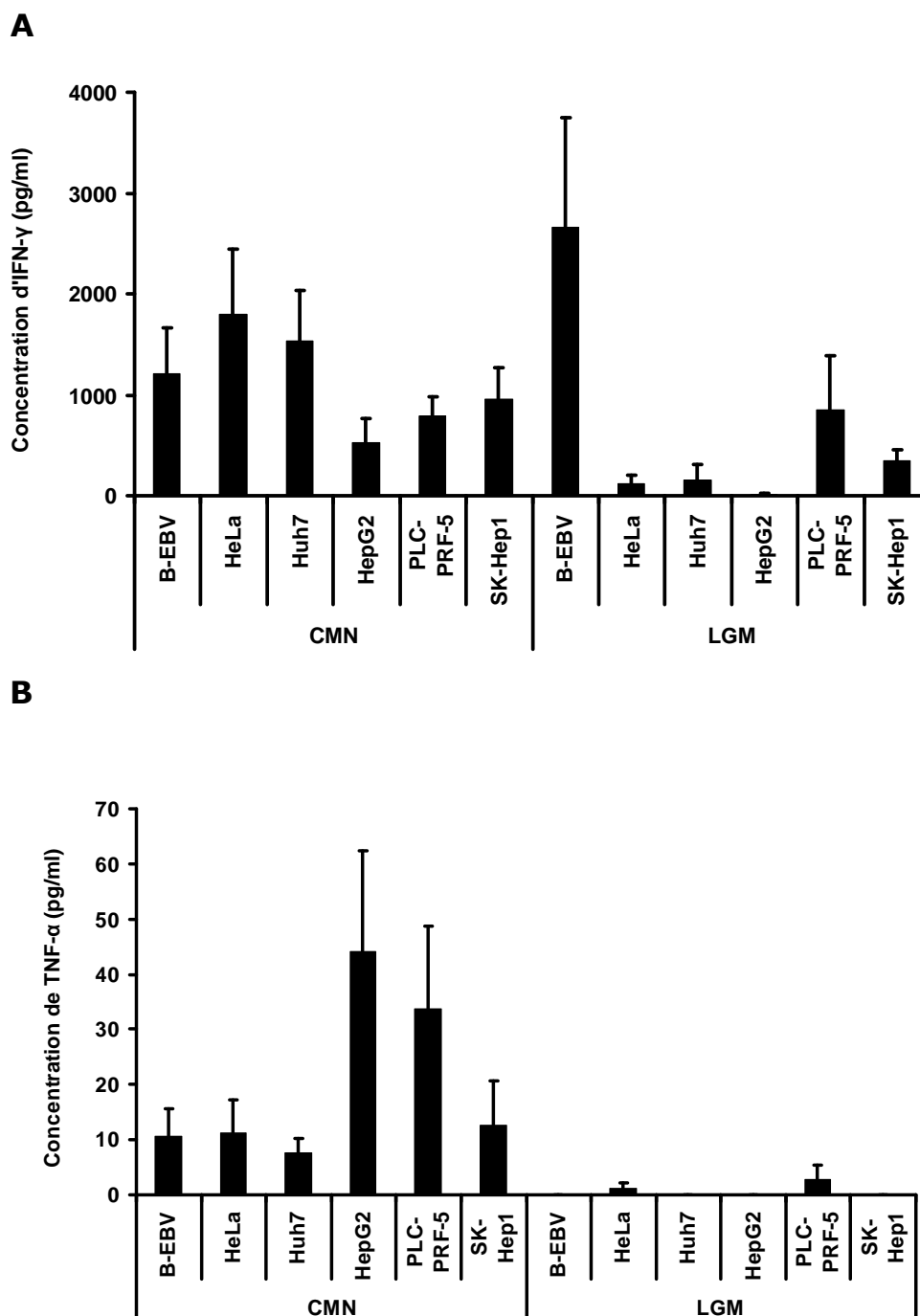


Figure 40 : Production d'IFN- γ (A) et de TNF- α (B) par les CMN et les LGM stimulés par différentes lignées cellulaires.

Les LGM et les CMN ont été co-cultivés pendant 3 jours avec les différentes lignées cellulaires irradiées, à un rapport répondeurs:stimulantes (R:S) de 4:1. Le milieu de culture a été supplémenté avec de l'IL-2 à 500u/ml. Les surnageants de culture ont été congelés jusqu'au jour du test Elisa pour lequel ils ont été dilués au 1/3^e.

A, B : moyenne \pm ES de 6 expériences indépendantes

III. Caractérisation de l'activité cytotoxique des LGM *in vitro*

III.1. L'activation par CD3/IL-2 permet une cytotoxicité maximale

Lors de la production des LGM allogéniques de grade clinique, le groupe du Pr Tiberghien a montré que le mode d'activation des CMN joue un rôle fondamental dans le potentiel alloréactif des LGM (Sauce et al., 2002). Le protocole initial était basé sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal CD3 pour l'activation des cellules et de l'IL-2 tout au long de la culture. Cependant, ce mode d'activation s'est montré responsable d'une perte d'alloréactivité des LGM par rapport aux CMN en termes de réponse proliférative et d'induction de GvH, et d'un phénotype plus différencié. D'autres protocoles ont ainsi été testés afin de limiter ces altérations fonctionnelles. L'anticorps CD3 a été remplacé par des anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes, et l'IL-2 par de l'IL-7. Il a alors été montré que la combinaison CD3/CD28+IL-7 permet de limiter la perte d'alloréactivité en termes de réponse proliférative *in vitro* et d'induction de GvHD *in vivo*, notamment grâce à un phénotype plus « naïf » rejoignant celui des CMN (Mercier-Letondal et al., 2008).

Au vu de ces données, nous avons voulu déterminer quel protocole d'activation et de culture permettrait d'acquérir la plus forte activité cytotoxique de la part des LGM. Pour cela, nous avons testé les quatre combinaisons suivantes : CD3+IL-2 ; CD3/CD28+IL-2 ; CD3+IL-7 ; CD3/CD28+IL-7. Les cellules ont été cultivées pendant 14 jours et leur expansion relative a été calculée. De plus, l'activité cytotoxique des cellules cultivées a été testée vis-à-vis des lignées HeLa et Huh7 en co-cultivant les cellules effectrices et les cellules cibles à différents rapports E:C pendant 6 jours.

Les cellules activées par CD3+IL-2 ou par CD3/CD28+IL-2 ont une croissance relative élevée, alors que celles activées par CD3+IL-7 ou CD3/CD28+IL-7 ont une expansion très faible (CD3/CD28+IL-7) ou même quasi-nulle (CD3+IL-7) au cours de la culture (Figure 41). Ainsi, l'IL-2 permet une expansion nettement plus importante que l'IL-7, ce qui représente un avantage considérable quant à une production de cellules à grande échelle.

La combinaison CD3/IL-2 est celle qui permet la plus forte cytotoxicité, que ce soit vis-à-vis des cellules HeLa ou des cellules Huh7 (Figure 42). Ainsi, cette combinaison a été conservée pour l'ensemble des expériences qui ont suivi.

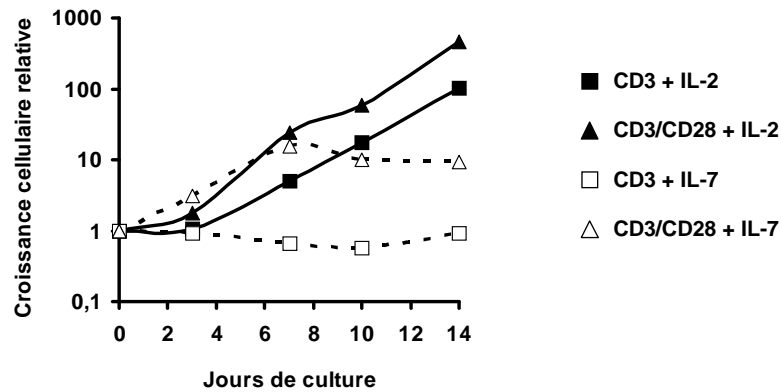


Figure 41 : Expansion relative des cellules cultivées $Co_{CD3+IL-2}$, $Co_{CD3/CD28+IL-2}$, $Co_{CD3+IL-7}$ et $Co_{CD3/CD28+IL-7}$.

Tous les 3 ou 4 jours, une numération cellulaire au bleu trypan a été effectuée et l'expansion relative des cellules calculée.

Expérience représentative de 4 expériences indépendantes

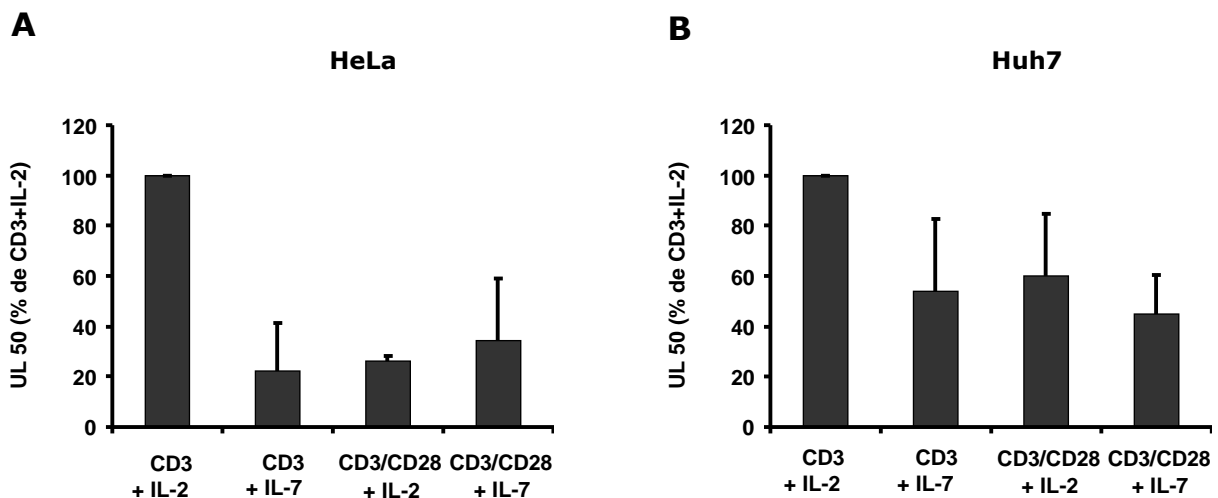


Figure 42 : Activité cytotoxique de cellules cultivées $Co_{CD3+IL-2}$, $Co_{CD3/CD28+IL-2}$, $Co_{CD3+IL-7}$ et $Co_{CD3/CD28+IL-7}$.

Les CMN ont été activées par CD3 ou par CD3/CD28 en présence d'IL-2 ou d'IL-7 pendant 14 jours avant de tester leur activité cytotoxique à différents rapports E:C vis-à-vis de cellules HeLa (A) ou Huh7 (B). Des CMN issues du même donneur ont été testées en parallèle. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'unités lytiques 50% (UL50) de la condition CD3+IL-2 (C: UL50=653±145 ; D: UL50=224±109).

A, B : moyenne±ES de 4 expériences indépendantes

Le phénotype des cellules cultivées pendant 14 jours selon les différents protocoles a été déterminé par l'analyse des marqueurs membranaires CD45RA et CD27. Les cellules double positives sont des cellules naïves, les cellules CD45RA- CD27+ sont des cellules centrales mémoires, les cellules double négatives sont des cellules mémoires effectrices et les cellules CD45RA+ CD27- sont des cellules effectrices. Nous avons ainsi montré que la combinaison CD3/IL-2 permet une expansion préférentielle de cellules effectrices mémoires par rapport aux CMN et aux autres combinaisons (Figure 43). Ce phénotype davantage différencié explique le potentiel cytotoxique élevé de ces cellules.

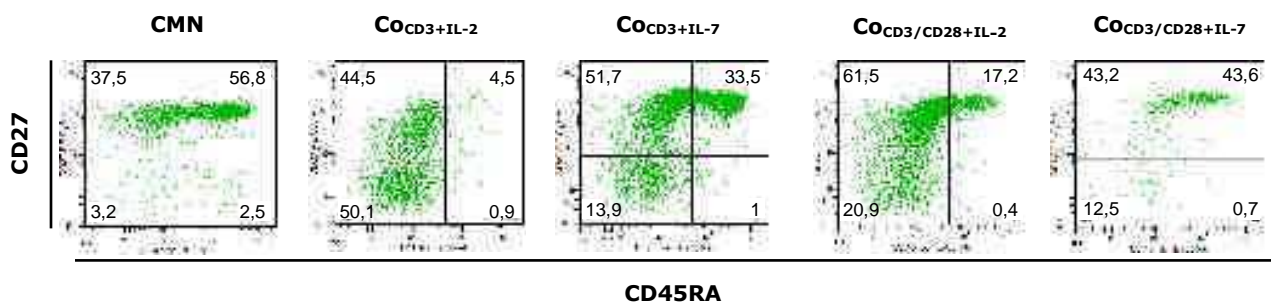


Figure 43 : Phénotype des cellules Co_{CD3+IL-2}, Co_{CD3/CD28+IL-2}, Co_{CD3+IL-7} et Co_{CD3/CD28+IL-7}.

Après 14 jours de culture, l'expression des marqueurs CD45RA et CD27 par les cellules cultivées selon les différents protocoles a été analysée par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules naïves (CD45RA+ CD27+), centrales mémoires (CD45RA- CD27+), mémoires effectrices (CD45RA- CD27-) et effectrices (CD45RA+ CD27+) sont indiqués dans les quadrants correspondants.

Expérience représentative de 4 expériences indépendantes

III.2. La transduction rétrovirale n'affecte pas la cytotoxicité des LGM

Des LGM ont été produits par activation CD3+IL-2, puis leur activité cytotoxique a été comparée à celle de CMN et de cellules cultivées en parallèle pendant 14 jours mais non-transduites et non-sélectionnées (cellules « Co »).

La cytotoxicité des LGM est similaire à celle des Co, indiquant que la transduction rétrovirale n'affecte pas le potentiel cytotoxique des LGM (Figure 44A). De plus, les LGM sont cytotoxiques dès un jour de co-culture avec les cellules cibles, alors qu'il faut attendre 3 jours pour avoir un effet cytotoxique des CMN (Figure 44B). Le potentiel de lyse des LGM est donc très élevé et rapide, indiquant que les cellules sont prêtes à exercer leur pouvoir cytotoxique du fait de leur activation et leur culture.

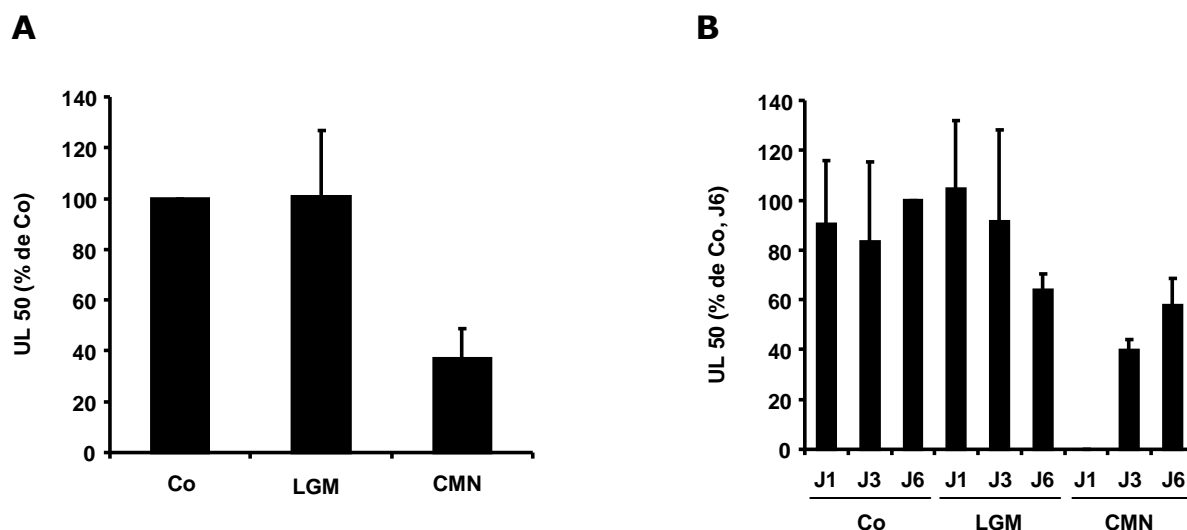


Figure 44 : Cytotoxicité des LGM par rapport aux CMN et Co.

Des CMN, Co et LGM issus du même donneur ont été co-cultivés avec des Huh7 en présence d'IL-2 pendant 6 jours (A) ou pendant 1, 3 ou 6 jours (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la condition Co, J6 (A : $UL50=363\pm236$; B : $UL50=218\pm64$).

A : moyenne \pm ES de 7 expériences indépendantes

B : moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes

III.3. Le potentiel cytotoxique des LGM est dépendant de l'IL-2

Nous avons ensuite voulu déterminer dans quelle mesure les LGM sont dépendants de l'IL-2 pour exercer leurs fonctions cytotoxiques. Aussi, il fut intéressant de savoir si l'IL-7, qui appartient à la même famille de cytokines que l'IL-2 et qui est également un facteur de survie des lymphocytes, peut favoriser le potentiel de lyse des LGM. La cytotoxicité des LGM a ainsi été testée en présence ou en absence d'IL-2 (500u/ml) ou d'IL-7 (20ng/ml) lors de leur co-incubation avec les cellules cibles.

L'activité cytotoxique des LGM est maximale en présence d'IL-2, l'ajout de l'IL-7 pendant le test de cytotoxicité résultant en une faible lyse des cellules cibles, équivalente à celle observée en l'absence de cytokine. Ces résultats indiquent que l'IL-2 conditionne le fort pouvoir cytotoxique des LGM et qu'elle ne peut être remplacée par l'IL-7 (Figure 45).

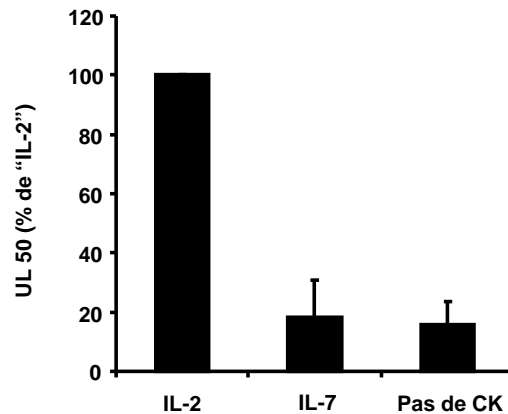


Figure 45 : Activité cytotoxique des LGM en présence ou en absence d'IL-2 et d'IL-7.

Des LGM et des cellules Huh7 ont été co-cultivés pendant 6 jours +/- IL-2 (500u/ml) ou IL-7 (20ng/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la condition avec IL-2 (UL50 : 173±58).

Moyenne±ES de 4 expériences indépendantes

CK, cytokine

III.4. Les LGM conservent leur activité cytotoxique pendant 28 jours de culture

Il serait intéressant de maximiser la quantité de LGM produits afin d'en diminuer le coût de production. De ce fait, nous avons voulu évaluer si les cellules maintiennent leurs fonctions cytotoxiques pendant une période supérieure à 14 jours. Pour cela, les cellules ont été produites comme précédemment décrit mais cultivées pendant 28 jours. La cytotoxicité des LGM a été testée une fois par semaine, le J0 correspondant aux CMN non manipulées.

L'activité cytotoxique des LGM atteint un maximum à J7, puis, malgré une diminution à J14, reste stable jusqu'à J28 (Figure 46).

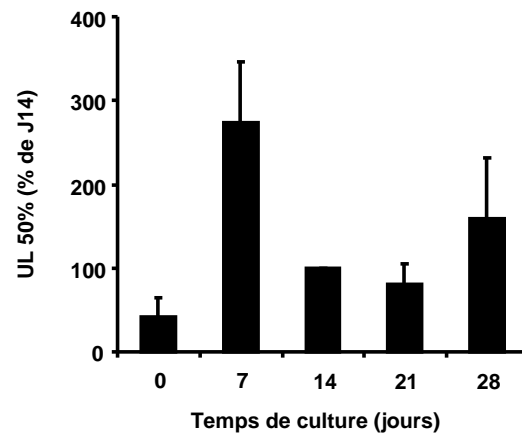


Figure 46 : Cytotoxicité des LGM après 7, 14, 21 et 28 d'expansion.

Des LGM ont été cultivés pendant 28 jours, et testés tous les 7 jours pour leur activité cytotoxique en les co-cultivant pendant 6 jours avec des cellules Huh7. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la cytotoxicité des LGM après 14 jours de culture (UL50 : 242±111).

Moyenne±ES de 6 expériences indépendantes

III.5. L'activité cytotoxique des LGM est non-restreinte par le CMH

Afin d'explorer le mécanisme par lequel les LGM reconnaissent les cellules cibles, nous avons utilisé, lors de tests de cytotoxicité, un anticorps bloquant anti-HLA de classe I (anti-HLA cl.I) permettant d'empêcher la reconnaissance des cellules cibles par les LGM via un mécanisme mettant en jeu les molécules du CMH de classe I. Avant d'évaluer l'effet de l'anticorps sur la lyse des cellules cibles par les LGM, l'anticorps bloquant a été testé en MLR pour s'assurer de son efficacité.

III.5.1. Validation de l'anticorps anti-HLA cl.I en MLR

Des CMN ont été marquées au CFSE comme précédemment décrit. Après co-culture avec des B-EBV irradiées, le contenu en CFSE des CMN a été analysé par cytométrie en flux. Les populations LTCD8+ et LTCD4+ ont été identifiées par immunomarquages membranaires, et l'effet de l'anticorps anti-HLA cl.I a été analysé sur la population LTCD8+.

Les CMN stimulées avec des B-EBV ont une réponse proliférative très forte par rapport aux cellules non-stimulées (Figure 47). Le témoin isotype n'a aucun effet, alors que l'anticorps anti-HLA cl.I inhibe de façon très importante la réponse proliférative des CMN. Cet anticorps a ainsi pu être utilisé pour caractériser les mécanismes de reconnaissance lors de la lyse des cellules cibles par les LGM.

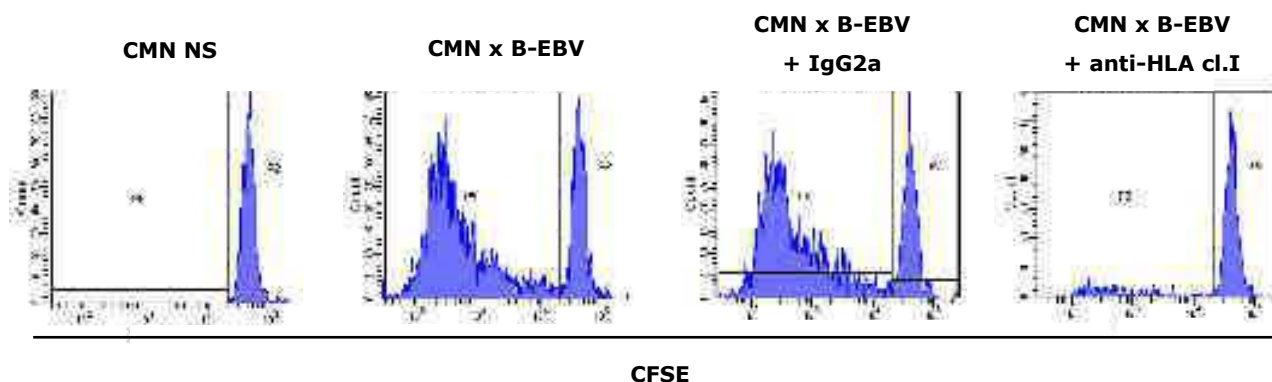


Figure 47 : Test de l'anticorps anti-HLA de classe I en MLR.

Des CMN ont été marquées au CFSE puis cultivées avec des cellules B-EBV irradiées pendant 6 jours, en présence ou en absence de l'anticorps anti-HLA cl.I (clone W6/32) ou du témoin isotype (IgG2a) à une concentration de 5µg/ml. Les CMN ont ensuite été marquées avec les anticorps CD3, CD4 et CD8 et le contenu en CFSE des LTCD8+ a été analysé par cytométrie en flux. NS = non-stimulées

III.5.2. Effet du blocage du CMH de classe I sur la cytotoxicité des LGM

L'activité cytotoxique des LGM a été testée en présence de l'anticorps anti-HLA cl.I pendant la co-culture avec les cellules cibles. Aucune inhibition de la cytotoxicité des LGM n'a pu être observée, ni avec le témoin isotype ni avec l'anticorps anti-HLA cl.I (Figure 48). Par conséquent, nous en avons conclu que la cytotoxicité des LGM n'est pas restreinte par le CMH.

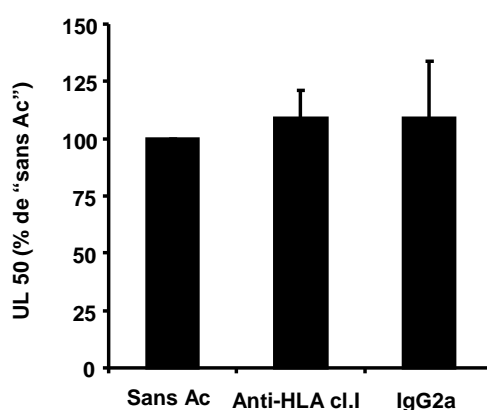


Figure 48 : Effet de l'anticorps anti-HLA de classe I sur la lyse de Huh7 par les LGM.

L'anticorps anti-HLA cl.I ou le témoin isotype (IgG2a) ont été ajoutés (5µg/ml) pendant la co-culture de 6 jours des LGM et des cellules Huh7. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la cytotoxicité des LGM sans anticorps (UL50 : 210±98).

Moyenne±ES de 4 expériences indépendantes

III.6. Les trois sous-populations lymphocytaires contribuent à l'activité cytotoxique des LGM

Après avoir montré que les LGM reconnaissent les cellules cibles via un mécanisme indépendant du CMH, nous avons voulu déterminer quelle sous-population lymphocytaire (T, NK ou NKT) est impliquée dans la cytotoxicité des LGM.

III.6.1. Tris immunomagnétiques

Lors d'expériences préliminaires, les cellules T CD8+ ont été isolées par déplétion avec un cocktail d'anticorps comprenant des anticorps CD4, CD19 et CD56. La fraction CD3+ CD8+ CD56- s'est révélée nettement moins cytotoxique que la fraction contenant les CD3+ CD4+ CD56-, CD3+ CD56+ et CD3- CD56+, indiquant que l'activité cytotoxique des LGM pourrait être médiée par les cellules NKT et/ou les NK (résultats non montrés). Par conséquent, à partir de la population de LGM totale qui comprend une majorité de cellules T, puis de NKT et une minorité de NK (Tableau 4), des tris immunomagnétiques permettant d'isoler les trois sous-populations ont été effectués et l'activité cytotoxique de chaque fraction a été testée en parallèle de celle des LGM non triés. Lors des 4 expériences indépendantes, nous avons obtenu des puretés de $89.7 \pm 5.8\%$ (moyenne \pm ES), $96.5 \pm 1.3\%$ et $87.1 \pm 4.7\%$ pour les fractions T, NK et NKT, respectivement.

