

Université de Montréal

**Signatures transcriptomiques et fonctionnelles de l'immunité
protectrice au cours de multiples infections par le virus de l'hépatite C**

Par

Sabrina Mazouz

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade du Doctorat (Ph.D.)
en Microbiologie et Immunologie

21 Décembre 2021

© Sabrina Mazouz 2021

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Signatures transcriptomiques et fonctionnelles de l'immunité protectrice au cours de multiples infections par le virus de l'Hépatite C

Présentée par:
Sabrina Mazouz

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

D^r Daniel Kaufmann, Président-rapporteur
D^{re} Naglaa Shoukry, Directrice de recherche
D^r Rafei Moutih, Membre du jury
D^r Alain Lamarre, Examineur Externe
D^r Étienne Gagnon, Représentant de la Doyenne

Résumé

Dans le monde, 58 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C (VHC). Depuis 2011, l'introduction des antiviraux à action directe a permis la guérison des infections chroniques chez la majorité des sujets traités (~95 %). Toutefois, les traitements sont coûteux et ne protègent pas contre les réinfections, d'où la nécessité de développer un vaccin prophylactique pour freiner efficacement l'épidémie du VHC. Environ 30% des primo-infections sont éliminées spontanément, représentant une occasion unique d'étudier les corrélats de l'immunité protectrice nécessaires pour le développement d'un vaccin efficace. Dans cette thèse, nous avons procédé à la définition des corrélats de l'immunité protectrice au cours des infections par le VHC primaires et subséquentes aux niveaux transcriptomique, clonotypique et fonctionnel à partir d'une cohorte d'utilisateurs de drogues par injection.

Le premier objectif était de caractériser le répertoire de récepteurs des cellules T CD8 spécifique de l'épitope immunodominant et cross-réactif NS3 1073-1081 (CINGVCWTV) restreint par HLA-A2 au cours d'une primo-infection aiguë progressant vers une résolution spontanée ou une infection chronique. Nous avons identifié un ensemble de treize clonotypes publics, indépendamment de l'issue de l'infection. Plusieurs clonotypes publics avaient une longue durée de vie après résolution de l'infection et ont proliféré après réinfection par le VHC. En explorant les bases de données publiques, nous avons identifié plusieurs clonotypes partagés avec d'autres épitopes viraux restreints par HLA-A2, mais ils étaient de faible fréquence et de réactivité croisée limitée, suggérant un rôle limité des lymphocytes T CD8 cross-réactifs au cours de l'infection primaire par le VHC.

Le deuxième objectif était de caractériser les signatures transcriptomiques longitudinales des cellules mononucléaires du sang périphérique totaux chez huit sujets ayant spontanément résolu deux infections consécutives par le VHC. Nous avons également comparé ces signatures avec un schéma vaccinal composé d'un vecteur à adénovirus de chimpanzé suivi d'un rappel utilisant la vaccine modifiée Ankara, exprimant tout deux les protéines non-structurales du VHC. Nous avons identifié une signature transcriptomique des plasmocytes au cours d'une réinfection aiguë, absente lors de l'infection primaire et après le rappel du vaccin.

La résolution spontanée est associée à une expansion rapide des cellules B mémoires spécifiques de la glycoprotéine E2 chez 3 sujets et à une augmentation transitoire des anticorps neutralisants anti- E2 chez 6 sujets. Parallèlement, il y avait une augmentation de l'étendue et de l'ampleur des lymphocytes T spécifiques du VHC chez 7 sujets.

En conclusion, nous avons identifié treize clonotypes publics uniques au VHC qui ont proliféré au cours des infections primaire et secondaire. La faible fréquence des clonotypes cross-réactifs suggère qu'ils ne sont pas des déterminants majeurs de l'issue de l'infection. De plus, nous avons observé une augmentation simultanée des réponses des lymphocytes B et T spécifiques du VHC au stade aiguë précoce, suggérant un rôle des deux bras de l'immunité adaptative dans la clairance de la réinfection du VHC. Nos résultats soutiennent l'idée de combiner deux stratégies vaccinales induisant à la fois une immunité à médiation cellulaire et une immunité humorale visant à prévenir les infections chroniques par le VHC.

Mots clés: Virus de l'hépatite C (VHC); Répertoire des récepteurs des cellules T (TCR); Réinfection par le VHC; Immunité protectrice; Réponse immunitaire mémoire; Vaccin

Abstract

Worldwide, 58 million individuals are chronically infected with hepatitis C virus (HCV). Since 2011, the introduction of direct acting antivirals enabled the cure of chronic HCV in the majority of treated subjects (~95%). However, direct-acting antivirals treatments are expensive and do not protect against reinfection, urging the need to develop a prophylactic vaccine to efficiently curb the HCV epidemic. Around 30% of acutely infected individuals will spontaneously clear the infection, representing a unique opportunity to study the correlates of immune protection needed to develop a potent vaccine. In this thesis, we proceeded to define the correlates of protective immunity during primary and sub-sequent HCV infections at the transcriptomic, clonotypic and functional levels using longitudinal peripheral blood mononuclear cells samples collected from a cohort of people who inject drugs (PWID).

The first aim was to characterize the CD8 T cell receptor repertoire specific to the immunodominant and cross-reactive HLA-A2 restricted NS3 1073-1081 (CINGVCWTV) epitope during acute HCV in PWID progressing to either spontaneous resolution or chronic infection. We identified a set of thirteen public clonotypes in HCV-infected subjects irrespective of infection outcome. Several public clonotypes were long-lived in resolvers and expanded upon reinfection. By mining publicly available data, we identified several TCR clonotypes shared with other HLA-A2 restricted epitopes, but they were of low frequency and limited cross-reactivity, suggesting that they are not major determinants of infectious outcome.

The second aim was to characterize longitudinal transcriptomic signatures using total peripheral blood mononuclear cells, as well as T and B cell recall responses in eight subjects who spontaneously resolved two successive episodes of HCV infection. Furthermore, we compared the transcriptomic signatures of primary and secondary resolving HCV infections, with an HCV nonstructural protein vaccine regimen of recombinant chimpanzee adenovirus 3 vector prime followed by modified vaccinia Ankara boost. We identified a plasma cell transcriptomic signature during early acute HCV reinfection that was absent in primary infection and following HCV vaccine boost. Spontaneous resolution of HCV reinfection was associated with rapid expansion of glycoprotein E2-specific memory B cells in 3 subjects and transient increase in E2-specific

neutralizing antibodies in 6 subjects. Concurrently, there was an increase in the breadth and magnitude of HCV-specific T cells in 7 subjects.

In conclusion, we identified thirteen new public CD8⁺ TCR clonotypes unique to HCV that expanded during acute infection and reinfection. The low frequency of cross-reactive TCRs suggests that they are not major determinants of infectious outcome. Moreover, we observed a concurrent increase of HCV-specific B and T cell responses early during acute HCV reinfection at the transcriptomic and functional levels, suggesting a role for both arms of the adaptive immune response in HCV reinfection clearance. Our results support the combined T and B cell-based vaccine strategy aimed at preventing chronic HCV infections.

Keywords: Hepatitis C Virus (HCV); T-cell receptor (TCR) repertoire; HCV re-infection; Protective immunity; Memory immune response; Vaccine

Table des matières

| | |
|--|-----------------|
| <i>Résumé</i> | <i>II</i> |
| <i>Abstract</i> | <i>IV</i> |
| <i>Liste d'abréviation</i> | <i>X</i> |
| <i>Liste des figures</i> | <i>XX</i> |
| <i>Remerciements</i> | <i>XXIII</i> |
| | |
| <u>Chapitre 1 Introduction</u> | <i>1</i> |
| 1.1. Contexte historique | 2 |
| 1.2. L'infection par le VHC | 2 |
| 1.2.1. Epidémiologie..... | 2 |
| 1.2.2. Transmission de l'infection..... | 4 |
| 1.2.3. Histoire naturelle de l'infection par le VHC | 5 |
| 1.2.3.1. Phase aiguë de l'infection..... | 5 |
| 1.2.3.3. Infection chronique..... | 6 |
| 1.3. Le virus de l'Hépatite C | 8 |
| 1.3.1. Taxonomie..... | 8 |
| 1.3.2. Génome | 8 |
| 1.3.2. Protéines virales..... | 8 |
| 1.3.2.1. Protéines structurales..... | 9 |
| 1.3.2.2. Protéines non structurales..... | 10 |
| 1.3.3. Le cycle viral du VHC..... | 11 |
| 1.3.3.1. Attachement et entrée du virus | 11 |
| 1.3.3.2. Traduction et réplication | 12 |
| 1.3.3.3. Assemblage et relargage des virions..... | 12 |
| 1.3.4. Variabilité génétique | 14 |
| 1.4. Étude de l'infection par le VHC: Modèles expérimentaux | 14 |
| 1.4.1. Modèles in vitro | 15 |
| 1.4.1.1. Les réplicons | 15 |
| 1.4.1.2. Les pseudoparticules rétrovirales..... | 15 |
| 1.4.1.3. Production de virus en culture cellulaire | 17 |
| 1.4.2. Modèles <i>In vivo</i> | 17 |
| 1.4.2.1. Modèle Murin..... | 17 |
| 1.4.2.2. Modèle Primate | 18 |
| 1.4.2.1. Modèle Équin..... | 19 |
| 1.4.2.3. Cohortes..... | 20 |
| 1.5. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection aiguë et chronique par le VHC.. 20 | |
| 1.5.1. Immunité intracellulaire et détection du VHC | 20 |
| 1.5.2. Les cellules tueuses naturelles | 23 |
| 1.5.3. Les cellules dendritiques..... | 23 |
| 1.5.4. Facteurs génétiques de l'hôte associés à la clairance spontanée de l'infection – Immunité innée | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 1.6. Réponse immunitaire adaptative spécifique du VHC | 25 |
| 1.6.1. Les récepteurs de l'immunité adaptative | 25 |
| 1.6.2. Immunité cellulaire spécifique du VHC | 28 |
| 1.6.2.1. Lymphocyte T CD8 | 28 |
| 1.6.2.1.1. Phase aigüe de l'infection | 28 |
| 1.6.2.1.2. Épuisement des lymphocytes T CD8 | 31 |
| 1.6.2.1.1 Étude du répertoire des TCRs spécifique du VHC | 32 |
| 1.6.2.2. Lymphocytes T CD4 | 34 |
| 1.6.2.2.1. CD4 auxiliaires : Régulateurs des lymphocytes T CD8 | 34 |
| 1.6.2.2.2. CD4 folliculaires auxiliaires : Régulateurs de la réponse humorale | 36 |
| 1.6.2.2.3. Les CD4 cytotoxiques | 39 |
| 1.6.2.3. Infection chronique: Mécanismes d'échappements viraux | 40 |
| 1.6.2.4. Facteurs génétiques de l'hôte associés à la clairance spontanées de l'infection - Immunité cellulaire | 42 |
| 1.6.3. Immunité humorale | 43 |
| 1.6.3.1. Cinétique et importance dans le contrôle de l'infection par le VHC | 43 |
| 1.6.3.2. Mécanismes d'échappements de l'immunité humorale | 46 |
| 1.7. Réinfection et immunité protectrice à long terme contre le VHC | 47 |
| 1.7.1. Étude de la réinfection chez le modèle chimpanzé | 47 |
| 1.7.2. Étude de la réinfection chez l'Homme | 49 |
| 1.8. Vaccin contre le VHC | 53 |
| 1.8.1. Élimination du VHC: Défis à relever à l'ère des AAD | 53 |
| 1.8.2. Importance et impact potentiel d'un vaccin contre le VHC | 55 |
| 1.8.3. Stratégies vaccinales contre le VHC | 56 |
| 1.8.3.1. Réponse humorale : les vaccins recombinant sous unitaire | 57 |
| 1.8.3.2. Réponse cellulaire: les vaccins vecteurs viraux | 58 |
| 1.8.4. Défis associés au développement et l'expérimentation d'une stratégie vaccinale efficace | 60 |
| 1.9. Analyse transcriptomique de la réponse immunitaire | 62 |
| 1.9.1 Profil d'expression de génique | 62 |
| 1.9.1.1. Principe | 62 |
| 1.9.1.2. Technologies | 62 |
| 1.9.2. Analyse transcriptomique de la réponse immunitaire | 63 |
| 1.9.2.1. Enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) | 64 |
| 1.9.2.2. Base de données | 65 |
| 1.9.2.3. Analyse d'enrichissement au niveau de l'échantillon | 66 |
| 1.9.3. Réponse transcriptomique de la phase aigüe de l'infection par le VHC | 66 |
| 1.9.3.1. Biopsies hépatiques | 67 |
| 1.9.3.2. PBMC totaux | 67 |
| 1.9.3.3. Lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC | 68 |
| 1.9.4. Réponse transcriptomique des stratégies vaccinales contre le VHC | 69 |
| 1.10. Comblent les lacunes en matière de connaissances des corrélats de l'immunité protectrice contre le VHC | 70 |
| <i>Chapitre 2 Hypothèses</i> | 70 |
| <i>et Objectifs</i> | 70 |
| <i>Chapitre 3 Manuscrit 1</i> | 73 |

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Chapitre 4 Manuscrit 2 | 124 |
|---------------------------------------|------------|

| | |
|--|------------|
| Chapitre 5 Discussions et Conclusions | 174 |
|--|------------|

| | |
|--|------------|
| 5.1. Premier Manuscrit - Expansion de lymphocytes T CD8 publics uniques spécifiques au virus de l'hépatite C au cours des infections primaires aiguës et réinfections | 176 |
| 5.1.1. Répertoire des TCR β diversifié indépendamment de l'issue de l'infection | 176 |
| 5.1.2. Identification de treize clonotypes publics indépendamment de l'issue de l'infection | 177 |
| 5.1.3. Expansion des clonotypes publics au cours de la réinfection par le VHC | 178 |
| 5.1.4. Reconnaissance limitée des épitopes restreints par HLA-A*02 par les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 | 179 |
| 5.1.5. Limitations de l'étude | 181 |
| 5.2. Deuxième manuscrit - Réponses concertées des lymphocytes T et B spécifiques du VHC au cours de l'élimination spontanée de la réinfection | 181 |
| 5.2.1. Signatures transcriptomiques associées à une réponse humorale au cours de la phase aiguë précoce de la réinfection en comparaison de la primo-infection par le VHC | 181 |
| 5.2.2. Signatures transcriptomiques associées aux lymphocytes T fortes après le rappel du vaccin contre le VHC chez des sujets sains..... | 183 |
| 5.2.3. Signatures transcriptomiques associées aux lymphocytes B absentes après le rappel du vaccin contre le VHC chez des sujets sains..... | 184 |
| 5.2.4. Activation et expansion des LBM spécifiques à E2 rapidement après une réexposition au VHC | 185 |
| 5.2.5. Augmentation concertée des réponses des lymphocytes T et B spécifiques du VHC au cours de la phase aiguë précoce | 186 |
| 5.2.5. Limitations de l'étude | 188 |
| 5.3. Importance de nos études | 190 |
| 5.3.1. Rôle de la réponse humorale versus cellulaire dans le contrôle de l'infection primaire et secondaire par le VHC | 190 |
| 5.3.2. Impact de nos études sur le design d'une stratégie vaccinale contre le VHC..... | 197 |
| 5.3.3. Évaluation de l'efficacité des stratégies vaccinales contre le VHC | 198 |
| 5.3.4. Conclusions | 200 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre 6 Perspectives | 201 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| 6.1. Caractérisation longitudinale de la réponse humorale chez les sujets développant une infection chronique après réinfection | 202 |
| 6.2. Caractérisation de la cinétique, du phénotype et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC au cours de la réinfection chez les sujets SR versus CI | 202 |
| 6.3. Caractérisation des corrélats de l'immunité protectrice au niveau transcriptomique par une approche sc-RNA-seq | 204 |
| 6.4. Séquençage du génome viral | 204 |
| 6.5. Caractérisation approfondie de la restauration immunitaire adaptative spécifique du VHC après le traitement par les AADs | 205 |
| 6.6. Conclusions finales | 206 |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Chapitre 7 Références | 207 |
|--------------------------------------|------------|

Chapitre 8 | Appendices* *i

APPENDIX I | Article publié dans Journal of Immunology (Manuscrit 1 – Chapitre 3)...ii

APPENDIX II | Article additionnel..... xxi

 Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus
 infection in patients with spontaneous viral clearance xxi

Curriculum Vitae..... xxvii

Liste d'abréviation

A

AAD | Antiviraux à actions directe

ACP | Analyse en composantes principales

Ad6 et Ad24 | Adénovirus de sérotype 6 et 24

ADNc | ADN complémentaire

Alb-uPa | Promoteur albumine – Plasminogène de type urokinase

ALT | Alanine aminotransférase

ApoB | Apo lipoprotéines B

ApoE | Apo lipoprotéines E

AR3 | Région antigénique 3

ARNm | ARN messenger

ARNsb+ | ARN simple brin de polarité positive

ASC | Antibody secreting cells (cellules sécrétrices d'anticorps)

B

BCR | B-cell receptor

Blys-BAFF | B lymphocyte stimulator – B-cell activating factor (Stimulateur de lymphocytes B)

C

CCR6 | C-C Motif Chemokine Receptor 6

CD | Cellules dendritiques

CD4 CTL | Lymphocytes T CD4 cytotoxiques

CD8-ML | Lymphocyte T CD8 « memory-like »

CD8-TE | Lymphocyte T CD8 en phase terminales d'épuisements

CDRs | Complementarity determining regions (régions déterminants la complémentarités)

CG | Centre germinatif

CH | carcinome hépatocellulaire

ChAd | Vecteurs viraux à adénovirus de chimpanzé non réplicatifs

CLDN1 | Claudine 1

CPA | Cellules présentatrices d'antigènes

CSR | Class-switch recombination (commutation de classe)

cT_{FH} | Circulating follicular helper T cells (Lymphocytes T CD4 folliculaires auxiliaires circulant)

CTLA-4 | Cytotoxic T-lymphocyte protein 4

CXCR5 | *Chemokine C-X-C motif receptor 5*

D

DEG | Differentially expressed genes (expression différentielle des gènes)

E

EGFR | Epidermal growth factor receptor (récepteurs de facteur de croissance épidermique)

ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay (dosage immune-enzymatique)

ELISPOT | Enzyme-linked immunospot (Immunospot enzymatique)

Eomes | Eomesodermin

EphA2 | Éphrine de type A2

ES | Score d'enrichissement

F

FDR | False discovery rates (taux de fausses découvertes)

FLU | Influenza

FOXP3 | Forhead box P3

G

GAG | glycosaminoglycanes

GBD | Global Burden Diseases (charge mondiale de morbidité attribuable aux maladies)

GO | Gene ontology (Nom de la base de donnée)

gpE1|E2 | Glycoprotéines E1|E2

GSEA | Gene Set Enrichment Analysis (enrichissement des ensembles de gènes)

GWAS | Genome-wide association study

H

HARSAH | Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes

HARSAH-VIH+ | Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes positifs au virus de l'immunodéficience humaine

HLA | Human leukocyte antigen

HS | Héparanes sulfates

HV-Eq | Hépacivirus équin

HV-Nr | Hépacivirus identifier chez les rats Norvège

HVR-1 | Région Hypervariable 1

I

IFN | Interférons

Ig | Immunoglobuline

IL28B | Interleukine-28B

IP-10 | Protéine-10 induite par l'interféron γ

IRES | Internal ribosome entry site (Site d'entrée des ribosomes)

IRF | Facteur régulateur de l'IFN

ISG | Gènes stimulés par l'interféron

ISGF3 | Facteur génique stimulé par l'IFN 3

J

JFH1 | Japanese fulminant hepatitis 1

K

KLRG1 | Killer cell lectin-like subfamily G member 1

L

LBM | Lymphocytes B mémoires

LCMV | Virus de la chorioméningite lymphocytaire

LD | Lipid droplets (gouttelettes lipidiques)

LDLR | Low-density lipoprotein receptor (récepteurs aux lipoprotéines de faible densité)

LVPs | Lipovirions (particules lipovirales)

M

MAVS | Mitochondrial antiviral signalling protein

MB | Membranous web (Réseau membranaire)

mCD | Cellules dendritiques myéloïdes

MDA5 | Melanoma differentiation-associated protein 5

MHC-I ou MHC-II | Molécules d'histocompatibilité de classe I ou II

MSigDB | Base de données des signatures moléculaires

MVA | Vaccine modifiée Ankara

N

nAbs | Neutralizing antibodies (Anticorps neutralisants)

NES | Normalized enrichment score (score d'enrichissement normalisé)

NF- κ B | Facteur nucléaire kappa B

NK | Natural killers

NGS | Next-generation sequencing (séquençage à haut débit de nouvelle génération)

NPLT | Non progresseurs à long terme

O

OCLN | Occludine

OLII | Organes lymphoïdes secondaires

OMS | Organisation Mondiale de la Santé

ORF | Open Reading Frame (Cadre de lecture ouvert)

OXPHOS | Phosphorylation oxydative

P

PAMP | Pathogen associated molecular patterns (modèles moléculaires associés à des agents pathogènes)

PBMC | Peripheral blood mononuclear cells (Cellules mononucléées du sang périphérique)

pCD | Cellules dendritiques plasmacytoïdes

p-CMH | Peptides-CMH

PD-1 | Programmed death-1

PEG-IFN α /RBV | Interféron- α pégylé et ribavirine

PRR | Pattern Recognition Receptors

R

RdRp | ARN polymérase ARN-dépendante

RE | Réticulum Endoplasmique

RIG-I | Receptors retinoic acid-inducible gene I

rgpE1|E2 | glycoprotéines E1|E2 recombinantes

RNA-seq | RNA-sequencing

Rt-PCR | Real-time RT-polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par RT-polymérase en temps réel)

RVS | Réponse virologique soutenue

S

SCID | Severe combined immunodeficiency (Immunodéficience sévère combinée)