Nous avons alors pu montrer que les cellules T sont faiblement cytotoxiques par rapport aux cellules NKT et NK, ces dernières exerçant une activité cytotoxique extrêmement élevée (Figure 49).

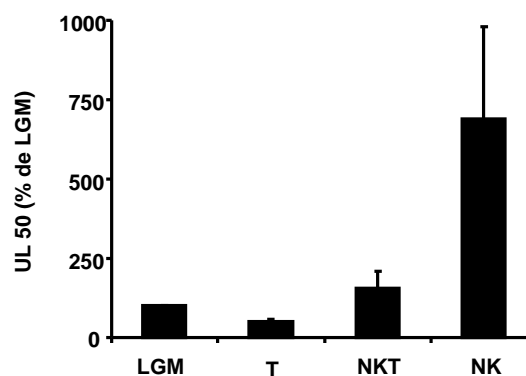


Figure 49 : Potentiel cytotoxique des sous-populations lymphocytaires T, NKT et NK.

Les cellules T (CD3+ CD56-), NK (CD3- CD56+) et NKT (CD3+ CD56+) ont été purifiées par tri immunomagnétique et testées pour leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules Huh7. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la cytotoxicité des LGM non-triés (UL50 : 154 ± 33).

Moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes

III.6.2. Test d'attachement

Des différences quantitatives et qualitatives ont pu clairement être observées (Tableau 4 et Figure 49) ; en effet, les cellules T sont les plus représentées au sein des LGM et sont les moins cytotoxiques, les cellules NKT ont une fréquence au sein des LGM et une activité cytotoxique intermédiaires, et enfin les cellules NK sont très minoritaires au sein des LGM et possèdent le potentiel cytotoxique le plus important. Ainsi, il fut intéressant d'étudier la contribution relative de chaque sous-population lymphocytaire dans la cytotoxicité totale des LGM. Pour cela, les LGM ont été co-incubés pendant 4h avec des Huh7 préalablement marquées au CFSE à un rapport E:C de 10:1, puis les LGM ont été marqués avec les anticorps CD3 et CD56. Le pourcentage de cellules T, NK et NKT positives pour le CFSE, donc liées aux cellules cibles, a été déterminé par cytométrie en flux.

La plupart des cellules liées aux cellules cibles sont les cellules NKT, suggérant qu'elles jouent un rôle important dans la lyse des cellules Huh7 par les LGM (Figure 50). Une analyse inverse des résultats a également été effectuée, à savoir la détermination du pourcentage de cellules CFSE+ au sein des différentes sous-populations lymphocytaires : ce sont les cellules NK et les NKT qui sont le plus fréquemment liées au cibles (résultats non montrés), ce qui est en accord avec les résultats de cytotoxicité des différentes fractions purifiées (Figure 49B).

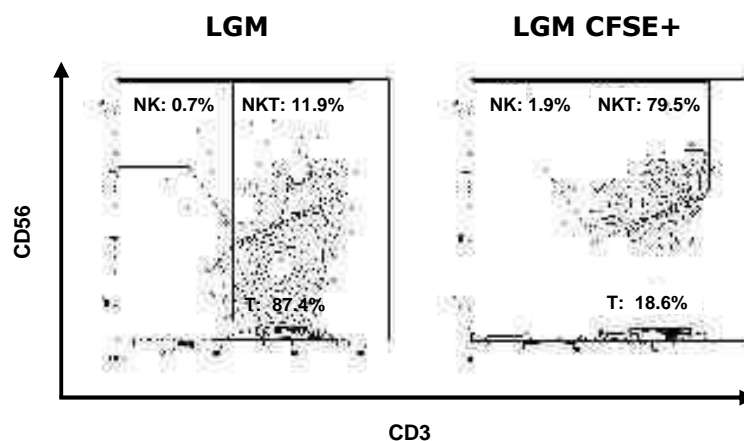


Figure 50 : Attachement des sous-populations lymphocytaires aux cellules cibles.

Les LGM ont été co-incubés pendant 4h avec des cellules Huh7 marquées au CFSE à un rapport E:C de 10:1, puis le pourcentage de cellules T, NK et NKT au sein de la population totale de LGM (C, gauche) ou dans la fenêtre CFSE+ (C, droite) a été déterminé, ce dernier représentant le pourcentage de chaque sous-population lymphocytaire liée aux cellules cibles.

Expérience représentative de 4 expériences indépendantes

III.6.3. Test de cytotoxicité par marquage membranaire du CD107a

Nous avons ensuite réalisé un test plus pertinent pour évaluer la contribution relative des différentes sous-populations lymphocytaires à l'activité cytotoxique des LGM. Le marqueur CD107a est exprimé à la surface des lymphocytes lorsque ces cellules produisent des granules cytotoxiques (granzyme, perforine) ; en réalisant un co-marquage CD3/CD56/CD107a, nous avons pu identifier les cellules T, NK et NKT qui dégranulent lors de leur co-incubation avec des cellules Huh7 pendant 4h à 37°C. Comme témoin positif de dégranulation, des CMN ont été activées quatre jours avant le test avec 1000u/ml d'IL-2 afin de produire des cellules LAK. Des cellules K562 ont été utilisées comme témoin positif de stimulation.

Le pourcentage de cellules positives pour le CD107a parmi la population totale est relativement faible (Figure 51A). On constate cependant que les LAK dégranulent de façon plus importante que les LGM, et d'autant plus quand elles sont mises en présence de K562 (Figure 51A). Dans le cas des LAK, près de 50% des NK dégranulent avec stimulation K562, et environ 20% avec stimulation Huh7 (Figure 51B). Les cellules NKT répondent de façon plus faible, alors que la réponse des cellules T est pratiquement nulle. Ces résultats sont en corrélation avec le fait que, dans ces conditions de cytotoxicité non-MHC restreinte, les cellules NK sont les cellules ayant le potentiel cytotoxique le plus élevé, principalement via le relargage de granules cytotoxiques. Si l'analyse inverse est effectuée, à savoir le pourcentage de chaque sous-population parmi les cellules CD107a positives, on constate que la majorité des cellules qui dégranulent sont à la fois les cellules T et les cellules NK (Figure 51C).

Compte tenu du potentiel cytotoxique de chaque sous-population et de leur répartition relative au sein des LGM, nous pouvons déduire que les trois sous-populations participent à l'activité cytotoxique des LGM.

III.7. Mécanismes impliqués dans la lyse des cellules cibles par les LGM

Le pourcentage de cellules positives pour le CD107a parmi l'ensemble de la population de LGM étant particulièrement faible, nous avons supposé que d'autres mécanismes entrent en jeu dans la lyse des cellules cibles par les LGM. Afin de les identifier, l'activité cytotoxique des LGM à l'encontre des cellules Huh7 a été évaluée en présence des anticorps bloquants anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-FasL ou anti-TRAIL, seuls ou en combinaison. Un anticorps isotype a été utilisé comme témoin négatif d'inhibition de la cytotoxicité. En présence des combinaisons anti-IFN- γ /anti-TNF- α et anti-FasL/anti-

TRAIL, on observe une inhibition de $31.0 \pm 8.9\%$ (moyenne \pm ES) et de $36.2 \pm 17.2\%$, respectivement (Figure 52). Les cytokines IFN- γ et TNF- α semblent ainsi jouer un rôle dans la lyse des cellules cibles, ainsi que la molécule TRAIL.

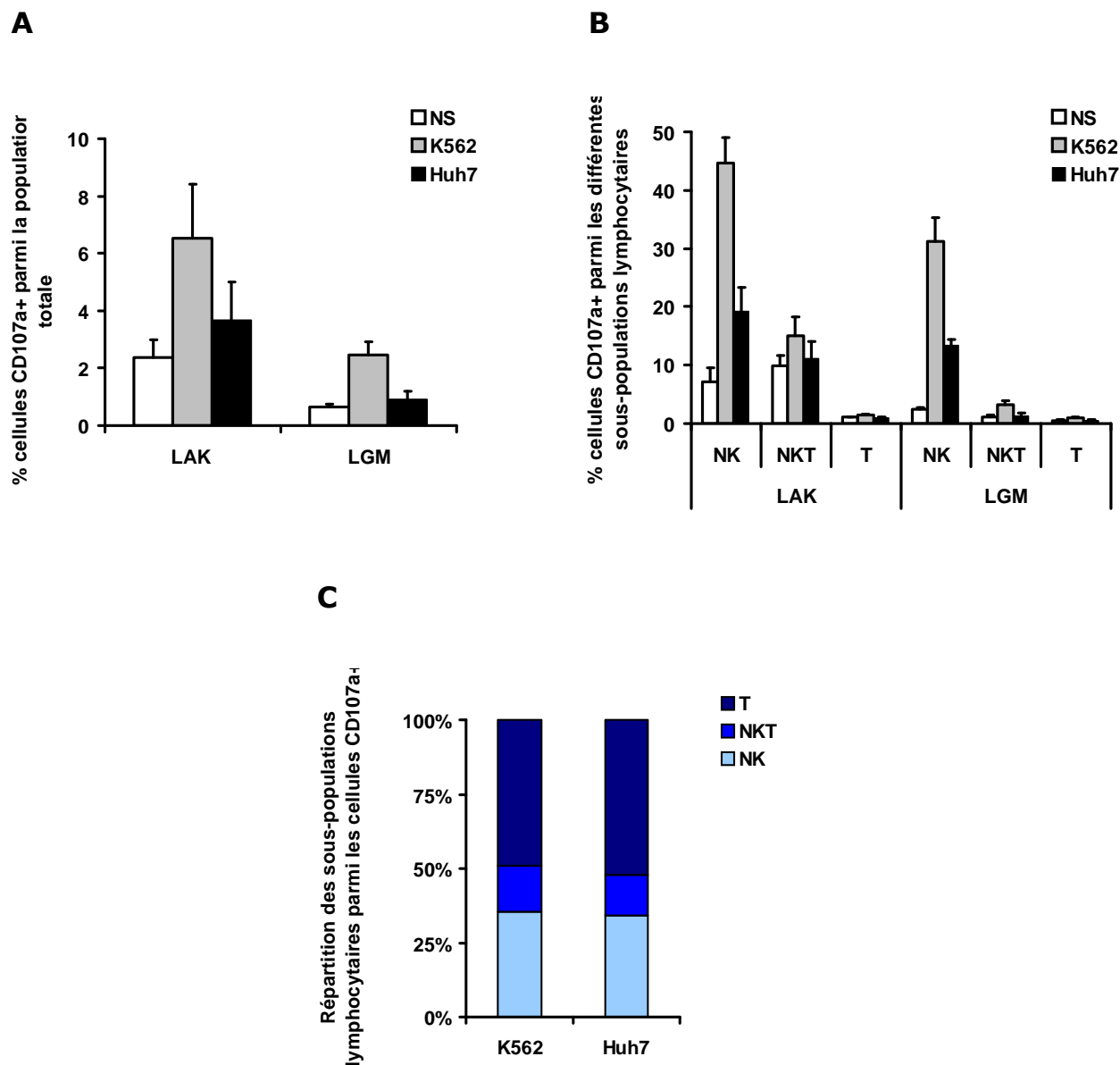


Figure 51 : Test de cytotoxicité par marquage membranaire du CD107a.

Des LGM ou des Lymphokine-Activated Killer cells (cellules LAK = PBMC activées pendant 4 jours en IL-2 à 1000u/ml) ont été co-incubés avec des K562 ou des Huh7 pendant 4h à 37°C à un rapport E:C de 4:1. L'anticorps anti-CD107a-PE a été ajouté pendant la co-incubation des cellules effectrices et des cellules cibles. Le milieu a été supplémenté avec du Golgi Stop (4 μ l pour 6.10^6 cellules) et de la brefeldine A (10 μ g/ml), une heure après l'initiation de la co-culture. L'expression du CD107a et des marqueurs CD3 et CD56 par les LGM et les LAK a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules CD107a positives a été analysé au sein de la population totale (A) ou au sein de chaque sous-population lymphocytaire (B). Inversement, la répartition des sous-populations de LGM parmi les cellules CD107a-positives a été analysée (C). A, B, C : moyenne \pm ES de 5 expériences indépendantes

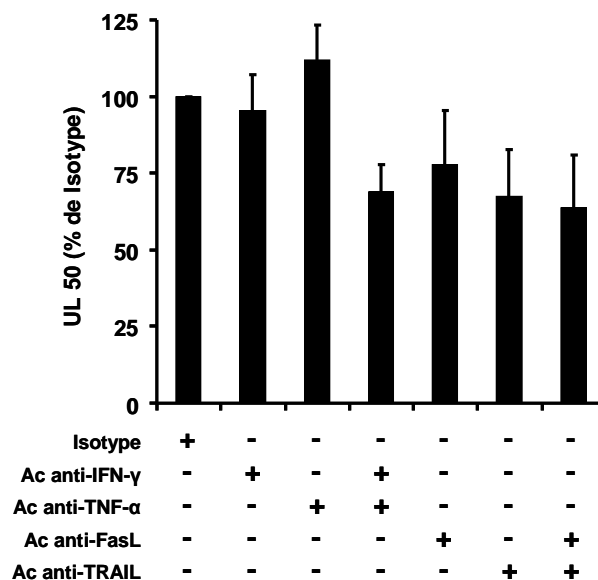


Figure 52 : Effet des anticorps bloquants anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-FasL et anti-TRAIL.

L'activité cytotoxique des LGM vis-à-vis des cellules Huh7 a été testée en présence d'un anticorps isotype ou des anticorps bloquants anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-FasL ou anti-TRAIL (10 μ g/ml). Des combinaisons d'anticorps anti-IFN- γ /anti-TNF- α et anti-FasL/anti-TRAIL ont été réalisées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL50 par rapport à la cytotoxicité des LGM en présence du témoin isotype (UL50 : 1118,5 \pm 397). Moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes

III.8. Les LGM sont similaires aux « Cytokine-Induced Killer cells »

L'ensemble de ces résultats suggèrent que nos cellules pourraient être similaires à un autre produit de thérapie cellulaire testé en clinique pour le traitement du CHC, les « Cytokine-Induced Killer cells ». Il s'agit de cellules également issues de l'expansion de CMN, mais utilisées de façon autologue, qui ont un fort pouvoir cytotoxique contre des tumeurs solides médié par les NKT et non-restreint par le CMH. Nous avons voulu déterminer dans quelle mesure nos LGM peuvent être assimilés aux CIK pour lesquelles l'expérience clinique est déjà importante. Dans ce but, nous avons comparé le phénotype CD3/CD56 et l'activité cytotoxique de Co produites dans les mêmes conditions que les LGM, à ceux de cellules activées selon trois différents protocoles décrits dans la littérature (Ayello et al., 2009; Olioso et al., 2009; Weng et al., 2008).

Les fréquences des cellules T, NK, et NKT sont similaires quelque soit le protocole utilisé, et la cytotoxicité des cellules CIK est équivalente à celle des Co (Figure 53). Au vu de ces résultats, nous pouvons ainsi considérer nos LGM comme des CIK génétiquement modifiées et utilisées de façon allogéniques.

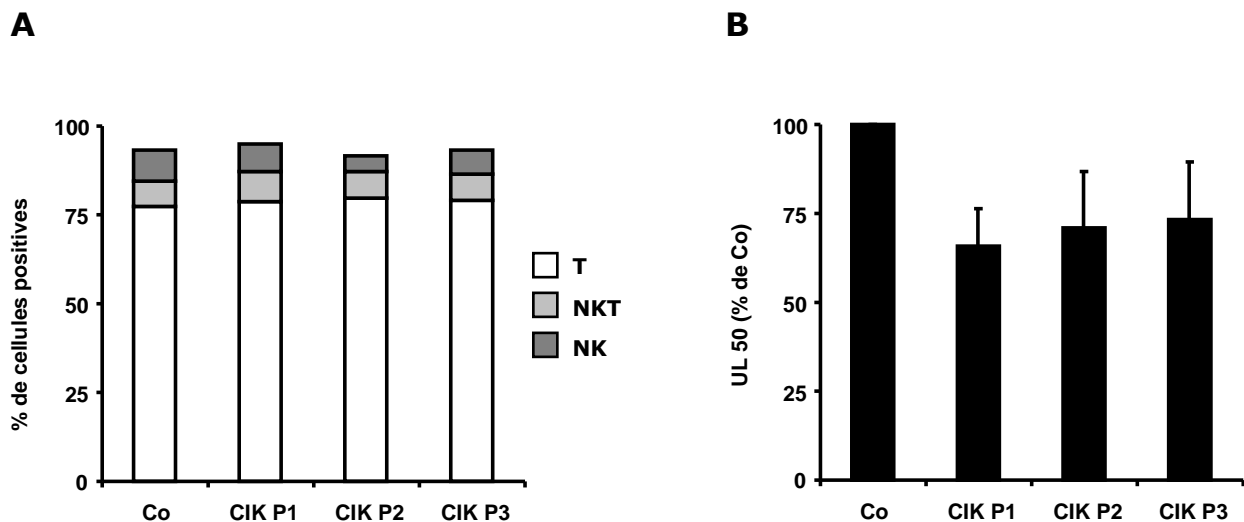


Figure 53 : Pourcentage des sous-populations lymphocytaires (A) et activité cytotoxique (B) des Co et des CIK générées selon différents protocoles.

L'activation et l'expansion des CMN pour la production des CIK ont été effectués selon trois protocoles :

- Protocole n°1 (P1) : activation avec IFN- γ (100u/ml), ajout 24h plus tard de l'anticorps CD3 (10ng/ml), puis expansion en IL-2 (Oliosio et al., 2009)
- Protocole n°2 (P2) : activation avec IFN- γ (100u/mL), ajout 24h plus tard de l'anticorps CD3 (10ng/mL), d'IL-2 (500u/mL) et d'IL-1 (100u/mL), puis expansion avec IL-2 (Weng et al., 2008)
- Protocole n°3 (P3) : activation avec l'anticorps CD3 (10ng/mL), IL-2 (500u/mL), IL-7 (20u/mL) et IL-15 (20u/mL), puis expansion avec IL-2, IL-7 et IL-15 (Ayello et al., 2009)

Le pourcentage de cellules T (blanc), NK (gris foncé) et NKT (gris clair) au sein des CIK produites selon les différents protocoles a été analysé par cytométrie en flux et comparé au phénotype des Co (A), puis l'activité cytotoxique des cellules CIK et Co vis-à-vis de cellules Huh7 a été évaluée (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'UL 50 par rapport à la cytotoxicité des Co (UL 50 : 200 \pm 48).

A, B : moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes

IV. Activité cytotoxique des LGM *in vivo*

IV.1. Modèle sous-cutané

La cytotoxicité des LGM *in vivo* a tout d'abord été testée dans un modèle de tumeur sous-cutanée. Des cellules HeLa ou Huh7 exprimant la luciférase (HeLa-Luc et Huh7-Luc) et des LGM ont été co-injectés en sous-cutané à des souris immunodéficientes Rag2^{-/-} γ _c^{-/-} à différents rapports E:C. La croissance tumorale a été suivie en bioluminescence *in vivo*.

Un effet cytotoxique dose-dépendant envers les HeLa-Luc et les Huh7-Luc a pu être observé, dès les plus faibles rapports E:C testés (1:1), puisqu'une croissance

relative inférieure à 1 indique une régression tumorale (Figure 54C,D). Dans le cas des cellules Huh7, on observe cependant un échappement tumoral 7 et 14 jours après l'injection des cellules (Figure 54D). Des doses plus importantes de LGM (rapport E:C = 30:1) permettent une régression tumorale (Figure 54A,B) chez la plupart des souris traitées (Figure 54E,F).

IV.2. Modèle orthotopique

IV.2.1. Les LGM migrent préférentiellement dans le foie après injection intraveineuse

Des expériences préliminaires ont été menées afin de déterminer le mode d'injection des LGM permettant une localisation de ces cellules au niveau du foie. Pour cela, des LGM ont été marqués avec un marqueur fluorescent, le DiR, et administrés par voie i.v. (en rétro-orbital) ou i.p.

La fluorescence des LGM est détectée dès 3h après l'injection (Figure 55A) et jusqu'à 72h (Figure 55C,D), principalement dans le foie et dans une moindre mesure dans la rate, les poumons et l'intestin dans le cas de l'injection i.v. (Figure 55B,E,F et résultats non montrés), alors que, après l'injection i.p., les LGM ont été détectés dans l'intestin, la rate et le foie, mais avec une plus faible émission de fluorescence hépatique qu'après l'injection i.v. (Figure 55B et résultats non montrés). L'administration des LGM par voie i.v. est donc la plus appropriée pour obtenir une migration préférentielle des cellules au niveau du foie.

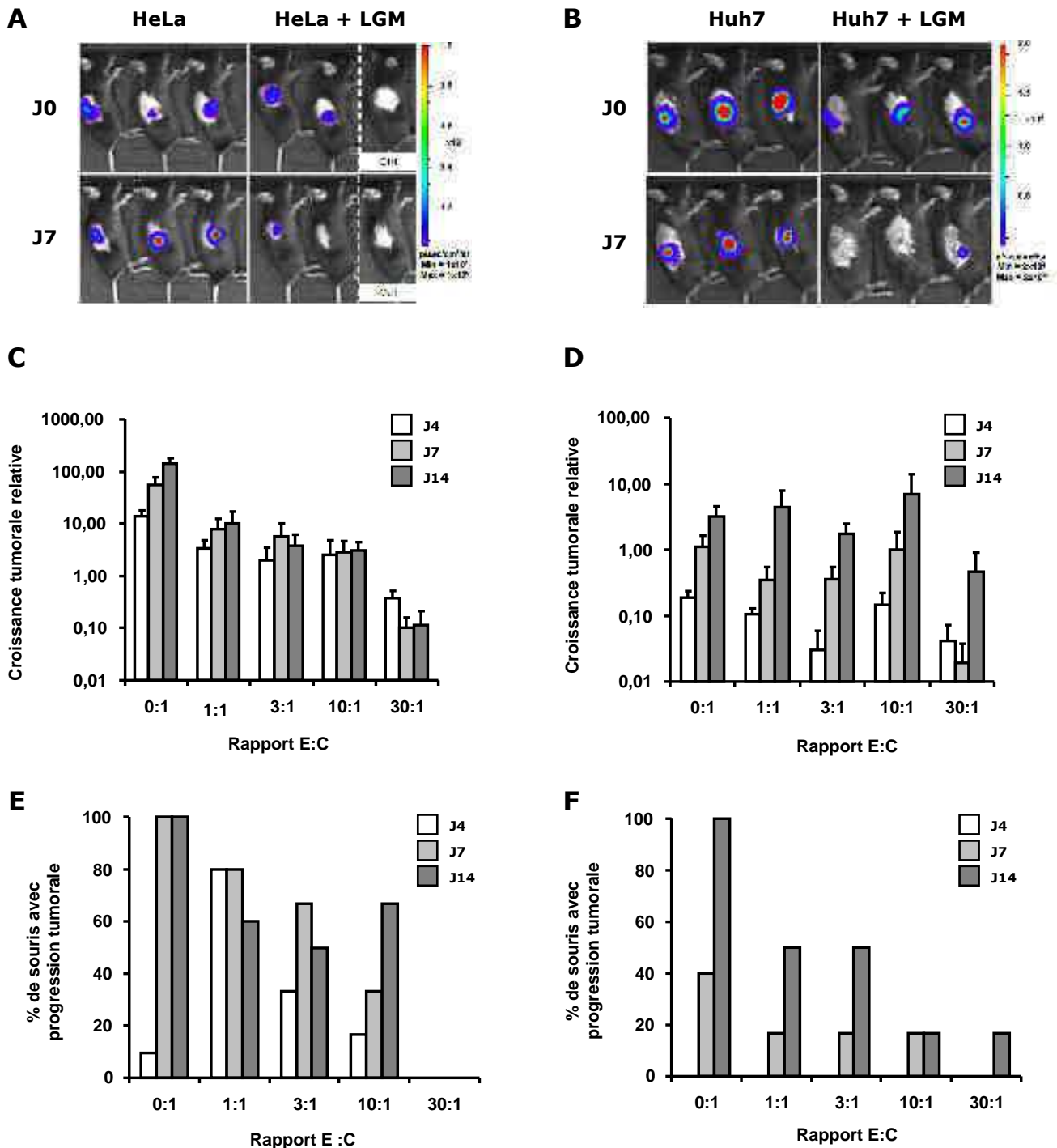


Figure 54 : Cytotoxicité des LGM *in vivo*.

Des cellules HeLa (A, C, E) ou Huh7 (B, D, F) exprimant la luciférase ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris C57Bl/6 Rag2^{-/-}γc^{-/-} en l'absence ou en présence de différentes quantités de LGM. La bioluminescence des cellules cibles est montrée au moment de l'injection (J0) ou sept jours plus tard (J7) pour les souris témoins injectées avec les cellules cibles seules et pour les souris injectées avec les cellules cibles et des LGM à un rapport E:C de 30:1. Comme témoin négatif de bioluminescence, une souris n'a reçu aucune cellule (Ctrl) (A, B). La croissance tumorale relative des cellules HeLa (C) et Huh7 (D) a été évaluée 4 (barres blanches), 7 (barres gris clair) et 14 jours (barres gris foncé) après injection des LGM. Le pourcentage de souris avec une progression tumorale a également été évalué 4, 7, et 14 jours après la co-injection des LGM avec les cellules HeLa (E) et Huh7 (F). Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes avec trois souris par groupe. *: P < 0,05 par rapport au groupe témoin sans injection de LGM (C, D: test t de Student; E, F: test du chi carré).