SLEA | Sample level enrichment analysis (analyse d'enrichissement au niveau de l'échantillon)

SMH | Hypermutation somatique

SR-BI | Scavenger de classe B type 1

STAT | Signal transducer and activator of transcription

T

TAO | Traitements par agonistes opioïdes

T-bet | (T-box expressed in T-cells)

T_{EM} | Lymphocytes T effecteurs mémoires

T_{CM} | Lymphocytes T mémoires centrales

TCR | T-cell receptor

T_{FH} | Follicular helper T cells (Lymphocytes T CD4 folliculaires auxiliaires)

T_{FR} | Lymphocytes T CD4 folliculaires régulateurs

T_H | Helper T cells (Lymphocytes T CD4 auxiliaires)

TIGIT | T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains

TIM-3 | T cell immunoglobulin and mucin-domaincontaining-3

TLR | Toll-like receptor

TNFRSF17 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17

TNFSF13B | TNF Superfamily Member 13b

TRAIL | Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

T_{REG} | Lymphocytes T CD4 régulateurs

TRIF | Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN β

U

UDI | Utilisateurs de drogue par voie intraveineuse

USP18 | Peptidase 18 spécifique de l'ubiquitine

UTR | Untranslated region (Régions non traduites)

V

VD | Virus de la Dengue

VFJ | Virus de la fièvre Jaune

V_H | Gène variable de la chaîne lourde

VHA | Virus de l'Hépatite A

VHB | Virus de l'Hépatite B

VHC | Virus de l'Hépatite C

VHC_{cc} | VHC culture cellulaire

VHC_{pp} | VHC pseudoparticules

VHNANB | Virus de l'Hépatite non-A non-B

VIH | Virus de l'immunodéficience humaine

VNO | Virus du Nil Occidental

VLDL | Very low-density lipoprotein (lipoprotéines de très faibles densité)

VZ | Virus Zika

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 | Distribution géographique mondiale des géotypes du VHC

Figure 2 | Histoire naturelle de l'infection par le VHC

Figure 3 | Cibles des antiviraux à action directe

Figure 4 | Organisation structurale du génome et polyprotéine précurseur du VHC

Figure 5 | Cycle de réplication du VHC

Figure 6 | Modèles d'études in vitro

Figure 7 | Induction de la réponse immunitaire innée antivirale après infection par le VHC

Figure 8 | Les récepteurs de l'immunité adaptative

Figure 9 | Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des réponses

immunitaires cellulaires associées à l'issue dichotomique de l'infection par le VHC

Figure 10 | La réaction du centre germinatif

Figure 11 | Modèle hypothétique de réponse immunitaire protectrice et non-protectrice en réponse à une réinfection par le VHC

Figure 12 | Cascade des soins du VHC

Figure 13 | Réponses immunitaires potentielles après vaccination contre le VHC

Figure 14 | Illustration de la méthode d'analyse GSEA

Figure 15 | Caractérisation longitudinale de la fréquence des LBM spécifiques de la glycoprotéine E2 et des titres d'anticorps anti-E2 au cours de la réinfection par le VHC chez trois sujets CI

*« Lis, au nom de ton Seigneur qui a créé,
qui a créé l'homme d'une adhérence.
Lis ! Ton Seigneur est le Très Noble,
qui a enseigné par la plume [le calame],
a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas. »*

Coran Sourate 96 – Versets 1 à 5

*A mes parents et ma famille en France et Algérie
À mes proches qui nous ont quittés (paix à leurs âmes)*

Remerciements

Bien qu'un seul auteur soit mentionné, une thèse de doctorat est le fruit d'un effort collectif regroupant famille, amis et collègues. Ces quelques lignes ne pourront jamais retranscrire l'incroyable contribution que vous avez apportée à ce modeste travail.

Dans un premier temps, j'aimerais remercier le Dr. Shoukry ainsi que les membres de son équipe passés et présents : Nathalie Bédard, Sarah Tran, Jessica Dion et Maude Boisvert. Merci également aux étudiants de l'équipe pour d'innombrables discussions, pour leur esprit d'équipe et pour m'avoir permis de participer à leurs projets de recherche : Asiyah Siddique, Manuel Flores, Mohamed Abdelnabi et Samaa Groban. Ce fut un plaisir de travailler au côté d'étudiants\chercheurs exemplaires. Un merci à Omar Khedr pour son travail et son aide apportée à mes projets de recherche. Merci à Elsa Brunet-ratnasingham, ma voisine de bureau, pour son optimisme sans faille et pour nos discussions scientifiques.

Un grand merci à l'ensemble des collaborateurs qui ont contribué aux deux articles de recherche inclus dans cette thèse. Un merci tout particulier au Dr. Ali Filali pour m'avoir apporté toute l'expertise bio-informatique cruciale pour mon second article de recherche, ainsi que pour son soutien et aide apportés pour la présentation de mes recherches en Corée du Sud. Merci aux scientifiques et étudiants du CRCHUM pour les échanges et interactions au cours du journal club et autres séminaires. Un grand merci aux membres de mon comité d'examen pré-doctoral : Dr. Nicole Bernard, Dr. Daniel Kaufmann et Dr. Alain Lamarre, ainsi qu'aux membres du comité de soutenance de thèse : Dr. Daniel Kaufmann, Dr Alain Lamarre, Dr. Rafei Moutih et Dr. Étienne Gagnon.

Un grand merci à l'organisme qui a financé mon doctorat : le Réseau Canadien sur l'Hépatite C (CanHepC), ainsi qu'à tous les membres, chercheurs et étudiants, de l'organisme. Un énorme merci à Norma Choucha pour son travail exemplaire, son optimisme sans faille et sa bienveillance tout au long de mon doctorat. Merci aux membres du Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal qui m'ont permis de finaliser cette thèse dans de « meilleures » conditions.

Je tiens à remercier de tout mon cœur ma famille en France et en Algérie. Un grand merci à ma mère pour sa patience et son soutien indéfectible depuis toujours, ainsi qu'à mes frères et ma sœur. Merci à tous mes ami(e)s en France et Canada pour leurs soutiens indéfectibles. Un merci tout particulier à Simane, Raïssa et Mahmoud pour avoir écouté inlassablement et avec patience toutes mes péripéties, ainsi que pour leur soutien. Un très grand merci également à Jocelyne Amara pour avoir pris le temps de corriger ma thèse.

Merci à toutes et à tous.

Chapitre 1 | Introduction

Une partie de cette introduction a été utilisée pour écrire la revue scientifique suivante :

Reversing immune dysfunction and liver damage after direct-acting antiviral treatment for hepatitis C.

Sabrina Mazouz MSc^{1,2}, Maude Boisvert PhD¹, Naglaa H Shoukry BPharm, PhD^{1,3},
Daniel Lamarre PhD^{1,3}

¹ Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),
Montréal, Québec;

² Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, Montréal, Québec;

³ Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal,
Québec

1.1. Contexte historique

C'est en 1975 que l'équipe de Dr. Harvey Alter a reporté pour la première fois l'existence d'un agent infectieux non identifié responsable d'hépatites chez 22 receveurs de transfusion sanguine. Les tests sérologiques contre les virus de l'hépatite A (VAH) et B (VHB) étant non concluants, ce nouvel agent infectieux fut alors nommé hépatite non-A, non-B (VHNANB) (1). C'est 14 ans plus tard, en 1989, que l'équipe du Dr. Michael Houghton a identifié, après un travail laborieux de criblage, un clone unique d'ADN complémentaire (ADNc) du virus produit à partir du sérum d'un chimpanzé expérimentalement infecté par le VHNANB. La même année, l'équipe du Dr. Charles Rice a également découvert le virus qui fut finalement nommé le virus de l'Hépatite C (VHC) (2, 3). Cette découverte a eu un impact important sur les stratégies en matière de santé publique, puisque fut introduit à partir de 1992 un test de dépistage du VHC au sein des banques de sang afin d'éliminer définitivement la contamination par transfusions sanguines (4). En 2020, les Docteurs Michael Houghton Charles Rice et Harvey Alter ont obtenu le prix Nobel de médecine pour la découverte du VHC.

1.2. L'infection par le VHC

1.2.1. Epidémiologie

L'infection par le VHC est un problème majeur de santé publique mondial. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 58 million de personnes sont infectées par le VHC à travers le monde (5). Annuellement, on dénombre environ 1.75 million de nouveaux cas d'infection, ainsi que 400.000 décès reliés au VHC (5). L'OMS a adopté en 2016 une stratégie globale d'élimination des hépatites virales avec pour objectifs une réduction des nouvelles infections par le VHB et VHC de 90%, et de la mortalité de 60% d'ici 2030 (6).

Les pays les plus touchés par le VHC sont la Chine, le Pakistan, l'Inde, le Nigeria, l'Égypte et la Russie, comptant pour plus de la moitié des cas d'infection mondiale (7). Le nombre d'infectés au Canada a été estimé à 30,4 cas pour 100000 personnes en 2019 (8). Les différents génotypes ont une répartition géographique variable. A l'opposé des génotypes 1, 2 et 3 qui ont une distribution géographique large, les autres génotypes sont plus confinés à des régions spécifiques (**Figure 1**, (7, 9, 10)). A l'échelle mondiale, les génotypes 1, 3 et 4 sont les plus prévalents et comptent pour 44%, 25% et 15% des infections par le VHC, respectivement (7).

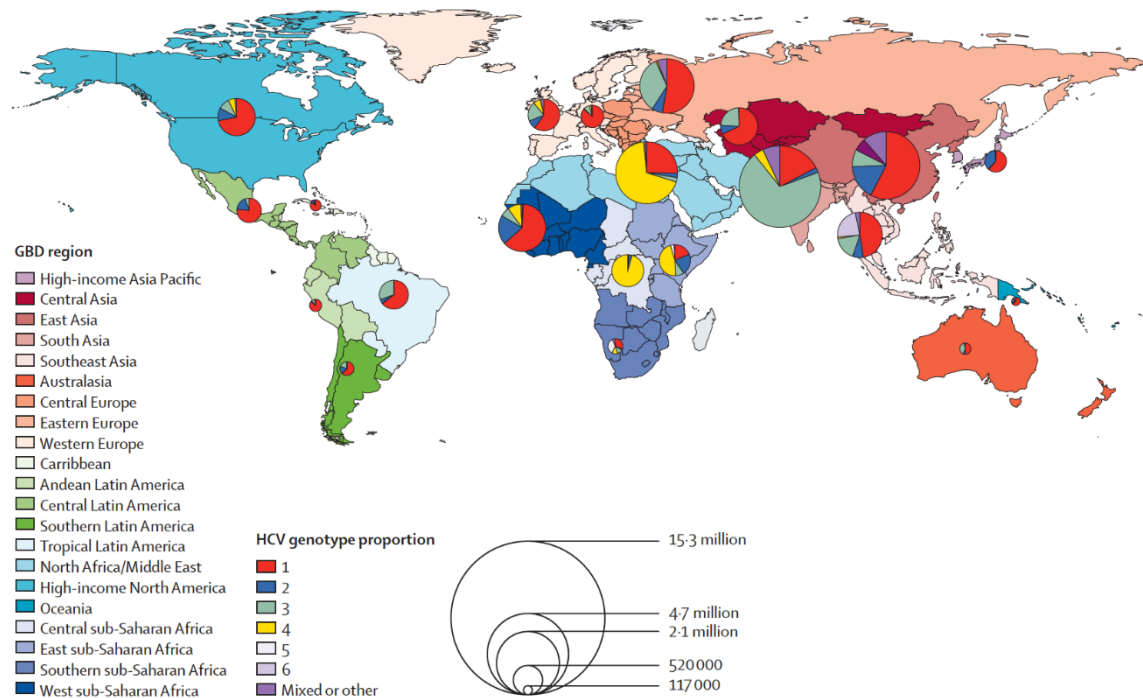


Figure 1 | Distribution géographique mondiale des génotypes du VHC (Adapté de Spearman *et al.* 2019 (7)) (GBD. De l'anglais *global Burden Diseases* ou charge mondiale de morbidité attribuable aux maladies)

1.2.2. Transmission de l'infection

Le mode de transmission principal du VHC est la voie sanguine (parentérale). Une infime quantité de sang contaminé suffit pour transmettre le VHC. Les transfusions de sang non dépisté, le partage de seringues et autres matériaux servant à la préparation de drogue, ainsi que l'utilisation d'équipements médicaux non stérilisés, font partie des principales procédures comportant le plus grand risque de transmission du VHC (5, 11). Les pratiques médicales dangereuses contribuent le plus à la transmission iatrogène du VHC dans les pays en développement à haute prévalence d'infection tels que l'Égypte (12) et le Pakistan (13). A l'inverse, l'utilisation de drogue par voie intraveineuse est le mode de transmission le plus répandue au sein des pays développés tels que la Grande-Bretagne (14) et les États-Unis (15). Au Canada, les utilisateurs de drogue par voie intraveineuse (UDI) comptent pour environ 85% des nouvelles infections par le VHC (16).

Depuis 2000, la transmission sexuelle du VHC a émergé comme facteur à risque d'infection, en particulier parmi les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAH) positifs au virus de l'immunodéficience humaine (VIH; HARSAH-VIH+) (17). L'utilisation concomitante de drogues par voie intraveineuse par les HARSAH-VIH+ augmente le risque de contracter le VHC (18). La transmission du VHC parmi les couples monogames hétérosexuels est quant à elle plus rare, avec une prévalence de 0.6% (19).

Le risque de transmission verticale (i.e. de la mère à son enfant lors de la grossesse ou l'accouchement) est de 5.8% chez les mamans mono-infectées. Une co-infection VHC-VIH augmente le risque de transmission du VHC à 10.8% (20).

Les hémodialyses (21), ainsi que les tatouages et piercing dans les milieux carcéraux (22) sont d'autres modes de transmission du VHC décrits dans la littérature.

1.2.3. Histoire naturelle de l'infection par le VHC

1.2.3.1. Phase aiguë de l'infection

L'infection aiguë par le VHC est dans la majorité des cas asymptomatique. Entre 20 à 30% des patients infectés présentent des symptômes, tels que faiblesse, malaise et jaunisse. Ces derniers apparaissent généralement entre 3 à 12 semaines après exposition virale (23).

Les anticorps anti-VHC sériques sont détectables seulement 12 semaines après le début de l'infection. En présence d'une sérologie anti-VHC positive, un test d'amplification des acides nucléiques est effectué afin de confirmer le diagnostic (24). De par sa nature asymptomatique, non seulement le diagnostic et le traitement de l'infection sont retardés, mais aussi le risque de transmission est augmenté.

L'évolution naturelle de l'infection par le VHC à la particularité unique d'aboutir à deux résultats clinique et virologique dichotomiques. En effet, dans ~30% des cas, le virus est complètement éliminé par le système immunitaire durant la phase aiguë de l'infection, soit dans les 24 semaines suivant l'exposition virale. Le sexe féminin, un taux élevé d'alanine aminotransférase (ALT), ainsi qu'une forte concentration de la protéine-10 induite par l'interféron γ (IP-10, aussi appelé CXCL10) sont des facteurs associés à l'élimination spontanée du VHC (25-27). A l'opposé, dans ~70% des cas, l'infection virale persiste au-delà des 24 semaines (i.e. infection chronique) (**Figure 2** (28)). Cependant, une élimination spontanée est observée dans 0.5-0.74% des cas d'infection chronique par le VHC chaque année (29, 30). Plus souvent causé par les virus de l'hépatite A (VHA) et B (VHB) (31), l'hépatite fulminante est quant à elle très rare dans le cas du VHC (<1%), et est souvent favorisée par certains cofacteurs tels que les co-infections par le VHB et VIH (32).

1.2.3.3. Infection chronique

Sans traitement, l'infection chronique progresse dans 15-25% des cas vers une cirrhose du foie, qui une fois établie, aboutit au développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) chez 3% des patients par année, dans les 10-40 ans suivant l'exposition virale (**Figure 2** (28)). Plusieurs facteurs sont associés à une progression plus rapide des maladies hépatiques parmi lesquels, le sexe masculin, un âge avancé (>50 ans), une consommation d'alcool élevée, ou encore une co-infection par le VIH ou le VHB (33). Les génotypes 3 (34) et 6 (35) du VHC sont également associés à un risque plus élevé de CH. Ces maladies hépatiques font du VHC l'indication principale des transplantations hépatiques dans les pays développés (36).

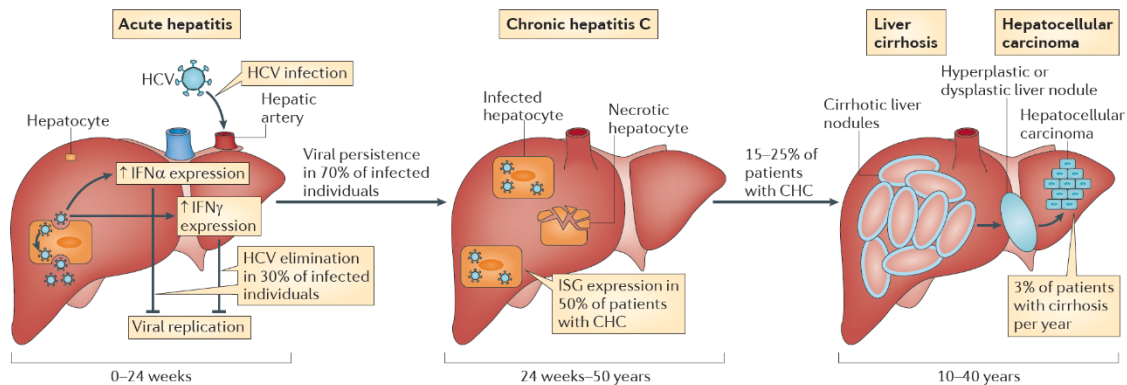


Figure 2 | Histoire naturelle de l'infection par le VHC (Adapté de Heim M.H., 2013 (28))

L'interféron- α pégylé et ribavirine (PEG-IFN α /RBV) a longtemps été la combinaison standard pour le traitement de l'infection chronique par le VHC. Depuis 2011, les antiviraux à action directe (AAD) ciblant et inhibant les protéines clés du cycle viral du VHC sont disponibles et sont extrêmement robustes avec un taux de réponse virologique soutenue (RVS) d'environ 95%, (37, 38).

Avant 2011, PEG-IFN α /RBV a été la combinaison standard pour le traitement du VHC. Ce traitement s'est avéré être modérément efficace avec l'obtention d'une RVS dans environ 40 à 80% des cas en fonction du génotype d'infection (39, 40).

De plus, le traitement PEG-IFN α /RBV a été long (48 semaines) et associé à de nombreux effets secondaires dont, entre autres, des maux de têtes et nausées (41). Depuis 2011, les AAD ciblant et inhibant les protéines clés du cycle viral du VHC sont disponibles (**Figure 3**, (42)). Les AAD présentent plusieurs avantages dont être pan-génotypiques (i.e. efficaces contre plusieurs génotypes), extrêmement robustes avec un taux de RVS d'environ 95%, d'une durée de traitement court (12 semaines), et associés à des effets secondaires minimes (37, 38). Depuis 2011, de nombreuses équipes ont entrepris l'étude de la restauration de la réponse immunitaire spécifique du VHC après élimination de l'infection par les AAD.

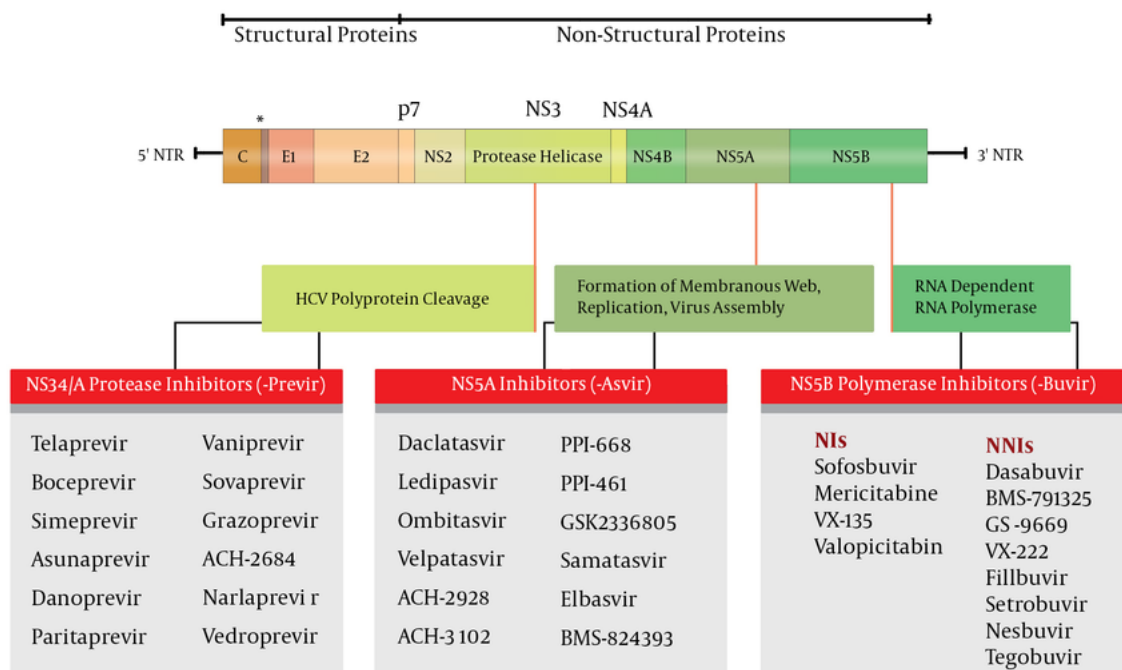


Figure 3 | Cibles des antiviraux à action directe (Adapté de Alavian *et al.* (43))

Les AAD se divisent en trois catégories en fonction de leur cible : 1) les inhibiteurs de la protéase NS3/4A qui vont permettre le blocage de la maturation des protéines virales; 2) les inhibiteurs de la protéine virale NS5A qui eux vont agir sur la formation des MW et la réplication virale; 3) Les inhibiteurs de la polymérase virale NS5B sont sous-divisés en deux catégories : A) les inhibiteurs nucléosidiques (NI) qui vont permettre le blocage de la synthèse de l'ARN virale et B) les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNI) qui eux vont agir sur la fonction catalytique de la protéine virale NS5B.

1.3. Le virus de l'Hépatite C

1.3.1. Taxonomie

Le VHC appartient au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae* (44); cette dernière incluant également les virus de la fièvre jaune (VFJ), du Nil occidental (VNO), de la dengue (VD) et du zika (VZ).

1.3.2. Génome

Le VHC est un virus enveloppé de 50-80 nm dont le génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive (ARNsb+) d'environ 9.6 kilobase. Cet ARN linéaire contient un unique cadre de lecture ouvert (ORF, de l'anglais *open reading frame*) codant pour une large polyprotéine précurseur (**Figure 4**) (45). La traduction et la réplication de l'ARN génomique sont régulées par deux régions non traduites (UTRs: *untranslated regions*) en 5' et 3' (46). L'initiation de la traduction s'opère en 5'UTR via le site interne d'entrée des ribosomes (IRES : *internal ribosome entry site*) (47). Ce dernier contient deux sites d'hybridation d'un micro-ARN (miR-122) (**Figure 4**) (48). Spécifiquement exprimé dans les cellules hépatiques, le miR-122 favorise la réplication et la traduction du VHC (49, 50) et stabilise la région 5'UTR en la protégeant de la dégradation par l'exonucléase Xrn1 (49-51). Essentielle à la réplication du VHC (52), la partie 3'UTR est quant à elle constituée trois éléments: une région variable, une séquence répétée poly-U/UC et une région hautement conservée nommée X-tail (53, 54).

1.3.2. Protéines virales

La polyprotéine précurseur du VHC est clivée par l'action combinée de protéases cellulaires puis virales, libérant trois protéines structurales (core, E1 et E2), et sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (**Figure 4**).

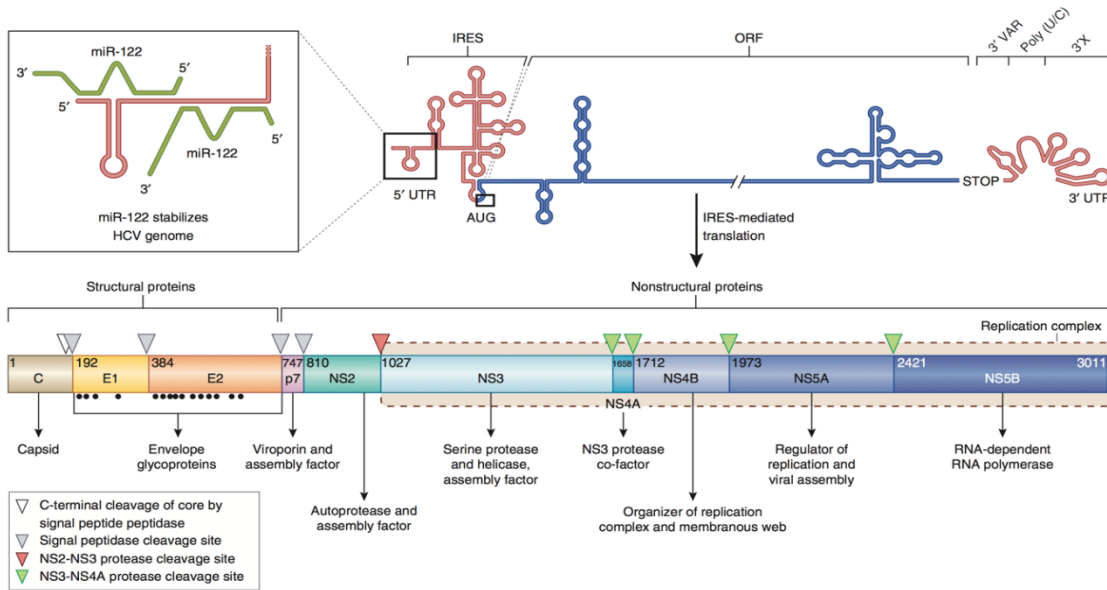


Figure 4 | Organisation structurale du génome et polyprotéine précurseur du VHC
(Adapté de Scheel et Rice 2013 (45))

1.3.2.1. Protéines structurales

Core | Première protéine structurale alignée sur l'ORF, la protéine core interagit avec l'ARNsb+ pour former la nucléocapside du VHC (55). Core est très conservée d'un génotype à l'autre (56) et a un rôle dans la régulation de nombreux processus cellulaires incluant la prolifération cellulaire, l'apoptose, mais également la modulation de la réponse immunitaire (57).

E1 et E2 | Les glycoprotéines E1 et E2 (gpE1|E2) s'associent au niveau du réticulum endoplasmique (RE) pour former des hétérodimères non covalents (58). Ces hétérodimères E1|E2 sont incorporées dans l'enveloppe lipidique du VHC lors du bourgeonnement des virions (59) et sont essentielles pour l'entrée virale (60). E2 contient, au niveau de l'extrémité N-terminale, la région hypervariable 1 (HVR-1) qui est la cible des anticorps neutralisants (nAbs, de l'anglais *neutralizing antibodies*) (61).

1.3.2.2. Proteines non structurales

P7 | La protéine P7 est une petite protéine hydrophobe, de la famille des viroporines, qui s'assemble en hexamère pour former un canal ionique. Elle joue un rôle dans l'assemblage et le relargage des virions (62-64).

NS2 | La protéine NS2 est une protéase dont l'activité catalytique réside dans sa partie C-terminale (65). NS2 se libère par auto-clivage de la protéase NS3 (66). De par son interaction avec la protéine p7, NS2 participe à la formation des particules virales (67, 68).

NS3 et NS4A | La protéine NS3 est la deuxième protéase du VHC. Elle possède un domaine sérine protéase dans son tiers N-terminal qui, avec son cofacteur NS4A (69), permet de cliver les protéines virales situées en aval (56, 70). NS3 possède aussi dans les deux tiers C-terminal un domaine NTPase/hélicase essentiel pour la réplication et traduction du génome viral (71). NS3 et NS4A ont également un rôle dans l'assemblage des virions (72, 73).

NS4B | NS4B est responsable de la biogénèse d'un réseau multivésiculaire au niveau du RE appelé « membranous web » (MW), au niveau duquel elle interagit avec d'autres protéines non-structurales (NS3, NS4A, NS5A et NS5B) et l'ARN viral, pour former le complexe de réplication (74, 75). La protéine NS4B a également un rôle dans la formation des virions et leur relargage (76) mais aussi dans certains processus cellulaires incluant le stress du RE (77), et l'apoptose (78).

NS5A | Principalement localisé au niveau du RE, la protéine NS5A est impliquée dans la réplication virale (79). Des mutations d'adaptations caractérisées au sein de cette protéine entraînent une meilleure capacité répliquative en culture cellulaire (80-82). De plus, au sein du complexe de réplication, NS5A est capable de moduler la réplication du VHC via son interaction avec la polymérase NS5B (83).

NS5B | La protéine NS5B est l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale (44). L'enzyme est le centre catalytique du complexe répliquatif et est donc essentielle à la réplication du génome du VHC.

1.3.3. Le cycle viral du VHC

1.3.3.1. Attachement et entrée du virus

Le tropisme du VHC est principalement hépatocytaire. Au cours de l'infection par le VHC, les virions circulant dans le sang sont associés à des composants lipoprotéiques de faible densité riches en Apo lipoprotéines E (ApoE) et B (ApoB). Ces particules lipovirales (LVPs, de l'anglais *lipovirparticles*) traversent l'endothélium des sinusoides du foie pour enfin entrer en contact avec la membrane basolatérale des hépatocytes (84). L'attachement initial des LVPs s'opère par contact de faible affinité des glycosaminoglycanes (GAG) de type héparanes sulfates (HS) avec ApoE (85). Les LVPs interagissent ensuite de façon séquentielle avec les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDLR, de l'anglais *low-density lipoprotein receptor*), puis scavenger de classe B type 1 (SR-B1) et tétraspanine CD81 (86). L'interaction entre le récepteur SR-B1 et HVR-1 induit un réarrangement de la bicouche lipidique du LVP permettant ainsi d'exposer le site d'interaction de CD81 situé au sein de la glycoprotéine E2 (87). Les récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFR, de l'anglais *epidermal growth factor receptor*) et éphrine de type A2 (EphA2) sont également requis pour l'entrée du virus (88). Après translocation au niveau de la jonction étanche des hépatocytes, les LVPs s'attachent aux récepteurs claudine 1 (CLDN1) et occludine (OCLN) résultant en leur internalisation par endocytose dépendante de la clathrine. Sous l'effet d'un pH acide, la membrane de l'endosome et l'enveloppe virale fusionnent, permettant ainsi la libération du génome du VHC dans le cytoplasme de la cellule infectée (**Figure 5**) (86). Bien que les LVPs interagissent avec plusieurs récepteurs à la surface des hépatocytes, seul quatre principaux sont nécessaire pour l'entrée virale: CD81, SR-B1, CLDN1 et OCLN (89).

1.3.3.2. Traduction et réplication

La traduction du génome viral est initiée au niveau des MW par le recrutement direct de la sous-unité ribosomale 40S par l'IRES situé en 5'UTR (90). La polyprotéine précurseur résultante est clivée dans un premier temps par le signal peptidase du RE, puis par les protéases virales NS2/3 et NS3/4A comme susmentionnée (section 1.3.2.2.) (91).

Le complexe de réplication, composé des protéines virales NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B, est responsable de l'initiation de la réplication. A partir de l'ARN du VHC, NS5B synthétise dans un premier temps un ARN complémentaire négatif qui sert de matrice pour la production de nombreux ARNs^{b+} qui seront soit encapsidés lors de la formation des virions, ou serviront d'ARN messagers pour la production des protéines virales (92).

1.3.3.3. Assemblage et relargage des virions

L'assemblage des LVPs nécessite une organisation spatiale et temporelle des protéines virales et du génome du VHC (93). L'assemblage de la nucléocapside du VHC est initié par l'interaction de la protéine core avec l'ARN viral (55) et les gouttelettes lipidiques (LDs, de l'anglais *lipid droplets*) (94). Cette dernière est essentielle pour le recrutement des autres protéines virales structurales et non structurales nécessaires à l'assemblage des LVPs. Les hétérodimères E1|E2, de par leurs interactions avec NS2 et p7, migrent à proximité des LDs où a lieu l'assemblage et le bourgeonnement des virions (**Figure 5**) (67, 68). Lors de leur biogénèse, les particules virales s'associent à des lipoprotéines de très faible densité (VLDL, de l'anglais *very low-density lipoprotein*) ainsi qu'à ApoB et ApoE pour former les LVPs. Les LVPs sont finalement évacuées par voie de sécrétion des VLDL ou par voie de sécrétion des endosomes (93). Au cours de cette dernière étape, la protéine virale p7 est nécessaire à la stabilité des LVPs grâce à sa capacité à moduler le pH des compartiments intracellulaires (64).

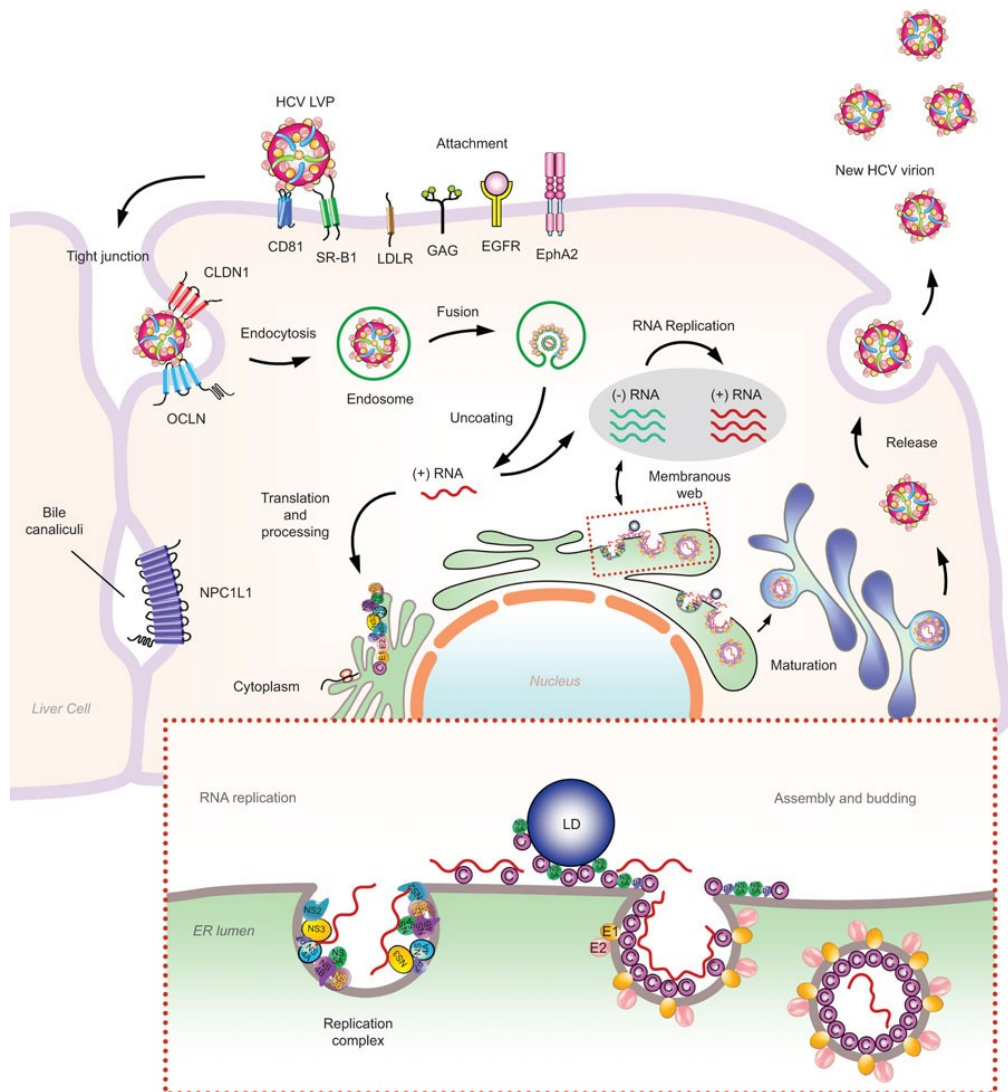


Figure 5 | Cycle de réplication du VHC (Adapté de Wong et al 2016 (86))

Les LVPs, recouverts des ApoB et ApoE, interagissent avec les récepteurs CD81 et SR-B1, ainsi que OCLN et CLDN1 au niveau des jonctions serrées, puis sont internalisés par endocytose dépendante de la clathrine. La membrane de l'endosome et l'enveloppe virale fusionnent, libérant ainsi l'ARN viral. Au niveau du RE, ce dernier est transcrit et clivé en 10 protéines structurales et non structurales. Les protéines NS4B et NS5A du VHC induisent la formation des « membranous web » où se déroule la réplication du génome viral et la biogénèse des LVPs.

1.3.4. Variabilité génétique

Une des caractéristiques importantes du VHC est sa variabilité génétique qui s'exprime à deux niveaux : le génotype et la quasi-espèce.

Basé sur le séquençage et l'analyse phylogénétique des régions core/E1 et NS5B, le VHC a été classifié en 8 génotypes (e.g. génotype 1, 2, 3 etc.) et 90 sous-types (e.g. 1a, 1b, 1c, etc.) (95, 96). L'ensemble des sous-types sont de génotypes 1 à 7. Le génotype 8, récemment isolé chez quatre individus en Inde, ne contient qu'un seul sous-type à ce jour (95). Au niveau nucléotidique, les génotypes diffèrent l'un de l'autre à hauteur de 30%, tandis que les sous-types présentent une variation de 15% (97).

De plus, un niveau élevé de production virale (environ 10^{12} virions par jour), couplé à un taux de mutations très important au cours de la réplication, et à un manque d'activité exonucléasique 3' → 5' correctrice de l'ARN polymérase NS5B, entraîne la circulation au sein d'un même individu de multiples variants viraux apparentés nommés « quasi-espèces » (98, 99). Par ce processus, le virus échappe à la pression de sélection liée aux réponses cellulaire et humorale, tout en gardant une capacité répliquative (en anglais, *viral fitness*) élevée. La circulation des quasi-espèces a un rôle majeur dans la persistance de l'infection et dans l'échec des traitements grâce à la sélection graduelle de variants viraux résistants (100, 101).

1.4. Étude de l'infection par le VHC: Modèles expérimentaux

L'étude des interactions hôte/virus, ainsi que l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques, nécessitent le développement de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* pertinents. Le chimpanzé, seul animal permissif, a longtemps été un modèle de choix pour l'étude de la réponse immunitaire innée et adaptative en réponse au VHC. Cependant, pour des raisons financières et surtout éthiques, l'utilisation de ce modèle n'est plus possible, forçant la communauté scientifique à développer et identifier de nouveaux modèles expérimentaux.

1.4.1. Modèles *in vitro*

1.4.1.1. Les réplicons

Les réplicons subgénomiques constituent le premier système développé permettant l'étude de la réplication cellulaire du VHC (102). Cette approche expérimentale repose sur l'utilisation d'une lignée cellulaire d'hépatomes nommée HuH-7.5 (103). Ces cellules HuH-7.5 sont transfectées avec des sous-génomés contenant un marqueur sélectionnable (Neor) sous le contrôle d'IRES, ainsi que les protéines non-structurelles (NS3-NS5B) du VHC, permettant ainsi une réplication continue de l'ARN viral (**Figure 6A**) (80, 102). L'utilisation de ce système a non seulement permis l'étude de la réplication de l'ARN du VHC et de l'immunité cellulaire (104, 105), mais également l'évaluation de nouveaux composés thérapeutiques, avec la découverte des AAD (106, 107). Malgré cela, les réplicons ne permettent pas la production de particules virales infectieuses *in vitro*, forçant le développement de nouveaux systèmes supportant l'étude de l'entrée virale.

1.4.1.2. Les pseudoparticules rétrovirales

Le développement des pseudoparticules rétrovirales (VHCpp) représente une avancée majeure permettant l'étude des mécanismes viraux associés aux glycoprotéines E1|E2, incluant l'entrée virale du VHC et l'évaluation de la neutralisation des anticorps (108-110). Les VHCpp sont produits après transfection de trois vecteurs au sein des cellules HEK 293T exprimant : 1) les protéines de capsid gag-pol du Lentivirus 2) les glycoprotéines E1|E2 et 3) un gène rapporteur tel que la luciférase (109) (**Figure 6B**). Une limitation majeure de ce système est la production des VHCpp dans des cellules non hépatocytaires (HEK-293T) qui ne produisent pas de lipides. De ce fait, l'association des virions avec les lipoprotéines n'est pas reproduite, et par conséquent, ce système ne permet pas l'étude de l'entrée virale via les récepteurs lipidiques tels que LDLR et SR-BI.

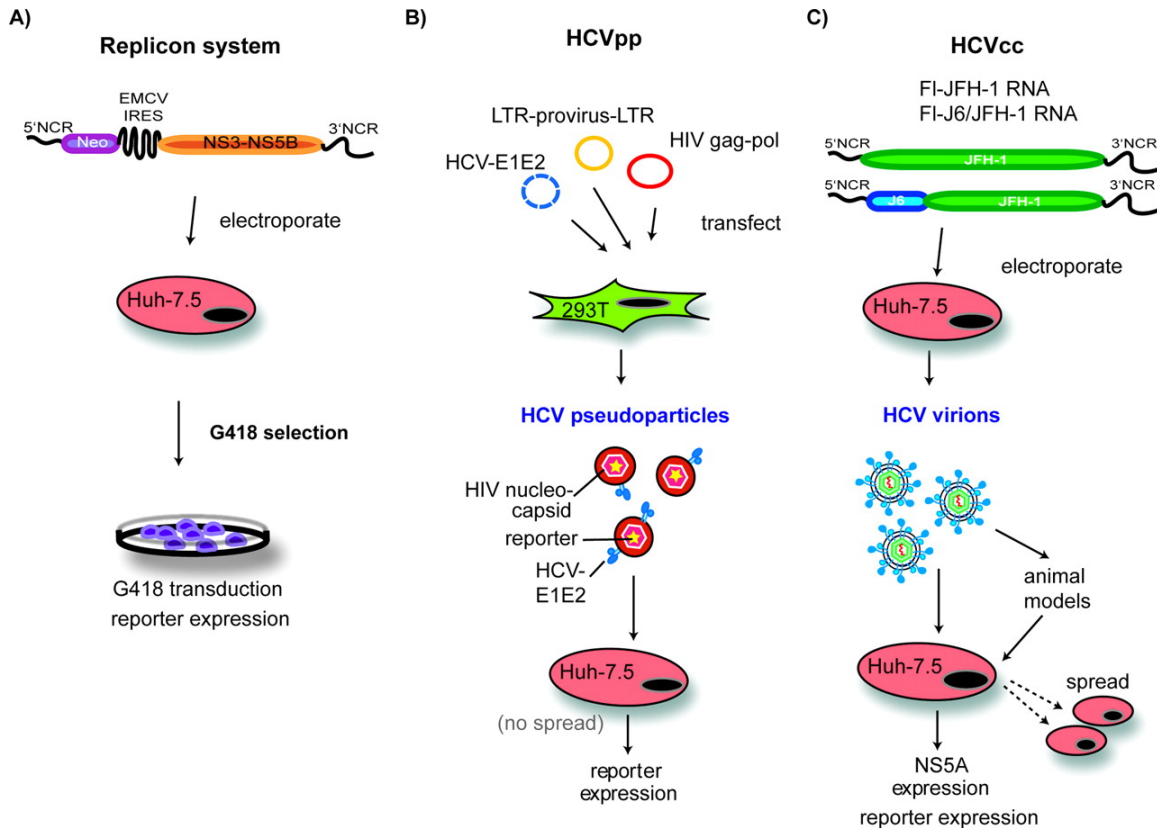


Figure 6 | Modèles d'études *in vitro* (Adapté de Tellinghuisen *et al.* (111))

A) Le système réplicon permet une répllication productive de l'ARN du VHC au sein des cellules Huh-7.5. La construction des réplicons permet également l'expression de gènes rapporteurs ou de résistance aux antibiotiques (G418) afin de mesurer ou de sélectionner les cellules répliquant l'ARN du VHC, respectivement. **B)** Le système VHCpp repose sur l'utilisation de rétrovirus recombinants contenant à leur surface gpE1|E2 du VHC générés après transfection de trois vecteurs au sein des cellules HEK-293T. La présence d'un vecteur exprimant un gène rapporteur permet une mesure quantitative de l'entrée des VHCpp au sein des cellules permissives Huh-7.5. **C)** Le système VHCcc repose sur l'utilisation des ARN génomiques JFH-1 ou J6|JFH-1 du VHC. L'électroporation de ces ARNs au sein des cellules Huh-7.5 permet la production de virions infectieux. L'évaluation d'une infection productive est possible grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs, la détection de l'expression de la protéine NS5A du VHC, ou encore la mesure de l'ARN viral.