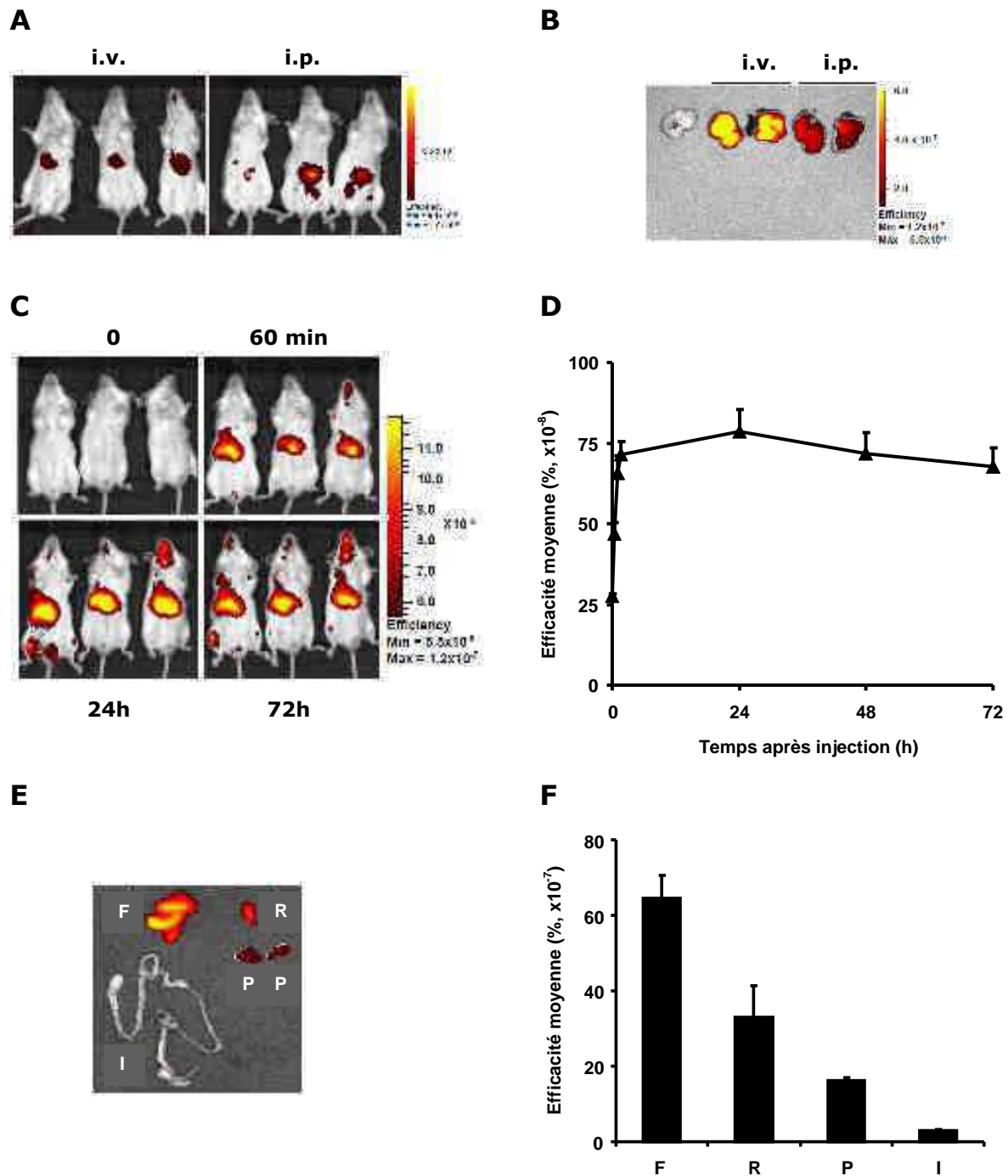


Figure 55 : Localisation des LGM après injection par voies i.p. et i.v.

Des LGM ($100 \cdot 10^6$) marqués au DiR ont été administrés à des souris SCID-bg par injection i.v. (rétro-orbitale) ou i.p. (A,B). L'émission de fluorescence a été mesurée 3h (et 24h, résultats non montrés) après l'injection (A), puis le foie a été prélevé pour mesurer leur émission de fluorescence (B). Des LGM ($150 \cdot 10^6$) ont été administrés à des souris SCID-bg par injection i.v. (rétro-orbitale) et l'émission de fluorescence a été mesurée 1, 24 et 72h plus tard (C,D). Le foie (F), la rate (R), les intestins (I) et les poumons (P) ont été prélevés et testés à 72h en émission de fluorescence (E,F).

IV.2.2. Les LGM ont une activité anti-tumorale *in vivo*

Des cellules Huh7 exprimant la luciférase ont été injectées dans la rate de souris SCID-bg, afin de permettre leur migration au niveau du foie par la veine splénique. Quatre jours plus tard, les souris ont été injectées avec des LGM ou du PBS comme témoin négatif. La bioluminescence *in vivo* de la tumeur a été réalisée juste avant l'administration i.v. des LGM, ainsi que trois et sept jours après l'injection afin d'évaluer la croissance tumorale.

La croissance tumorale a été ralentie chez les souris ayant été administrées avec des LGM par rapport aux souris témoins (Figure 56B), certaines souris ayant même éliminé la quasi-totalité des cellules tumorales (Figure 56A). Par ailleurs, une progression tumorale a été observée chez 100% des souris témoins, alors que cela n'a été le cas chez seulement 50% (J3 après l'injection des LGM) et 38% (J7 après l'injection des LGM) des souris traitées (Figure 56C). Aucun effet secondaire n'a par ailleurs été constaté chez les souris traitées avec des LGM.

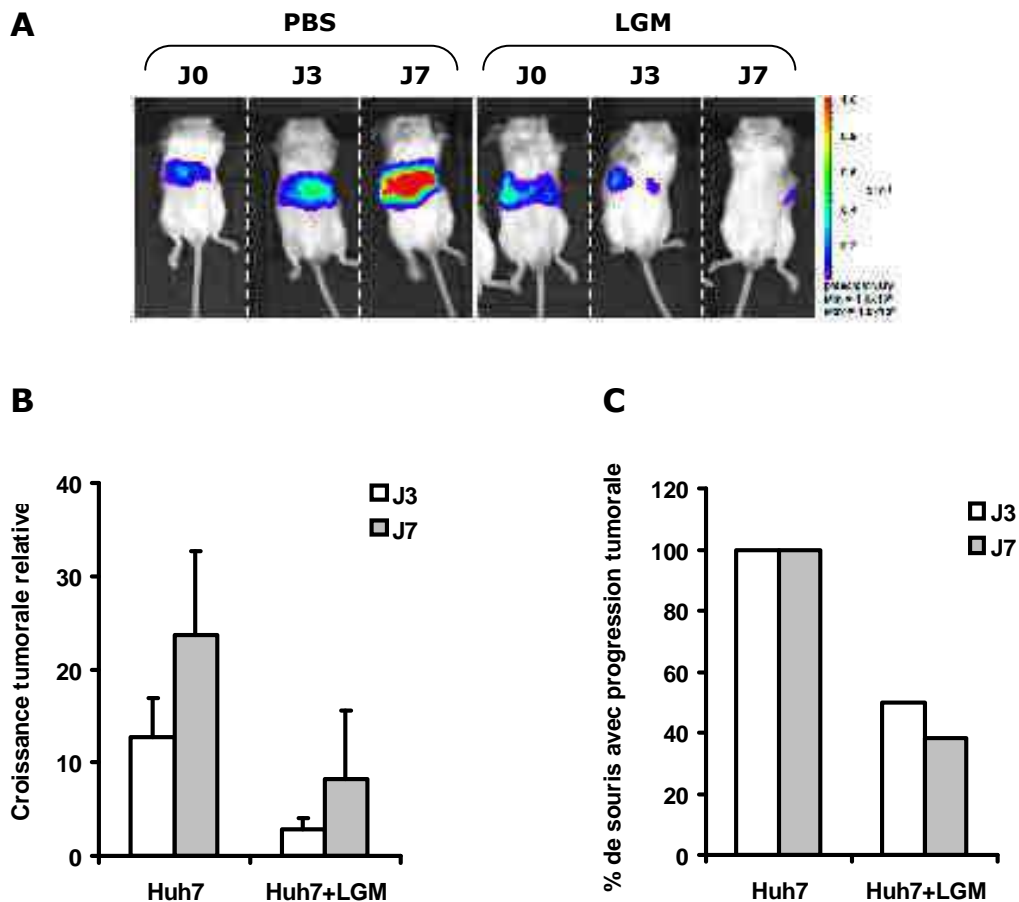


Figure 56 : Effet anti-tumoral des LGM.

Des cellules Huh7 (10^6) exprimant la luciférase (Huh7-Luc) ont été injectées par voie intrasplénique chez des souris SCID-bg qui ont été testées en bioluminescence 4 jours plus tard pour vérifier la localisation hépatique des Huh7-Luc. Les LGM ($200 \cdot 10^6$) ont alors été administrés (J0) par voie rétro-orbitale (A), et du PBS a été injecté comme témoin négatif (B). La croissance tumorale a été mesurée 3 et 7 jours après l'injection des LGM (A,B) et le pourcentage de souris avec progression tumorale a été estimé (C).

A : expérience représentative de 3 expériences indépendantes

B, C : moyenne \pm ES de 3 (J3) ou 2 (J7) expériences indépendantes

V. Résistance des LGM à la cyclosporine

L'allo-immunisation du système immunitaire du receveur à l'encontre des LGM constitue une limitation majeure de notre approche, c'est pourquoi un conditionnement immunosuppresseur est nécessaire pour éviter le rejet des LGM. L'activité cytotoxique des LGM et des CMN a été testée *in vitro* en présence d'une dose réponse de cyclosporine A (CsA), inhibiteur de calcineurine.

La cytotoxicité des CMN est inhibée par la CsA alors que celle des LGM n'est pas altérée, indiquant que les LGM sont résistants à la cyclosporine du fait de leur culture (Figure 57A).

La résistance des cellules cultivées a également été montrée *in vivo* ; des splénocytes issus de souris FvB transgéniques pour la luciférase ont été cultivés de façon similaire aux LGM humaines et utilisés comme source de lymphocytes allogéniques. Les splénocytes ont été injectés à des souris receveuses Balb-c avec de la CsA (Figure 57B, droite) ou du PBS (Figure 57B, gauche). En l'absence de CsA, les splénocytes cultivés sont rejetés par le système immunitaire de la souris receveuse, et n'induisent donc pas de GvHD. Au contraire, en présence de CsA, le système immunitaire des souris receveuses est inhibé ce qui conduit au non-rejet des splénocytes qui induisent une GvHD, l'alloréactivité étant utilisée ici comme critère d'évaluation de la fonctionnalité des LGM. Ceci démontre bien la résistance des cellules cultivées à la CsA.

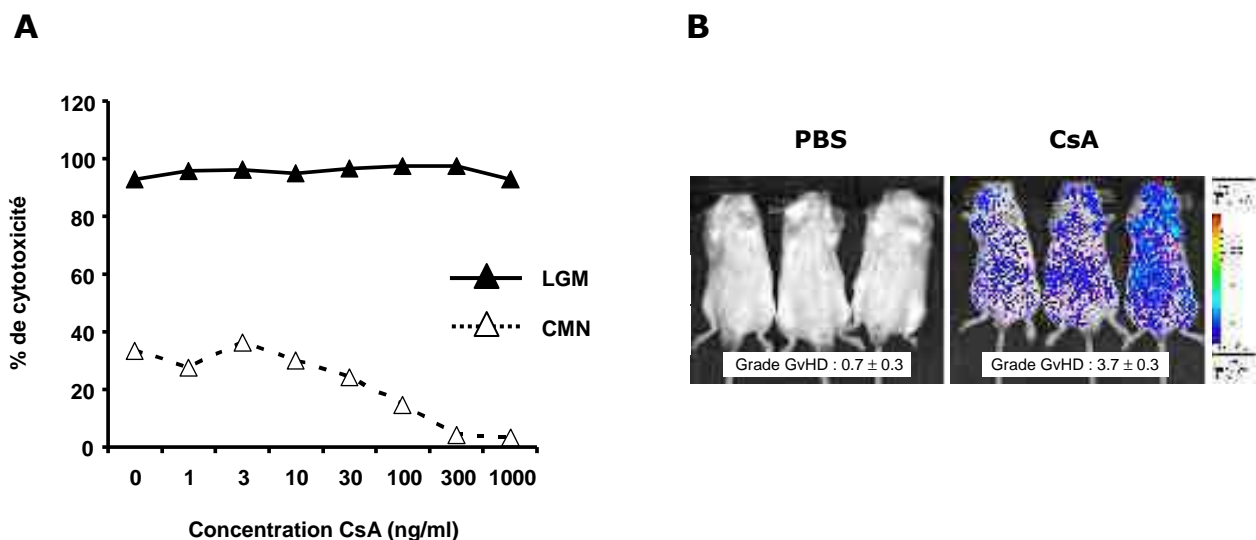


Figure 57 : Effet de la cyclosporine A sur l'activité cytotoxique des LGM *in vitro* (A) et sur leur potentiel d'induction de GvHD (B).

L'activité cytotoxique des CMN et des LGM vis-à-vis de cellules Huh7 a été déterminée après 6 jours de co-culture à un rapport E:C de 40:1, en présence d'une dose-réponse de CsA (A).

Des splénocytes de souris FvB transgéniques pour la luciférase ont été activés par de la concanavaline A (5 µg/ml), du β-mercaptoéthanol (50 µM) et de l'IL-2 (500 UI/ml) et cultivés pendant 14 jours. Dix millions de cellules ont été administrées en i.p. à des souris Balb-c avec ou sans CsA. Des injections quotidiennes d'IL-2 ont été effectuées, et le grade de GvHD a été déterminé en aveugle deux fois par semaine. La présence des splénocytes exprimant la luciférase a été mise en évidence par analyse de la bioluminescence sept jours après l'administration des cellules.

A : expérience représentative de 4 expériences indépendantes

B : expérience représentative de 4 expériences indépendantes

Immunothérapie de l'infection par le VHC

I. Les LGM ont une activité anti-virale vis-à-vis du VHC

Dans le cadre de l'étude menée par Ohira et al., des lymphocytes hépatiques du greffon ont été isolés au moment de la transplantation hépatique, activés par CD3+IL-2 et réinjectés au patient de manière autologue trois jours plus tard (Ohira et al., 2009). Il a été constaté de façon très intéressante que l'administration de ces lymphocytes issus du greffon hépatique induisait une diminution importante de la charge virale chez des patients VHC+ transplantés (4 patients sur 7). L'ARN viral est devenu indétectable chez deux d'entre eux. Les patients répondeurs présentaient une charge virale avant greffe inférieure à celle des patients non-répondeurs, indiquant que l'effet thérapeutique des cellules injectées est dépendant de la charge virale. Le greffon étant déjà réinfecté au moment de l'administration des cellules (trois jours post-greffe), une immunothérapie plus précoce, au moment de la transplantation par exemple, serait ainsi nettement plus efficace. Pour cela, des cellules prêtes-à-l'emploi telles que nos LGM seraient nécessaires.

Au vu de ces données, nous avons voulu déterminer si nos LGM pouvaient avoir une activité anti-virale vis-à-vis du VHC. Nous avons testé l'activité anti-virale des LGM en utilisant d'une part le système réplicon qui reflète la réplication virale uniquement, et d'autre part le système VHCcc qui permet la production de particules virales infectieuses. Des cellules Huh7.5.1. ont été électroporées avec un réplicon subgénomique exprimant la luciférase ou infectées avec du VHCcc (clone Jc-1) codant la luciférase, puis les LGM ont été ajoutés 4 heures plus tard. Après trois jours de co-incubation, la réplication virale et la production de particules virales infectieuses, avec ou sans LGM, ont été quantifiées par mesure de l'activité luciférase. L'activité anti-virale des LGM en système réplicon a été testée en co-culture et en transwell (pas de contact entre les cellules Huh7.5.1 et les LGM). En parallèle de chaque test, une co-culture de LGM et de cellules Huh7.5.1 pendant trois jours a permis de contrôler la survie des cellules cibles par coloration au cristal violet.

Les LGM inhibent de façon dose dépendante la réplication virale (Figure 58A) et la production de particules virales infectieuses (Figure 59A). Cet effet est obtenu à de faibles rapports E:C (<1:1) pour lesquels aucune cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles n'est observée (Figures 58B et 59B), ce qui suggère que l'administration *in vivo* d'une faible quantité de LGM serait suffisante pour obtenir un effet anti-viral efficace tout en limitant leur hépatotoxicité. Au rapport E:C de 2:1, l'effet anti-viral des LGM est similaire à celui de l'IFN- γ , témoin positif d'inhibition de la réplication virale (inhibition > 3 log) (Figure 58A). L'effet anti-viral des LGM est plus important quand les cellules sont ajoutées le jour de l'infection, plutôt qu'un, deux ou trois jours plus tard (Figure 59A).

L'activité anti-virale des LGM est similaire à celle des cellules témoins Co (cellules cultivées en parallèle pendant 14 jours mais non transduites et non sélectionnées), indiquant que la transduction rétrovirale n'affecte pas le potentiel anti-viral des LGM. Par ailleurs, l'ajout d'IL-2 pendant les trois jours de co-incubation des LGM et des cellules Huh7.5.1 est nécessaire pour la survie des LGM et donc pour un effet anti-viral élevé (Figure 58A et 58C). L'IL-2 seule (rapport E:C = 0:1) n'a aucun effet sur la réplication virale (Figure 58A).

En système transwell, on observe également une inhibition de la réplication virale bien qu'elle soit moins importante qu'en co-culture. Cela suggère que les contacts cellulaires entre LGM et cellules infectées ne sont pas indispensables pour l'inhibition de la réplication virale, et que des facteurs solubles sont de ce fait très probablement impliqués dans l'activité anti-virale des LGM.

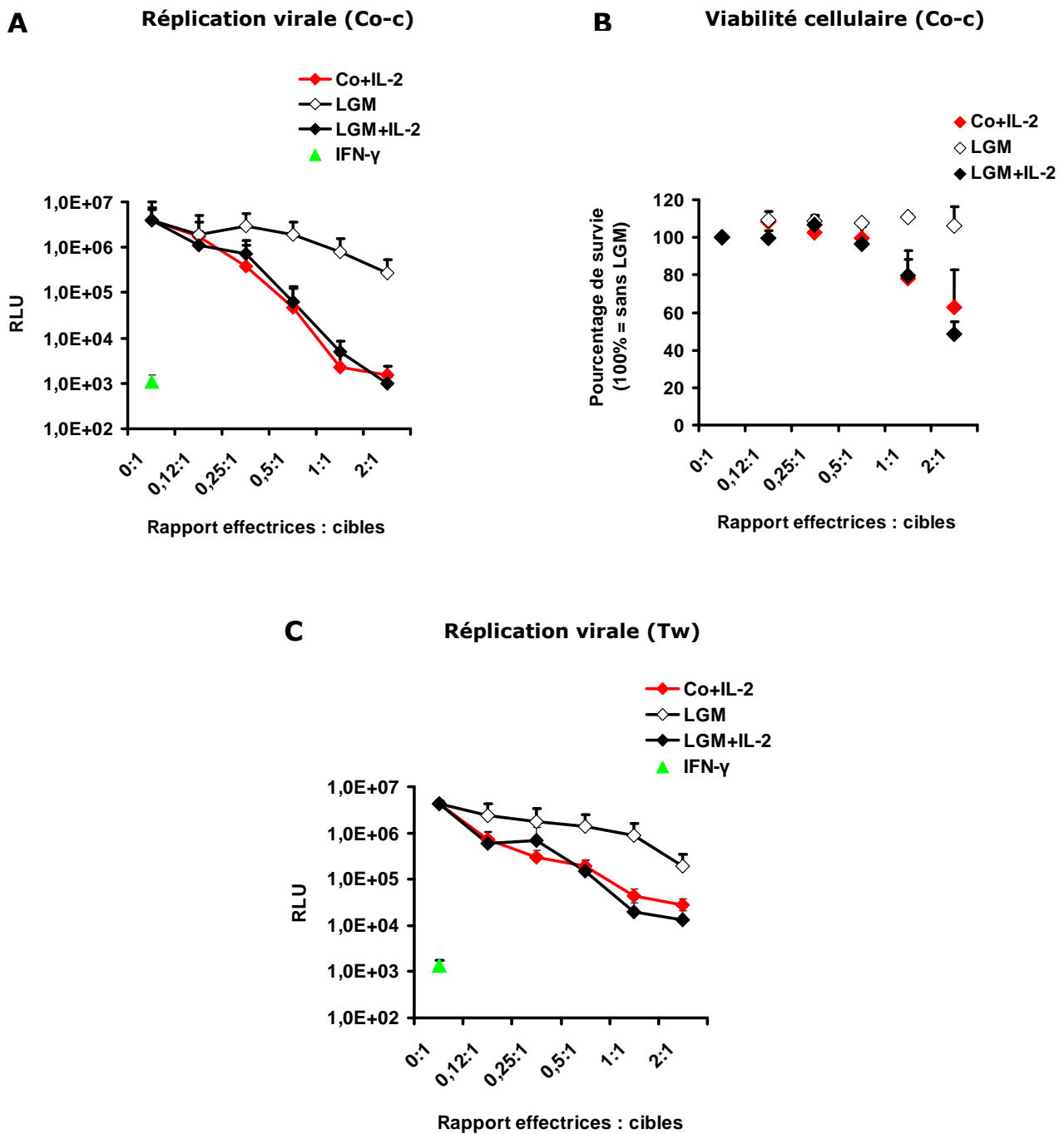


Figure 58 : Activité anti-virale des LGM en co-culture et en transwell, et viabilité des cellules cibles (modèle réplicon).

Des LGM ou des Co (cellules cultivées non transduites et non sélectionnées) ont été co-incubés pendant trois jours avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec de l'ARN JFH1ΔE1E2-Luc, à différents rapports effectrices:cibles, en présence ou en absence d'IL-2, en co-culture (Co-c, contacts cellulaires) (A) ou en transwell (Tw, absence de contacts cellulaires) (C). L'activité luciférase a ensuite été mesurée, reflétant la réplication virale au sein des cellules Huh7.5.1. L'ajout d'IFN-γ a été utilisé comme contrôle positif d'inhibition de la réplication. La survie des cellules Huh7.5.1 a été analysée par co-culture avec les LGM ou les Co pendant trois jours, avant coloration des cellules cibles résiduelles au cristal violet (B).

A, B, C : moyenne±ES de 4 ou 5 expériences indépendantes

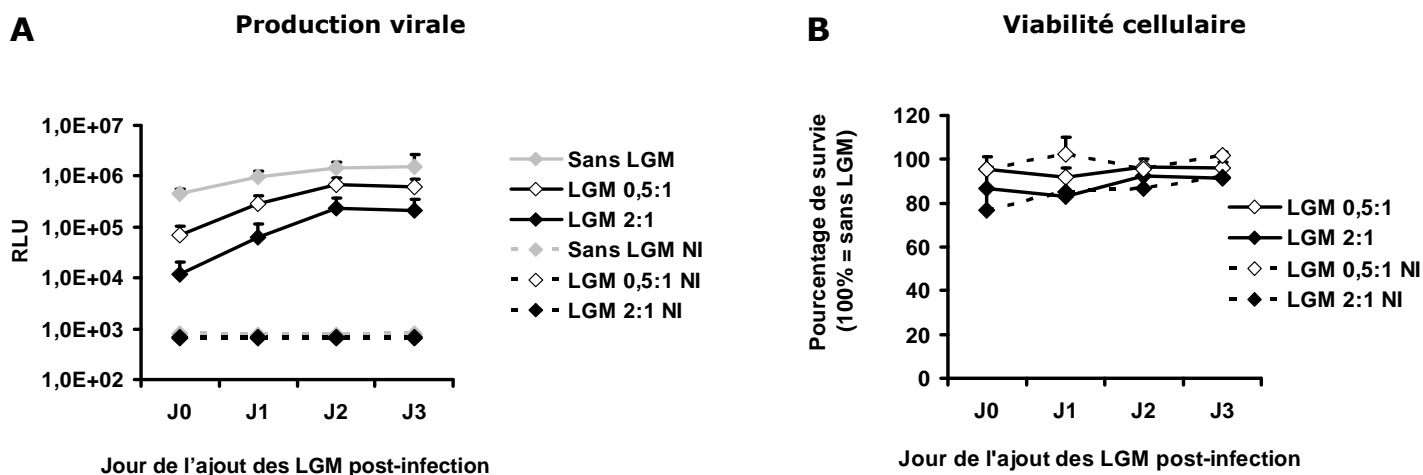


Figure 59 : Activité anti-virale des LGM et viabilité des cellules cibles (modèle VHCcc).

Des cellules Huh7.5.1 ont été infectées ou non avec du VHCcc Jc-1-luc, puis des LGM ont été ajoutés à différents jours post-infection, à des ratios E:C de 0,5:1 et 2:1 (A). Après trois jours de co-culture, la production de particules virales par les cellules Huh7.5.1 a été analysée par révélation de leur activité luciférase. Parallèlement, la survie des cellules Huh7.5.1 a été estimée par marquage au cristal violet par rapport aux cellules Huh7.5.1 infectées sans LGM (B).

A, B : moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes

NI = cellules Huh7.5.1 non-infectées

Par la suite, nous avons voulu déterminer l'impact du remplacement de l'anticorps monoclonal CD3 par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes pour l'activation des LGM sur l'activité anti-virale des LGM. Pour cela, nous avons testé l'activité anti-virale de LGM activés par CD3+IL-2 ou par CD3/CD28+IL-2, avec les systèmes réplicon et VHCcc en contrôlant la viabilité des Huh7.5.1.

L'inhibition de la réplication virale par les LGM activés par CD3/CD28 est aussi efficace que celle induite par les LGM activés par CD3, que ce soit en système réplicon ou en VHCcc (Figure 60A et 60C). De même, la cytotoxicité des LGM suite aux deux modes d'activation est comparable. Nous avons choisi de conserver le mode d'activation CD3 pour l'ensemble des expériences qui ont suivi.