1.4.1.3. Production de virus en culture cellulaire

Le système de production de virus en culture cellulaire (VHCcc) est le premier système permettant l'étude de toutes les étapes du cycle viral, incluant l'assemblage et la libération des virions du VHC (60, 112, 113). Ce modèle d'étude a été rendu possible grâce à la construction d'un clone JFH1 (de l'anglais, *Japanese fulminant hepatitis 1*) de génotype 2a, isolé à partir du sérum d'un japonais ayant développé une hépatite fulgurante (114). Les virions sont produits après transfection de l'ARN génomique au sein des cellules HuH-7.5 et sont utilisés pour inoculer la même lignée cellulaire *in vitro* ou infecter des chimpanzés (60) (**Figure 6C**). A ce jour, d'autres clones représentant les sept principaux génotypes ont été développés (113, 115, 116).

Bien que les modèles *in vitro* soient nécessaires pour la compréhension des étapes initiales de l'infection, ils restent artificiels. Par conséquent, les études *in vivo* sont cruciales pour imiter et se rapprocher au plus possible de l'infections naturelles par le VHC.

1.4.2. Modèles *In vivo*

1.4.2.1. Modèle Murin

Les premiers modèles murin développés pour l'étude du VHC repose sur le repeuplement du foie murin par des hépatocytes humains chez les souris immunodéficientes. L'humanisation du foie est possible grâce à l'utilisation de souris avec une immunodéficiences sévère combinée (SCID, de l'anglais *severe combined immunodeficiency*) exprimant un gène codant pour l'activateur du plasminogène de type urokinase sous le contrôle d'un promoteur d'albumine (Alb-uPa), résultant en une destruction du foie murin (117, 118). L'inoculation de ces souris Alb-uPa|SCID par le VHC a permis l'établissement d'une infection persistante (118). Un autre modèle de souris transgénique exprimant les récepteurs occludine et CD81, et capable de récapituler le cycle viral du VHC, fut également développé (119, 120).

Cependant, ces souris chimériques sont non seulement difficiles à produire, mais présentent également certaines limitations, telle que l'incapacité de reproduire les pathologies du foie liées à l'infection dont la cirrhose et le CHC (121, 122).

Une approche de métagénomique virale a été utilisée afin d'identifier de nouveaux hépacivirus infectant différents modèles animaux (123). Cette approche a conduit à l'identification d'un hépacivirus capable de se répliquer dans le foie de rats Norvège (HV-Nr) présents à New York (124, 125). L'infection de souris immunocompétente par HV-Nr est possible et résulte en une résolution spontanée 3 à 5 semaines après inoculation. L'établissement d'une infection chronique chez ces mêmes souris nécessite une déplétion des lymphocytes T CD4 avant inoculation (126). Une plus forte similitude avec l'infection par le VHC a été observée chez l'hôte naturel de HV-Nr, le rat, avec notamment l'établissement d'une infection chronique, ainsi que le développement de fibrose hépatique (127). Il existe toutefois des contrastes avec une infection par le VHC, comme notamment l'absence de lymphocytes T CD8 réactifs produisant de l'interféron γ (IFN γ) contre le HV-Nr au cours de l'infection aiguë, reporté par Atcheson *et al.* (128). Malgré cela, le rat semble être le modèle animal immunocompétent approprié pour l'étude de l'immunité antivirale contre l'analogue du VHC, HV-Nr, ainsi que pour le développement d'une stratégie vaccinale efficace (129).

1.4.2.2. Modèle Primate

Le chimpanzé est la seule espèce animale susceptible à l'infection par le VHC. Ce modèle a été déterminant dans l'identification du VHC (2), et a longtemps été le seul disponible pour l'étude de ce virus. Bien qu'il existe une homologie génétique supérieure à 98% entre l'Homme et le chimpanzé, ces deux modèles diffèrent sur plusieurs points en réponse à l'infection par le VHC. En effet, 75% versus 30-40% des infections évoluent vers la chronicité chez l'Homme et le chimpanzé respectivement (130). De plus, chez le modèle chimpanzé, peu de maladies hépatiques ont été reportées avec seulement un cas de CHC (131). Néanmoins, le chimpanzé a longtemps été le modèle expérimental de choix permettant l'étude des paramètres de l'immunité protectrice au cours de la phase aiguë de l'infection par le VHC et ce, de manière hautement contrôlée (132-138).

Ce modèle a également été utilisé pour l'évaluation de plusieurs stratégies thérapeutiques (139-142) et vaccinales (143, 144). Pour des raisons de coût mais surtout d'éthique, l'utilisation de ce modèle à des fins expérimentales n'est, à ce jour, plus possible (145).

La susceptibilité à l'infection par le VHC a été testée chez d'autres primates, sans succès (146). Néanmoins, une étude récente a utilisé le modèle macaque rhésus pour étudier la réponse humorale après immunisation avec les glycoprotéines E1|E2 du VHC (147). Chen *et al.* ont observé une cinétique et réactivité des anticorps similaires entre l'humain et le macaque rhésus. De plus, des nAbs utilisant le gène variable de la chaîne lourde (V_H) $V_{H1.36}$ identifiés chez le macaque rhésus présentent une homologie de 90% avec le gène V_{H1-69} humain (147). Le macaque rhésus semble donc être un modèle de choix pour l'évaluation des stratégies vaccinales induisant une réponse humorale.

1.4.2.1. Modèle Équin

L'hépacivirus équin (HV-Eq) fut initialement découvert chez le chien et fut naturellement nommé hépacivirus canin (148). Cependant, d'autres études ont par la suite permis d'identifier le cheval comme hôte naturel de cet hépacivirus (123, 149). HV-Eq est l'homologue le plus proche du VHC identifié à ce jour, avec une homologie d'environ 50% (148). Il existe plusieurs similitudes entre les infections par le VHC et HV-Eq. Tout comme le VHC, HV-Eq est un virus hépatotrope capable d'induire une infection aiguë pouvant évoluer vers une chronicité six mois après inoculation. Cependant, le taux de résolution spontanée de l'infection par HV-Eq est considérablement supérieur à celui du VHC (150-152). D'autres similitudes, telle qu'une séroconversion retardée, détectable dans environ 30% des cas (151), un niveau similaire de glycosylations des gpE1|E2 (153), une liaison similaire de miR-122 à la partie 5'UTR de l'ARN de HV-Eq (154), ou encore le développement de pathologies hépatiques ont également été observés (123). L'ensemble de ces caractéristiques font de HV-Eq et son hôte un modèle de choix. Cependant, les coûts important associés à ce modèle animal de grande taille constitue un frein important à son utilisation.

1.4.2.3. Cohortes

En raison de la nature asymptomatique de l'infection aiguë par le VHC, un nombre restreint d'individus connaissent leur statut infectieux. Il est donc, par conséquent, difficile de détecter les infections par le VHC de façon précoce, et de déterminer la date exacte d'inoculation. Les premières connaissances de la réponse immunitaire en réponse à l'infection par le VHC chez l'homme proviennent d'études suivant des individus ayant été exposés de façon accidentelle (155), ou présentant des symptômes (156). Des efforts importants à l'échelle internationale ont été déployés afin d'établir des cohortes faisant le suivi des utilisateurs de drogues par injection (UDI) (157-159). Les UDI représentent le principal réservoir du VHC dans les pays développés, avec une incidence d'infection de l'ordre de 5 à 25% chaque année (160). Le recrutement d'UDI séronégatifs et leur suivi au cours de multiples infections par le VHC représentent une opportunité exceptionnelle d'étudier la réponse immunitaire de manière longitudinale et d'identifier les corrélats de l'immunité protectrice. Toutefois, les UDI constituent une population marginalisée pouvant souffrir de multiples problèmes sociaux et/ou psychologiques, rendant leur suivi parfois difficile. Malgré cela, ces cohortes restent d'une importance cruciale pour les essais cliniques de stratégie vaccinale contre le VHC (161).

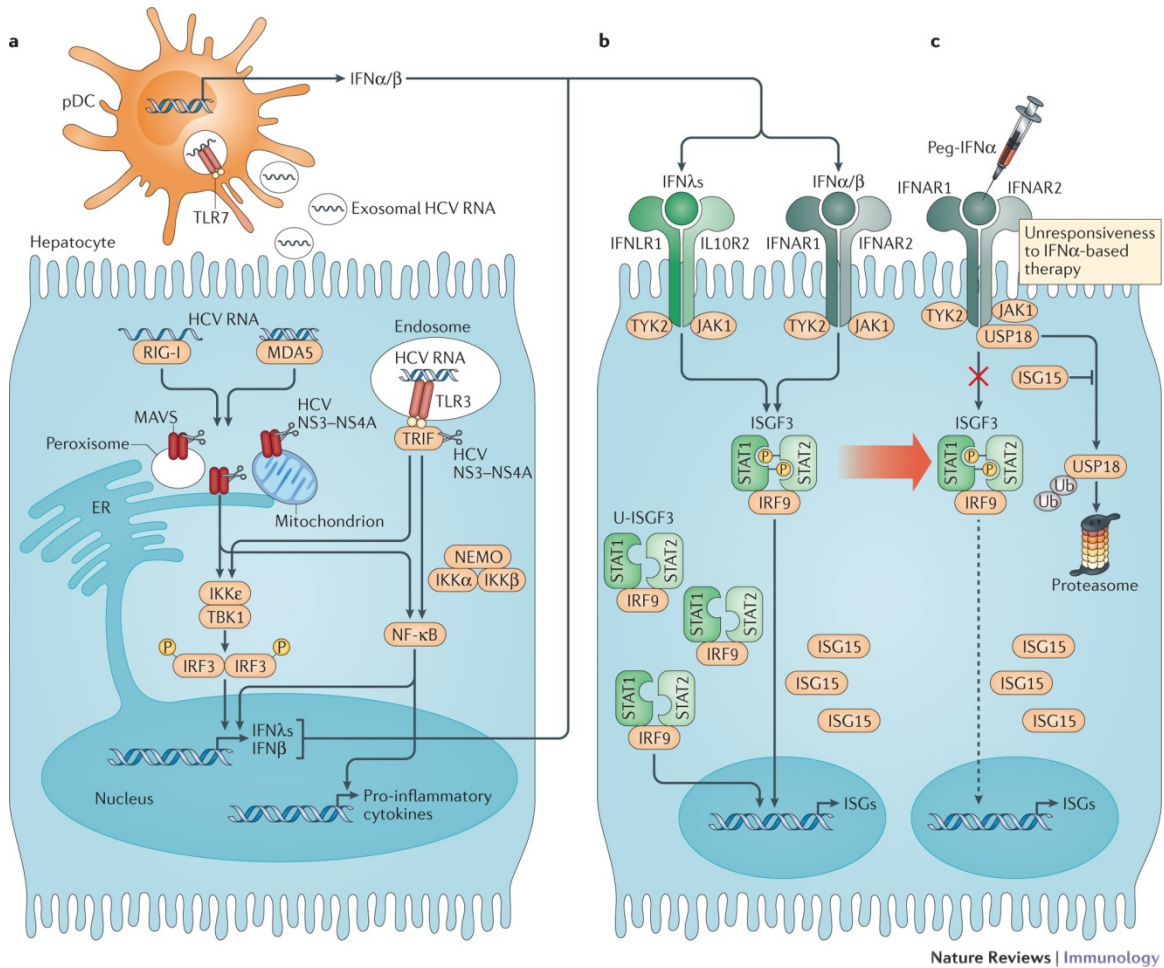
1.5. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection aiguë et chronique par le VHC

1.5.1. Immunité intracellulaire et détection du VHC

La défense contre l'infection par le VHC est initiée par la réponse immunitaire innée au sein même des hépatocytes infectés (**Figure 7**, (162)). En effet, l'ARN du VHC est reconnu par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, de l'anglais *pattern recognition receptors*) incluant RIG-I (de l'anglais, *receptors retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 I (de l'anglais, *melanoma differentiation-associated protein 5*) et TLR3 (de l'anglais, *toll-like receptor 3*) (163-165).

Cette détection virale déclenche différentes voies de signalisation en aval médiées soit par MAVS, dans le cas de RIG-I et MDA5, ou par TRIF, dans le cas de TLR3. Toutes ces voies de signalisation convergent vers l'induction de l'expression des interférons (IFN) de type I et de type III et de cytokines pro-inflammatoires par le facteur régulateur de l'interféron 3 (IRF3) et le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), respectivement (166). Les IFN I et III libérés interagissent avec leurs récepteurs présents à la surface des hépatocytes et induisent à leur tour l'expression de gènes stimulés par l'interféron (ISG), qui vont exercer des fonctions effectrices antivirales (167).

Le VHC interfère avec la réponse immunitaire innée via le clivage des protéines de signalisation MAVS (de l'anglais, *mitochondrial antiviral signalling protein*) et TRIF (de l'anglais, *Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN β*) par la protéase NS3/NSA4 du VHC, sans toutefois l'abroger complètement (**Figure 7A** (168)). Après liaison des IFN de type I et de type III à leurs récepteurs, le facteur génique stimulé par l'IFN 3 (ISGF3), composé des transducteurs de signal STAT1 et STAT2 (de l'anglais, *signal transducer and activator of transcription 1 and 2*) phosphorylés et du facteur régulateur 9 de l'IFN (IRF9), induit l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISG). Au cours de l'infection chronique, l'expression des ISG est maintenue par l'ISGF3 non phosphorylé (**Figure 7B**, (169)). Une expression élevée de l'ISG15 stabilise et conduit finalement au blocage de la signalisation via la peptidase 18 spécifique de l'ubiquitine (USP18) (170). En conséquence, les cellules hépatiques infectées par le VHC ne répondent plus à la stimulation par l'IFN (171), y compris par le traitement peg-IFN α (Figure 7C, (172)).



Nature Reviews | Immunology

Figure 7 | Induction de la réponse immunitaire innée antivirale après infection par le VHC (Adapté de Shin *et al.* (162)).

a) L'ARN du VHC est détecté au sein des hépatocytes infectés par RIG-I, MDA5 et TLR3, entraînant ainsi l'induction d'IFN λ , d'IFN β et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Les exosomes chargées d'ARN viral libérés à partir d'hépatocytes infectés sont reconnues par les cellules dendritiques plasmocytoïdes qui en réponse produisent des IFN de type I. b) Les IFN de type I et de type III se lient à leurs récepteurs à la surface des hépatocytes et induisant l'expression des ISG. c) L'ISG15 stabilise la protéine USP18 qui agit en bloquant les signaux via le récepteur IFN α/β . RE, réticulum endoplasmique ; IKK ϵ , I κ B kinase- ϵ ; IRF, facteur de régulation IFN; JAK1, Janus kinase 1; NEMO, modulateur essentiel NF- κ B ; NF- κ B, facteur nucléaire- κ B; TBK1, kinase 1 de liaison à TANK; TYK2, tyrosine kinase 2; Ub, ubiquitine.

1.5.2. Les cellules tueuses naturelles

Les cellules tueuses naturelles (NK, de l'anglais *natural killers*) forment l'une des premières lignes de défense du système immunitaire inné. Les cellules NK détruisent les cellules infectées via la sécrétion de molécules cytotoxiques (i.e. perforine et granzyme) ou via l'interaction des récepteurs de mort présent à la surface des cellules cibles comme le récepteur du ligand qui induit l'apoptose TRAIL (de l'anglais, *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*). Ces cellules peuvent également réguler l'immunité innée et adaptative via la production de cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α , l'IL-10 et l'IL-21 (173). L'activité des NK est déterminée par l'ensemble des interactions entre les récepteurs d'activation et d'inhibition présents à leur surface et les ligands présents à la surface des cellules infectées (174).

Une fréquence plus faible de cellules NK exprimant les récepteurs NKp30, NKp46, CD161 et NKG2D a été détectée chez des sujets ayant éliminé l'infection par le VHC en comparaison d'une infection chronique (175). Au cours de l'infection chronique, le phénotype et la fonctionnalité des cellules NK reportées varient d'une étude à l'autre. En effet, des niveaux d'expressions des récepteurs activateurs et de capacité dégranulatrice des cellules NK tantôt élevés (176) ou réduits (177) ont été reportés. Néanmoins, plusieurs études s'accordent sur une production réduite de cytokines pro-inflammatoires par les cellules NK au cours de l'infection chronique (178-180). De plus, une étude a reporté la capacité du VHC à inhiber directement la production d'IFN- γ par les cellules NK via l'interaction de gE2 aux récepteurs CD81 présents à leurs surfaces (181).

1.5.3. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui relient l'immunité innée et adaptative et sont essentielles à l'induction des réponses immunitaires spécifiques aux pathogènes dont le VHC. Le rôle principal des CD est de capturer, traiter et de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD8 et CD4, et de faciliter leur polarisation en cellules effectrices (voir section 1.6.). Les CD sont activées et se différencient en CD matures en réponses à divers signaux de « danger », dont principalement la reconnaissance des modèles moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMP, de l'anglais *pathogen*

associated molecular patterns) par les PRR, tels que les TLR et les récepteurs lectines de type C (182). Les CD peuvent être subdivisés en deux sous-ensembles principaux: les CD myéloïdes (mCD) et les CD plasmacytoïdes (pCD). Les mCD constituent la sous-population majoritaire et sont principalement associées au traitement et à la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les pDC, quant à eux, peuvent détecter l'ARN du VHC via les TLR-7 et RIG-I, et sont les principaux producteurs d'IFN de type I et III (**Figure 7A**, (183, 184)).

Notre laboratoire a précédemment démontré que la résolution spontanée de l'infection par le VHC est caractérisée par une hyperactivité prolongée des mCD et pCD (185). Une fréquence moindre des mCD et pDC en circulation s'est trouvée chez les patients atteints d'une infection chronique par le VHC (186, 187). Cependant, les mDC jouerait un rôle dans l'expansion des lymphocytes T régulateurs (T_{REG}), favorisant ainsi la persistance de l'infection par le VHC (188) (voir section 1.6.2.2.1.). De plus, Doyle *et al.* ont démontré que les pCD intrahépatiques maintiennent la capacité de produire des cytokines et chimiokines en réponse aux agonistes de TLR-7, indiquant qu'ils restent sensibles au VHC et contribuent à l'inflammation au cours d'une infection chronique (189).

1.5.4. Facteurs génétiques de l'hôte associés à la clairance spontanée de l'infection – Immunité innée

Des études d'association pangénomique (GWAS, de l'anglais *genome-wide association study*) ont démontré une corrélation entre plusieurs polymorphismes mononucléotidiques (SNP, de l'anglais *single-nucleotide polymorphisms*) en amont du gène IFNL3 codant pour l'interféron $\lambda 3$ (IFN- $\lambda 3$, anciennement IL28B), dont particulièrement le SNP rs12979860, et la résolution spontanée de l'infection (190, 191). En effet, les sujets homozygotes pour l'allèle rs12979860-C (i.e. CC) sont plus susceptibles d'éliminer spontanément l'infection par le VHC que ceux portant l'allèle rs12979860-T (i.e. CT et TT) (191). Prokunina-Olsson *et al.* ont décrit un variant dinucléotidique rs368234815 dont l'allèle ancestral ΔG génère la protéine IFN- $\lambda 4$ de pleine longueur, tandis que l'allèle TT provoque un décalage du cadre de lecture qui empêche l'expression de cette protéine (192). L'issue favorable de l'infection corrèle avec l'incapacité d'exprimer l'IFN-

$\lambda 4$ (193). En effet, l'IFN- $\lambda 4$ stimule l'induction d'ISG via l'activation de la voie de signalisation Jak-STAT après liaison aux récepteurs présents à la surface des hépatocytes, résultant en un pronostic faible d'éliminer l'infection (194).

Dans le cas des cellules NK, l'expression des gènes KIR2DL3 et son ligand HLA-C1 a été également associé à une probabilité accrue d'éliminer spontanément l'infection par le VHC, et ce, en raison d'une activation plus rapide et une signalisation inhibitrice moindre (195, 196). Notre laboratoire a démontré une association entre le génotype CC du SNP rs12979860 et une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A après élimination spontanée de l'infection (197).

1.6. Réponse immunitaire adaptative spécifique du VHC

La réponse immunitaire adaptative est clé pour le contrôle et la protection à long terme des infections virales. Celle-ci est constituée de trois populations majeures : Les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4, et les lymphocytes B.