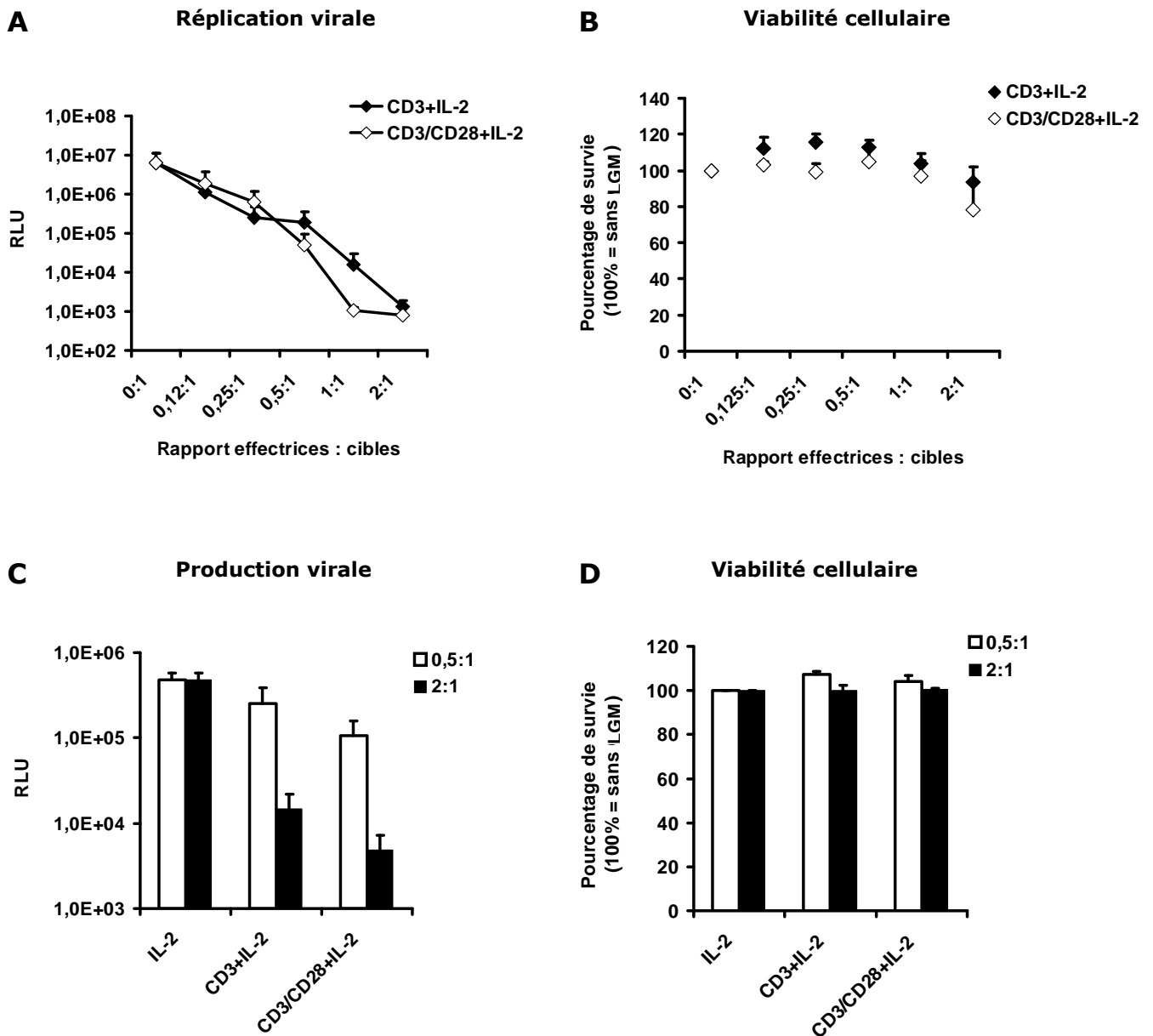


Figure 60 : Activité anti-virale des LGM activés par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes

Des LGM activés par l'anticorps monoclonal CD3 ou par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes ont été incubés pendant 3 jours avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec de l'ARN JFH1ΔE1E2-Luc (A, B), ou avec des cellules Huh7.5.1 infectées par VHCcc (C, D) à un rapport E:C de 0,5:1 ou de 2:1. L'activité luciférase (A, C) et la survie des cellules cibles (B, D) ont été analysées.

A, B : moyenne±ES de 6 expériences indépendantes

C, D : moyenne±ES de 3 expériences indépendantes

II. Caractérisation de l'activité anti-virale des LGM

II.1. L'activité anti-virale des LGM est principalement médiée par l'IFN- γ

L'activité anti-virale des LGM s'observe aussi bien en co-culture directe (Co-c) qu'en système transwell (Tw) (Figure 58A,C) suggérant l'implication d'un ou de plusieurs facteur(s) soluble(s). Des anticorps bloquants anti-IFN- γ , anti-IFN- α ou anti-IFN- β ont été ajoutés pendant la co-culture directe des LGM et des cellules cibles à un rapport E:C de 0,5:1 (Figure 61A) ou en système transwell à un rapport E:C de 2:1 (Figure 61B).

L'anticorps bloquant anti-IFN- γ reverse l'inhibition de la réplication virale, en co-culture et en transwell, alors que les anticorps anti-IFN- α et anti-IFN- β ou le témoin isotype sont sans effet (Figure 61). Ces résultats indiquent que l'activité anti-virale des LGM est due essentiellement à une production d'IFN- γ .

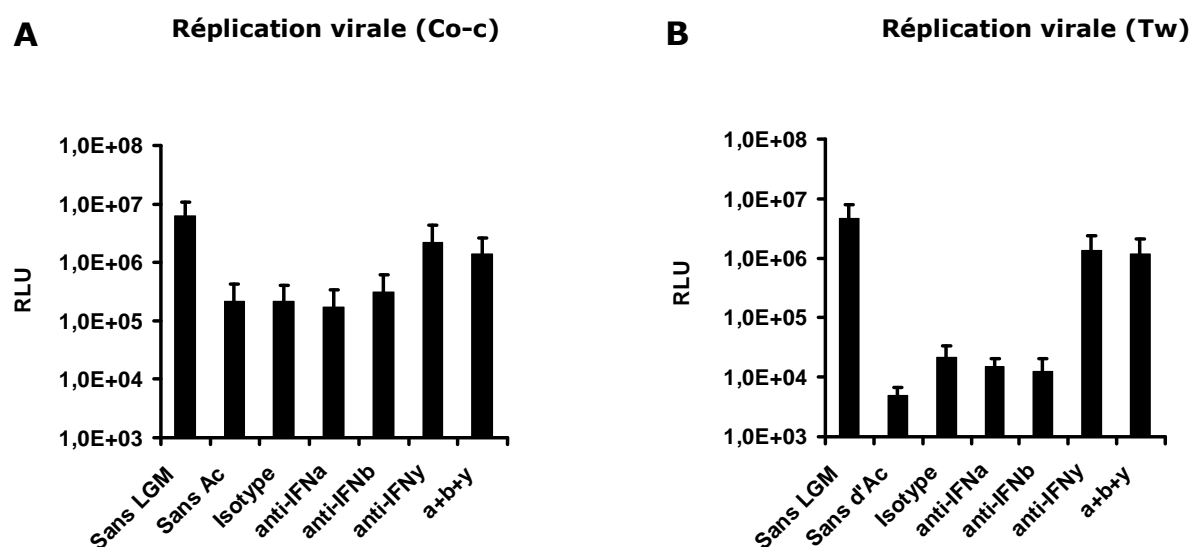


Figure 61 : Effet des anticorps bloquants anti-IFNs sur l'activité anti-virale des LGM en co-culture et en transwell (modèle réplicon).

Des LGM ont été co-incubés avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec de l'ARN JFH1 Δ E1E2-Luc pendant 3 jours, en co-culture (A) à un rapport E:C de 0,5:1 ou en transwell (B) à un rapport E:C de 2:1, en présence ou en absence d'anticorps bloquants anti-IFN- α , anti-IFN- β , anti-IFN- γ ou la combinaison des trois anticorps avec l'ajout d'un anticorps isotype comme témoin négatif. Tous les anticorps ont été utilisés à une concentration de 5 μ g/ml.

A, B : moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes.

II.2. Les cellules CD56+ (NK et NKT) participent davantage à l'activité anti-virale des LGM

Nous avons ensuite voulu déterminer quelle population lymphocytaire est responsable de l'activité anti-virale des LGM. Pour cela, nous avons trié les LGM en sous-population CD56+ (contenant les cellules NK, CD3- CD56+, et NKT, CD3+ CD56+) et CD56- (contenant les lymphocytes T CD3+ CD56-). L'effet anti-viral de ces fractions a été testé en dose-réponse et comparé à celui des LGM non triés, en système réplicon (Figure 62A) et en système VHCcc (Figure 62C). La survie des cellules Huh7 a été contrôlée par coloration des cellules cibles au cristal violet (Figure 62B,D).

L'inhibition de la réplication virale et la production de particules virales infectieuses est plus importante avec les cellules CD56+ qu'avec les cellules CD56-. En système réplicon, on observe que les cellules CD56+ sont plus cytotoxiques que les cellules CD56- (en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude portant sur la cytotoxicité des LGM décrite précédemment) aux rapports E:C de 2:1 et 1:1. A de plus faibles rapports E:C, les cellules CD56+ ont un potentiel anti-viral plus élevé que les cellules CD56- mais sans être plus cytotoxiques. Dans le cas du système VHCcc, l'inhibition de l'infection est plus élevée avec les cellules CD56+, sans que l'on observe de cytotoxicité envers les cellules cibles quelque soit le rapport E:C testé (0.5:1 et 2:1). Ces résultats suggèrent que l'activité anti-virale des LGM est davantage médiée par les cellules CD56+ (Figure 62).

II.3. L'activité anti-virale des LGM n'est pas inhibée par les inhibiteurs de calcineurine

L'indication majeure de l'utilisation de nos LGM est la prévention de la réinfection du greffon chez des patients transplantés hépatiques chroniquement infectés par le VHC. Ces patients étant sous conditionnement immunosuppresseur afin d'empêcher le rejet du greffon par leur système immunitaire, nous avons voulu tester l'activité anti-virale de nos LGM en présence de drogues immunosuppressives afin de déterminer si les cellules y sont résistantes, comme elles le sont en terme d'activité cytotoxique.

Une dose-réponse de CsA et de FK506 a été réalisée lors de la co-incubation des LGM et des cellules cibles, en système réplicon et en système VHCcc. Quelque soit le système, l'activité anti-virale des LGM n'est pas inhibée par la CsA (Figure 63A) ni par le FK506 (Figure 63B). Un effet anti-viral de la CsA seule est observé, alors que cela n'est pas le cas pour le FK506. Les deux inhibiteurs de calcineurine n'altèrent pas la viabilité des cellules Huh7.5.1 (résultats non montrés).

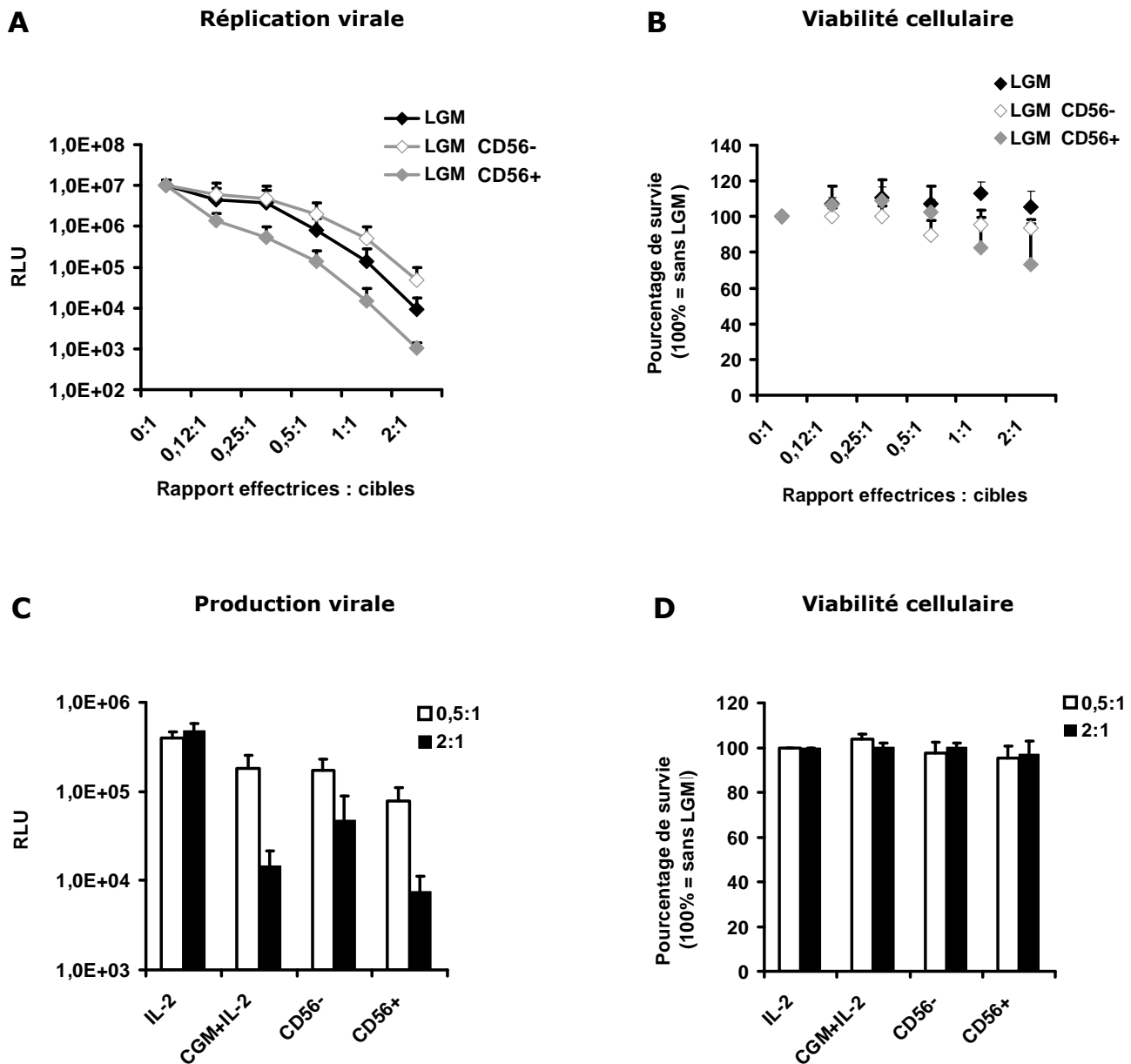


Figure 62 : Activité anti-virale des LGM CD56- et des CD56+ (modèles réplicon et VHCcc).

Après 14 jours de culture, des LGM ont été marqués avec un anticorps CD56-PE puis avec des billes anti-PE et sélectionnés par tri immunomagnétique. L'enrichissement des fractions CD56- et CD56+ a été déterminé par immunomarquage et analysé par cytométrie en flux. Des LGM non triés et les fractions positives et négatives ont été co-cultivés en dose-réponse pendant 3 jours avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec de l'ARN JFH1ΔE1E2-Luc (A, B), ou avec des cellules Huh7.5.1 infectées par VHCcc (C, D) à un rapport E:C de 0,5:1 ou de 2:1. L'activité luciférase (A, C) et la survie des cellules cibles (B, D) ont été analysées.

A, B : moyenne±ES de 3 expériences indépendantes

C, D : moyenne±ES de 6 (rapport E:C de 0,5:1) ou de 3 (rapport E:C de 2:1) expériences indépendantes

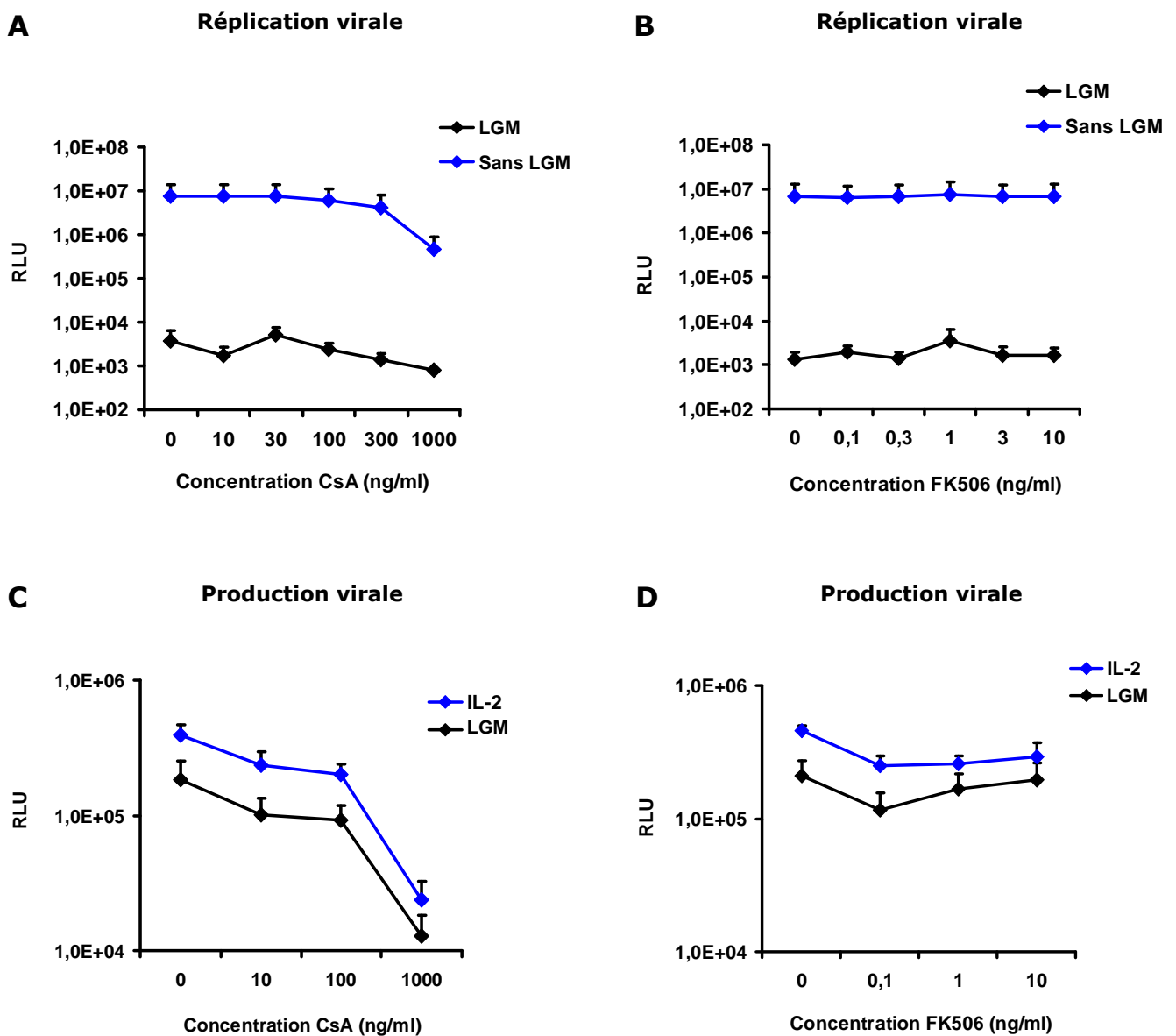


Figure 63 : Effet des inhibiteurs de calcineurine CsA et FK506 sur l'activité anti-virale des LGM.

Des LGM ont été co-cultivés pendant 3 jours avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec de l'ARN JFH1 Δ E1E2-Luc (A, B), ou avec des cellules Huh7.5.1 infectées par VHCcc (C, D) à un rapport E:C de 0,5:1, en présence de concentrations croissantes de CsA (A, C) ou de FK506 (B, D). Les cellules Huh7.5.1 ont également été cultivées en présence de CsA ou de FK506 en l'absence de LGM (milieu supplémenté avec de l'IL-2).

A, B : moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes

C, D : moyenne \pm ES de 6 expériences indépendantes

Discussion

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème majeur de santé publique, d'une part en raison de sa haute prévalence - environ 170 millions de personnes infectées dans le monde -, et d'autre part du fait de la sévérité de ses complications. Le traitement standard, associant le (PEG-IFN)- α et la ribavirine, se limite par une efficacité modérée (chez seulement 50% des patients traités), des effets secondaires très importants conduisant fréquemment à des arrêts prématurés du traitement, et des coûts élevés. Récemment, deux inhibiteurs de protéase (telaprevir et boceprevir) ont reçu une autorisation temporaire d'utilisation en France ; associés au traitement par (PEG-IFN)- α et ribavirine, ils permettent de guérir un plus grand nombre de patients, parfois en réduisant la durée du traitement et donc en limitant les effets secondaires (McHutchison et al., 2010; Susser et al., 2009). Cependant, des résistances à ces molécules ont déjà été mises en évidence (Pawlotsky, 2011) et le coût de ces traitements reste élevé, c'est pourquoi le développement de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une complication grave de l'infection par le VHC survenant chez 1 à 4 % des patients, dans la plupart des cas sur foie cirrhotique. Il s'agit d'un cancer de mauvais pronostic pour lequel les traitements actuellement disponibles ont une efficacité limitée. Le traitement de choix est la transplantation hépatique, car elle permet de traiter simultanément le cancer et la cirrhose sous-jacente. Néanmoins, en raison de la pénurie actuelle de greffons, elle est réservée aux patients répondant aux critères de Milan, pour lesquels le risque de récurrence tumorale est faible (Mazzaferro et al., 1996). De plus, elle possède une efficacité limitée chez les patients chroniquement infectés par le VHC car le foie nouvellement greffé est systématiquement et extrêmement rapidement réinfecté par le virus. La prévention de cette réinfection du greffon par le VHC représente un challenge de taille pour les cliniciens.

Nous proposons d'utiliser des LGM exprimant le gène de toxicité conditionnelle HSV-tk pour deux applications cliniques majeures, le traitement du CHC en combinaison avec les autres thérapies actuellement disponibles, et la prévention de la réinfection du greffon par le VHC lors de la transplantation hépatique.

Les LGM comme immunothérapie adjuvante du CHC

L'immunothérapie basée sur l'administration de LGM allogéniques dans le cadre du traitement d'hémopathies malignes a été montrée comme étant bénéfique pour le patient, et cela sans effets secondaires majeurs (Ciceri et al., 2007). En effet, des lymphocytes allogéniques exprimant le gène HSV-tk ont été largement utilisés lors de

plusieurs études cliniques, en association avec une greffe de CSH (Bonini et al., 1997; Ciceri et al., 2007; Ciceri et al., 2009; Tiberghien et al., 2001). Cette dernière permet une reconstitution du système immunitaire, alors que les LGM ont une activité anti-leucémique très importante vis-à-vis des cellules cancéreuses résiduelles (Ciceri et al., 2007). Au vu de ces propriétés anti-cancéreuses à l'encontre des hémopathies malignes, nous avons voulu déterminer si ces cellules pouvaient avoir une activité anti-tumorale envers des tumeurs solides, et en particulier vis-à-vis du CHC. L'hypothèse de cette nouvelle application est renforcée par le fait qu'un autre produit de thérapie cellulaire a déjà fait l'objet de nombreuses études cliniques pour le traitement de tumeurs solides, les cellules CIK. Il s'agit de lymphocytes prélevés à partir du sang du patient, activés et cultivés *in vitro* puis réinjectés de façon autologue. Plusieurs essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de cancer colorectal, de carcinome rénal, de cancer de l'estomac ou de CHC (Sangiolo et al., 2008). Utilisées en combinaison avec les traitements standards (chimiothérapie, résection chirurgicale), les cellules CIK possèdent une activité anti-tumorale importante et améliorent significativement la survie des patients, notamment lorsqu'elles sont utilisées chez des patients atteints de CHC (voir tableau 2) (Hui et al., 2009; Kim et al., 2007; Shi et al., 2004; Takayama et al., 2000; Wang et al., 2002). Lors de notre étude, nous avons comparé nos LGM et les cellules CIK d'un point de vue phénotypique et fonctionnel en utilisant différents protocoles d'activation et de culture décrits dans la littérature pour la production de CIK (Ayello et al., 2009; Oliosio et al., 2009; Weng et al., 2008). Nous n'avons pas observé de différence significative concernant le pourcentage de cellules T, NK et T NK-like au sein des LGM et des CIK, ainsi qu'au niveau de leur potentiel cytotoxique vis-à-vis de cellules Huh7 *in vitro*. Nous en avons déduit que nos LGM sont en fait des CIK génétiquement modifiées, ce qui suggère fortement qu'elles peuvent avoir un effet anti-tumoral à l'encontre du CHC.

Le contrôle de l'alloréactivité des LGM représente un élément crucial de notre approche, les cellules alloréactives pouvant être toxiques pour les tissus sains du patient et induire une GvHD ou un rejet du greffon hépatique. Nous avons opté pour le transfert du gène HSV-tk au sein de nos cellules, qui peuvent alors être éliminées de façon conditionnelle par le GCV (Garin et al., 2001).

Activées par l'anticorps monoclonal CD3 et cultivées en présence d'IL-2, des CMN isolées à partir de sang périphérique de donneurs sains ont été transduites avec succès à l'aide du vecteur rétroviral codant pour le gène de toxicité conditionnelle HSV-tk et le marqueur membranaire CD34. La caractérisation des LGM en termes de pureté et de sensibilité au GCV fut un paramètre clé à tester. Un tri immunomagnétique a permis de sélectionner les cellules transduites, avec une pureté moyenne de 89.4% qui, au vu

d'essais à blanc réalisés par l'EFS Bourgogne/Franche-Comté avec des LGM transduits avec le même vecteur, pourra être améliorée lors des productions de LGM de grade clinique (pureté > 99% après tri CliniMACS – communication personnelle). Jusqu'à présent, les LGM utilisés en clinique ont été transduits avec la forme tronquée du human Large Nerve Growth factor Receptor (Δ LNGFR), ou avec le gène de sélection néomycine phosphotransférase II (neoR) rendant les cellules résistantes au G418, analogue de la néomycine qui est toxique pour les cellules eucaryotes non porteuses du gène. Cependant, le gène neoR est responsable d'altérations au niveau du métabolisme des cellules transduites et d'une diminution de leur alloréactivité (Mailly et al., 2010). Ainsi, les gènes de sélection permettant un tri immunomagnétique, tels que le Δ LNGFR ou le CD34, sont dorénavant privilégiés (Mailly et al., 2010).

Nous avons confirmé que les LGM sont hautement sensibles au GCV, la mort de la quasi-totalité des cellules étant observée après une semaine de culture en présence de la drogue, alors qu'aucun effet n'a lieu sur les cellules cultivées non transduites et non sélectionnées. Les différentes sous-populations lymphocytaires que sont les cellules T, les cellules NK et les cellules T NK-like sont transduites de manière équivalente et éliminées de la même façon par le GCV. Lors d'essais cliniques, il a été observé que la GvHD engendrée par les LGM est une complication généralement de faible grade (GvHD aiguë de grade I/II ou GvHD chronique modérée) survenant chez une minorité de patients (environ 30%), mais qui peut être contrôlée avec succès grâce à l'administration de GCV lorsqu'elle survient (Bonini et al., 1997; Ciceri et al., 2007; Ciceri et al., 2009; Tiberghien et al., 2001).

Un nouveau vecteur baptisé « iCasp9-CD19 » a été récemment développé par l'équipe de M. K. Brenner (Di Stasi et al., 2011). Le gène iCasp9 code d'une part pour la caspase 9 humaine, et d'autre part pour une protéine de liaison au FK506, FKBP12. En présence d'AP1903, molécule analogue au FK506 se liant avec une forte affinité au FKBP12, une dimérisation de iCasp9 a lieu, entraînant l'activation des caspases 3, 6 et 7 et aboutissant à l'apoptose de la cellule transduite. Le transgène iCasp9 est fusionné au gène codant le marqueur membranaire CD19, qui permet la sélection des cellules transduites par tri immunomagnétique. Ce vecteur a été utilisé pour la transduction de lymphocytes T allogéniques qui ont été administrés chez cinq patients pédiatriques en rechute leucémique suite à une greffe de CSH. En cas de GvHD (GvHD de grade I chez 4 patients), les patients ont été traités avec une dose unique (0.4 mg/kg) d'AP1903 qui a permis l'élimination de plus de 90% des cellules génétiquement modifiées en 30 minutes seulement, mettant un terme à la GvHD (Di Stasi et al., 2011). Au vu de cette élimination extrêmement rapide, il sera envisageable d'utiliser ce vecteur pour la transduction de nos lymphocytes allogéniques lors de leur future utilisation en clinique.

L'activation des cellules, indispensable au transfert de gène, et la culture, nécessaire pour leur expansion, sont responsables d'une diminution de la capacité d'induction de GvHD *in vivo* (Contassot et al., 1998a; Weijtens et al., 2002), ainsi que d'une perte d'alloréactivité *in vitro* en termes de réponse proliférative et de production de cytokines suite à une stimulation allogénique (Markt et al., 2003; Sauce et al., 2002). De ce fait, nous avons voulu tester ces propriétés fonctionnelles en les comparant à celles des CMN non manipulées. Pour cela, nous avons utilisées des cellules B-EBV comme témoin positif de stimulation, et différentes lignées de CHC (Huh7, HepG2, SK-Hep1 et PLC-PRF-5). Les cellules B-EBV induisent une réponse proliférative de la part des CMN et des LGM qui est équivalente en termes de pourcentage de cellules qui entrent en division. Cependant, les LGM se divisent moins que les CMN, comme en témoigne la MFI, ce qui est en accord avec de précédentes études (Mercier-Letondal et al., 2008; Montcuquet et al., 2008; Sauce et al., 2002) Les lignées de CHC sont en revanche de moins bonnes stimulantes que les B-EBV, étant donné qu'elles induisent une réponse proliférative plus faible de la part des CMN et des LGM. L'IL-2 est détectable dans le surnageant de culture des CMN stimulées avec B-EBV, ce qui est concordant avec le fait que ces cellules ont une très forte réponse proliférative par stimulation B-EBV. Cependant, l'IL-2 n'est pas détectable dans les surnageants de culture des CMN stimulées par les lignées de CHC, ni dans ceux des LGM quelque soit la stimulation allogénique. L'absence d'IL-2 détectable peut s'expliquer par le fait que l'IL-2 produite est rapidement consommée par les cellules répondantes.

La caractérisation de l'activité cytotoxique de nos LGM a constitué un point central de nos travaux. Les LGM se sont révélés très cytotoxiques *in vitro* vis-à-vis de cellules HeLa (contrôle positif de sensibilité à la lyse) et de différentes lignées de CHC. Les cellules produisent de grandes quantités d'IFN- γ et dans une moindre mesure du TNF- α , les deux cytokines pouvant entrer en synergie pour médier la cytotoxicité des LGM (Wang et al., 2011). En effet, nos résultats montrent que l'ajout simultané des anticorps bloquants anti-IFN- γ et anti-TNF- α pendant la co-culture des LGM et des cellules cibles inhibe partiellement l'activité cytotoxique des LGM, alors que les anticorps seuls n'ont quasiment aucun effet.

Il a été montré que la perte d'alloréactivité des LGM du fait de la culture peut être limitée par le remplacement de l'anticorps monoclonal CD3 par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes pour l'activation des cellules, et l'IL-2 par l'IL-7 pour la culture (Mercier-Letondal et al., 2008). Au vu de ces données, nous avons voulu déterminer quelles conditions d'activation et de culture permettent une cytotoxicité optimale. L'activité cytotoxique la plus élevée a été obtenue avec la condition CD3+IL-2, en raison d'une expansion préférentielle de cellules effectrices dans cette condition par rapport aux

autres conditions testées. De ce fait, cette combinaison a été utilisée pour les expériences qui ont suivi et sera probablement la plus appropriée pour les futures applications cliniques. Par ailleurs, l'IL-2 est responsable d'une croissance relative très élevée par rapport à l'IL-7, ce qui est un élément crucial pour la production de cellules à grande échelle.

En plus de sa présence requise pendant l'expansion des LGM, l'IL-2 est également nécessaire pour assurer une cytotoxicité maximale pendant la co-incubation avec les cellules cibles. En effet, les LGM sont très peu cytotoxiques en absence d'IL-2, de même qu'en présence d'IL-7, autre cytokine impliquée dans la survie cellulaire. De ce fait, il apparaît nécessaire d'associer de l'IL-2 aux LGM lors de leur administration *in vivo*, ce qui n'a pas été réalisé en clinique jusqu'à présent dans le cas des LGM. Cependant, dans l'étude de Slavin et al., les patients traités avec des lymphocytes allogéniques ont reçu en sous-cutané de l'IL-2 recombinant (6.10^6 UI/m² par jour) pendant les 5 jours suivant l'administration des cellules. L'IL-2, associé à un traitement à l'indométacine afin de limiter la fièvre et des réactions inflammatoires, a été bien tolérée chez la plupart des patients. La durée de l'administration d'IL-2 a été limitée à 3 jours chez quelques patients en raison de l'apparition d'effets secondaires non tolérés (Slavin et al., 2010).

Nous avons voulu déterminer l'impact de la transduction rétrovirale sur la fonctionnalité des LGM, car il a été montré que l'alloréactivité des LGM peut être altérée en raison du transfert de gène (Markt et al., 2003; Sauce et al., 2002). Pour cela, la cytotoxicité des LGM et de cellules cultivées non transduites et non sélectionnées a été comparée. Aucune différence n'a pu être observée, indiquant que la transduction rétrovirale n'affecte pas l'activité cytotoxique des LGM.

Les LGM ont une capacité de lyse très rapide puisqu'un seul jour de co-incubation avec les cellules cibles suffit pour observer une forte lyse, alors que les CMN atteignent leur potentiel de lyse maximal au bout de 6 jours seulement. Les LGM conservent leur activité cytotoxique pendant au moins 28 jours de culture, rendant possible une expansion des cellules à très grande échelle.

Les cellules CIK sont largement étudiées pour leur activité anti-tumorale vis-à-vis du CHC, et sont produites de façon similaire à nos LGM – activation par CD3+IL-2 (+/- IL-1, IL-7, IL-15, IFN- γ) – mais sans transfert de gène. Il a été montré que les principales cellules cytotoxiques sont des lymphocytes T NK-like (Shi et al., 2004; Wang et al., 2002) ; il s'agit de lymphocytes T ayant acquis le CD56 et des récepteurs NK pendant leur culture *in vitro*, et qui ont la particularité d'exercer une cytotoxicité non retirée par le CMH. Ainsi, il fut intéressant de déterminer, au sein de nos LGM, la ou les sous-population(s) lymphocytaire(s) impliquée(s) dans leur cytotoxicité, ainsi que les mécanismes de reconnaissance et de lyse des cellules cibles.

Les LGM sont composés majoritairement de lymphocytes T, puis de cellules T NK-like et enfin d'un faible pourcentage de cellules NK. Après avoir séparé les différentes sous-populations par tri immunomagnétique, les cellules NK se sont révélées être les cellules les plus cytotoxiques, suivies des cellules T NK-like puis des cellules T. Compte tenu du fait que les cellules les plus nombreuses sont les moins cytotoxiques (lymphocytes T) et que les cellules les plus rares sont les plus cytotoxiques (cellules NK), la contribution relative de chaque sous-population a été étudiée, en un premier temps grâce à un test d'attachement. La plupart des cellules liées aux cellules cibles sont les cellules T NK-like. Bien que le test n'évalue pas directement la cytotoxicité des LGM, il suggère fortement que les cellules T NK-like jouent un rôle prépondérant dans la lyse des cellules cibles. Par ailleurs, ces résultats sont concordants avec les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des CIK. Néanmoins, nous avons voulu utiliser un test plus pertinent pour déterminer la contribution relative de chaque sous-population dans la cytotoxicité des LGM. Lors du test de cytotoxicité par marquage du CD107a qui permet d'identifier les cellules produisant des granules cytotoxiques, il a été observé que les principales cellules qui dégranulent sont les cellules T et les cellules NK. Les cellules NK dégranulent de façon très importante – ce qui coïncide avec la cytotoxicité plus élevée des cellules NK après tri immunomagnétique – mais sont très faiblement représentées au sein des LGM, alors que les cellules T dégranulent peu par rapport aux NK mais sont en nombre très important. Quant aux cellules T NK-like, elles sont plus nombreuses que les cellules NK mais dégranulent de façon beaucoup moins importante, ce qui suggère qu'elles pourraient exercer leur activité cytotoxique par d'autres mécanismes, par exemple via la voie Fas/FasL. De façon similaire à celle des cellules CIK, la cytotoxicité des LGM n'est pas restreinte par le CMH, et semble impliquer des facteurs solubles tels que l'IFN- γ et le TNF- α , ainsi que la molécule TRAIL.

Concernant l'évaluation de l'efficacité de notre approche *in vivo*, le premier modèle utilisé fut un modèle de tumeur sous-cutané, les LGM et les cellules tumorales étant co-injectés à différents rapports effectrices:cibles. Les LGM sont fortement cytotoxiques à un rapport de 30:1, vis-à-vis des cellules HeLa et des Huh7. La lyse des cellules cibles a lieu à des rapports effectrices cibles plus élevé *in vivo* que *in vitro*, puisqu'il y a une élimination des cellules cibles *in vivo* à un rapport effectrices:cibles de 30:1, alors que la cytotoxicité *in vitro* est maximale à un rapport effectrices:cibles environ un log plus faible. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une partie des LGM injectés en sous-cutané peuvent quitter le site de co-injection et ainsi ne plus être en contact avec les cellules tumorales, ce qui n'est pas le cas *in vitro*.

Le modèle d'injection des LGM par voie intraveineuse quatre jours après administration des cellules tumorales par voie intrasplénique constitue un modèle

nettement plus pertinent. L'injection des cellules tumorales par voie intrasplénique permet une diffusion des cellules dans la veine porte et une diffusion homogène au niveau du foie, ce qui ne serait pas le cas lors d'une injection des cellules directement dans le foie. Des expériences préliminaires ont montré que les LGM, administrés par voie intraveineuse, migrent préférentiellement au niveau du foie. Ce tropisme hépatique s'explique par l'acquisition durant la culture *in vitro* des molécules I-CAM-1 et V-CAM-1 (Hamann et al., 2000) et pourrait permettre d'obtenir une cytotoxicité ciblée au niveau du foie tout en limitant la propagation des cellules à travers le corps et donc une éventuelle toxicité périphérique. Les LGM ont une forte activité anti-tumorale vis-à-vis de cellules Huh7 administrées quatre jours plus tôt par voie intrasplénique. A terme, un autre mode d'administration des LGM sera testé en collaboration avec l'Institut de Recherche sur les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD, Strasbourg), à savoir un système d'injection intra-tumorale robotisée guidée par scanner, développé par l'IRCAD. L'objectif d'une administration intra-tumorale est d'augmenter la concentration locale des cellules effectrices au contact de leurs cellules cibles afin d'en accentuer l'efficacité thérapeutique et de diminuer les risques de toxicité périphérique.

Un dernier point primordial à étudier est l'allo-immunisation à l'encontre des LGM. Les patients étant immunocompétents, les LGM peuvent être rejetés par le système immunitaire du receveur. Ce phénomène peut être considéré comme un second système de sécurité (en plus du gène suicide) pour éviter une toxicité des LGM à long terme, mais serait également responsable d'une efficacité anti-tumorale réduite. Nous avons montré que nos LGM sont résistants *in vitro* et *in vivo* à deux inhibiteurs de calcineurine, la CsA et le FK506, utilisés en routine en transplantation. En effet, la cytotoxicité des LGM n'est pas altérée en leur présence. La résistance des LGM à la CsA et au FK506 est due à la culture *in vitro* des cellules, les CMN non manipulées étant sensibles aux deux drogues. Lorsqu'elle entre dans une cellule au repos, la CsA se lie à une protéine cytoplasmique, la cyclophylline. Ce complexe interagit avec la calcineurine qui voit alors son activité phosphatase être inhibée, empêchant la déphosphorylation du facteur de transcription NF-ATp et sa translocation dans le noyau pour sa fixation sur le promoteur du gène codant l'IL-2 (Flanagan et al., 1991). Ce phénomène inhibe l'activation des cellules au repos. La CsA n'a pas d'effet sur les cellules cultivées (Contassot et al., 1998b) car les cellules sont activées et NF-AT est déjà présent au niveau du noyau.

Il paraît néanmoins difficilement envisageable d'utiliser les inhibiteurs de calcineurine chez des patients atteints de CHC. D'autres approches d'immunomodulation peuvent être envisagées.

Dans l'étude de Slavin et al. basée sur l'administration de lymphocytes allogéniques activés (non génétiquement modifiés) pour le traitement d'hémopathies

malignes et d'une dizaine de tumeurs solides métastatiques mais n'incluant pas de CHC (cancer du sein, cancer colorectal, mélanome, cancer de l'estomac, glioblastome...) (Slavin et al., 2010), un conditionnement lymphodéplétant, consistant en l'administration de fludarabine (25mg/m²) ou de cyclophosphamide (1000mg/m²), est réalisé avant l'infusion des lymphocytes allogéniques. Ce conditionnement permet d'une part de créer une « niche » pour les lymphocytes allogéniques qui peuvent alors exercer leur activité anti-tumorale, et d'autre part d'éliminer en partie les lymphocytes T régulateurs du receveur qui sont susceptibles de compromettre l'effet anti-tumoral des cellules allogéniques. L'absence de traitement immunosuppresseur après l'administration des lymphocytes allogéniques a pour conséquence le rejet des cellules allogéniques par le système immunitaire du receveur, dans un délai estimé à une semaine maximum, ce qui permet d'empêcher la survenue d'une GvHD. En effet, l'innocuité de cette approche est basée sur le rejet anticipé des cellules allogéniques par le système immunitaire du receveur. L'effet anti-tumoral est supposé être très rapide et avoir lieu avant que les cellules ne soient rejetées, comme le suggère les taux de survie sans progression de la maladie qui concernent 4 patients sur 5 présentant une hémopathie maligne, et 5 patients sur 21 présentant des tumeurs métastatiques (Slavin et al., 2010).

Un autre conditionnement pré-injection à base de FTY720 pourrait être utilisé. Il s'agit d'un immunomodulateur induisant la séquestration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes, empêchant ainsi leur dissémination en périphérie (Tedesco-Silva et al., 2007). La molécule n'induit pas d'immunosuppression généralisée car n'affecte pas l'activation des lymphocytes et leur prolifération. Il a déjà été utilisé lors d'essais cliniques pour la prévention du rejet de greffe, notamment dans le cadre de la transplantation rénale (Tedesco-Silva et al., 2007).

La mise en place de modèles de CHC dans des animaux immunocompétents est un objectif crucial pour étudier l'activité cytotoxique des LGM tout en empêchant le rejet des LGM par le système immunitaire du receveur. Pour cela, des cellules tumorales issues de souris Balb/c (cellules BNL-1) ont été transduites de façon similaire aux cellules humaines de sorte qu'elles expriment la luciférase. Les cellules tumorales BNL-1 et des splénocytes issus de souris de souches différentes (C57BL/6 ou FvB) comme source de lymphocytes allogéniques seront administrés à des souris Balb/c traitées avec des inhibiteurs de calcineurine ou des conditionnements lympho-ablatifs. La croissance des cellules tumorales en présence ou en absence de LGM sera suivie par bioluminescence, de manière similaire aux expériences menées avec les cellules humaines.

Un modèle de CHC spontané murin dans des souris immunocompétentes déficientes pour TIF1a (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,

Illkirch) pourra être utilisé ultérieurement afin d'évaluer de façon plus pertinente la capacité anti-tumorale des lymphocytes allogéniques.

Utilisation des LGM pour la prévention de la réinfection du greffon hépatique par le VHC

Une immunothérapie basée sur l'utilisation de lymphocytes hépatiques chez des patients cirrhotiques atteints de CHC et traités par transplantation hépatique a été décrite en 2009 (Ohira et al., 2009). Dans cette étude, les lymphocytes présents au sein du greffon ont été récoltés, activés et cultivés pendant trois jours puis administrés au patient transplanté (entre 2.10^8 et 5.10^8 cellules par individu). Une diminution très importante de la charge virale de certains patients chroniquement infectés par le VHC a été constatée. Par ailleurs, une activité anti-virale des cellules CIK a été mise en évidence chez des patients chroniquement infectés par le VHB (Shi et al., 2009). De ce fait, nous nous sommes penchés sur un autre aspect fonctionnel éventuel de nos LGM, à savoir leur activité anti-virale vis-à-vis du VHC, en vue de la prévention de la réinfection du greffon lors de la transplantation hépatique.

Lors de notre étude *in vitro*, nous avons montré que nos LGM ont une importante activité anti-virale vis-à-vis du VHC. Ils inhibent de façon efficace la réplication virale (système réplicon) ainsi que l'infection de cellules Huh7.5.1 par des VHCcc. De manière très intéressante, cette activité anti-virale a lieu à de faibles rapports effectrices:cibles auxquels peu ou pas de cytotoxicité de la part des LGM envers les cellules cibles n'est observée. De ce fait, la dose thérapeutique nécessaire pour obtenir un effet anti-viral pourra être plus faible que celle utilisée pour obtenir un effet anti-tumoral chez des patients atteints de CHC, ce qui permettra de limiter une éventuelle toxicité.

Même si les trois sous-populations lymphocytaires (cellules T, NK et T NK-like) participent à l'activité anti-virale des LGM via la production d'IFN- γ , il semble que l'effet observé soit davantage médié par les cellules NK et T NK-like. Ces résultats sont en corrélation avec ceux publiés par Ohira et al. (Ohira et al., 2009). L'activité anti-virale des LGM n'est pas altérée par la transduction rétrovirale, et ne semble pas être améliorée par le remplacement de l'anticorps monoclonal CD3 par les anticorps CD3/CD28 co-immobilisés sur billes. Par ailleurs, l'activité anti-virale des LGM n'est pas affectée par les inhibiteurs de calcineurine CsA et FK506, ce qui rend cette approche réalisable chez les patients transplantés qui reçoivent dans tous les cas un conditionnement immunosuppresseur pour empêcher le rejet du greffon hépatique.

Lors de l'étude menée par Ohira et al., cinq patients sur les sept patients transplantés et administrés avec les lymphocytes hépatiques activés *in vitro* ont vu leur

charge virale diminuer (Ohira et al., 2009). L'ARN viral était non détectable chez deux d'entre eux, un patient ayant même éradiqué l'infection. Plus la charge virale avant greffe est faible, plus sa diminution post-transplantation est importante, ce qui indique que le potentiel anti-viral des lymphocytes est conditionné par la capacité du virus à réinfecter le greffon. Ainsi, la limitation de cette approche d'immunothérapie réside dans le fait que le foie nouvellement greffé est déjà réinfecté par le VHC lorsque les lymphocytes hépatiques sont injectés au patient (trois jours post-greffe). L'administration d'un produit de thérapie cellulaire au moment de la greffe, ce qui est possible dans le cadre de notre approche allogénique uniquement, permettrait une efficacité thérapeutique nettement supérieure. Nos résultats *in vitro* vont dans ce sens puisque l'on observe une activité anti-virale plus importante lorsque les cellules sont ajoutées le jour de l'infection par VHCcc plutôt que un, deux ou trois jours plus tard.

Nous avons caractérisé l'activité anti-virale des LGM grâce aux systèmes réplicon et VHCcc, la prochaine étape étant la preuve de concept *in vivo*. Nous avons développé au laboratoire le modèle murin uPA^{+/+}/SCID (voir Partie II) que nous souhaitons utiliser pour tester nos LGM. Ces souris immuno- et hépatodéficientes reconstituées avec des hépatocytes humains constituent un modèle d'infection à VHC pour lequel nous avons déjà une forte expérience du fait de l'étude de la prévention de l'infection par le VHC par l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 (voir Partie II). Ainsi, il sera intéressant d'étudier l'effet des LGM à la fois en prévention et en traitement de l'infection et de caractériser l'activité anti-virale des LGM vis-à-vis de différents génotypes du VHC. La résistance des LGM aux inhibiteurs de calcineurine pourra également être testée dans ce modèle.

Création d'une banque de LGM allogéniques prêts-à-l'emploi

Quelque soit l'application clinique, l'objectif à terme est de créer une banque de LGM allogéniques prêts-à-l'emploi. Les avantages de notre approche allogénique par rapport aux approches autologues (CIK, lymphocytes hépatiques) sont nombreux. Premièrement, il sera possible d'établir une production de LGM à très grande échelle. Les lymphocytes issus de donneurs sains sont beaucoup plus faciles à cultiver et à étendre que ceux issus de patients qui sont souvent sujets à de lourds traitements. Nous avons estimé qu'à partir d'un prélèvement de cytophérèse de 10.9 CMN, il devrait être possible d'obtenir 50x10.9 LGM, soit de quoi réaliser 100 injections, sur la base de la dose moyenne utilisée dans l'étude de Ohira et al. de 5x10.6 cellules/kg. Deuxièmement, les cellules sont prêtes-à-l'emploi, ce qui implique qu'elles peuvent être administrées immédiatement au patient, au moment de la transplantation hépatique par exemple. Il n'y a donc pas de perte de temps liée à la production et à la qualification des cellules.

Troisièmement, si un lot clinique destiné à un patient ne peut plus lui être administré pour raisons médicales ou autres, les cellules peuvent être utilisées pour un autre patient, empêchant ainsi la perte de lots cliniques.

Ainsi, la création d'une banque de cellules prêtes-à-l'emploi serait extrêmement « rentable » d'un point de vue logistique et financier, et pertinente en terme de développement industriel en comparaison avec les approches classiques d'immunothérapies autologues qui consistent à produire, pour chaque lot, des cellules destinées à un seul patient.

PARTIE II

Prévention *in vivo* de l'infection par le VHC
par l'administration d'un anticorps
monoclonal ciblant le récepteur CLDN1

Matériel et méthodes

I. Greffe des HPH dans les souris Alb-uPA^{+/+}/SCID

Grâce à une collaboration avec l'équipe de J. Petersen et M. Dandri (Université de Hamburg, Allemagne), nous avons mis en place le modèle murin d'infection par VHC uPA/SCID. Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID ont été générées par croisement de souris SCID hétérozygotes pour le gène uPA (Alb-uPA^{+/-}/SCID). Selon la loi de Mendel, 25% des souriceaux issus de ce croisement sont homozygotes uPA^{+/+}, 25% sont homozygotes uPA^{-/-} et 50% sont hétérozygotes uPA^{+/-}. Un génotypage des souriceaux de chaque portée est ainsi nécessaire afin de sélectionner uniquement les individus uPA^{+/+} qui sont les seules pouvant être greffées efficacement avec les HPH. Pour cela, un morceau de queue d'environ 5mm a été prélevé à l'âge de deux semaines, l'ADN extrait et une PCR effectuée afin de déterminer le génotype de chaque souris.

Ce mode d'obtention de souris homozygotes est fastidieux et conduit à la production inutile d'animaux hétérozygotes ou homozygotes uPA^{-/-}, sacrifiés, ce qui n'est pas satisfaisant éthiquement. Par la suite, des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID ont donc été croisées entre elles afin d'obtenir une progéniture exclusivement uPA^{+/+}. Les souris Alb-uPA^{+/+}/SCID étant hypofertiles en raison de leur hépatodéficience, les reproducteurs ont été greffés avec des hépatocytes murins de souris Balb/c (injection de 0,5.10⁶ cellules par voie intrasplénique), ce qui leur permet de récupérer une fertilité quasiment normale (Brezillon et al., 2008), et ont ainsi été réservées pour la reproduction.

Les souris Alb-uPA^{+/+}/SCID ont été greffées à l'âge de 2-3 semaines avec 1.10⁶ HPH injectées par voie intrasplénique. Les HPH ont été isolées à partir de pièces opératoires obtenues après résections hépatiques en collaboration avec les Prs Bachellier et Pessaux (Hôpital de Hautepierre, Strasbourg). Les cellules ont été cryopréservées jusqu'au jour de la greffe. Afin d'améliorer la prise de greffe, un conditionnement pré- et post-greffe a été effectué à l'aide d'un anticorps anti-asialo-GM1 déplaçant les cellules NK (Clone SH34, référence ATCC : CRL-2405).

II. Dosage d'albumine

Environ 4 semaines après la greffe, puis tout au long des expériences, un prélèvement de sang par voie rétro-orbitale a été effectué afin de récolter le sérum après centrifugation. La quantification de l'albumine humaine dans le sérum des souris greffées, reflétant le niveau de repopulation par les HPH, a été effectuée par dosage Elisa à l'aide du kit « Human Albumine ELISA Quantification Set » (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) selon le protocole fourni. Brièvement, un anticorps primaire anti-

albumine a été incubé pendant 1h à température ambiante dans une plaque 96 puits MAXISORP Nunc (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France), puis du TBS 1% BSA a été ajouté pendant 30 minutes à température ambiante. Les sérums de souris, dilués généralement au 1/20000^e, ont ensuite été ajoutés en duplicata et incubés pendant 1h à température ambiante. Une dose-réponse d'albumine humaine de concentrations connues a été effectuée en parallèle pour l'établissement d'une gamme étalon. Un anticorps secondaire anti-albumine humaine couplé à l'enzyme HRP a été incubé pendant 1h à température ambiante. Le substrat de l'enzyme, TMB (Sigma Aldrich), a été ajouté pendant 10 minutes, puis la réaction a été stoppée avec du H₂SO₄ à 0,18M. Entre chaque étape, cinq lavages ont été effectués à l'aide de Tris Buffer Saline (TBS) supplémenté de 0,5% de Tween 20.

La lecture de l'absorbance a été effectuée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque, et la concentration sérique d'albumine humaine a été déterminée grâce à la gamme étalon.

III. Anticorps

III.1. Provenance des anticorps

L'anticorps monoclonal anti-CLDN1 humain (clone OM-7D3-B3, produit dans le rat) ainsi qu'un anticorps de rat témoin (clone LK-3B2-D8-E11) ont été fournis à 2mg/ml par Genovac/Aldevron (Freiburg, Germany). Ils ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

III.2. Détermination de la pharmacocinétique des anticorps

Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID greffées avec des HPH mais non infectées ont été injectées par voie i.p. avec 500µg d'anticorps anti-CLDN1 ou 500µg d'anticorps témoin (=J0). Des prélèvements de sang par voie rétro-orbitale ont été réalisés à J1, J3, J7, J11 et J21 puis le sérum récolté et congelé jusqu'au jour du test.

Pour l'ensemble des prélèvements, la concentration de l'anticorps anti-CLDN1 a été déterminée grâce à deux tests indépendants : d'une part incubation des sérums sur des cellules Huh7.5 surexprimant CLDN1 puis analyse par cytométrie en flux, et d'autre part dosage Elisa. La concentration de l'anticorps témoin a été quantifiée uniquement par test Elisa car il ne peut pas être détecté dans le test par cytométrie en flux.