1.6.1. Les récepteurs de l'immunité adaptative

La reconnaissance des antigènes viraux par les cellules de l'immunité adaptative est possible grâce aux molécules présentes à leur surface appelées récepteurs des lymphocytes T (TCR, de l'anglais *T-cell receptor*) et B (BCR, de l'anglais *B-cell receptor*), ces derniers étant aussi connus sous le nom d'immunoglobuline (Ig). Ces récepteurs sont composés de deux sous-unités: les chaînes α et β (TCRs), et les chaînes lourdes et légères (BCRs) (**Figure 8A**). Au cours du développement lymphocytaire, la diversité du répertoire de ces récepteurs est obtenue grâce aux réarrangements somatiques des segments de gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) (i.e. diversité combinatoire), ainsi qu'à l'addition ou la délétion de nucléotides entre les segments (i.e. diversité jonctionnelle), résultant en un TCR\BCR spécifique (**Figure 8B**). Les chaînes β et lourdes sont obtenues par les réarrangements V(D)J et les chaînes α et légères par le réarrangement des gènes VJ seulement.

La région variable des récepteurs est celle en contact avec l'antigène sous forme native dans le cas des BCR ou dénaturé sous forme peptidique présenté par les molécules d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) dans le cas des lymphocytes T CD8 et de classe II (MHC-II) dans le cas des lymphocytes T CD4. Cette région variable est constituée des régions déterminant la complémentarité (CDR, de l'anglais *complementarity determining regions*) CDR1, CDR2 et CDR3. Dans le cas des TCRs, CDR1 et CDR2 interagissent principalement avec les MHC-I et MHC-II. La région CDR3 des TCRs et BCRs encodée par la jonction des segments V(D)J constitue la région la plus variable directement en contact avec l'antigène, contribuant ainsi le plus à la spécificité des récepteurs. En plus des diversités dites combinatoire et jonctionnelle, s'ajoute une autre source de diversité avec l'appariement d'une chaîne α et β (TCRs) et de deux chaînes lourdes et légères (BCRs). L'ensemble de ces mécanismes moléculaires permet la production théorique de 10^{18} TCRs et 10^{13} BCRs. S'ensuit une mort par apoptose des lymphocytes autoréactifs exprimant un BCR ou TCR reconnaissant un antigène du soi, définissant une sélection négative. Finalement, les lymphocytes T et B subissent une sélection positive permettant de générer ce qu'on appelle le répertoire immunitaire (198).

Au niveau du centre germinatif (CG) et après reconnaissance de l'antigène, les lymphocytes B matures subissent un processus de diversification supplémentaire des Ig appelé hypermutation somatique (SMH, de l'anglais *somatic hypermutation*). Ce processus permet l'introduction de mutations au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères permettant *in fine* une augmentation de l'affinité de l'antigène pour son BCR (199). Les lymphocytes B matures, qui co-exprimaient avant stimulation les IgM et IgD, peuvent également subir une commutation de classe (CSR, de l'anglais *class-switch recombination*), au cours de laquelle des segments de gènes codant pour des régions constantes des Ig sont recombinaés afin d'exprimer une Ig d'un autre isotype, modulant ainsi les fonctions effectrices des lymphocytes B (200).

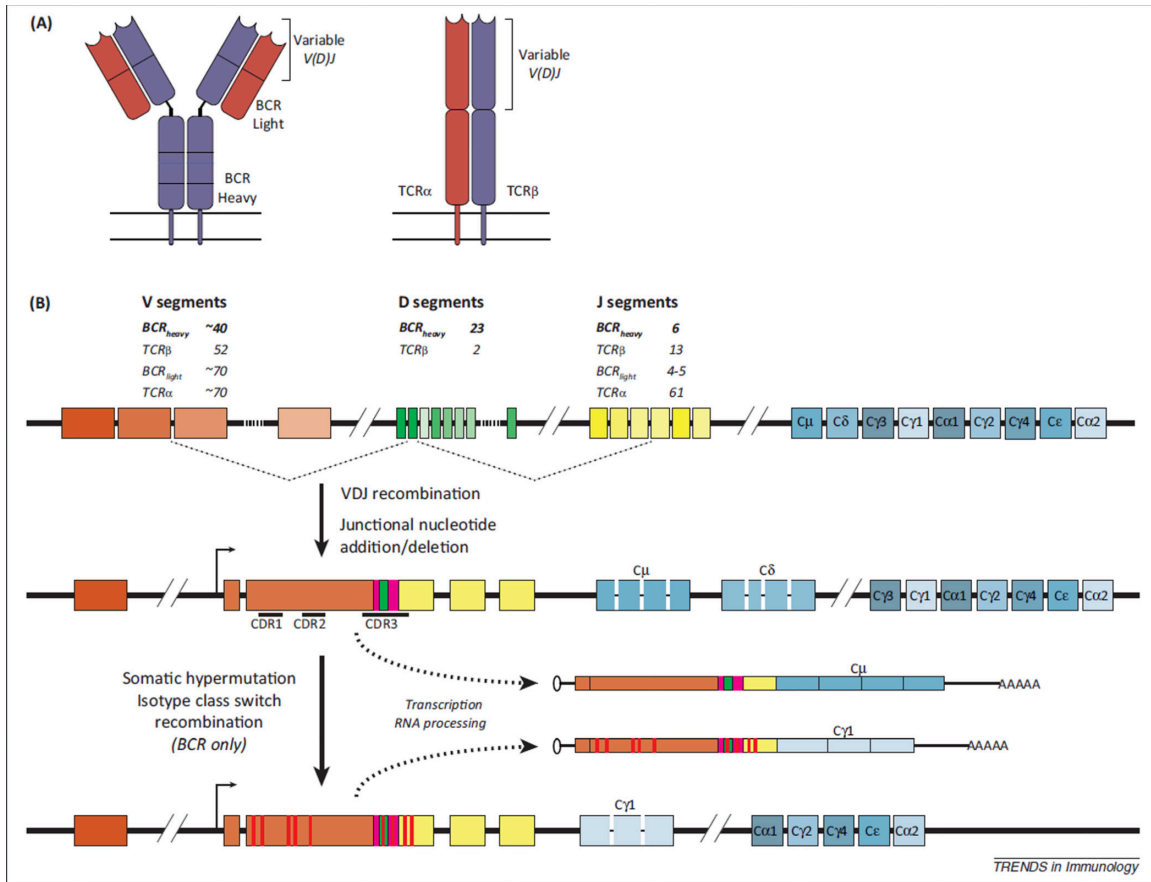


Figure 8 | Les récepteurs de l'immunité adaptative (Adapté de Calis *et al.* (201))

(A) Les TCRs et BCRs sont constitués des chaînes α et β , et des chaînes lourdes et légères, respectivement. **(B)** La diversité du répertoire est obtenue par recombinaison des segments V(D)J pour la chaîne lourde (BCR) et la chaîne β (TCR), et des segments VJ pour la chaîne légère (BCR) et α (TCR). Au cours du réarrangement somatique, l'addition et délétion de nucléotides aux jonctions des segments, constituant la région CDR3, permet d'ajouter une diversité supplémentaire. Après reconnaissance de l'antigène, le BCR des lymphocytes B matures passent par deux mécanismes supplémentaires : 1) hypermutation somatique au cours de laquelle des mutations (en rouge) sont introduites au niveau de la région variable de l'Immunoglobuline, et la commutation de classe qui permet la production de différents isotopes aux fonctions effectrices différentes. Abréviations : Récepteurs des cellules T (TCR) et B (BCR), Segment Variables (V), de Diversité (D) et de Jonction (J).

1.6.2. Immunité cellulaire spécifique du VHC

1.6.2.1. Lymphocyte T CD8

1.6.2.1.1. Phase aiguë de l'infection

Les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC sont activés chez presque tous les individus et sont détectés dans le sang périphérique 6 à 8 semaines après le début de l'infection. Cette apparition coïncide avec une augmentation du niveau ALT et une baisse des titres viraux (**Figure 9**; 1-3). Au cours de la phase aiguë de l'infection et indépendamment de son issue, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC expriment les marqueurs d'activation CD38 et *programmed death-1* (PD-1) (202, 203). Cependant, ces T CD8 spécifiques du VHC présentent une prolifération altérée et ne produisent pas de cytokines antivirales tel que IFN γ , correspondant à un phénotype dit « sous le choc » (de l'anglais « *stunned* ») (**Figure 9**, (204)). Wolski *et al.* ont étudié les différences transcriptionnelles entre les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC isolés au cours de la phase aiguë chez des sujets ayant résolu l'infection en comparaison de ceux ayant développé une infection chronique, et ont identifié une dérégulation des processus métaboliques chez ces derniers (205). Auparavant, Bengsch *et al.* ont observé chez le modèle murin d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) que la signalisation via PD-1 induisait des altérations glycolytiques et mitochondriales au niveau des lymphocytes T CD8 (206). Ces résultats soulignent l'importance des processus métaboliques dans la régulation et l'épuisement des lymphocytes T CD8 tôt au cours d'une infection virale. Wolski *et al.* ont également observé une expression élevée du gène TCF7 codant pour TCF1 chez les sujets éliminant l'infection de façon spontanée (205), une protéine fortement exprimée par les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC restaurées après traitement du VHC par les AAD (205, 207). A l'inverse, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC des sujets chroniques expriment fortement p53 (205), révélant un rôle dans la régulation immunitaire de ce gène connu à ce jour principalement pour son rôle dans le métabolisme et la carcinogénèse (208).

Une étude récente par Barili *et al.* a démontrée que le ciblage de p53 permet la résolution de l'altération glycolytique et mitochondriale induite au cours de l'infection chronique, révélant une nouvelle avenue thérapeutique pour le traitement des lymphocytes T dysfonctionnels associés aux infections chroniques (209). De plus, Wolski *et al.* ont corrélé la dérégulation des processus métaboliques à la présence de lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC, confirmant le rôle crucial de cette population dans l'aide des T CD8 au cours de la phase aiguë de l'infection (voir section 1.6.3.).

L'élimination spontanée de l'infection se caractérise par l'expression précoce par les T CD8 spécifiques du VHC du récepteur α de l'IL-7 (CD127), un marqueur des lymphocytes T mémoires, et la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (210, 211). Cette réponse est de grande ampleur, large (i.e. ciblant de multiples épitopes viraux) et polyfonctionnelle (i.e. produisant plusieurs cytokines et présentant des propriétés prolifératives et cytotoxiques) (Figure 8; (211)). Après résolution de l'infection, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC ne subissent plus de stimulation antigénique. S'ensuit une phase de contraction clonale avec une diminution drastique de leur fréquence (environ 90%) et le maintien d'un pool mémoire capable de proliférer rapidement en cas de réinfection

A l'opposé, les infections chroniques sont caractérisées par une réponse T CD8 spécifique du VHC faible, étroite et aux fonctions effectrices altérées (211). Cette réponse immunitaire limitée peut contrôler l'infection par le VHC de manière transitoire, cependant, la pression de sélection immunitaire qu'elle exerce conduit à l'émergence de mutants d'échappement viraux au sein des épitopes ciblés, facilitant ainsi la persistance virale. Parce qu'ils ne reconnaissent plus le virus autologue, les T CD8 ciblant les épitopes viraux qui ont muté reviennent à un phénotype de type mémoire avec l'expression de CD127. A l'opposé, les T CD8 exposés à une stimulation antigénique constante sont quant à eux sujets à des changements phénotypiques, fonctionnels, transcriptionnels et épigénétiques drastiques, définissant un processus nommé épuisement lymphocytaire (Figure 9; (205, 206, 212)).

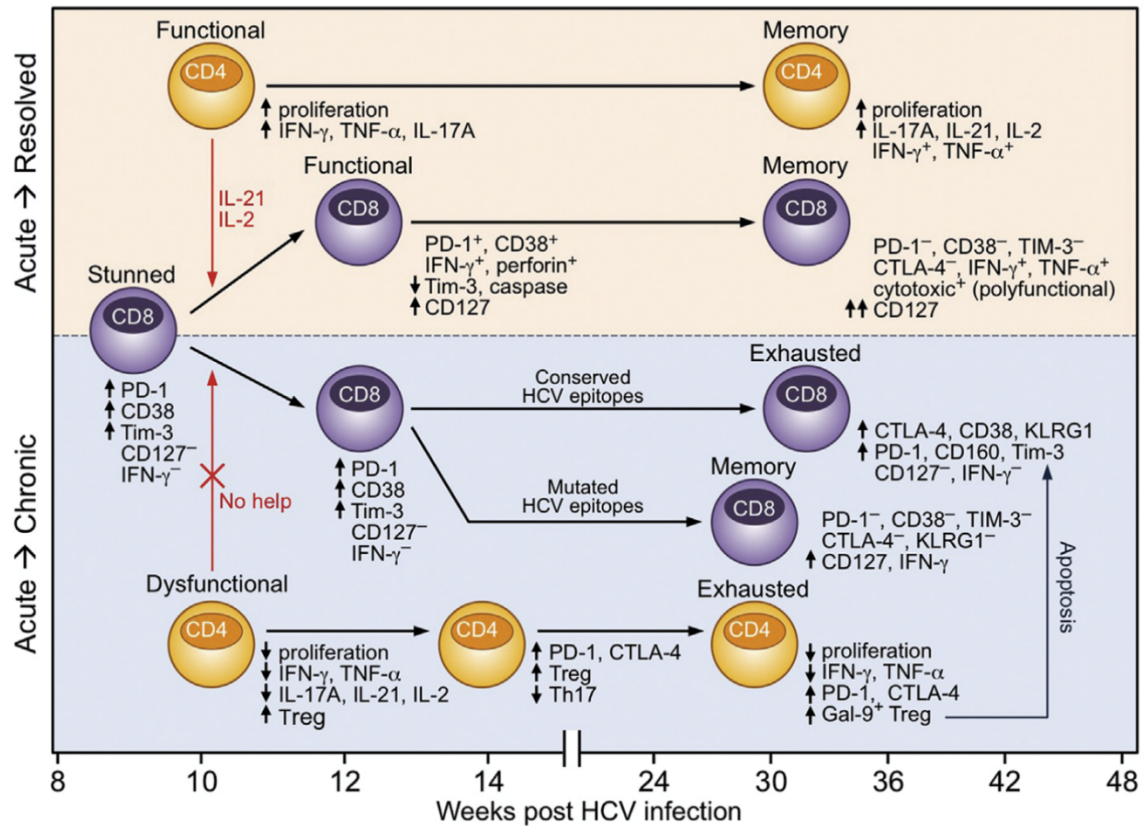


Figure 9 | Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des réponses immunitaires cellulaires associées à l'issue dichotomique de l'infection par le VHC (Adapté de Park *et al.* (213)).

En présence d'une réponse robuste des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC produisant les cytokines IL-2 et IL-21, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC acquièrent de nombreuses fonctions effectrices (haut). A l'opposé, une réponse dysfonctionnelle des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC conduit au développement d'un phénotype épuisé des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC attribué à une stimulation antigénique continue.

1.6.2.1.2. Épuisement des lymphocytes T CD8

L'épuisement des lymphocytes T entraîne une perte progressive des fonctions effectrices caractérisée par une production de cytokines limitée, une capacité prolifératrice moindre et *in fine*, une disparition de la majorité des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC du sang périphérique et leur localisation au niveau du foie (214, 215). Le récepteur inhibiteur (RI) PD-1 est un acteur central de l'épuisement des lymphocytes T contribuant à l'établissement de l'infection chronique (8, 216-218). Outre PD-1, la stimulation antigénique continue des T CD8 conduit à l'expression d'un spectre de RI comprenant TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin-domaincontaining-3*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte protein 4*), 2B4, CD160, KLRG1 (*killer cell lectin-like subfamily G member 1*), TIGIT (*T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains*), et CD39 (219, 220).

Des études récentes ont démontré que les lymphocytes T épuisés constituent une population hétérogène pouvant être divisée en deux sous-catégories : 1) les T CD8 au phénotype épuisé et mémoire ayant une capacité proliférative et 2) ceux en phase terminale d'épuisement (CD8-TE) (207, 221). La première sous-catégorie nommée en anglais « memory-like » (CD8-ML) est caractérisée par l'expression du facteur de transcription TCF1, du marqueur mémoire CD127 et du RI PD-1 (PD-1⁺ TCF1⁺ CD127⁺) (207, 222, 223). La deuxième catégorie en revanche présente une capacité proliférative moindre et est caractérisée par une forte expression de PD-1 et du facteur de transcription Eomesodermin (Eomes), une faible expression du facteur de transcription T-box exprimé dans les cellules T (T-bet), et l'absence de CD127 (PD-1^{HI} Eomes^{HI} T-bet^{LO} CD127⁻) (221). La même étude démontre que les T CD8 spécifiques du VHC intrahépatique chez les sujets chroniques ont un profil Eomes^{HI} T-bet^{LO} suggérant qu'ils appartiennent aux CD8-TE (221). A l'opposé des CD8-TE, les CD8-ML peuvent avoir une capacité proliférative plus importante après une intervention thérapeutique bloquant la signalisation via PD-1 (222). Le traitement anti-PD-1 a été évalué et a démontré une efficacité limitée à la fois chez le modèle chimpanzé (224) et humain (225) de l'infection par le VHC.

En effet, seulement 1 chimpanzé sur 3 infectés expérimentalement par le VHC a démontré une baisse transitoire de la charge virale après traitement par anti-PD-1 (224). De même, le traitement anti-PD-1 testé auprès d'une cohorte de 54 patients chroniques a résulté en une baisse transitoire de la virémie auprès d'un nombre restreint de sujets, dont deux seulement présentant une charge virale négative après traitement (225). Néanmoins, Barili *et al.* ont démontré récemment que les inhibiteurs d'histone méthyl transférase ont la capacité de restaurer les fonctions effectrices des CD8-TE (209). Cette approche représenterait donc une nouvelle stratégie immunomodulatrice qui pourrait être complémentaire au traitement anti-PD1. Des études récentes ont identifié le facteur de transcription TOX comme crucial pour la formation et le maintien des CD8-TE. En effet, TOX traduirait la stimulation antigénique persistante en un programme transcriptionnel et épigénétique propre aux CD8-TE (226-230). La suppression du domaine de liaison de TOX résulterait en une diminution de l'expression de PD-1 conjointement à une augmentation des fonctions effectrices des CD8-TE. Néanmoins, une diminution importante de leur fréquence a finalement été observée suggérant le rôle de TOX dans le maintien de cette population (227). Les T CD8 PD-1⁺ TCF1⁺ CD127⁺ spécifiques du VHC détectés chez des sujets chroniques ou traités par les AAD expriment fortement TOX. A l'opposé, une faible expression de TOX des T CD8 spécifique du VHC a été détectée chez les sujets ayant résolu l'infection spontanément de manière similaire au T CD8 naïve ou spécifique de l'influenza (227).

1.6.2.1.1 Étude du répertoire des TCRs spécifique du VHC

Après les sélections négative et positive au niveau du thymus, le nombre de lymphocyte T exprimant un TCR unique produit, aussi appelé clonotype, s'élève à environ $2 \cdot 10^7$ (231). Au cours d'une infection virale, les clonotypes reconnaissant les complexes peptides-CMH (p-CMH) prolifèrent (i.e. expansion clonale) et se différencient en cellules effectrices primaires.

Les clonotypes présentant une plus grande avidité fonctionnelle, définie comme la résultante de la reconnaissance et la force d'interaction des TCR aux complexes p-CMH présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), prolifèrent plus rapidement et vont ainsi dominer la réponse immunitaire effectrice (232). Le répertoire de TCR spécifique d'un épitope au cours d'une infection peut être défini par plusieurs autres paramètres.

La **diversité** du répertoire est définie comme le nombre de clonotypes unique formant le répertoire. Le répertoire des TCR spécifique d'un épitope peut être soit large ou restreint s'il est composé d'un grand ou petit nombre de clonotypes, respectivement.

Les clonotypes peuvent présenter également une **flexibilité** définie par leur capacité à reconnaître plusieurs variants d'un même épitope. En effet, dans le cas d'une infection par le VIH, des clonotypes flexibles capables de reconnaître de multiples variants des épitopes ciblés ont été détectés chez des sujets non progressifs à long terme (NPLT) (i.e. asymptomatique avec une charge virale faible) (233). Dans le cas du VHC, une étude importante a démontré la capacité du virus à exploiter un « trou » dans le répertoire de TCR spécifique de l'épitope NS3-1406, représentant ainsi un mécanisme d'échappement viral (234).

Certains clonotypes dit **cross-réactifs** peuvent reconnaître différents épitopes viraux. Notamment, les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 du VHC sont connus pour présenter une réactivité croisée avec plusieurs épitopes restreints par HLA-A2 dont NA-231 de l'Influenza (235).

Les clonotypes spécifiques d'un épitope donné peuvent aussi présenter la particularité d'être présents chez plusieurs individus. Ces clonotypes nommés « **publics** » ont été détectés dans le cas du VHC indépendamment de l'issue de l'infection pour les épitopes suivants: ³⁹⁸SLASLFTQGA⁴⁰⁷ de la gpE2, ¹³⁹⁵HSKKKCDEL¹⁴⁰³ et ¹⁴³⁵ATDALMTGY¹⁴⁴³ de la protéine NS3 (236, 237). Des études supplémentaires restent nécessaires afin de déterminer l'existence de clonotypes publics spécifiques d'autres épitopes immunodominants du VHC et s'ils corrélerent avec une résolution spontanée de l'infection.

1.6.2.2. Lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 auxiliaires (T_H de l'anglais, *helper T cells*) sont des acteurs centraux de l'immunité adaptative contre les pathogènes viraux. C'est suite à la reconnaissance d'un antigène spécifique présenté par une APC que les cellules T CD4 naïves subissent plusieurs cycles de division et se polarisent en différentes sous-populations ayant des fonctions spécialisées au cours de l'infection virale (Figure 9, (238)).