III.2.1. Dosage de l'anticorps anti-CLDN1 par cytométrie en flux

Des cellules Huh7.5 surexprimant le récepteur CLDN1 ont été utilisées pour le dosage de l'anticorps anti-CLDN1 dans le sérum des souris traitées. En plaque 96 puits à fond rond, 5.10^4 cellules ont été déposées par puits et incubées avec les sérums à tester (dilués au 1/50^e) pendant 30 minutes à 4°C. Une dose réponse de concentrations connues d'anticorps anti-CLDN1 (clone OM-7D3-B3) dilué dans du sérum de souris Alb-uPA^{-/-}/SCID a été effectuée afin d'établir une gamme étalon. Après lavage avec du PBS froid, un anticorps anti-rat couplé au PE (dilué au 1/50^e) a été incubé pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées et fixées avec du PBS 2% formaldéhyde, puis les marquages ont été analysés par cytométrie en flux avec le LSRII et le logiciel Diva. Les moyennes de fluorescence obtenues avec les concentrations connues d'anticorps ont permis d'établir une gamme étalon permettant de déterminer les concentrations d'anticorps anti-CLDN1 dans le sérum des souris traitées.

III.2.2. Dosage des l'anticorps par dosage Elisa

Le kit Rat IgG2b ELISA Quantification Set (Bethyl Laboratories) a été utilisé pour la quantification de l'anticorps anti-CLDN1 dans le sérum des souris traitées, et le kit Rat IgG ELISA Quantification Set (Bethyl Laboratories) pour le dosage de l'anticorps témoin. Les sérums ont été dilués au 1/5000^e pour le dosage IgG2b et au 1/2000^e pour le dosage IgG. Le protocole suivi est identique à celui du dosage de l'albumine humaine.

IV. Stratégie de prévention de l'infection par le VHC

Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID repopulées avec des HPH (concentration d'albumine sérique de l'ordre de 10mg/ml) ont été injectées à J-1, J1 et J5 avec l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 ou avec l'anticorps témoin (500µg par injection), le J0 faisant référence au jour de l'inoculation des souris avec du sérum de patient chroniquement infecté par le génotype 1b (10^4 copies d'ARN \sim 2325 UI/souris). A J42, les souris traitées par anticorps anti-CLDN1 au début de l'expérience ont été ré-inoculées avec du sérum de patient chroniquement infecté par le génotype 2a (10^5 copies d'ARN \sim 23255 IU/souris).

Des prélèvements de sang par voie rétro-orbitale ont été réalisés à J0, puis tous les 7 jours jusqu'à J91, date à laquelle les souris ont été euthanasiées. La présence d'ARN viral dans le sérum des souris, dilués au 1/100^e, a été déterminée par RT-PCR à l'aide du kit Abbott RealTime^{RT}HCV (Abbott France, Rungis, France), kit utilisé en routine

pour la quantification de la charge virale chez les patients infectés par le VHC (limite de détection : 12 UI/ml). Les taux sériques d'albumine humaine, permettant de vérifier l'innocuité du traitement au niveau hépatique, et les concentrations sériques d'anticorps anti-CLDN1 ont été déterminés pour chaque prélèvement tout au long de l'expérience, comme décrit précédemment.

V. Evaluation de la toxicité hépatique par immunohistochimie

Dans un premier temps, des marquages en immunohistochimie de la cytokératine 18 (CK18), de l'albumine humaine et du CMH de classe I ont été mis au point. Ces marqueurs permettent de mettre en évidence les HPH greffées et de les différencier des hépatocytes murins.

Dans un deuxième temps, afin d'évaluer la toxicité de l'anticorps anti-CLDN1 au niveau hépatique, le foie de souris traitées avec l'anticorps ou non traitées ont été prélevés. Les HPH greffées ont été identifiées par marquage de la CK18 en immunohistochimie.

V.1. Préparation des lames histologiques

Après euthanasie des souris greffées, le foie a été prélevé et fixé en formaline 4%. Il a ensuite été déshydraté par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes puis dans un solvant substituant du xylène (LMR-SOL, Labomoderne, Paris, France) (Tableau 5). Les échantillons ont ensuite été plongés dans de la paraffine liquide à 56°C pendant 2h avant l'inclusion en paraffine à 4°C pendant la nuit pour la constitution des blocs. Des coupes de 7µm ont été effectués à l'aide d'un microtome (Reichert-Jung, Depew, USA) et déposées sur des lames Superfrost plus (VWR, West Chester, USA) humidifiées avec de l'eau distillée et placées sur une plaque chauffante. Les lames ont été séchées dans un four à 37°C pendant une nuit.

Ethanol 70%	1 nuit
Ethanol 95%	45 minutes
Ethanol 95%	45 minutes
Ethanol 100%	1h30
Ethanol 100%	1h30
LMR	1h
LMR	1h

Tableau 5 : Déshydratation des échantillons.

Les lames ont été déparaffinées comme indiqué Tableau 6. Les marquages ont ensuite été effectués immédiatement, sans laisser sécher les lames.

LMR	5 minutes
LMR	5 minutes
Ethanol 100%	5 minutes
Ethanol 100%	5 minutes
Ethanol 95%	5 minutes
Ethanol 70%	5 minutes
dH ₂ O	10 secondes
dH ₂ O	2 minutes

Tableau 6 : Déparaffinage des lames.

V.2. Coloration hématoxyline-éosine

L'hématoxyline (Sigma-Aldrich) est un colorant violet utilisé pour la coloration des noyaux, et l'éosine (Sigma-Aldrich), colorant rouge, permet la coloration du cytoplasme cellulaire. Après déparaffinage, les lames ont été plongées dans des bains successifs décrits Tableau 7. Les lames ont ensuite été montées avec du milieu de montage (Sigma-Aldrich) et des lamelles porte-objet (Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne) pour l'observation microscopique.

Hématoxyline	15 minutes
H ₂ O	5 minutes
dH ₂ O	5 minutes
Eosine	10 minutes
dH ₂ O	5 minutes
Ethanol 100%	2 minutes
Ethanol 100%	2 minutes
Ethanol 100%	2 minutes
LMR	2 minutes
LMR	2 minutes

Tableau 7 : Coloration hématoxyline-éosine.

V.3. Mise au point des marquages en immunohistochimie

Après déparaffinage, un démasquage antigénique a été effectué ; les lames ont été plongées dans un tampon Tris-EDTA, pH9, pendant 45 minutes à 96°C au bain-marie. Après les avoir laissées refroidir pendant 20 minutes, les coupes ont été délimitées à l'aide de Dakopen (Dako, Glostrup, Danemark). Le kit Vectastain ABC Mouse IgG (Vector Laboratories) a été utilisé pour les marquages selon le protocole fourni. Les coupes ont été incubées avec du sérum normal pendant 20 minutes à température ambiante, sérum correspondant à l'espèce dans laquelle a été produit l'anticorps secondaire. Les biotines et avidines endogènes ont ensuite été bloquées, à température ambiante, avec le kit Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) selon le protocole fourni, avant l'incubation des coupes avec les anticorps primaires décrits dans le Tableau 8. Les incubations de 2h ont été effectuées à température ambiante, celles d'une nuit à 4°C.

Un anticorps secondaire biotinylé a été incubé sur les coupes pendant 45 minutes à température ambiante, puis du peroxyde d'hydrogène à 3% a été ajouté pendant 5 minutes afin d'inactiver les peroxydases endogènes. Les coupes ont ensuite été incubées à température ambiante avec un complexe constitué de HRP biotinylée et d'avidine, puis avec le substrat de la HRP, Novared (Vector Laboratories). La réaction a été suivie au microscope jusqu'à obtenir une intensité de marquage correcte (environ 10 minutes), puis les lames ont été lavées dans un bain de dH₂O pendant 20 minutes. Entre chaque étape, trois lavages de 5 minutes ont été effectués en immergeant les lames dans du PBS supplémenté de 0,5% de Tween 20.

Les coupes ont ensuite été contre-colorées avec de l'hématoxyline comme décrit précédemment, puis montées avec des lamelles porte-objet pour l'observation au microscope.

Antigène	Fournisseur	Dilutions	Incubations
CK18	Dako	1/25 ^e	1 nuit
Albumine	Acris Antibodies, Herford, Germany	1/200 ^e - 1/500 ^e	2h - 1 nuit
HLA de classe I	Abcam	1/100 ^e - 1/200 ^e - 1/500 ^e - 1/1000 ^e	2h - 1 nuit

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour les marquages en immunohistochimie.

Les géotypages des souriceaux ont été effectués par Mr Nicolas Brignon. L'isolement des HPH est réalisé en routine par Mlle Sarah Durand. Les greffes de HPH, l'administration des anticorps, l'inoculation des souris avec le VHC et les prélèvements rétro-orbitaux ont été réalisés par les Drs Laurent Mailly et Eric Robinet et Mr Nicolas Brignon. Les dosages des charges virales dans le sérum des souris ont été effectués par le service Virologie du Plateau Technique de Microbiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Résultats

I. Pharmacocinétique des anticorps *in vivo*

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer les temps de demi-vie de l'anticorps anti-CLDN1 et de l'anticorps témoin afin d'optimiser notre protocole de prévention de l'infection par le VHC. Pour ce faire, des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID greffées avec des HPH ont été injectées avec l'anticorps anti-CLDN1 ou l'anticorps témoin (500µg par souris) (=J0). Des prélèvements rétro-orbitaux ont été réalisés 1, 3, 7, 11 et 21 jours après l'administration de l'anticorps. Les concentrations sériques d'anticorps anti-CLDN1 et d'anticorps témoin ont été déterminées par cytométrie en flux et par dosage Elisa IgG2b pour l'anticorps anti-CLDN1, et par dosage Elisa IgG uniquement pour l'anticorps témoin.

Suite au test Elisa, le temps de demi-vie de l'anticorps anti-CLDN1 a pu être estimé à 2.8 ± 0.3 jours (moyenne \pm ES), avec comme concentrations moyennes d'anticorps 114.4 ± 13.9 , 70.4 ± 8.0 , 18.1 ± 6.8 µg/ml à J1, J3 et J7, respectivement (Figure 64A) (Dosage par cytométrie en flux : temps de demi-vie = 3.4 ± 0.4 jours). L'anticorps n'est plus détectable à partir de J11. De son côté, l'anticorps témoin possède une demi-vie nettement plus importante que celle de l'anticorps anti-CLDN1, estimée à 6.7 ± 1.4 jours. Les concentrations sériques moyennes de l'anticorps témoin, plus élevées que celles de l'anticorps anti-CLDN1, sont de 336.1 ± 51.0 , 294.1 ± 58.0 , 173.6 ± 50.2 , 124.4 ± 58.2 et 43.2 ± 19.2 µg/ml à J1, J3, J7, J11 et J21, respectivement (Figure 64B).

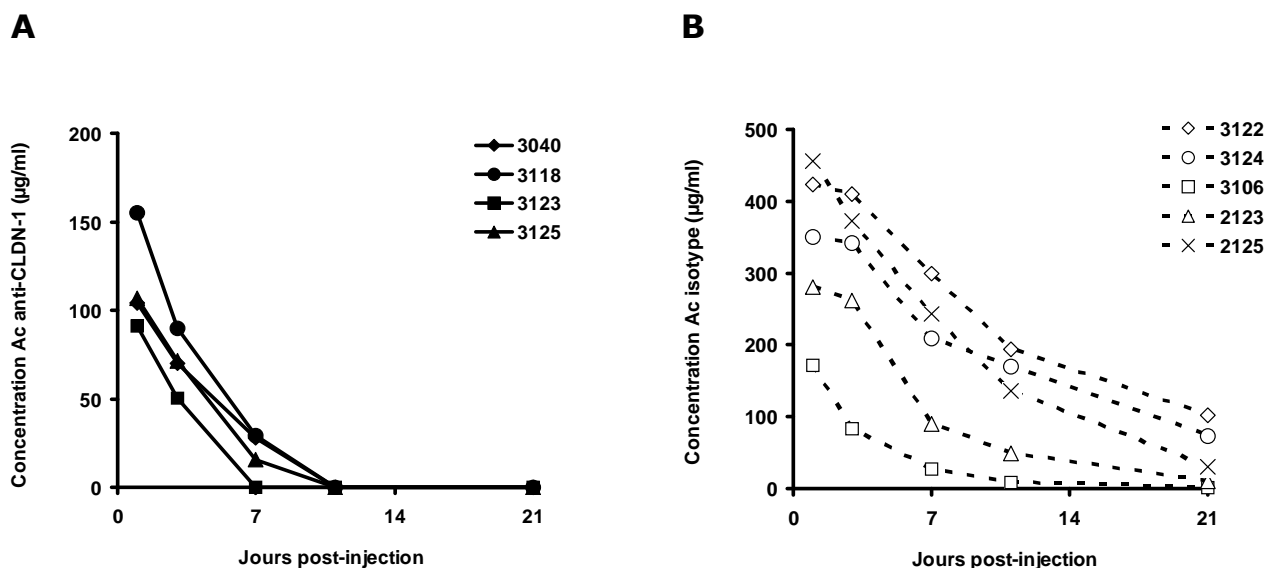


Figure 64 : Pharmacocinétique de l'anticorps anti-CLDN1 (A) et de l'anticorps témoin (B).

Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID greffées mais non infectées ont été injectées avec de l'anticorps anti-CLDN1 (A, n=4) ou de l'anticorps témoin (B, n=5) (=J0). Le sérum a été prélevé à J1, J3, J7, J11 et J21 par prélèvement rétro-orbitaire, et la concentration d'anticorps a été déterminée par test Elisa IgG2b (anticorps anti-CLDN1) ou par test Elisa IgG (anticorps témoin).

II. L'anticorps monoclonal anti-CLDN-1 prévient l'infection *in vivo* par le VHC

La capacité de l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 à inhiber l'infection du VHC ayant été démontrée *in vitro* (Fofana et al., 2010), nous avons voulu déterminer si l'anticorps pouvait prévenir l'infection par le VHC *in vivo*, grâce au modèle Alb-uPA^{+/+}/SCID. Pour cela, l'anticorps anti-CLDN1 ou l'anticorps témoin ont été injectés par voie i.p. 24h avant l'inoculation des souris avec du sérum de patient infecté chroniquement par le VHC de génotype 1b, puis 1 et 5 jours post-inoculation. Des prélèvements de sang par voie rétro-orbitale ont été effectués tous les 7 jours afin de suivre la charge virale, la pharmacocinétique des anticorps et les taux d'albumine.

L'ensemble des 4 souris injectées avec l'anticorps témoin a développé une infection stable en trois semaines après l'inoculation du VHC, alors que les 5 souris traitées avec l'anticorps anti-CLDN1 n'ont pas développé d'infection (Figure 65A). La protection est efficace puisque l'ARN viral est indétectable pendant 5 semaines après l'inoculation du VHC. L'anticorps anti-CLDN1 peut être détecté dans le sérum des souris à J0 et J7, alors qu'il ne l'est plus à J14 (Figure 65B).

Afin de s'assurer que les souris initialement traitées par l'anticorps anti-CLDN1 peuvent être infectées, les animaux ont été réinoculés à J42 avec du sérum de patient chroniquement infecté par le génotype 2a, l'anticorps n'étant plus détectable à ce stade. Une infection a été observée chez l'ensemble des souris, à des taux similaires à ceux obtenus chez les souris injectées avec l'anticorps témoin. Ces résultats montrent que les souris sont sensibles à une infection par le VHC. Par conséquent, l'absence d'ARN viral dans le sérum des souris traitées par l'anticorps anti-CLDN1 durant la première phase de l'expérience est bien la conséquence d'un effet préventif de la part de l'anticorps.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'anticorps anti-CLDN1 pourrait être un outil efficace pour la prévention de l'infection par le VHC chez le patient VHC+ transplanté hépatique.

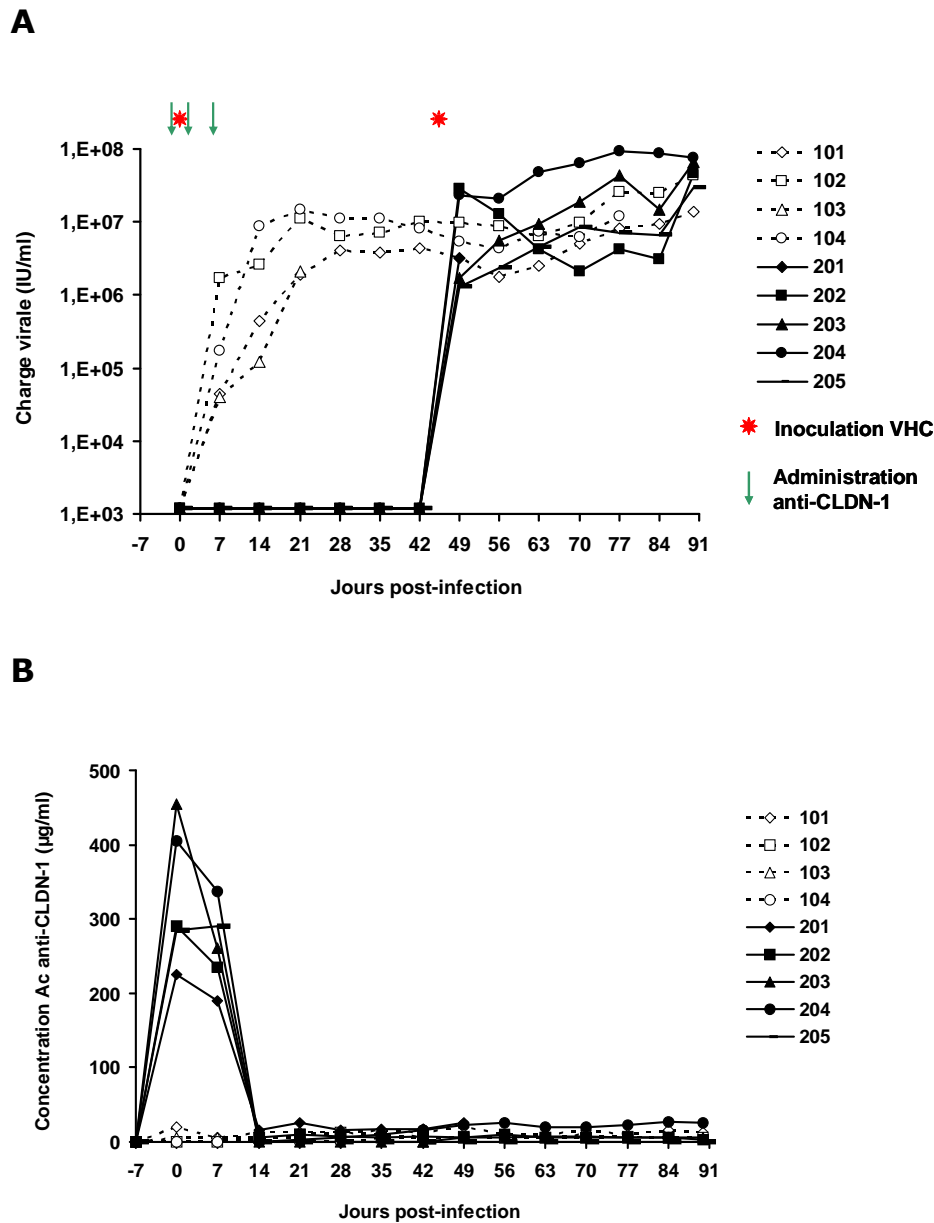


Figure 65 : Prévention de l'infection VHC *in vivo* par l'administration de l'anticorps monoclonal anti-CLDN1

Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID, inocuées à J0 par du sérum de patient chroniquement infecté par le génotype 1b, ont été injectées avec de l'anticorps anti-CLDN1 (symboles noirs, traits pleins) (n=5) ou avec un anticorps témoin (symboles blancs, traits pointillés) (n=4) à J-1, J1 et J5. Les souris ont été réinoculées à J42 et suivies jusqu'à J91. La charge virale (A), exprimée en unités internationales (UI) par millilitre (ml) de sérum, a été quantifiée par RT-PCR. La concentration sérique de l'anticorps anti-CLDN1 (B) a été déterminée par cytométrie en flux après incubation de cellules Huh7.5 avec le sérum des souris puis révélation avec un anticorps secondaire anti-rat couplé au PE.

III. L'administration de l'anticorps anti-CLDN1 n'est pas toxique pour les hépatocytes humains

La concentration sérique d'albumine humaine a été suivie tout au long du traitement afin de vérifier l'absence de toxicité de l'anticorps vis-à-vis des HPH greffées. Les taux sériques d'albumine humaine sont stables pour l'ensemble des souris, qu'elles aient reçu de l'anticorps témoin ou de l'anticorps anti-CLDN1 (Figure 66). Ces résultats suggèrent l'innocuité du traitement par l'anticorps anti-CLDN1 au niveau hépatique.

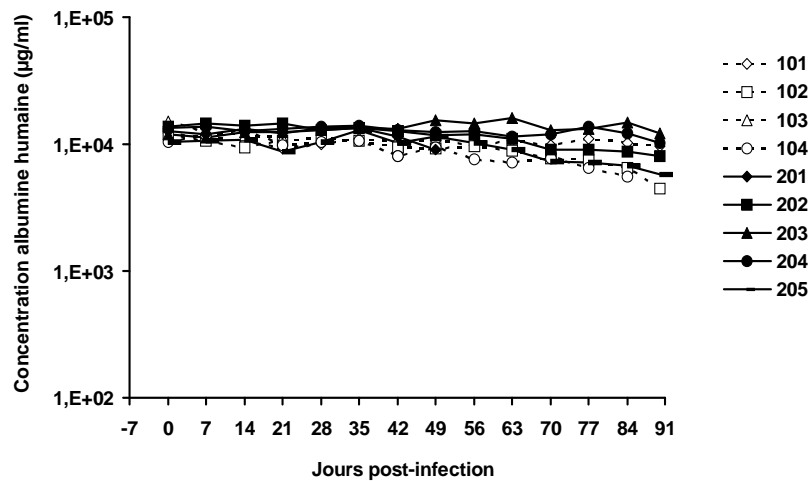


Figure 66 : Dosage de l'albumine humaine dans le sérum des souris traitées.

Les taux sériques d'albumine humaine des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID inoculées à J0 par du VHC et injectées avec de l'anticorps anti-CLDN1 (symboles noirs, traits pleins) (n=5) ou avec un anticorps témoin (symboles blancs, traits pointillés) (n=4) ont été déterminés par dosage Elisa. Le suivi a été réalisé de J0 à J91.

Afin de confirmer les résultats obtenus par le dosage sérique de l'albumine humaine, les souris traitées avec l'anticorps anti-CLDN1 ou avec l'anticorps témoin ont été sacrifiées à J91 et leur foie prélevé pour la réalisation d'analyses histologiques.

Des marquages en immunohistochimie ont préalablement été mis au point sur des foies de souris Alb-uPA^{+/+}/SCID greffées avec des HPH mais non infectées. Le marqueur humain HLA de classe I (HLA cl.I) et les marqueurs hépatocytaires humains CK18 et albumine humaine ont été utilisés afin de discriminer les HPH et les hépatocytes murins. Les anticorps primaires ont été testés à différentes concentrations et incubés sur les coupes histologiques pendant 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C.

Les dilutions et incubations optimales de chaque anticorps sont les suivantes (Figure 67) :

- anticorps anti-HLA cl.I : dilution au 1/1000^e, incubation 2h
- anticorps anti-CK18 : dilution au 1/25^e, incubation sur la nuit
- anticorps anti-albumine : dilution au 1/500^e, incubation 2h, sans démasquage antigénique

Un marquage CK18 a été réalisé sur les foies de souris traitées avec l'anticorps anti-CLDN1 ou traitées avec l'anticorps témoin. Chez les souris traitées avec l'anticorps anti-CLDN1, les HPH sont toujours présents et sont morphologiquement similaires à ceux des souris injectées avec l'anticorps témoin (Figure 68).

L'ensemble de ces données montre que le traitement par l'anticorps anti-CLDN1 n'altère pas les HPH en termes de fonctionnalité (production d'albumine humaine) et de morphologie, indiquant que l'anticorps n'est pas toxique pour les hépatocytes. Ces résultats sont renforcés par un bon état général des souris, étant donné l'absence de perte de poids ou de mortalité liée au traitement par l'anticorps anti-CLDN1.

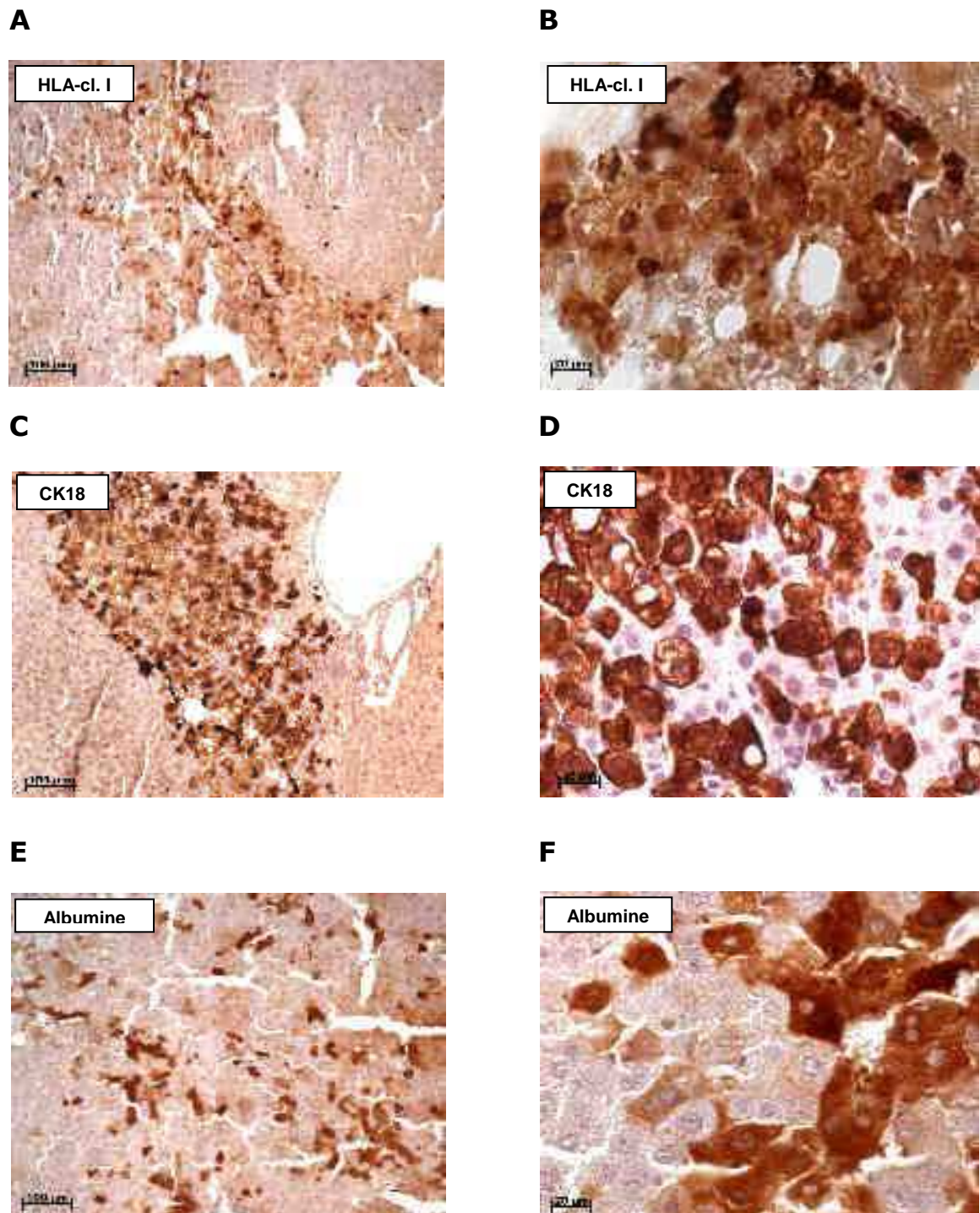


Figure 67 : Mise au point des marquages des HPH en immunohistochimie.