1.6.2.2.1. CD4 auxiliaires : Régulateurs des lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T_H sont essentiels pour le maintien de la prolifération et polyfonctionnalité des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC. Leurs rôles centraux ont été initialement démontrés dans le contexte d'une infection chronique par le LCMV chez le modèle murin. En comparaison au contrôle immunologique de l'infection en présence des T CD4, leurs déplétions médiées par des anticorps avant inoculation ont résulté en une virémie persistante (239). Une approche expérimentale similaire de déplétion des CD4 chez le modèle chimpanzé avant réinfection par une souche homologue du VHC, a également abouti à en une infection persistante, de faible virémie, caractérisée par l'émergence de mutants d'échappement viraux présentés par les CMH-I (134).

Chez l'humain, une réponse cellulaire T CD4 spécifique du VHC vigoureuse, large (i.e. ciblant de nombreux épitopes dominants) et soutenue est associée à une clairance spontanée de l'infection (202, 240-249). L'infection chronique, quant à elle, est associée à un épuisement rapide des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC caractérisé par une expression accrue de PD1, CTLA-4 et TIM-3, ainsi qu'une perte graduelle de leur capacité proliférative et fonctionnelle avec une production réduite des cytokines IL-2, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, et IL-21 (202, 240-248).

L'introduction récente des tétramères CMH de classe II a permis une caractérisation plus approfondie des CD4 spécifiques du VHC au cours de la phase aiguë de l'infection.

Chen *et al.* ont démontré, grâce à l'utilisation d'un ensemble de 12 tétramères, une similarité aux niveaux de la fréquence, du phénotype et de la fonctionnalité des T CD4 spécifiques du VHC détectées à la fois chez les sujets ayant résolu l'infection et chroniques (250). Ces T CD4 spécifiques du VHC expriment les marqueurs d'inhibition PD1 et CTLA4, ainsi que le marqueur d'activation CD38. L'expression élevée de PD1 et CTLA4 au cours de la phase aiguë, indépendamment de l'issue de l'infection, supporte le concept selon lequel PD1 et CTLA4 sont également des marqueurs d'activation. Après résolution de l'infection, les T CD4 spécifiques du VHC sont toujours détectables dans le sang et sont caractérisés par une diminution de l'expression de CD38, PD1 et CTLA4, ainsi qu'une hausse de l'expression du marqueur mémoire CD127. A l'opposé, les T CD4 spécifiques du VHC maintiennent l'expression de CD38, PD1 et CTLA4 lorsque l'infection chronique s'établit, indiquant une activation et un épuisement continus. S'ensuit une diminution puis une disparition de la population dans le sang. Ces résultats suggèrent que la perte de fonctionnalité des T CD4 observée chez les sujets chroniques n'est pas le résultat d'un défaut d'activation mais plutôt d'une prolifération limitée due à un profil d'épuisement continu suivi d'une disparition précoce de cette population. L'incapacité de maintenir une réponse T CD8 robuste de par leur disparition est une caractéristique de la persistance du VHC.

La réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC peut également être régulée négativement par les lymphocytes CD4 T régulateurs (T_{REG}). Les T_{REG} sont caractérisées par l'expression du récepteur α à l'IL-2 (CD25) ainsi que le facteur de transcription FOXP3 (de l'anglais, *Forkhead box P3*). Plusieurs études ont souligné le rôle important des T_{REG} dans l'immunité antivirale au cours d'une infection chronique par le VHC. En effet, des études ont démontré qu'au cours de l'infection, les T_{REG} s'accumulent au niveau du foie où ils suppriment la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T spécifiques du VHC. En résulte un déséquilibre entre le ratio des cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL-2, IFN γ) et anti-inflammatoires (e.g. IL-10, TGF- β) associé au développement d'une infection chronique (248, 251). En comparaison des individus sains ou ayant résolu l'infection par le VHC spontanément, une fréquence et une capacité suppressive plus élevée des T_{REG} a été observé chez les sujets chroniques (251, 252).

De plus, leurs fréquences corrélaient positivement avec la charge virale du VHC (253-256). La production d'IL-21 par les T CD4 est nécessaire pour le maintien de l'immunité antivirale médiée par les T CD8 (257-259). Notre laboratoire a démontré qu'au cours de la phase aiguë de l'infection par le VHC, un déséquilibre entre les T_{REG} et les T_{H17} pourrait contribuer à l'échec de la réponse immunitaire. En effet, l'élimination spontanée de l'infection par le VHC est associée à une expansion des T_{H17}. A l'opposé, chez les sujets chroniques, l'absence d'expansion des T_{H17} conduit à une diminution de la survie et de la fonction des T CD8 spécifiques du VHC. De plus, la présence accrue de T_{REG} non seulement inhibe davantage l'expansion des T_{H17}, mais aussi conduit à la mort par apoptose des T CD4 et CD8 exprimant TIM-3 via la production du ligand de ce récepteur inhibiteur, Gal-9 (260).

1.6.2.2.2. CD4 folliculaires auxiliaires : Régulateurs de la réponse humorale

Bien que le contrôle immunitaire de l'infection ait été initialement attribué à la réponse immunitaire des cellules T spécifiques du VHC, l'immunité humorale semble également y contribuer. En effet, des études ont démontré que la production de nAbs est corrélée avec le contrôle viral de l'infection (261, 262). Les lymphocytes T CD4 folliculaires auxiliaires (T_{FH}, de l'Anglais *follicular helper T cells*) ont un rôle crucial dans l'initiation de la réponse humorale. En effet, les T_{FH} permettent la génération de cellules sécrétrices d'anticorps anti-VHC (ASC, de l'anglais *antibody secreting cells*) et de lymphocytes B mémoires (LBM) spécifiques du VHC suite à la réaction du CG au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLII) (Figure 9).

Les T_{FH} expriment à leur surface le récepteur de chémokine CXCR5 (*chemokine C-X-C motif receptor 5*). CXCR5 lie CXCL13, une chémokine principalement produite par les CD folliculaires, permettant aux T_{FH} de migrer vers les follicules des cellules B. Les T_{FH} expriment également les marqueurs d'activation CD69, HLA-DR et PD1, les molécules co-stimulatrices CD40L et ICOS, ainsi que le facteur de transcription bcl-6 (263, 264).

La différenciation des lymphocytes B résultent des interactions $T_{FH}|B$ suivantes: TCR|CMH-II, ICOS|ICOS-L, PD1|PD1L1, CD40L|CD40, ainsi que via la production d'IL21 par les T_{FH} (265). Chez l'Homme, les T_{FH} présents dans les CG sont difficiles à étudier de par leur localisation, cependant une sous-population analogue circule dans le sang périphérique et correspond en un versant mémoire des T_{FH} appelé cT_{FH} (de l'anglais, circulating T_{FH}). Bien qu'il existe des différences entre ces deux populations analogues, Locci *et al.* ont identifié un profil transcriptionnel partagé entre les T_{FH} isolés des amygdales et les cT_{FH} (266). De plus, l'étude des répertoires de TCR a révélé une relation clonale entre ces deux populations (267). Par conséquent, l'activité des cT_{FH} est le reflet direct de la différenciation et l'activité des T_{FH} au niveau des OLII.

A ce jour, un nombre limité d'études ont caractérisé la fonction des cT_{FH} au cours de l'infection par le VHC. Au cours de la phase aigüe, la fréquence des cT_{FH} activés (ICOS+) spécifiques du VHC a été corrélée positivement à la production d'anticorps anti-NS4 (246). Les cT_{FH} peuvent être divisés en trois sous-populations basées sur l'expression des récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR6 (C-C Motif Chemokine Receptor 6): cT_{FH1} (CXCR3+ CCR6-); cT_{FH2} (CXCR3- CCR6-); cT_{FH17} (CXCR3- CCR6+) (268). Raziorrouh *et al.*, ainsi que notre équipe, ont récemment démontré que la fréquence des cT_{FH} ICOS+ CXCR3+ corrèlent avec la production de nAbs, chez les sujets ayant résolu l'infection (269). Ces résultats suggèrent l'importance de l'activation précoce des cT_{FH1} pour l'activation et l'expansion rapide des lymphocytes B spécifiques du VHC et la production de nAbs qui en résulte (246, 269).

La fréquence des cT_{FH} chez les sujets infectés chroniquement est moins clair puisqu'elle a été reportée comme étant soit inchangée (270), augmentée (271) ou encore diminuée (272, 273). Toutefois les cellules T_{FH} s'accumulent au niveau du foie où elles pourraient contribuer à la formation de structures lymphoïdes tertiaires de type CG (246, 272, 274). Les nAbs anti-VHC augmentent à mesure que l'infection progresse, suggérant un rôle important des T_{FH} au cours de l'infection chronique (261, 270).

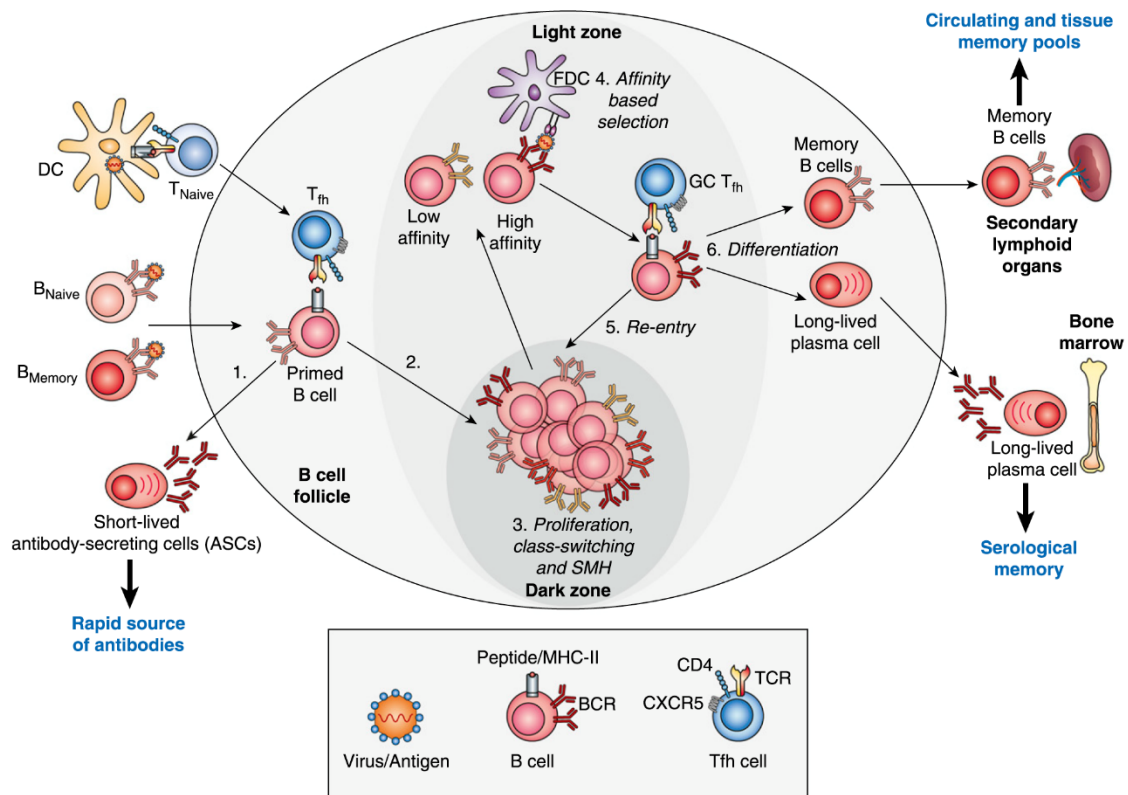


Figure 10 | La réaction du centre germinatif (Adapté de Koutsakos *et al.* (275)).

Au niveau des OLII, les CD présentent des antigènes du VHC via les CMH-II aux T CD4 qui, sous le bon environnement polarisant, se différencient en T_{FH}. (1) Au niveau de la zone B, les lymphocytes B naïves ou mémoires, pré-activés par l'antigène, l'internalisent et le présentent via CMH-II aux T_{FH}. (2) L'interaction B|T_{FH} entraîne la différenciation des lymphocytes B en ASC de courte durée de vie ou en leurs entrées dans la réaction du CG. (3) L'entrée dans la réaction du CG, au niveau de la zone sombre, permet la prolifération, la commutation de classe isotypique, ainsi que la diversification de leurs séquences BCR via SMH des lymphocytes B. (4) Au niveau de la zone clair du CG, les différents clones de cellules B entrent en compétition pour l'antigène présenté par les CD folliculaires (CDF). Les clones de plus haute affinité capturent l'antigène et le présentent via CMHII aux T_{FH} afin de recevoir une aide supplémentaire. Cette nouvelle interaction B|T_{FH} entraîne soit (5) une réentrée dans une réaction du CG ou (6) une différenciation en lymphocytes B mémoires, qui seront en circulation ou dans les OLII, ou en plasmablastes qui migrent vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocytes de longue durée de vie et fournir une mémoire sérologique.

L'activité des T_{FH} est régulée par les T CD4 folliculaires régulateurs (T_{FR}). Les T_{FR} peuvent supprimer les réactions du CG en agissant sur les interactions T_{FH}|B, et ce, afin de prévenir une suractivation de l'immunité humorale. Un mauvais contrôle des réactions du CG peut aboutir à une augmentation des nAbs, ainsi qu'à l'émergence de maladies auto-immunes (276). Une étude réalisée par Cobb *et al.* a observée une accumulation des CD25⁺Foxp3⁺ T_{FR} au niveau du foie chez des sujets infectés chroniques (277). Cette accumulation jouerait un rôle important dans la suppression de la réponse immunitaire médiée par les T_{FH} contre le VHC au niveau du foie.

Puisque la très grande majorité de ces études a été effectuée à partir des T_{FH} totaux, nos connaissances sur la régulation des T_{FH} spécifiques du VHC au cours de l'infection restent limitées. Une compréhension plus approfondie est cruciale pour le développement d'une stratégie vaccinale conçue pour induire une excellente réponse nAbs (voir section 6.2.).

1.6.2.2.3. Les CD4 cytotoxiques

En plus de leur rôle dans la régulation de la réponse des lymphocytes B et T CD8, les T CD4 peuvent également se différencier en cellules cytotoxiques (CD4 CTL). Après reconnaissance des cellules infectées via les CMH de classe II, les CD4 CTL exercent leur activité cytolytique à la fois par leur capacité à produire du granzyme B et de la perforine, ainsi que par interaction avec FAS (CD95) (278, 279). Au même titre que les lymphocytes T CD8, les facteurs de transcription T-bet et Eomesodermin semblent également réguler la cytotoxicité des CD4 CTL. Du fait que T-bet est le facteur de transcription maître des cellules T_{H1}, la grande majorité des CD4 CTL dériveraient principalement de cette lignée (280, 281). Des lymphocytes T CD4 présentant une activité cytolytique ont été détectés chez des sujets au cours d'une infection chronique par le VHC et ce, à une fréquence plus élevée que chez des individus sains, mais moindre en comparaison de sujets infectés par le VIH (282). L'identification de mutations d'échappement au niveau des épitopes reconnus par les T CD4 soutient l'hypothèse que ces cellules peuvent appliquer directement une pression immunitaire grâce à la capacité des CD4 CTL à cibler les cellules infectées (283). La sélection des mutations virales par le VHC conduisant à l'évasion de la reconnaissance immunitaire par les T CD4 pourrait contribuer à l'établissement d'une infection chronique.

1.6.2.3. Infection chronique: Mécanismes d'échappements viraux

L'établissement d'une infection chronique dans 75% des cas souligne la capacité du VHC à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Outre la disparition des T CD4 auxiliaires spécifiques du VHC, la production de cytokines immunomodulatrices par les T_{REG}, l'épuisement des lymphocytes T et l'échappement viral sont deux mécanismes clés contribuant à l'établissement d'une infection chronique.

L'émergence de mutations d'échappement virales est définie par une ou plusieurs substitutions d'acides aminés au niveau des épitopes viraux reconnus par les T CD8 spécifiques du VHC (284). L'apparition de ces mutations induit une diminution de la reconnaissance de ces épitopes et permet ainsi au virus d'échapper à la pression des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC (285, 286). Les mutations d'échappements viraux apparaissent tôt au cours de la phase aigüe et participent à l'établissement d'une infection chronique (287, 288). Ces mutations ont été observées auprès de 50 à 70% des épitopes viraux ciblés par les T CD8 spécifiques du VHC chez les sujets présentant une infection chronique (287, 289). Elles peuvent être localisées à différentes positions : 1) Au niveau du site de liaison de l'épitope aux molécules HLA (de l'anglais, *human leukocyte antigen*) de classe I résultant en une diminution ou abolissement de l'affinité de fixation; 2) Au niveau des résidus impliqués dans le contact épitope-TCR (290) ou 3) Au niveau de la région flanquante de l'épitope virale résultant en un traitement protéasomal altéré des épitopes du VHC (291-293). Certaines mutations d'échappements peuvent entraîner une réduction de la capacité répliquative du virus (de l'anglais, *fitness cost*) (294-296). Dans ces cas-là, le virus peut revenir au type dit naturel ou sauvage (de l'anglais, *wild type*) en cas de transmission à un nouvel hôte négatif pour l'allèle HLA de classe I restrictif (292). D'autres études ont démontré l'apparition de mutations d'échappements conjointement à des mutations compensatoires afin de préserver la capacité répliquative du virus (297-299). Plusieurs études ont également reporté la présence de mutations d'échappements identiques chez des patients positifs pour le même allèle HLA de classe I restrictif, et non présent chez des sujets négatifs pour cet allèle, définissant un mécanisme appelé empreinte HLA de classe I (300-306).

Dans le cas de HLA-A*01, Neumann-Haefelin *et al.* ont démontré une accumulation d'un variant d'échappement viral associé à un faible coût de fitness virale, remplaçant ainsi le variant sauvage et devenant ainsi la séquence consensus dominante (307). Comme susmentionné, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC reconnaissant le variant sauvage qui a muté (CD8-ML) gardent une certaine capacité proliférative et effectrice (220, 223). Des études évaluant la réponse immunitaire spécifique du VHC auprès de femmes infectées chroniques avant et après accouchement soutiennent cette hypothèse (308, 309). En effet, Honegger *et al.* ont démontré que lorsque la pression des T CD8 est atténuée au cours de la grossesse, le virus mute cette fois-ci vers la séquence sauvage permettant aux T CD8 spécifiques du VHC d'émettre à nouveau une pression sélective après accouchement, résultant en un contrôle de la charge virale (308). Une étude récente a démontré que les femmes pouvant contrôler la virémie après accouchement, *versus* celles qui ne le peuvent pas, ont une fréquence élevée de lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC au profil Th1 (i.e. produisant IFN γ et IL-2) trois mois post-partum (309). L'ensemble de ces résultats suggérerait que les T CD4 permettraient le contrôle viral via une aide apportée au T CD8 spécifique du VHC.

A l'opposé des T CD8, nos connaissances sur l'existence de mutations d'échappements au niveau des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC restent encore limitées.

Chez le modèle murin d'infection par le LCMV, Ciurea *et al.* ont démontré une association entre la présence de mutations d'échappements au niveau des épitopes reconnus par les T CD4 et la persistance virale (310). Cependant, dans le cas d'une infection par le VHC, les résultats sont contradictoires. En effet, certaines études ont reporté un lien entre l'altération de la réponse CD4 et la présence de mutations d'échappements chez des sujets infectés par le VHC (283, 311, 312). A l'inverse, d'autres études ont reporté l'absence de mutations d'échappements au niveau des épitopes reconnus par les T CD4 auprès de la majorité des sujets infectés par le VHC, suggérant que ce mécanisme semble rare (313, 314). Fuller *et al.* ont comparé la fréquence des mutations d'échappements parmi les épitopes du VHC restreints au CMH de classe I versus classe II chez le modèle chimpanzé d'infection par le VHC (315).

Cette étude a reporté des mutations auprès de 75% versus 18% des épitopes des lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement, suggérant que les derniers sont relativement stables et que d'autres mécanismes seraient à l'origine de l'échec de la réponse T CD4 spécifique du VHC chez les sujets chroniques (315). Parce qu'il n'existe pas à ce jour de consensus concernant le rôle et l'impact des mutations d'échappements dans les épitopes des T CD4 spécifiques du VHC, des recherches supplémentaires restent nécessaires afin d'approfondir nos connaissances sur cet aspect de la réponse immunitaire antivirale.

1.6.2.4. Facteurs génétiques de l'hôte associés à la clairance spontanées de l'infection - Immunité cellulaire

Une réponse des lymphocytes T spécifiques du VHC robuste est liée aux facteurs génétiques de l'hôte. En effet, différentes molécules HLA de classe I et II ont été associées à une résolution spontanée de l'infection par le VHC (316-321).

Parmi les molécules HLA de classe I, HLA-A*03 (297), HLA-B*15 (322), HLA-B*27 (294, 298, 318, 323-327) et HLA-B*57 (299, 320) ont été associées à une résolution spontanée et portent les épitopes immunodominants issues des protéines virales NS3 (HLA-A*03) et NS5B (HLA-B*15, HLA-B*27 et HLA-B*57). Dans le cas d'une infection par le VIH, HLA-B*27 et HLA-B*57 ont également été associées à un meilleur contrôle viral (328, 329). Étudié en détail dans la littérature scientifique, le rôle protecteur de HLA-B*27 a été lié à un apprêtement (de l'anglais *processing*) de l'antigène viral rapide et à une incapacité du VHC de sélectionner des mutations d'échappements viraux en raison de leur impact délétère sur la capacité répliquative du virus (294, 325, 326). Les sujets développant une infection chronique par le VHC malgré l'expression de HLA-B*27 présentent de multiples mutations d'échappements au niveau de l'épitope reconnu par les lymphocytes T CD8 (294, 297). Ce schéma complexe d'évolution virale est nécessaire pour l'abolissement complet de la reconnaissance de l'épitope virale par les lymphocytes T CD8 présentant une flexibilité (i.e. pouvant reconnaître plusieurs variants d'un même épitope). Le taux élevé de clairance associé à HLA-B*27 pourrait donc être expliqué par une élimination de l'infection avant l'apparition de ce schéma complexe de mutations virales.