Des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID greffées avec des HPH ont été euthanasiées et leur foie prélevé et fixé. Les HPH ont été marqués en immunohistochimie avec les anticorps primaires anti-HLA de classe I (dilution au 1/1000^e, incubation 2h) (A,B), anti-cytokératine 18 (dilution au 1/25^e, incubation 16h) (C,D) ou anti-albumine humaine (dilution au 1/500^e, incubation 2h) (E,F). Une contre-coloration à l'hématoxyline a été effectuée.

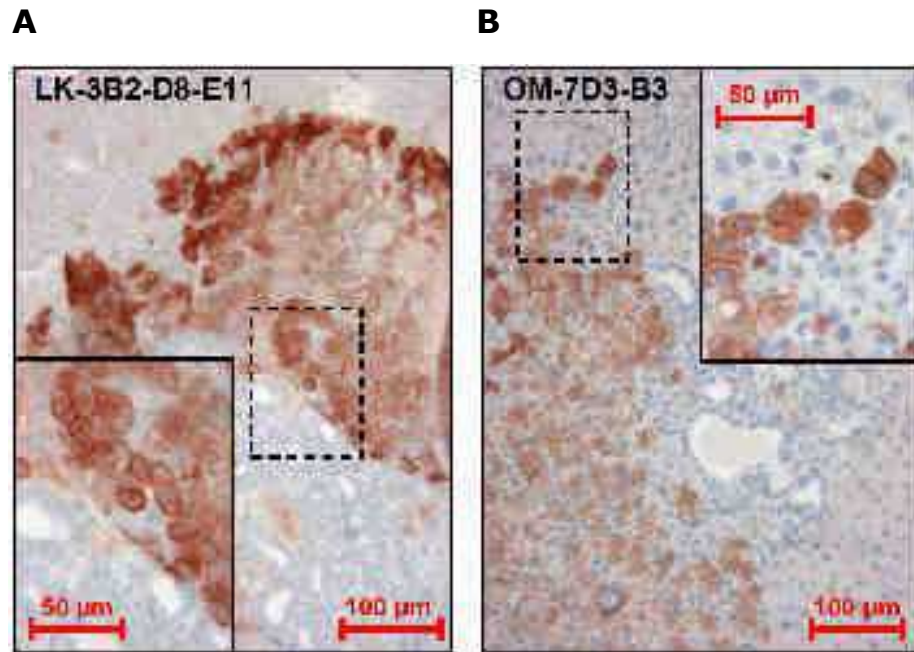


Figure 68 : Evaluation de la toxicité hépatique de l'anticorps anti-CLDN1 par marquage de la cytokératine 18 en immunohistochimie.

Des souris injectées avec l'anticorps témoin (A) ou avec l'anticorps anti-CLDN1 (B) ont été sacrifiées et leur foie prélevé et fixé. Un marquage de la cytokératine 18 humaine a été réalisé afin d'identifier les HPH.

Discusión

L'entrée du VHC dans les hépatocytes humains est un processus complexe nécessitant de multiples étapes et faisant intervenir les glycoprotéines d'enveloppe du virus et des facteurs d'entrée de la cellule hôte. Après attachement à la cellule cible, le virus interagit spécifiquement avec ses récepteurs que sont SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN. Des anticorps spécifiques de ces molécules sont étudiés pour leur capacité à bloquer le processus d'entrée du virus et ainsi à empêcher l'infection de la cellule cible par le VHC.

L'anticorps monoclonal dirigé contre CLDN1 (clone OM-7D3-B3) inhibe efficacement l'infection de HPH par le VHC *in vitro* (Fofana et al., 2010). De même que des anticorps monoclonaux dirigés contre CD81 (Meuleman et al., 2008) ou SR-BI (Meuleman et al., 2011b), nous avons montré que l'anticorps OM-7D3-B3 prévient l'infection par le VHC (génotype 1b) chez des souris Alb-uPA^{+/+}/SCID, et cela quand il est administré à J-1, J1 et J5 (J0 = jour de l'inoculation). En effet, la charge virale est indétectable pendant les six semaines post-inoculation chez 100% des souris traitées avec l'anticorps anti-CLDN1, alors que l'ensemble des souris administrées avec l'anticorps témoin développent très rapidement une infection chronique, ce qui confirme l'infectiosité de l'inoculum viral. Les souris traitées initialement avec l'anticorps anti-CLDN1 ont été réinoculées à J42 (date à laquelle l'anticorps n'est plus détectable dans le sérum) avec du VHC d'un autre génotype que celui utilisé précédemment (génotype 2a), et ont développé une infection chronique. Par conséquent, les souris sont sensibles à l'infection, ce qui démontre que l'absence d'ARN viral dans la première phase de l'expérience est bien la conséquence d'un effet préventif de l'anticorps anti-CLDN1.

Lors de précédentes études, l'effet préventif de l'infection VHC par les anticorps monoclonaux anti-CD81 a été obtenu après seulement deux injections d'anticorps (400µg par injection, à J-1 et à J1 après l'inoculation du virus) (Meuleman et al., 2008). Cependant, l'inoculation a été réalisée avec la souche H77C (génotype 1a) ou la souche ED43 (génotype 4a), et non avec du virus polyclonal. Par ailleurs, la prévention de l'infection par l'anticorps anti-SR-BI a été effectuée à l'aide de cinq injections d'anticorps au total (400µg par injection, à J-1, J1, J5, J8 et J12), et l'inoculation avec du sérum issu de chimpanzés infectés avec les souches H77C, ED43 ou HK6a (génotype 6a) et adapté sur souris (Meuleman et al., 2011b). Lors de notre étude, nous avons inoculé nos souris avec un seul génotype (génotype 1b), mais avec du sérum de patient chroniquement infecté par le VHC adapté sur souris. L'infection par du sérum de patient, qui contient plusieurs quasi-espèces du virus, est plus physiologique que l'infection par des VHCcc, et ce d'autant plus que les patients infectés par le génotype 1 sont les plus difficiles à traiter.

Bien qu'il n'y ait pas eu de comparaison directe des trois types d'anticorps, anti-CD81, anti-SR-B1 et anti-CLDN1, il ne semble pas y avoir de différence entre eux en

terme d'efficacité de la prévention de l'infection. Si un choix devait être fait entre ces trois anticorps, il devrait plutôt se faire sur la base de leur innocuité et de leur efficacité en situation de traitement d'une infection chronique établie. Des résultats préliminaires non montrés suggèrent que notre anticorps anti-CLDN1 serait plus intéressant pour le traitement d'une infection chronique que les anticorps anti-CD81 ou SR-B1 publiés à ce jour.

La quantification de l'anticorps anti-CLDN1 a été réalisée grâce à deux tests indépendants, par cytométrie en flux et par dosage Elisa, avec une bonne corrélation entre les deux tests ($R=0,755$, $R^2=0,57$). De leur côté, les concentrations d'anticorps témoin n'ont pu être déterminées qu'en dosage Elisa : le dosage par cytométrie en flux étant basé sur l'expression de CLDN1 par des cellules Huh7.5, nous avons vérifié que les anticorps témoins ne sont pas détectables dans ce test. L'anticorps anti-CLDN1 a un temps de demi-vie environ deux fois moins important que l'anticorps témoin, avec des concentrations sériques d'anticorps plus faibles. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que l'anticorps anti-CLDN1 se fixe sur son antigène et est de ce fait épuisé sur les HPH, alors que l'anticorps témoin ne rencontre aucun antigène et se maintient ainsi présent à de plus fortes concentrations dans la circulation sanguine.

L'anticorps n'est pas toxique pour les hépatocytes, comme le montrent la morphologie préservée des hépatocytes humains en histologie, l'intégrité des jonctions serrées en microscopie électronique (résultat non montré), ainsi que les concentrations stables d'albumine humaine dans le sérum des souris traitées qui témoignent d'une fonctionnalité préservée. La survie des hépatocytes en présence de l'anticorps et l'intégrité des jonctions serrées a déjà été montrée *in vitro* (Fofana et al., 2010). Cependant, l'évaluation de l'innocuité de l'anticorps devra être complétée par d'autres analyses. En effet, CLDN1 peut être exprimée par divers tissus autres que le foie, notamment le rein, impliquant que l'anticorps pourrait avoir des effets délétères sur des cellules non-hépatocytaires. Cette toxicité ne peut être évaluée directement dans notre modèle murin étant donné que la CLDN1 humaine est exprimée exclusivement par les hépatocytes greffés, d'origine humaine. Des expériences préliminaires d'immunomarquages analysés par cytométrie en flux ont montré que l'anticorps OM-7D3-B3 réagit de façon croisée avec la CLDN1 murine au niveau des hépatocytes murins. Les souris traitées avec les anticorps anti-CLDN1 ou témoin ont une survie et un poids similaires, indiquant que l'anticorps anti-CLDN1 n'induit pas de toxicité périphérique bien qu'il soit capable de se fixer sur les hépatocytes murins. Des immunomarquages sur d'autres tissus murins seront réalisés afin de confirmer la capacité de l'anticorps à se fixer sur des tissus murins, renforçant l'hypothèse de l'innocuité de l'anticorps.

L'ensemble de ces résultats indique que l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 pourrait être utilisé pour la prévention de la réinfection du greffon par le VHC lors de la transplantation hépatique de part son innocuité et son potentiel à empêcher l'infection. La prochaine étape consiste à évaluer quel serait l'effet anti-viral de l'anticorps dans le cadre du traitement d'une infection déjà établie, et cela pour différents génotypes. Des résultats préliminaires montrent que notre anticorps anti-CLDN1 présente effectivement une capacité à diminuer la charge virale dans des souris chroniquement infectées avec du virus de génotype 1b (sérum de patient adapté sur souris) ou 2a (VHCcc, souche Jc1). Cependant, une amélioration du protocole de traitement (adaptation de dose, durée et fréquence d'administration de l'anticorps) reste à faire, notamment pour le sérum de génotype 1b.

Par ailleurs, des combinaisons avec les inhibiteurs de protéases telaprevir ou boceprevir seront également testées afin d'évaluer d'une part la capacité de l'anticorps anti-CLDN1 à prévenir le développement de variants résistants à ces DAA, et d'autre part une éventuelle activité antivirale synergique entre anticorps anti-CLDN1 et DAA. En effet, une étude récente visant à déterminer les mécanismes de résistance du VIH aux antirétroviraux a décrit un modèle hypothétique selon lequel le mode de transmission du virus de cellules à cellules permet l'infection d'une cellule naïve par plus de particules virales que lors d'une transmission par virus libre. En présence d'une thérapie antirétrovirale, ce mode de transmission serait associé à une probabilité plus élevée de transmettre des variants résistants produits au sein de la cellule donneuse (Sigal et al., 2011). Des résultats internes au laboratoire ont montré que l'anticorps anti-CLDN1 inhibe à la fois l'entrée du VHC sous forme libre et la transmission du virus de cellules à cellules (communication personnelle). Etant donné que l'anticorps anti-CLDN1 cible un facteur de l'hôte et non un composant du virus comme le font les DAA, il a potentiellement la capacité de bloquer l'entrée de l'ensemble des variants du VHC, qu'ils soient sensibles ou résistants aux DAA, et quelle que soit la voie de transmission utilisée. Ainsi, par analogie avec l'étude de Sigal et al., nous avons émis l'hypothèse que l'anticorps anti-CLDN1 pourrait empêcher, en présence de DAA, le développement de résistances à ces molécules. Cette hypothèse sera testée dans le modèle uPA-SCID en quantifiant l'apparition de variants résistants au telaprevir (les mutations les plus souvent rapportées étant : V36A/M/C, T54A/S, R155K/T/Q et A156V/T (Pawlotsky, 2011)) dans le sérum de souris infectées par du sérum (polyclonal) de patient de génotype 1b après traitement par telaprevir, anti-CLDN1 et telaprevir plus anti-CLDN1. Alternativement, nous pourrions infecter les animaux avec une souche monoclonale en injectant directement par voie intrahépatique l'ARN codant la séquence d'un VHC de génotype 1 dans lequel nous aurons, ou non, introduit les mutations associées à la résistance au telaprevir, comme cela a été décrit par Hiraga et al. (Hiraga et al., 2011).

Discussion générale

Mon travail de thèse s'est focalisé sur le développement de deux nouvelles approches d'immunothérapie du CHC et de l'infection par le VHC. Nous avons fait la preuve de concept de l'utilisation des LGM comme outil puissant de thérapie cellulaire et génique du CHC, reposant sur l'alloréactivité de lymphocytes issus de donneurs sains à l'encontre des cellules tumorales. Nous avons également montré que ces lymphocytes ont une activité anti-virale importante vis-à-vis du VHC. De son côté, l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 (clone OM-7D3-B3) a la capacité de prévenir l'infection par le VHC dans des souris chimériques Alb-uPA^{+/+}/SCID, modèle récemment mis en place au laboratoire.

Les options thérapeutiques actuelles du CHC étant particulièrement limitées, une immunothérapie du CHC basée sur l'administration de LGM constituerait une approche innovante et efficace en association avec les traitements standards. Des conditionnements immunomodulateurs, qui restent à définir, seraient nécessaires pour empêcher le rejet des LGM par le système immunitaire du patient.

Concernant l'utilisation de LGM pour leur effet anti-viral, il ne serait pas concevable de les utiliser chez les patients chroniquement infectés par le VHC. En effet, un traitement immunosuppresseur n'est pas envisageable chez ces patients, au vu de l'arrivée des nombreuses thérapies antivirales ciblant directement le VHC. Par contre, la prévention de la réinfection du greffon par le VHC lors de la transplantation hépatique est une indication possible. En effet, le patient est déjà sous traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet du greffon, ce qui le protégera simultanément de l'allo-immunisation à l'encontre des LGM. Le jour de la greffe, il suffirait de décongeler un lot de LGM et de l'administrer au patient pendant la transplantation hépatique.

Au-delà du fait que les LGM constitueraient un outil très efficace pour la prévention de la réinfection du greffon par le VHC, la principale problématique de notre approche concerne son positionnement parmi le large éventail de DAA qui sera mis sur le marché très prochainement. Les nouvelles drogues anti-virales ont comme avantage une simplicité d'administration, et seront donc largement utilisées par les cliniciens. Néanmoins, nous sommes convaincus que notre approche d'immunothérapie trouverait sa place parmi les options thérapeutiques de la prévention de la réinfection du greffon par le VHC, et cela pour différentes raisons. Premièrement, étant donné que les LGM seront administrés au moment de la transplantation hépatique, les chirurgiens seront les principaux prescripteurs du traitement par LGM. Le rejet de greffe et par conséquent l'alloréactivité sont des phénomènes bien connus des chirurgiens, qui pourraient donc être sensibilisés à notre approche. Deuxièmement, au vu des résultats cliniques publiés par Ohira et al. (Ohira et al., 2009), une seule (ou éventuellement deux) administration

pourrait être suffisante pour prévenir la réinfection du greffon, ce qui est un réel avantage par rapport aux DAA qui doivent être administrés durant plusieurs semaines. De plus, prévenir l'infection au lieu de tenter de la traiter représente un atout considérable. Troisièmement, le coût du traitement par LGM sera probablement très inférieur à celui des DAA, coût que nous avons estimé à moins de 1000 euros pour un lot thérapeutique. Cette estimation tient compte uniquement des coûts de production et non de la rentabilisation des dépenses liées au développement. Cependant, les validations précliniques ayant déjà été effectuées en grande partie, les coûts de développement ne devraient pas être répercutés de façon excessive sur le coût du produit final. Enfin, il faudra déterminer si les LGM peuvent inhiber des variants résistants aux DAA, l'émergence de résistances étant l'une des principales limitations de ces nouvelles thérapies (Pawlotsky, 2011). Les patients non répondeurs aux DAA seront ainsi les cibles privilégiées de notre approche d'immunothérapie.

L'anticorps anti-CLDN pourrait également être utilisé pour prévenir la réinfection du greffon par le VHC lors de la transplantation hépatique. Si son efficacité quant au traitement de l'infection est avérée, il sera envisageable d'utiliser l'anticorps chez des patients chroniquement infectés par le VHC, éventuellement en combinaison avec (PEG-IFN)- α et ribavirine ou avec les inhibiteurs de protéases actuellement utilisés en clinique.

Quelque soit l'application thérapeutique, l'avantage majeur des LGM par rapport aux anticorps anti-CLDN1 réside dans le fait qu'elles ont déjà été largement utilisées chez l'homme. Cette expérience clinique représente un réel atout, notamment en ce qui concerne leur innocuité. De son côté, l'anticorps anti-CLDN1 devra être humanisé pour son administration chez l'homme. Néanmoins, l'anticorps permettra de cibler un éventail plus large de patients que les LGM (patients transplantés et patients chroniquement infectés par le VHC). La poursuite des études précliniques chez l'animal est donc indispensable, aussi bien pour les LGM que pour les anticorps anti-CLDN1, avant d'envisager toute étude clinique de phase I.

Bibliographie

A

- Alter, M.J. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13:2436-2441.
- Andréo, U., P. Maillard, O. Kalinina, M. Walic, E. Meurs, M. Martinot, P. Marcellin, and A. Budkowska. 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* 9:2445-2456.
- Aravalli, R.N., C.J. Steer, and E.N. Cressman. 2008. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48:2047-2063.
- Ayello, J., C. van de Ven, E. Cairo, J. Hochberg, L. Baxi, P. Satwani, and M.S. Cairo. 2009. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from *ex vivo* expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp Hematol* 37:1216-1229.
- Azuma, H., N. Paulk, A. Ranade, C. Dorrell, M. Al-Dhalimy, E. Ellis, S. Strom, M.A. Kay, M. Finegold, and M. Grompe. 2007. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol* 25:903-910.

B

- Baker, J., M.R. Verneris, M. Ito, J.A. Shizuru, and R.S. Negrin. 2001. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood* 97:2923-2931.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-642.
- Basma, H., A. Soto-Gutiérrez, G.R. Yannam, L. Liu, R. Ito, T. Yamamoto, E. Ellis, S.D. Carson, S. Sato, Y. Chen, D. Muirhead, N. Navarro-Alvarez, R.J. Wong, J. Roy-Chowdhury, J.L. Platt, D.F. Mercer, J.D. Miller, S.C. Strom, N. Kobayashi, and I.J. Fox. 2009. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 136:990-999.
- Bertolino, P., G.W. McCaughan, and D.G. Bowen. 2002. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 80:84-92.

- Bissig, K.D., T.T. Le, N.B. Woods, and I.M. Verma. 2007. Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20507-20511.
- Bissig, K.D., S.F. Wieland, P. Tran, M. Isogawa, T.T. Le, F.V. Chisari, and I.M. Verma. 2010. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 120:924-930.
- Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76:13001-13014.
- Bode, J.G., E.D. Brenndörfer, J. Karthe, and D. Häussinger. 2009. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol Chem* 390:1013-1032.
- Bondanza, A., V. Valtolina, Z. Magnani, M. Ponzoni, K. Fleischhauer, M. Bonyhadi, C. Traversari, F. Sanvito, S. Toma, M. Radrizzani, S. La Seta-Catamancio, F. Ciceri, C. Bordignon, and C. Bonini. 2006. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood* 107:1828-1836.
- Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti, P. Servida, E. Zappone, L. Ruggieri, M. Ponzoni, S. Rossini, F. Mavilio, C. Traversari, and C. Bordignon. 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276:1719-1724.
- Boonstra, A., L.J. van der Laan, T. Vanwolleghem, and H.L. Janssen. 2009. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 50:1646-1655.
- Bosch, F.X., J. Ribes, M. Diaz, and R. Cléries. 2004. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127:S5-S16.
- Brezillon, N.M., L. DaSilva, D. L'Hôte, F. Bernex, J. Piquet, N. Binart, S. Morosan, and D. Kremsdorf. 2008. Rescue of fertility in homozygous mice for the urokinase plasminogen activator transgene by the transplantation of mouse hepatocytes. *Cell Transplant* 17:803-812.
- Brimacombe, C.L., J. Grove, L.W. Meredith, K. Hu, A.J. Syder, M.V. Flores, J.M. Timpe, S.E. Krieger, T.F. Baumert, T.L. Tellinghuisen, F. Wong-Staal, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2011. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85:596-605.
- Bukh, J. 2004. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39:1469-1475.
- Burlone, M.E., and A. Budkowska. 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90:1055-1070.

C

- Chalmers, D., C. Ferrand, J.F. Apperley, J.V. Melo, S. Ebeling, I. Newton, A. Duperrier, A. Hagenbeek, E. Garrett, P. Tiberghien, and M. Garin. 2001. Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. *Molecular Therapy* 4:146-148.
- Chayama, K., C.N. Hayes, N. Hiraga, H. Abe, M. Tsuge, and M. Imamura. 2011. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol* 26:13-18.
- Chevaliez, S. 2011. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 17:116-121.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
- Ciceri, F., C. Bonini, S. Markt, E. Zappone, P. Servida, M. Bernardi, A. Pescarollo, A. Bondanza, J. Peccatori, S. Rossini, Z. Magnani, M. Salomoni, C. Benati, M. Ponzoni, L. Callegaro, P. Corradini, M. Bregni, C. Traversari, and C. Bordignon. 2007. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 109:4698-4707.
- Ciceri, F., C. Bonini, M.T.L. Stanghellini, A. Bondanza, C. Traversari, M. Salomoni, L. Turchetto, S. Colombi, M. Bernardi, J. Peccatori, A. Pescarollo, P. Servida, Z. Magnani, S.K. Perna, V. Valtolina, F. Crippa, L. Callegaro, E. Spoldi, R. Crocchiolo, K. Fleischhauer, M. Ponzoni, L. Vago, S. Rossini, A. Santoro, E. Todisco, J. Apperley, E. Olavarria, S. Slavin, E.M. Weissinger, A. Ganser, M. Stadler, E. Yannaki, A. Fassas, A. Anagnostopoulos, M. Bregni, C.G. Stampino, P. Bruzzi, and C. Bordignon. 2009. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncology* 10:489-500.
- Contassot, E., W. Murphy, R. Angonin, J.J. Pavy, M.C. Bittencourt, R. Robinet, C.W. Reynolds, J.Y. Cahn, P. Herve, and P. Tiberghien. 1998a. *In vivo* alloreactive potential of *ex vivo* expanded primary T lymphocytes. *Transplantation* 65:1365-1370.
- Contassot, E., E. Robinet, R. Angonin, V. Laithier, M. Bittencourt, J.J. Pavy, J.Y. Cahn, P. Herve, and P. Tiberghien. 1998b. Differential effects of cyclosporin A on the alloreactivity of fresh and *ex vivo*-expanded T lymphocytes. *Bone Marrow Transplantation* 22:1097-1102.
- Cooke, K.R., L. Kobzik, T.R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, J.M. Crawford, and J.L. Ferrara. 1996. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88:3230-3239.
- Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.

D

- Dandri, M., M.R. Burda, E. Török, J.M. Pollok, A. Iwanska, G. Sommer, X. Rogiers, C.E. Rogler, S. Gupta, H. Will, H. Greten, and J. Petersen. 2001. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33:981-988.
- Dazzi, F., and J.M. Goldman. 1998. Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation. *Annu Rev Med* 49:329-340.
- de Jong, Y.P., C.M. Rice, and A. Ploss. 2010. New horizons for studying human hepatotropic infections. *J Clin Invest* 120:650-653.
- Di Stasi, A., S.K. Tey, G. Dotti, Y. Fujita, A. Kennedy-Nasser, C. Martinez, K. Straathof, E. Liu, A.G. Durett, B. Grilley, H. Liu, C.R. Cruz, B. Savoldo, A.P. Gee, J. Schindler, R.A. Krance, H.E. Heslop, D.M. Spencer, C.M. Rooney, and M.K. Brenner. 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 365:1673-1683.
- Diepolder, H.M. 2009. New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 82:103-109.
- Dorner, M., J.A. Horwitz, J.B. Robbins, W.T. Barry, Q. Feng, K. Mu, C.T. Jones, J.W. Schoggins, M.T. Catanese, D.R. Burton, M. Law, C.M. Rice, and A. Ploss. 2011. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474:208-211.
- Doskali, M., Y. Tanaka, M. Ohira, K. Ishiyama, H. Tashiro, K. Chayama, and H. Ohdan. 2011. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3⁻CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺ cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother* 34:129-138.
- Dustin, L.B., and C.M. Rice. 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 25:71-99.

E

- El-Serag, H.B., J.A. Marrero, L. Rudolph, and K.R. Reddy. 2008. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 134:1752-1763.
- El-Serag, H.B., and L. Rudolph. 2007. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132:2557-2576.
- Enserink, M. 2011. Infectious diseases. First specific drugs raise hopes for hepatitis C. *Science* 332:159-160.
- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wölk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.

Eyre, N.S., T.F. Baumert, and M.R. Beard. 2009. Closing the gap: the tight junction protein occludin and hepatitis C virus entry. *Hepatology* 49:1770-1772.

Eyre, N.S., H.E. Drummer, and M.R. Beard. 2010. The SR-BI partner PDZK1 facilitates hepatitis C virus entry. *PLoS Pathog* 6:e1001130.

F

Fafi-Kremer, S., I. Fofana, E. Soulier, P. Carolla, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, A.H. Patel, F.L. Cosset, P. Pessaux, M. Doffoël, P. Wolf, F. Stoll-Keller, and T.F. Baumert. 2010. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp Med* 207:2019-2031.

Fauci, A.S., D. Mavilio, and S. Kottlilil. 2005. NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nat Rev Immunol* 5:835-843.

Fehse, B., O.S. Kustikova, Z. Li, A. Wahlers, W. Bohn, W.R. Beyer, D. Chalmers, P. Tiberghien, K. Kuhlcke, A.R. Zander, and C. Baum. 2002. A novel 'sort-suicide' fusion gene vector for T cell manipulation. *Gene therapy* 9:1633-1638.

Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292:767-770.

Flanagan, W.M., B. Corthésy, R.J. Bram, and G.R. Crabtree. 1991. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-807.

Flisiak, R., S.V. Feinman, M. Jablkowski, A. Horban, W. Kryczka, M. Pawlowska, J.E. Heathcote, G. Mazzella, C. Vandelli, V. Nicolas-Métral, P. Groscurin, J.S. Liz, P. Scalfaro, H. Porchet, and R. Crabbé. 2009. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology* 49:1460-1468.

Fofana, I., S.E. Krieger, F. Grunert, S. Glauben, F. Xiao, S. Fafi-Kremer, E. Soulier, C. Royer, C. Thumann, C.J. Mee, J.A. McKeating, T. Dragic, P. Pessaux, F. Stoll-Keller, C. Schuster, J. Thompson, and T.F. Baumert. 2010. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 139:953-964, 964.e951-954.

Frentzen, A., K. Hüging, J. Bitzegeio, M. Friesland, S. Haid, J. Gentzsch, M. Hoffmann, D. Lindemann, G. Zimmer, F. Zielecki, F. Weber, E. Steinmann, and T. Pietschmann. 2011. Completion of Hepatitis C Virus Replication Cycle in Heterokaryons Excludes Dominant Restrictions in Human Non-liver and Mouse Liver Cell Lines. *PLoS Pathog* 7:e1002029.

Fukasawa, M. 2010. Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. *Biol Pharm Bull* 33:355-359.

Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.

G

Gane, E.J., S.K. Roberts, C.A. Stedman, P.W. Angus, B. Ritchie, R. Elston, D. Ipe, P.N. Morcos, L. Baher, I. Najera, T. Chu, U. Lopatin, M.M. Berrey, W. Bradford, M. Laughlin, N.S. Shulman, and P.F. Smith. 2010. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 376:1467-1475.

Garin, M.I., E. Garrett, P. Tiberghien, J.F. Apperley, D. Chalmers, J.V. Melo, and C. Ferrand. 2001. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood* 97:122-129.

Ge, D., J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, J.G. McHutchison, and D.B. Goldstein. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.

Georgel, P., C. Schuster, M.B. Zeisel, F. Stoll-Keller, T. Berg, S. Bahram, and T.F. Baumert. 2010. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med* 16:277-286.

Ghany, M.G., D.B. Strader, D.L. Thomas, L.B. Seeff, and A.A.f.t.S.o.L. Diseases. 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49:1335-1374.

Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J.A. Mengshol, N. Castelblanco, and H.R. Rosen. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81:9249-9258.

H

Hamann, A., K. Klugewitz, F. Austrup, and D. Jablonski-Westrich. 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol* 30:3207-3218.

Hao, M.Z., H.L. Lin, Q. Chen, Y.B. Ye, Q.Z. Chen, and M.S. Chen. 2010. Efficacy of transcatheter arterial chemoembolization combined with cytokine-induced killer cell therapy on hepatocellular carcinoma: a comparative study. *Chin J Cancer* 29:172-177.

Henke, J.I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C.G. Schüttler, C. Fehr, C. Jünemann, and M. Niepmann. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27:3300-3310.

- Hikosaka, K., H. Noritake, W. Kimura, N. Sultana, M.T. Sharkar, Y. Tagawa, T. Uezato, Y. Kobayashi, T. Wakita, and N. Miura. 2011. Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed Res* 32:143-150.
- Hiraga, N., M. Imamura, H. Abe, C.N. Hayes, T. Kono, M. Onishi, M. Tsuge, S. Takahashi, H. Ochi, E. Iwao, N. Kamiya, I. Yamada, C. Tateno, K. Yoshizato, H. Matsui, A. Kanai, T. Inaba, S. Tanaka, and K. Chayama. 2011. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology* 54:781-788.
- Hiroishi, K., T. Ito, and M. Imawari. 2008. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1473-1482.
- Hui, D., L. Qiang, W. Jian, Z. Ti, and K. Da-Lu. 2009. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 41:36-41.
- Hwang, S.J., and S.D. Lee. 2011. Hepatic steatosis and hepatitis C: Still unhappy bedfellows? *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1:96-101.
- Hézode, C., N. Forestier, G. Dusheiko, P. Ferenci, S. Pol, T. Goeser, J.P. Bronowicki, M. Bourlière, S. Gharakhanian, L. Bengtsson, L. McNair, S. George, T. Kieffer, A. Kwong, R.S. Kauffman, J. Alam, J.M. Pawlotsky, S. Zeuzem, and P.S. Team. 2009. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360:1839-1850.

J

- Jacobson, I.M., J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, K.R. Reddy, N.H. Bzowej, P. Marcellin, A.J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Sola, R.A. Terg, E.M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A.J. Sankoh, T.L. Kieffer, S. George, R.S. Kauffman, S. Zeuzem, and A.S. Team. 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364:2405-2416.
- Jiang, S., O. Herrera, and R.I. Lechler. 2004. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 16:550-557.
- Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309:1577-1581.

K

- Kamegaya, Y., Y. Hiasa, L. Zukerberg, N. Fowler, J.T. Blackard, W. Lin, W.H. Choe, E.V. Schmidt, and R.T. Chung. 2005. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 41:660-667.

- Kato, T., A. Furusaka, M. Miyamoto, T. Date, K. Yasui, J. Hiramoto, K. Nagayama, T. Tanaka, and T. Wakita. 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 64:334-339.
- Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, M. Zayas, M.Z. Lopez, V. Lohmann, J. Luban, and R. Bartenschlager. 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5:e1000546.
- Kim, H.M., J. Lim, Y.D. Yoon, J.M. Ahn, J.S. Kang, K. Lee, S.K. Park, Y.J. Jeong, J.M. Kim, G. Han, K.H. Yang, Y.J. Kim, Y. Kim, and S.B. Han. 2007. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol* 7:1793-1801.
- Kremsdorf, D., and N. Brezillon. 2007. New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol* 13:2427-2435.
- Krieger, S.E., M.B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H.J. Harris, E.K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V.L. Dao Thi, M. Dreux, F.L. Cosset, J.A. McKeating, C. Schuster, and T.F. Baumert. 2010. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51:1144-1157.
- Kwo, P.Y., E.J. Lawitz, J. McCone, E.R. Schiff, J.M. Vierling, D. Pound, M.N. Davis, J.S. Galati, S.C. Gordon, N. Ravendhran, L. Rossaro, F.H. Anderson, I.M. Jacobson, R. Rubin, K. Koury, L.D. Pedicone, C.A. Brass, E. Chaudhri, J.K. Albrecht, and S.-. investigators. 2010. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 376:705-716.

L

- Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M.E. Munk, S. Kauppinen, and H. Ørum. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327:198-201.
- Larrubia, J.R., S. Benito-Martínez, J. Miquel, M. Calvino, E. Sanz-de-Villalobos, and T. Parra-Cid. 2009. Costimulatory molecule programmed death-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 15:5129-5140.
- Lavanchy, D. 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 17:107-115.
- Lavillette, D., A.W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A.H. Patel, J. Dubuisson, J.K. Ball, and F.L. Cosset. 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41:265-274.
- Law, M., T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A.W. Tarr, Z. Stamataki, P. Gastaminza, F.V. Chisari, I.M. Jones, R.I. Fox, J.K. Ball, J.A. McKeating, N.M. Kneteman, and D.R.

- Burton. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14:25-27.
- Legrand, N., A. Ploss, R. Balling, P.D. Becker, C. Borsotti, N. Brezillon, J. Debarry, Y. de Jong, H. Deng, J.P. Di Santo, S. Eisenbarth, E. Eynon, R.A. Flavell, C.A. Guzman, N.D. Huntington, D. Kremsdorf, M.P. Manns, M.G. Manz, J.J. Mention, M. Ott, C. Rathinam, C.M. Rice, A. Rongvaux, S. Stevens, H. Spits, H. Strick-Marchand, H. Takizawa, A.U. van Lent, C. Wang, K. Weijer, T. Willinger, and P. Ziegler. 2009. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* 6:5-9.
- Lerat, H., M. Honda, M.R. Beard, K. Loesch, J. Sun, Y. Yang, M. Okuda, R. Gosert, S.Y. Xiao, S.A. Weinman, and S.M. Lemon. 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122:352-365.
- Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wölk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
- Lindenbach, B.D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A.J. Syder, J.A. McKeating, R.E. Lanford, S.M. Feinstone, M.E. Major, G. Leroux-Roels, and C.M. Rice. 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3805-3809.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T. Wang. 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83:2011-2014.
- Lohmann, V., F. Körner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
- Luijterink, M.C., E.A. van Beurden, H.E. Malingré, S.M. Jacobs, M. Grompe, L.W. Klomp, R. Berger, and I.E. van den Berg. 2004. Renal proximal tubular cells acquire resistance to cell death stimuli in mice with hereditary tyrosinemia type 1. *Kidney Int* 66:990-1000.
- Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M.N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.L. Cosset, S.M. Rothenberg, T. Pietschmann, A.H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoël, W. Raffelsberger, O. Poch, J.A. McKeating, L. Brino, and T.F. Baumert. 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17:589-595.

M

- Mailly, L., C. Leboeuf, P. Tiberghien, T. Baumert, and E. Robinet. 2010. Genetically engineered T-cells expressing a ganciclovir-sensitive HSV-tk suicide gene for the prevention of GvHD. *Current Opinion in Investigational Drugs* 11:559-570.
- Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J.L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, and N. Ifrah. 1987. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2:175-178.
- Marktel, S., Z. Magnani, F. Ciceri, S. Cazzaniga, S.R. Riddell, C. Traversari, C. Bordignon, and C. Bonini. 2003. Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 101:1290-1298.
- Mazzaferro, V., E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito, and L. Gennari. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693-699.
- McHutchison, J.G., M.P. Manns, A.J. Muir, N.A. Terrault, I.M. Jacobson, N.H. Afdhal, E.J. Heathcote, S. Zeuzem, H.W. Reesink, J. Garg, M. Bsharat, S. George, R.S. Kauffman, N. Adda, A.M. Di Bisceglie, and P.S. Team. 2010. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 362:1292-1303.
- Melkus, M.W., J.D. Estes, A. Padgett-Thomas, J. Gatlin, P.W. Denton, F.A. Othieno, A.K. Wege, A.T. Haase, and J.V. Garcia. 2006. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat Med* 12:1316-1322.
- Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, J.R. Lakey, D.L. Tyrrell, and N.M. Kneteman. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-933.
- Mercier-Letondal, P., N. Montcuquet, D. Sauce, J.M. Certoux, S. Jeanningros, C. Ferrand, M. Bonyhadi, P. Tiberghien, and E. Robinet. 2008. Alloreactivity of *ex vivo*-expanded T cells is correlated with expansion and CD4/CD8 ratio. *Cytotherapy* 10:275-288.
- Meuleman, P., J. Bukh, L. Verhoye, A. Farhoudi, T. Vanwolleghem, R.Y. Wang, I. Desombere, H. Alter, R.H. Purcell, and G. Leroux-Roels. 2011a. *In vivo* evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* 53:755-762.
- Meuleman, P., M.T. Catanese, L. Verhoye, I. Desombere, A. Farhoudi, C.T. Jones, T. Sheahan, K. Grzyb, R. Cortese, C.M. Rice, G. Leroux-Roels, and A. Nicosia. 2011b. A human monoclonal antibody targeting SR-BI precludes hepatitis C virus infection and viral spread *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*

- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. *Hepatology* 48:1761-1768.
- Meuleman, P., and G. Leroux-Roels. 2008. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 80:231-238.
- Meuleman, P., L. Libbrecht, R. De Vos, B. de Hemptinne, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, T. Roskams, and G. Leroux-Roels. 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41:847-856.
- Molina, S., V. Castet, L. Pichard-Garcia, C. Wychowski, E. Meurs, J.M. Pascussi, C. Sureau, J.M. Fabre, A. Sacunha, D. Larrey, J. Dubuisson, J. Coste, J. McKeating, P. Maurel, and C. Fournier-Wirth. 2008. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82:569-574.
- Montcuquet, N., P. Mercier-Letondal, S. Perruche, A. Duperrier, M. Couturier, A. Bouchekiou, M. Bonyhadi, C. Ferrand, P. Tiberghien, and E. Robinet. 2008. Regulatory T-cell expansion and function do not account for the impaired alloreactivity of *ex vivo*-expanded T cells. *Immunology* 125:320-330.
- Moon, Y.J., H.H. Yoon, M.W. Lee, I.K. Jang, D.H. Lee, J.H. Lee, S.K. Lee, K.H. Lee, Y.J. Kim, and Y.W. Eom. 2009. Multipotent progenitor cells derived from human umbilical cord blood can differentiate into hepatocyte-like cells in a liver injury rat model. *Transplant Proc* 41:4357-4360.
- Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5:453-463.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4:1065-1067.
- Moriya, K., H. Yotsuyanagi, Y. Shintani, H. Fujie, K. Ishibashi, Y. Matsuura, T. Miyamura, and K. Koike. 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78 (Pt 7):1527-1531.

N

- Negro, F. 2010. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* 59:1279-1287.
- Nishimura, R., J. Baker, A. Beilhack, R. Zeiser, J.A. Olson, E.I. Segal, M. Karimi, and R.S. Negrin. 2008. *In vivo* trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood* 112:2563-2574.

O

- Ohira, M., K. Ishiyama, Y. Tanaka, M. Doskali, Y. Igarashi, H. Tashiro, N. Hiraga, M. Imamura, N. Sakamoto, T. Asahara, K. Chayama, and H. Ohdan. 2009. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *Journal of Clinical Investigation* 119:3226-3235.
- Olioso, P., R. Giancola, M. Di Riti, A. Contento, P. Accorsi, and A. Iacone. 2009. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial. *Hematol Oncol* 27:130-139.

P

- Pang, R.W., J.W. Joh, P.J. Johnson, M. Monden, T.M. Pawlik, and R.T. Poon. 2008. Biology of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15:962-971.
- Pawlotsky, J.M. 2004. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 12:96-102.
- Pawlotsky, J.M. 2011. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 53:1742-1751.
- Peveling-Oberhag, J., S. Zeuzem, and W.P. Hofmann. 2010. Antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with advanced liver disease and after liver transplantation. *Med Microbiol Immunol* 199:1-10.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7408-7413.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
- Ploss, A., M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y.P. de Jong, and C.M. Rice. 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457:882-886.
- Ploss, A., and C.M. Rice. 2009. Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* 10:1220-1227.
- Popescu, C.I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Hélot, Y. Rouillé, and J. Dubuisson. 2011. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* 7:e1001278.
- Post, J., S. Ratnarajah, and A.R. Lloyd. 2009. Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection. *Cell Mol Life Sci* 66:733-756.

R

- Roetynck, S., M. Baratin, S. Johansson, C. Lemmers, E. Vivier, and S. Ugolini. 2006. Natural killer cells and malaria. *Immunol Rev* 214:251-263.
- Ruggeri, L., M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R.S. Negrin, M.F. Martelli, and A. Velardi. 1999. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94:333-339.
- Ruhnke, M., A.K. Nussler, H. Ungefroren, J.G. Hengstler, B. Kremer, W. Hoeckh, T. Gottwald, P. Heeckt, and F. Fandrich. 2005. Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* 79:1097-1103.

S

- Sangiolo, D., E. Martinuzzi, M. Todorovic, K. Vitaggio, A. Vallario, N. Jordaney, F. Carnevale-Schianca, A. Capaldi, M. Geuna, L. Casorzo, R.A. Nash, M. Aglietta, and A. Cignetti. 2008. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *International Immunology* 20:841-848.
- Sarrazin, C., T.L. Kieffer, D. Bartels, B. Hanzelka, U. Müh, M. Welker, D. Wincheringer, Y. Zhou, H.M. Chu, C. Lin, C. Weegink, H. Reesink, S. Zeuzem, and A.D. Kwong. 2007. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132:1767-1777.
- Sauce, D., N. Tonnelier, A. Duperrier, B. Petracca, M.D. Bittencourt, M. Saadi, P. Saas, C. Ferrand, P. Herve, P. Tiberghien, and E. Robinet. 2002. Influence of *ex vivo* expansion and retrovirus mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11:929-940.
- Scaife, M.D., A. Neschadim, D.H. Fowler, and J.A. Medin. 2009. Novel application of lentiviral vectors towards treatment of graft-versus-host disease. *Expert Opin Biol Ther* 9:749-761.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21:5017-5025.
- Schmidt-Wolf, I.G., P. Lefterova, B.A. Mehta, L.P. Fernandez, D. Huhn, K.G. Blume, I.L. Weissman, and R.S. Negrin. 1993. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 21:1673-1679.
- Seggewiss, R., and H. Einsele. 2010. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115:3861-3868.

- Sherman, M. 2010. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 78:7-10.
- Shi, M., J. Fu, F. Shi, B. Zhang, Z. Tang, L. Jin, Z. Fan, Z. Zhang, L. Chen, H. Wang, G.K. Lau, and F.S. Wang. 2009. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Immunol* 132:43-54.
- Shi, M., B. Zhang, Z.-R. Tang, Z.-Y. Lei, H.-F. Wang, Y.-Y. Feng, Z.-P. Fan, D.-P. Xu, and F.-S. Wang. 2004. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 10:1146-1151.
- Shoukry, N.H., A.G. Cawthon, and C.M. Walker. 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 58:391-424.
- Sigal, A., J.T. Kim, A.B. Balazs, E. Dekel, A. Mayo, R. Milo and D. Baltimore. 2011. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 477:95-98.
- Simmonds, P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 85:3173-3188.
- Slavin, S., A. Ackerstein, R. Or, M.Y. Shapira, B. Gesundheit, N. Askenasy, and S. Morecki. 2010. Immunotherapy in high-risk chemotherapy-resistant patients with metastatic solid tumors and hematological malignancies using intentionally mismatched donor lymphocytes activated with rIL-2: a phase I study. *Cancer Immunology Immunotherapy* 59:1511-1519.
- Sullivan, G.J., D.C. Hay, I.H. Park, J. Fletcher, Z. Hannoun, C.M. Payne, D. Dalgetty, J.R. Black, J.A. Ross, K. Samuel, G. Wang, G.Q. Daley, J.H. Lee, G.M. Church, S.J. Forbes, J.P. Iredale, and I. Wilmot. 2010. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51:329-335.
- Susser, S., C. Welsch, Y. Wang, M. Zettler, F.S. Domingues, U. Karey, E. Hughes, R. Ralston, X. Tong, E. Herrmann, S. Zeuzem, and C. Sarrazin. 2009. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 50:1709-1718.
- Susser, S., J. Vermehren, N. Forestier, M.W. Welker, N. Grigorian, C. Füller, D. Perner, S. Zeuzem, and C. Sarrazin. 2011. Analysis of long-term persistence of resistance mutations within the hepatitis C virus NS3 protease after treatment with telaprevir or boceprevir. *J Clin Virol* 52:321-327.
- Sánchez-Fueyo, A., and T.B. Strom. 2011. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology* 140:51-64.

T

- Takayama, T., T. Sekine, M. Makuuchi, S. Yamasaki, T. Kosuge, J. Yamamoto, K. Shimada, M. Sakamoto, S. Hirohashi, Y. Ohashi, and T. Kakizoe. 2000. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 356:802-807.
- Tang, H., and H. Grisé. 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117:49-65.
- Tedesco-Silva, H., P. Szakaly, A. Shoker, C. Sommerer, N. Yoshimura, F.P. Schena, M. Cremer, A. Hmissi, H. Mayer, P. Lang, and F.C.S. Group. 2007. FTY720 versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplantation: six-month results of a double-blind study. *Transplantation* 84:885-892.
- Thomas, D.L., C.L. Thio, M.P. Martin, Y. Qi, D. Ge, C. O'Huigin, J. Kidd, K. Kidd, S.I. Khakoo, G. Alexander, J.J. Goedert, G.D. Kirk, S.M. Donfield, H.R. Rosen, L.H. Tobler, M.P. Busch, J.G. McHutchison, D.B. Goldstein, and M. Carrington. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.
- Tiberghien, P., C. Ferrand, B. Lioure, N. Milpied, R. Angonin, E. Deconinck, J.M. Certoux, E. Robinet, P. Saas, B. Petracca, C. Juttner, C.W. Reynolds, D.L. Longo, P. Herve, and J.Y. Cahn. 2001. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97:63-72.
- Timpe, J.M., and J.A. McKeating. 2008. Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. *Gut* 57:1728-1737.
- Tong, Y., Y. Zhu, X. Xia, Y. Liu, Y. Feng, X. Hua, Z. Chen, H. Ding, L. Gao, Y. Wang, M.A. Feitelson, P. Zhao, and Z.T. Qi. 2011. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol* 85:2793-2802.
- Traggiai, E., L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J.C. Piffaretti, A. Lanzavecchia, and M.G. Manz. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104-107.
- Tsai, W.L., and R.T. Chung. 2010. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 29:2309-2324.
- Tsukita, S., Y. Yamazaki, T. Katsuno, and A. Tamura. 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930-6938.

V

- Velardi, A., L. Ruggeri, A. Mancusi, F. Aversa, and F.T. Christiansen. 2009. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* 21:525-530.

Vermeiren, J., and C. Sarrazin. 2011. New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect* 17:122-134.

Voisset, C., and J. Dubuisson. 2004. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* 96:413-420.

W

Wakita, T., A. Katsume, J. Kato, C. Taya, H. Yonekawa, Y. Kanegae, I. Saito, Y. Hayashi, M. Koike, M. Miyamoto, Y. Hiasa, and M. Kohara. 2000. Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by Cre/loxP system. *J Med Virol* 62:308-317.

Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.

Wakita, T., C. Taya, A. Katsume, J. Kato, H. Yonekawa, Y. Kanegae, I. Saito, Y. Hayashi, M. Koike, and M. Kohara. 1998. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J Biol Chem* 273:9001-9006.

Walter, E., R. Keist, B. Niederöst, I. Pult, and H.E. Blum. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 24:1-5.

Wang, A.G., D.S. Lee, H.B. Moon, J.M. Kim, K.H. Cho, S.H. Choi, H.L. Ha, Y.H. Han, D.G. Kim, S.B. Hwang, and D.Y. Yu. 2009. Non-structural 5A protein of hepatitis C virus induces a range of liver pathology in transgenic mice. *J Pathol* 219:253-262.

Wang, F.S., M.X. Liu, B. Zhang, M. Shi, Z.Y. Lei, W.B. Sun, Q.Y. Du, and J.M. Chen. 2002. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World Journal of Gastroenterology* 8:464-468.

Wang, R., J.J. Jaw, N.C. Stutzman, Z. Zou, and P.D. Sun. 2011. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*

Washburn, M.L., M.T. Bility, L. Zhang, G.I. Kovalev, A. Buntzman, J.A. Frelinger, W. Barry, A. Ploss, C.M. Rice, and L. Su. 2011. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140:1334-1344.

Weijtens, M., A. van Spronsen, A. Hagenbeek, E. Braakman, and A. Martens. 2002. Reduced graft-versus-host disease-inducing capacity of T cells after activation, culturing, and magnetic cell sorting selection in an allogeneic bone marrow transplantation model in rats. *Hum Gene Ther* 13:187-198.

Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy. 2007. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25:139-170.

Weng, D.S., J. Zhou, Q.M. Zhou, M. Zhao, Q.J. Wang, L.X. Huang, Y.Q. Li, S.P. Chen, P.H. Wu, and J.C. Xia. 2008. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas. *J Immunother* 31:63-71.

Will, C., M. Fromm, and D. Müller. 2008. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int* 28:577-584.

Worns, M.A., and P.R. Galle. 2010. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 42 Suppl 3:S302-309.

Y

Yang, J.D., I. Nakamura, and L.R. Roberts. 2011. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 21:35-43.

Z

Zeisel, M.B., I. Fofana, S. Fafi-Kremer, and T.F. Baumert. 2011. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 54:566-576.

Zeisel, M.B., G. Koutsoudakis, E.K. Schnober, A. Haberstroh, H.E. Blum, F.L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, E. Soulier, E. Schvoerer, C. Schuster, F. Stoll-Keller, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, H. Barth, and T.F. Baumert. 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46:1722-1731.

Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding, and H. Deng. 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81:12465-12471.

Résumé / Summary

Le virus de l'hépatite C (VHC) est une des causes majeures de carcinome hépatocellulaire (CHC), dont les traitements ont une efficacité modérée. La transplantation hépatique (TH) est l'option thérapeutique de choix mais est limitée, chez les patients chroniquement infectés par le VHC, par une réinfection systématique du greffon. Nous proposons d'utiliser des lymphocytes génétiquement modifiés (LGM) issus de donneurs sains qui ont fait leurs preuves pour le traitement d'hémopathies malignes et qui, exprimant un gène suicide, peuvent être éliminés en cas d'effets secondaires. Nous montrons maintenant que ces LGM présentent d'une part une activité anti-tumorale vis-à-vis du CHC, et d'autre part un effet anti-viral envers le VHC. L'objectif est la création d'une banque de LGM allogéniques prêts-à-l'emploi, avec des avantages en termes de coût, de logistique et de disponibilité immédiate par rapport aux approches classiques d'immunothérapies, autologues pour la plupart. Parallèlement, nous avons étudié *in vivo* l'effet anti-viral d'un anticorps monoclonal anti-claudin-1 dirigé contre un co-récepteur du VHC et inhibant l'entrée du VHC dans les hépatocytes humains. Grâce à un modèle d'infection par VHC de souris présentant un foie chimérique humanisé, nous montrons que cet anticorps permet de prévenir efficacement l'infection par le VHC. Nos résultats apportent les preuves de concept de l'utilisation de deux produits, anticorps anti-claudin-1 et LGM, pour la prévention de la réinfection du greffon hépatique par le VHC, les LGM pouvant également être envisagés en association avec les thérapies actuelles du CHC.

The hepatitis C virus (HCV) is a major cause of hepatocellular carcinoma (HCC), whose treatments are of limited efficacy. The liver transplantation (LT) is the optimal therapy but is limited by a very rapid and universal HCV reinfection of the liver graft. We propose to use healthy donor-derived suicide gene modified lymphocytes (GML), known to be efficient for the treatment of hematological malignancies and that can be eliminated in case of adverse events. We show now that GML have a strong anti-tumoral activity against HCC and an anti-viral effect on HCV. Our objective is to create a bank of ready-for-use allogeneic GML which could have numerous advantages in terms of costs, logistics and immediate availability, as compared with autologous immunotherapies. In parallel, we have studied the *in vivo* anti-viral effect of a monoclonal antibody (mAb) directed against an HCV coreceptor, claudin-1, inhibiting HCV entry in human hepatocytes. Using a human liver-chimeric mouse model of HCV infection, we show that this mAb can efficiently prevent HCV infection *in vivo*. Our results provide the proofs of concept that these two products, anti-claudin-1 mAb and GML, could be used for the prevention of liver graft HCV reinfection, while GML could further be used for the treatment of HCC, in combination with current HCC therapies.