Cependant, il a été démontré que la protection associée aux molécules HLA de classe I est restreinte à certains génotypes et sous-types, telle qu'une protection contre les génotypes 1a et 1b, et non 3a, dans le cas de la molécule HLA-B*27 (324), ou encore le génotype 1a et non 1b dans le cas de HLA-B*57 (320). Cibler les lymphocytes T CD8 spécifiques de ces épitopes immunodominants représente un objectif important pour une stratégie vaccinale efficace.

Parmi les molécules HLA de classe II, plusieurs études menées auprès de différentes populations à travers le monde ont identifié HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*1101 et HLA-DQB1*0301 comme étant associé à une clairance spontanée de l'infection (330). Cependant, des variations selon l'origine ethnique ont été reportées. Par exemple, HLA-DRB1*0701 a été à la fois associé à une persistance virale dans les populations Européennes (331) et à une clairance virale auprès d'une cohorte thaïlandaise (332). Bien que certains allèles HLA de classe II aient été associés à une résolution spontanée de l'infection, des études supplémentaires restent nécessaires pour déterminer leurs rôles et impact sur la réponse immunitaire au cours de l'infection par le VHC.

1.6.3. Immunité humorale

1.6.3.1. Cinétique et importance dans le contrôle de l'infection par le VHC

Bien que l'ARN virale soit détectable dans le sang entre une à trois semaines suivant le début de l'infection, la séroconversion (i.e. présence d'anticorps anti-VHC) n'est observée qu'à partir de huit semaines environ (284, 333). Le rôle de la réponse humorale dans la résolution spontanée de l'infection par le VHC a longtemps été considéré comme mineur.

Bien que la présence d'anticorps capables de neutraliser l'infection par le VHC (nAbs) en ciblant les gpE1|E2 ait été décrite pour la première fois chez le modèle chimpanzé (334), leur génération n'a pas toujours été associée à une résolution spontanée (335, 336). Chez l'humain, une étude a reporté une réponse anticorps retardée, de titre faible, qui devient rapidement non détectable après élimination spontanée de l'infection (337).

De plus, plusieurs études ont rapporté une clairance à médiation cellulaire chez des sujets séronégatifs, suggérant que les nAbs ne sont pas nécessaires à l'élimination spontanée de l'infection (338-340).

A l'opposé, plusieurs études ces dernières années ont démontré une association entre l'apparition précoce des nAbs au cours de la phase aiguë de l'infection et la résolution spontanée (261, 262, 341-345). Une meilleure compréhension de l'implication de la réponse humorale au cours de l'infection par le VHC a été rendue possible grâce au développement d'outils appropriés pour la mesure des niveaux de nAbs. Les premières études sur la neutralisation des anticorps ont été limitées à l'utilisation d'un nombre restreints de séquences de références du VHC, résultant en une sous-évaluation de la réponse nAbs (108, 109). Le développement d'une banque de VHCpp constituée de 19 séquences génétiquement distinctes représentant la variabilité naturelle des gE1|E2 de génotype 1 observés chez des sujets (i.e. sujet-spécifique; autologue), a permis de souligner l'impact des nAbs, au cours de l'infection aiguë, sur l'évolution de la séquence HVR-1 de gE2 (341). L'utilisation de cette même banque de VHCpp a démontré une association entre la résolution spontanée et l'ampleur de la réponse nAbs générée tôt au cours de l'infection (262). Cette apparition des nAbs à des moments plus précoces en comparaison des infections chroniques n'est plus détectable dans le plasma des sujets après élimination de l'infection, suggérant une action rapide et de courte durée de la réponse humorale (261, 262, 341-343). Une étude récente a démontré que les nAbs générés dans les 100 jours suivant le début de l'infection virale ont une capacité de neutralisation étroite, dirigée contre le virus fondateur (343). Deux autres études ont démontré la capacité des nAbs à exercer une pression sélective sur les quasi-espèces en circulation conduisant à l'émergence de mutations d'échappements compromettant la capacité répliquative du VHC, contribuant ainsi à son élimination (344, 345). De plus, des nAbs cross-réactifs (bnAbs; i.e. définie comme la capacité de neutraliser différents variants génétiquement divers du VHC en ciblant des épitopes relativement conservés de gpE1|E2) ont également été isolés et pourraient protéger contre des infections hétérologues (346-349). L'apparition des nAbs est retardé chez les sujets (312, 341) et chimpanzés (350) développant une infection chronique, bien après la phase aiguë de l'infection.

Des bnAbs ont également été isolés à partir de plasma de sujets infectés chroniques (346-348). Bien que ces bnAbs ne permettent pas l'élimination de l'infection, ils ont été associés à un risque moindre de développer une fibrose hépatique (351). De plus, des patients présentant une hypogammaglobulinémie, défini par un taux d'anticorps très faible, ont une progression des maladies hépatiques rapide et sévère, suggérant un possible rôle protecteur des nAbs lors d'une infection chronique par le VHC (352). Le maintien des nAbs dans le temps semble nécessiter une stimulation continue des LBM spécifiques de gE2. En effet, la fréquence des cellules sécrétant des anticorps spécifiques de gE2 augmente à mesure que l'infection progresse vers la chronicité, coïncidant avec une augmentation des nAbs dans le plasma des sujets chroniques (270, 353-355). Le séquençage des bnAbs isolés à partir du plasma de sujets ayant résolu l'infection de façon spontanée a révélé que leurs générations nécessitent peu d'hypermutation somatique (270, 356). En effet, ces bnAbs partagent >92% et >96% d'identité avec la chaîne lourde et légère de la lignée germinale, respectivement, versus 86% d'identité (chaîne lourde) pour un bnAb isolé chez un patient chronique (356). Ces bnAbs ciblent principalement la région antigénique 3 (AR3) de gE2 et ont la particularité commune d'utiliser le segment V_H1-69 (270, 349, 357, 358). La présence de nAbs utilisant ce même gène a également été observé dans le contexte d'autres infections virales dont l'influenza et le VIH (359). Une étude récente de notre laboratoire confirme la présence de V_H1-69+ LBM gE2-spécifique indépendamment de l'issue de l'infection, cependant un enrichissement de V_H3-23+ LBM gE2-spécifique a également été observé (270). Leur rôle dans le cadre d'une infection par le VHC reste à être caractérisé. Toutefois, les anticorps V_H3-23+ neutralisent et protègent contre les infections par les flavivirus Dengue et Zika (360). Une caractérisation plus approfondie de la structure des bnAbs a montré que leur capacité d'interaction aux épitopes conservés de gE2 provient d'une longue région CDRH3 (entre 18 à 22 résidus) formant une structure d'épingle à cheveux β stabilisée par un pont disulfure (361, 362). Ces résultats ont une importance cruciale dans le design d'une stratégie vaccinale favorisant l'expansion des bnAbs chez l'homme.

La capacité de neutralisation des bnAbs était jusqu'à présent évaluée grâce à l'utilisation de panel de VHCpp présentant des séquences consensus de gpE1|E2 de différents génotypes ou variant intra génotypique du VHC propre à chaque laboratoire, rendant la comparaison des résultats entre les différentes études difficiles. L'équipe du Dr. Bailey a récemment développé une librairie de 15 VHCpp de référence antigénétiquement divers couvrant à la fois les 6 principaux génotypes (gt1a à gt6a) et 4 niveaux de sensibilité à la neutralisation (363). Ce panel peut à présent être utilisé comme standard de mesure de la largesse de la neutralisation des anticorps au cours des infections naturelles et après vaccination.

1.6.3.2. Mécanismes d'échappements de l'immunité humorale

Les nAbs ont pour cible majeure l'entrée virale au sein des hépatocytes. Cette neutralisation peut s'opérer à plusieurs niveaux : 1) empêcher l'attachement des virions à la cellule hépatique; 2) empêcher les interactions entre les particules virales et les facteurs d'entrée; 3) interférer avec la fusion virale (364). L'échappement de la réponse humorale par le VHC est possible grâce à de multiples stratégies.

L'épitope immunodominant HVR1 de la glycoprotéine E2, cible principale des nAbs (61, 365, 366), joue un rôle important dans l'échappement de la réponse humorale par le VHC. En effet, HVR1 mute à un taux élevé permettant une évasion continue de la réponse humorale, ainsi que la sélection de variants viraux hautement résistants à la neutralisation par les nAbs (312, 366, 367). Cette évolution de HVR1 façonnée par la pression des nAbs a été démontrée lorsque l'infection progresse vers la chronicité. A l'opposé, l'élimination spontanée de l'infection a été associée à une stase évolutive de la population quasi-espèce (100, 368). De plus, HVR1 élicite la production d'anticorps non-neutralisants qui masquerait la face neutralisante et protégerait le VHC de la liaison des nAbs (369). HVR1 agirait également comme un bouclier contre les nAbs en masquant les épitopes conservés et sites de liaison à CD81 situés au cœur de gE2. En effet, la suppression de HVR1 augmente de façon significative la sensibilité du VHC à la neutralisation par des anticorps monoclonaux et polyclonaux (i.e. sérum de patients) (370, 371).

Les N-glycosylations de gE2 agirait également tel un bouclier protecteur contre la reconnaissance par les nAbs. En effet, E2 contient 11 sites de N-glycosylation qui sont hautement conservés à travers les différents génotypes et leurs suppressions augmentent la sensibilité du VHC aux nAbs, confirmant qu'ils agissent par encombrement stérique sur les nAbs (372, 373).

L'association du VHC avec les lipoprotéines à haute densité de l'hôte faciliterait l'entrée virale via l'interaction avec le récepteur SR-BI, limitant ainsi l'exposition des virions aux nAbs (374, 375). Par ailleurs, la présence d'apoE autour des virions matures masquerait et protégerait la gE2 des nAbs (376).

Grâce à l'utilisation du système VHCcc, une étude récente a démontré la production d'exosomes recouvertes de gE2 par les cellules infectées *in vitro*. Ces exosomes agirait tels un leurre, interagissant avec les nAbs et diminuant ainsi leur disponibilité pour cibler les gpE2 à la surface des virions (377).

Une autre étude a récemment démontré que l'immunité innée, via les protéines transmembranaires induites par l'interféron (IFITM), peut également jouer un rôle important. En effet, l'échappement de la réponse humorale par le VHC a été associé à la résistance aux IFITM, des protéines limitant l'entrée de nombreux virus enveloppés, incluant le VHC, dans les cellules hôtes (378).

Finalement, le VHC échapperait à la réponse humorale grâce à sa capacité d'infecter les hépatocytes via une transmission de cellule à cellule facilitée par les récepteurs EGFR, CLDN1, OCLN et SR-BI (379-381).

1.7. Réinfection et immunité protectrice à long terme contre le VHC

1.7.1. Étude de la réinfection chez le modèle chimpanzé

Les chimpanzés ayant résolu spontanément une première infection peuvent être réinfectés par une souche homologue ou hétérologue du VHC (135, 382-387). Par conséquent, l'élimination spontanée d'une première infection ne protège pas complètement contre l'établissement d'une réinfection.

Bien qu'aucune immunité stérilisante n'ait été observée, une résolution spontanée des réinfections par une souche homologue ou hétérologue du VHC a été caractérisée par un niveau et une durée de virémie nettement réduits dans la majorité des études (135, 383, 384, 386-388), excepté une (389). Ces résultats suggèrent la présence d'une immunité protectrice induite après résolution spontanée d'une première infection. Les chimpanzés qui résolvent spontanément une infection primaire par le VHC développent des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires à longue durée de vie détectables dans le sang périphérique et le foie sept ans après l'élimination du virus (135). Le rôle central des lymphocytes T CD4 mémoires a été démontré par déplétion médiée par des anticorps chez deux chimpanzés ayant initialement résolu une première infection par la souche 1a du VHC. En effet, la déplétion des lymphocytes T CD4 mémoires a résulté en une virémie persistante, de faible niveau, après réinfection par une souche homologue du VHC, malgré la présence de lymphocytes T CD8 mémoires intra-hépatiques fonctionnels (134). En l'absence d'une aide adéquate des lymphocytes T CD4, le contrôle partiel de la réinfection par les lymphocytes T CD8 mémoires a été caractérisé par l'émergence de mutations au niveau des épitopes restreints au CMH-I et une persistance virale après plus d'un an de suivi (134). Par une approche similaire, la déplétion des lymphocytes T CD8 mémoires, avant une troisième infection, a entraîné un retard significatif du contrôle de la virémie, et ce, malgré la présence des lymphocytes T auxiliaires CD4 mémoires. Le contrôle de la virémie a coïncidé avec la réapparition de lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC dans le foie (135). En comparaison avec la première infection chez les mêmes chimpanzés, les lymphocytes CD4 et CD8 produisant de l'IFN γ ont été détectés plus tôt et à une fréquence plus élevée après réexposition virale (134, 135, 383, 384, 386, 388). De plus, la hiérarchie des épitopes dominants reconnus par les lymphocytes T CD4 a été conservée après réexposition par une souche homologue du VHC, et ce 7 ans après l'élimination d'une première infection (136). Cette réponse protectrice a été caractérisée par l'expansion de clonotypes possédant une plus grande avidité et activité antivirale, détectables à la fois dans le sang périphérique mais aussi, et à une plus grande fréquence, dans le foie (390, 391).

A l'opposé, une virémie persistante après réexposition caractérisée par l'émergence de mutations d'échappement a été associée à une diversité des répertoires de TCR réduite (390). L'immunité innée joue également un rôle dans l'immunité protectrice au cours d'une réinfection par une souche hétérologue du VHC. En effet, la résolution de la réinfection chez un chimpanzé sur deux a été associée à une expression intra-hépatique plus importante des gènes CD8, CD56, IFN de type I et II, et d'ISG, peu de temps après inoculation et ce, en l'absence de nAbs (392).

Dans l'ensemble, les expériences effectuées chez le modèle chimpanzé ont pu démontrer le rôle crucial des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires dans la protection contre les réinfections. A l'opposé, les nAbs semblent ne pas être nécessaires, ni suffisants dans l'établissement d'une immunité protectrice à long terme chez le chimpanzé (134, 135, 392).

1.7.2. Étude de la réinfection chez l'Homme

Une cohorte de femmes ayant été exposées accidentellement à une même souche du VHC de génotype 1b ont développé des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires à longue durée de vie détectables dans le sang périphérique 18 à 20 ans après l'élimination du virus. Les anticorps anti-VHC circulants ont été, quant à eux, indétectables (155). Des individus exposés à des doses subcliniques en milieu domestique (393), professionnel (394, 395), ou via l'utilisation de drogues par voie intraveineuse (396), mais non infectés et en absence d'anticorps anti-VHC, ont également développé des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC. La caractérisation phénotypique des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC ont démontré que ces derniers exprimaient les marqueurs de surface caractéristiques des cellules mémoire centrale (T_{CM} : $CCR7^+ CD45RA^- CD127^+$) (397). Consistant avec un profil de cellules T CD8 mémoires à longue durée de vie (398), les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC générés après élimination du virus sont caractérisés par l'expression accrue de CD127 et Bcl-2 (399-401), ainsi que l'expression diminuée de KLRG1 (402). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le maintien pendant des périodes prolongées des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC.

De façon générale, les T CD8 mémoires expriment des facteurs de transcription qui favorisent leur maintenance et auto-renouvellement. Le facteur de transcription FOXO1, par exemple, promeut l'expression de gènes pro-mémoire et pro-survie tels que IL7R, *BCL2*, *SELL*, *CCR7*, et *TCF7* (403, 404). De manière antigène-indépendante, les cytokines de la famille γ qui sont IL-7, IL-15 et IL-21, favorisent la survie et la prolifération homéostatique basale des lymphocytes T mémoires (405-407). De plus, certaines études ont démontré qu'une quantité minimale d'ARN du VHC est maintenue pendant une période prolongée après élimination de l'infection, suggérant qu'une restimulation périodique des lymphocytes T mémoires spécifiques du VHC pourrait également contribuer à leur maintien (408-410). Enfin, la présence de lymphocyte T CD4 et CD8 spécifique d'épitopes viraux chez des sujets non-exposés indique qu'une restimulation périodique par des antigènes viraux cross-réactifs permettrait également le maintien dans le temps des lymphocytes T mémoires (235, 411, 412).

Les individus ayant résolu une première infection par le VHC peuvent être réinfectés (413-416). Plusieurs études ont démontré que les UDI qui ont spontanément résolu une première infection sont moins susceptibles d'être réinfectés et développer une virémie persistante en comparaison de leurs homologues séronégatifs (385, 415, 417). Cependant, une autre étude a démontré le contraire, avec un taux d'infection plus élevé chez les IDU ayant résolu une première infection et un risque équivalent de développer une virémie persistante en comparaison des IDU naïfs (418). Une étude menée au Canada par Grebely *et al.* a démontré que le taux de infection chez les UDI ayant résolu une première infection était 4 fois moindre en comparaison de ceux précédemment non infectés. Cette même étude a démontré que le taux d'incidence des réinfections reporté dans la littérature étaient inconsistant en raison d'un intervalle de tests d'ARN viral différents (419). En effet, certaines réinfections résolues très rapidement pourraient avoir été manquées lorsque l'intervalle entre deux tests d'ARN était plus important. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer un risque de réinfection et de virémie persistante moindre. Outre la présence des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires, certains facteurs relatifs à l'hôte tels que le sexe, l'âge et le génotype IFNL3 (CC), sont associés à une résolution spontanée après réinfection (419, 420).

Finalement, des interventions mises en place, telle que le programme d'échange de seringues, afin de conseiller et éduquer les UDI sur les risques d'infection par le VHC peuvent également avoir un impact (421, 422).

En effet, il est possible que les UDI ayant été déjà infectés, prennent plus précaution lors du partage de leur matériel d'injection, diminuant ainsi le risque de réinfection.

Osburn *et al.* ont été les premiers à étudier la réponse immunitaire au cours de la réinfection par le VHC chez les UDI ayant éliminé spontanément une première infection (416). Les cas de réinfections ont été délimités par deux paramètres : un minimum de 60 jours entre deux infections et l'identification d'une nouvelle infection distincte de la précédente par analyse des séquences Core-E1. Parmi les 22 UDI sélectionnés, 50% ont été réinfectés, parmi lesquels 83% ont éliminé spontanément la deuxième infection. Cette résolution fut caractérisée par un niveau et une durée de virémie nettement réduits en comparaison de la première infection, ainsi qu'à une réponse immunitaire cellulaire élargie (i.e. ciblant plus d'épitopes), et pour 60% des cas, à la génération de nAbs (416). Consistant avec les résultats observés chez le modèle chimpanzé, ces résultats ont démontré qu'une première infection résolue influence non seulement l'issue de la suivante, mais également sa cinétique (**Figure 10A**). Par conséquent, il existe une immunité protectrice naturelle dans le modèle humain de réinfection par le VHC.

Notre laboratoire a entrepris la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC, avant et au cours de la réinfection, chez les UDI ayant éliminé deux infections consécutives *versus* ceux qui ont développé une infection chronique après réexposition virale (423). L'immunité protectrice a été associée à la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 mémoire polyfonctionnelle. Avant réinfection, les T CD8 CD127^{hi} mémoire VHC-spécifique ont été détectés dans les deux groupes, mais seuls les résolveurs spontanés ont développé les lymphocytes T mémoire polyfonctionnelle aux côtés des lymphocytes T mémoire effecteur CD127^{lo}, tous deux exprimant de faibles niveaux de PD-1. A l'opposé, les cellules T mémoire préexistantes de patients infectés de façon chronique avaient non seulement une expansion confinée en raison de la non-reconnaissance des variants viraux, mais exprimaient également des niveaux variables de PD-1 (**Figure 10B**).

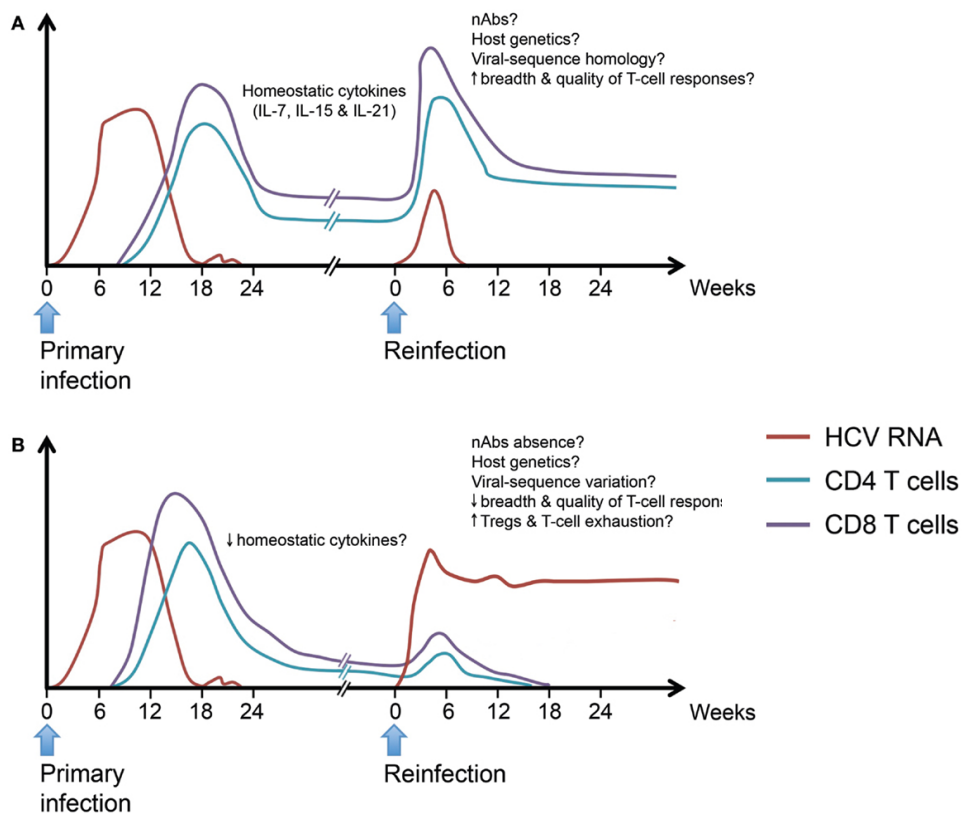


Figure 11 | Modèle hypothétique de réponse immunitaire protectrice et non-protectrice en réponse à une réinfection par le VHC (Adapté de Abdel-Hakeem *et al.* (211)). Après élimination spontanée d'une première infection, les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires sont maintenus via l'action des cytokines homéostatiques IL-7, IL-15 et IL-21. **(A)** La résolution d'une réinfection est caractérisée par une magnitude et une durée de virémie plus courte, ainsi qu'une expansion rapide des lymphocytes T mémoires. **(B)** A l'opposé, une virémie persistante après réinfection est caractérisée par une expansion limitée des lymphocytes T mémoires ainsi que par l'émergence de mutations d'échappement. D'autres facteurs encore peu caractérisés tels que l'absence de nAbs, certains facteurs génétiques de l'hôte ou encore une expansion des Tregs pourraient jouer un rôle important dans la persistance de la réinfection.

Dans l'ensemble, l'étude a démontré que l'immunité protectrice résulte de plusieurs facteurs dont la magnitude, le spectre et la qualité de la réponse des lymphocytes T mémoire VHC- spécifiques (423). Une analyse approfondie du répertoire des TCR chez ces mêmes patients a révélé que les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC en expansion après réinfection provenaient quasi-exclusivement du répertoire de lymphocytes T mémoire préexistant (424). La protection contre une virémie persistante a été associée à un répertoire des TCR plus restreint en pré-réinfection. Post-réinfection, ces répertoires sont devenus plus focalisés, avec l'expansion préférentielle de clonotypes présentant une plus grande avidité fonctionnelle et une polyfonctionnalité (424).

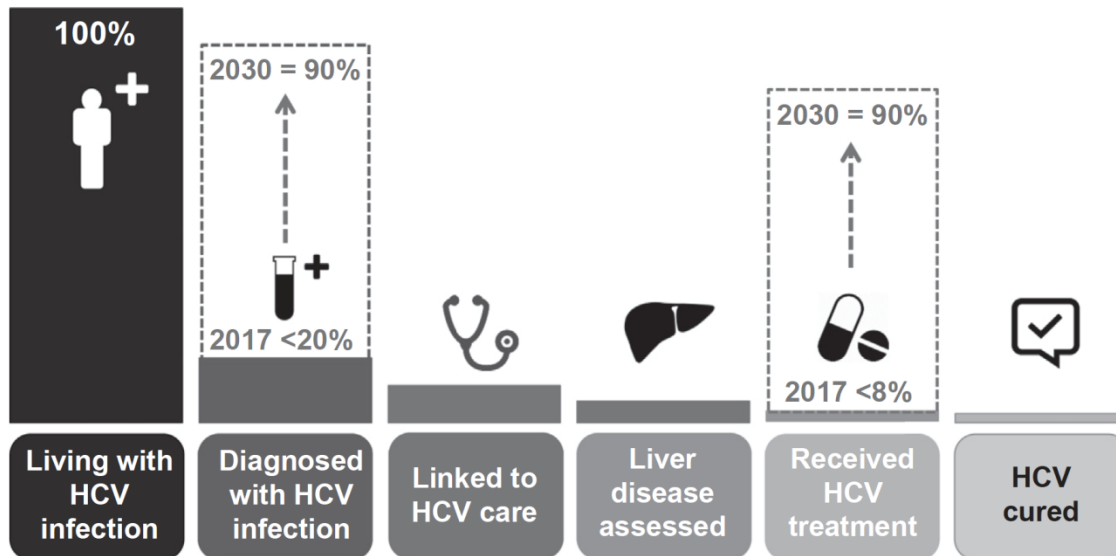
La protection contre l'établissement d'une infection chronique a également été associée à la génération de nAbs cross-réactifs (358, 416). Une étude récente par Merat *et al.* a caractérisé la présence de nAbs chez les UDI capables d'éliminer de multiples réinfections. L'étude a démontré que la majorité des nAbs cross-réactifs contre au moins 3 génotypes ciblent principalement la partie AR3 de la glycoprotéine E2. De plus, les LBM exprimant des nAbs cross-réactifs ont été détectés dans le sang périphérique jusqu'à 25 ans après l'élimination spontanée d'une première infection (358, 425). Bien que la présence de nAbs ait été reportée, des études supplémentaires restent nécessaires afin de déterminer l'importance de la réponse humorale au cours de la clairance d'une réinfection.

1.8. Vaccin contre le VHC

1.8.1. Élimination du VHC: Défis à relever à l'ère des AAD

Un changement de paradigme s'est opéré pour le traitement des infections par le VHC avec l'introduction des AAD. Ce succès conduit l'OMS à adopter une stratégie mondiale d'élimination des hépatites virales (VHB et VHC) d'ici 2030 (6). Il existe toutefois plusieurs défis associés à la réussite de cette stratégie d'élimination.

L'ambitieux objectif fixé par l'OMS nécessite la mise en place d'une stratégie permettant un taux annuel de guérison induite par les AAD considérablement supérieure au taux de nouvelles infections par le VHC.



Malheureusement, l'inverse a été observé en 2016 auprès de 54 pays sur 91 analysés, avec seulement quelques rares pays, tels que le Japon et l'Australie, en voie d'éliminer le VHC d'ici 2030 (426). Selon une étude menée en 2018 auprès de 45 pays à revenu élevé, 80% sont en mauvaise voie d'atteindre les objectifs instaurés par l'OMS, incluant le Canada (427).

L'élimination du VHC à travers le monde nécessite des stratégies ciblées touchant les différents axes de la cascade des soins, dont une amélioration du dépistage, lien vers les soins et finalement, le traitement de l'infection (**Figure 11**, (428)). En effet, le dépistage précoce de l'infection par le VHC permettrait non seulement de réduire les risques de développer une maladie hépatique, mais également de prévenir la transmission du virus. Depuis 2019, la pandémie inattendue de COVID19 a des répercussions négatives sur la cascade des soins du VHC, mettant encore plus en péril les progrès actuels vers l'élimination du VHC dans le monde (429, 430).

Un autre défi associé à l'élimination du VHC est le coût élevé des AAD. En Amérique du Nord, le coût du traitement (i.e. d'environ 25.000\$ US) représente un réel frein pour l'élimination de l'infection, en particulier chez les sujets ne possédant pas d'assurance médicale (432).

Cependant, un système de négociation des prix permet aux compagnies pharmaceutiques de vendre à moindre coût des AAD génériques aux pays à faible revenu, parmi lesquels le Pakistan avec un prix de 60\$ par traitement (426).

Comme mentionné précédemment, les traitements AAD ne protègent pas contre les réinfections. De plus, des risques de développer un CHC persistent après élimination de l'infection. Dans l'ensemble, ces facteurs incitent au développement d'un vaccin prophylactique pour enrayer efficacement et rapidement l'épidémie de VHC (38, 433).

1.8.2. Importance et impact potentiel d'un vaccin contre le VHC

Une stratégie vaccinale idéale permettrait de prévenir l'établissement d'une infection (i.e. immunité stérilisante), réduisant ainsi l'incidence globale du VHC (**Figure 12A**). Néanmoins, une stratégie vaccinale prévenant la persistance de l'infection sans toutefois prévenir l'incidence permettrait de réduire la morbidité/mortalité associée au VHC (**Figure 12B**). Plusieurs études ont modélisé l'impact potentiel d'un vaccin sur la transmission et prévalence du VHC chez les UDI (433-436). Ces modèles ont intégré plusieurs scénarios possibles, incluant différentes efficacités ou stratégies d'administration du vaccin. Ces modélisations mathématiques ont démontré la possibilité d'une réduction substantielle de la transmission du VHC grâce à une stratégie vaccinale de faible efficacité. En effet, une virémie de faible niveau au cours de la phase aiguë de l'infection permettrait de réduire la présence du virus au niveau des matériaux d'injections partagés entre UDI (436). Par conséquent, le développement d'une stratégie vaccinale permettant de prévenir le développement d'une infection chronique avec des taux d'ARN virale faible semble un objectif raisonnable dans la lutte contre le VHC.

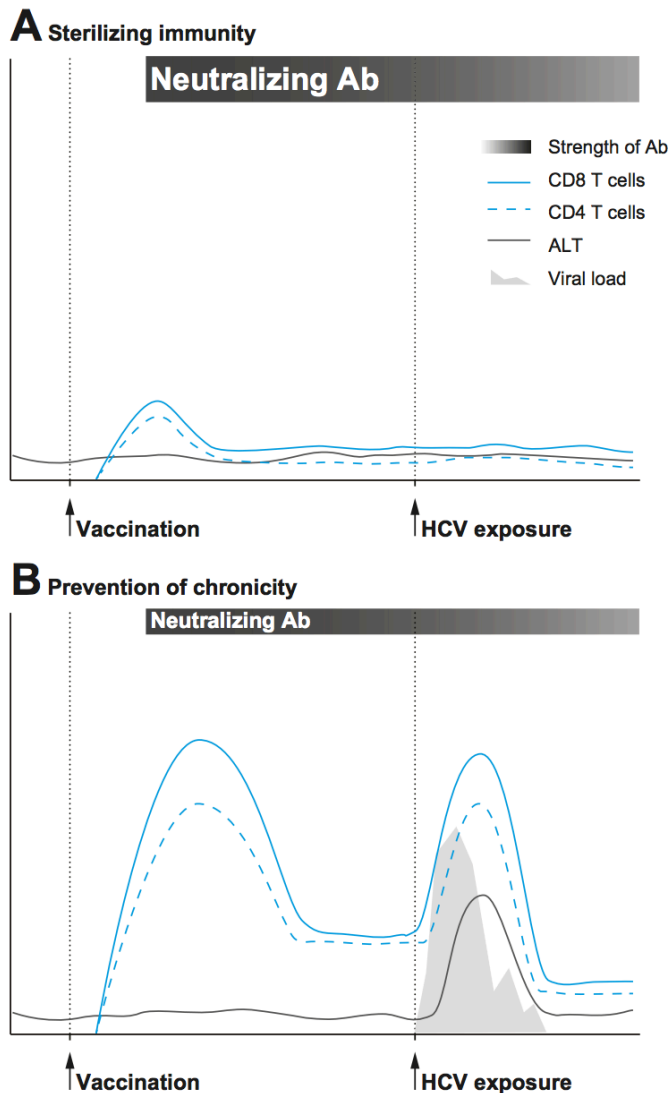


Figure 13 | Réponses immunitaires potentielles après vaccination contre le VHC (Adapté de Baumert *et al.* (437)).

La stratégie vaccinale idéale contre le VHC induirait une immunité stérilisante médiée par les nAbs (A). Néanmoins, une stratégie permettant la prévention d'une infection chronique médiée principalement par les lymphocytes T CD4 et CD8 mémoires semble plus réalisable (B).

1.8.3. Stratégies vaccinales contre le VHC

Des vaccins prophylactiques contre les virus de la famille des *Flaviridae*, dont YFV et l'encéphalite japonaise ont été développés avec succès. Ces vaccins reposent sur l'utilisation de virus vivants atténués ou inactivés, et leurs utilisations ont significativement réduit l'incidence des infections (438, 439). Une approche similaire dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre le VHC semble attractive. En effet, le sérum de souris immunocompétentes immunisées par des particules VHCcc inactivées par les UV a protégé les souris uPa-SCID de l'infection par le VHC (440).

Cette approche vaccinale n'a été rendue possible que grâce au développement récent de systèmes de culture cellulaire permettant une répllication productive du VHC (441). Cependant, les aspects pratiques de production et de purification à grande échelle limitent à ce jour l'utilisation de particules du VHC inactivées comme stratégie vaccinale (442, 443). Pour ces raisons, les stratégies développées à ce jour reposent sur l'utilisation de gènes ou protéines du VHC sous différentes formulations vaccinales, tels que les pseudo-particules virales (444) ou encore, les plasmides à ADN (445, 446). A ce jour, l'immunogénicité de seulement deux stratégies vaccinales contre le VHC a été évaluée chez l'homme. Le premier vaccin, développé par Chiron/Novartis, est composé des glycoprotéines E1|E2 recombinantes, conçu pour induire une réponse humorale et donc, neutraliser le virus (447). Le second développé par Okairos/GlaxoSmithKline repose quant à lui sur l'expression des protéines NS du VHC et induit une immunité cellulaire destiné à détruire les cellules infectées (143).

1.8.3.1. Réponse humorale : les vaccins recombinant sous unitaire

Les vaccins recombinant sous unitaire sont déjà utilisés avec succès pour l'immunisation contre différents pathogènes dont l'hépatite B (448). Pour le VHC, la formulation la plus prometteuse repose sur l'utilisation des gpE1|E2 recombinantes (rgpE1|E2) dérivé d'un isolat de génotype 1a. L'approche rgpE1|E2 a été initialement testée chez le modèle chimpanzé et a résulté en une forte réponse humorale. Sept chimpanzés ont été immunisés, puis infectés avec une souche homologue du VHC. Parmi eux, cinq ont développé une immunité stérilisante, tandis que les deux autres ont résolu l'infection de façon spontanée (449). Il a été démontré plus tard que les sept chimpanzés ont développé des anticorps neutralisants contre les génotypes 1a, 4a, 5a et 6a (450). Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres modèles animaux (447, 451). Suite à ces résultats prometteurs, un essai clinique de phase I a été entrepris. Des sujets sains ont reçu ou non (i.e. groupe placebo) 4 doses successives (jours 0 et semaine 4, 24 et 48) de rgpE1|E2 additionné d'un adjuvant huile dans l'eau (MF59C.1) (452).

Le vaccin a dans l'ensemble été bien toléré et a permis l'induction d'une réponse humorale et cellulaire avec la détection de nAbs ciblant de multiples épitopes et une prolifération des lymphocytes T CD4 spécifiques des gpE1|E2 polyfonctionnelles (452-454). Une étude complémentaire a démontré, grâce à l'utilisation d'un panel de VHCcc (génotype 1 à 7), que seulement 3 sujets sur 16 ont développé des bnAbs en réponse au vaccin (455). Ces résultats suggèrent la nécessité d'optimiser la stratégie vaccinale afin de potentialiser l'induction de bnAbs.

Certains défis sont associés au développement industriel du vaccin rgpE1|E2, dont une difficulté à produire et purifier les glycoprotéines à grande échelle. En effet, la purification des gpE1|E2 repose sur une méthode non-spécifique de faible affinité (456). Dans l'optique de faciliter la production, Ruwona *et al.* ont supprimé les domaines transmembranaires des gpE1|E2 afin d'obtenir une forme soluble du complexe. Cependant, cette approche a altéré l'immunogénicité des gpE1|E2 avec un taux faible de nAbs induit chez le modèle murin (457). Une étude précédente a démontré que la région HVR1 de gpE2 masque les épitopes conservés ciblés par les bnAbs (371), incitant la production d'un dérivé soluble tronqué de cette glycoprotéine (458-460). Chez le modèle animal, cette formulation vaccinale a induit la production de bnAbs neutralisant les génotypes 2a, 4a, 5a, 6a et 7a (459). Cependant, une étude par Law *et al.* a démontré par la suite que les gpE1|E2 tronquées de la partie HVR1 induisaient un taux de nAbs contre la souche homologue (i.e. gt1a) plus faible que la formulation complète (461). Ainsi, la suppression de HVR1 ne semble pas être nécessaire pour l'optimisation de la stratégie vaccinale.

Dans l'ensemble, des recherches supplémentaires sont à ce jour nécessaires afin d'optimiser la combinaison antigène/adjuvant qui potentialisera la production de bnAbs et qui permettra, idéalement, d'induire une immunité stérilisante.

1.8.3.2. Réponse cellulaire: les vaccins vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont des outils prometteurs capables d'induire une réponse cellulaire robuste (462). Dans le cadre du VHC, les premiers résultats d'une approche vaccinale utilisant les vecteurs viraux ont été obtenus chez le modèle chimpanzé.

Les gènes codant pour les protéines NS3 à NS5 de gt1b du VHC ont été délivrés via les adénovirus de sérotype 6 (Ad6) et 24 (Ad24) comme amorce (i.e. prime), suivis d'un rappel (i.e. boost) d'ADN plasmidique (143). Suite à l'inoculation par une souche hétérologue (gt1a) du VHC, les cinq chimpanzés vaccinés ont montré un taux d'ALT et de virémie inférieure au groupe contrôle (i.e. non vacciné). Des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC à réactivité croisée ont été détectés à la fois dans le sang et dans le foie des chimpanzés vaccinés. Quatre chimpanzés sur cinq ont éliminé l'infection avec une durée et magnitude de virémie plus courte que le groupe contrôle, tandis que le cinquième a maintenu un niveau faible mais constant d'ARN viral tout au long de la durée de l'étude. En comparaison, deux chimpanzés sur cinq du groupe contrôle ont développé une infection chronique (143). Une autre étude par Park *et al.* a observé une expansion précoce des T CD8 CD127⁺ PD1⁻ polyfonctionnelles chez les chimpanzés vaccinés en comparaison du groupe contrôle (463). Une signature similaire fut par la suite observée chez des chimpanzés éliminant une infection aiguë de façon spontanée (400). Au vu de ces résultats prometteurs, des vecteurs viraux à adénovirus de chimpanzé non réplicatifs (ChAd) ont été criblés afin d'identifier ceux non neutralisés par le sérum humain (464). Le vecteur viral ChAd3 a été sélectionné pour sa capacité à induire une réponse cellulaire de longue durée de vie chez les modèles murins et macaques.

La formulation vaccinale composée de l'amorce ChAd3 suivie d'un rappel utilisant la vaccine modifiée Ankara (MVA) exprimant tous deux les protéines NS3 à NS5 (ChAd3/MVA-NS) de gt1b a été testée chez des sujets sains en phase I d'essai clinique (465, 466). L'approche amorce/rappel ChAd3/MVA-NS a été bien tolérée et très immunogène, avec l'amorçage de lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC polyfonctionnelles, à réactivité croisée (i.e. réactifs aux gt1a et 3a) et ciblant les protéines NS3 à NS5 du VHC. Ces cellules ont été détectées dans le sang plus d'un an après vaccination et présentaient un profil phénotypique et fonctionnel typique des lymphocytes mémoires à longue durée de vie centrale (T_{CM}) et effecteur (T_{EM}) (465, 467). De plus, une étude récente par Hartnell *et al.* a démontré grâce à l'utilisation de tétramère CMH de classe II que les T CD4 auxiliaires après vaccinations sont présents avec un phénotype et une fréquence similaire à ceux des UDIs ayant résolu une infection spontanément (468).

La stratégie vaccinale ChAd3/MVA-NS a été récemment testée chez 548 UDIs dans le cadre d'un essai clinique de phase II (clinicaltrials.gov; Identifiant: NCT01436357). Une étude récente a indiqué que 14 UDIs de chaque groupe (i.e. ChAd3/MVA-NS et placebo) ont développé une infection chronique, suggérant ainsi que cette stratégie vaccinale n'est pas efficace (469). Toutefois, des résultats préliminaires présentés au symposium HCV2021 ont démontré que les sujets vaccinés présentaient une réduction significative du pic d'ARN viral en comparaison des sujets non vaccinés. Ces premiers résultats suggèrent donc que les lymphocytes T mémoires induits par le vaccin permettraient un contrôle partiel de la virémie sans toutefois prévenir l'établissement d'une infection chronique. Comprendre les paramètres immunologiques de cet échec sera essentiel afin d'améliorer cette stratégie vaccinale. Les vaccins contre le VHC de nouvelles générations combineront très probablement les deux approches testées à ce jour afin d'induire à la fois une réponse cellulaire et humorale. Ils nécessiteront également l'utilisation d'un adjuvant afin de potentialiser les réponses T telles que la chaîne invariante de requin tronqué (sli_{tr}) (470, 471).

1.8.4. Défis associés au développement et l'expérimentation d'une stratégie vaccinale efficace

De nombreux défis entravent encore à ce jour le développement d'une stratégie vaccinale efficace.

Parmi ces défis, la très grande diversité génétique du virus avec 8 génotypes et 90 sous-génotypes, donnant lieu à une réponse immunitaire spécifique au génotype d'infection (95, 472). En effet, une réactivité croisée inter-génotypique des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC restreinte a été observée chez des sujets infectés par les génotypes 3 (473) et 4 (474). Toutefois, un vaccin codant pour les régions conservées du VHC a généré des lymphocytes T CD8 à réactivité croisée inter-génotypique chez le modèle murin (475). De plus, des nAbs capables de neutraliser de multiples génotypes ont été détectés chez plusieurs sujets infectés (270, 358), soulignant que ce challenge n'est pas insurmontable.

Un autre facteur important influençant la réponse aux vaccins est la variation génétique entre les individus (476). Les vaccins conçus pour induire une réponse immunitaire cellulaire devront contenir des antigènes pouvant être présentés par de multiples molécules HLA. La stratégie vaccinale devra également surmonter certains facteurs de l'hôte influençant la réponse immunitaire tels que l'âge, la consommation d'alcool ou encore les co-infections (477). De plus, une meilleure compréhension des paramètres de l'immunité protectrice reste cruciale pour le développement d'un vaccin anti-VHC efficace.

Le manque de modèles animaux précliniques immunocompétents a longtemps constitué un frein important. L'utilisation de virus analogues au VHC, tel que HV-Nr et HV-Eq, permet à présent l'évaluation de stratégies vaccinales chez leurs hôtes naturels, le rat et le cheval, respectivement. Il existe toutefois des différences génétiques entre ces espèces et l'homme qu'il faut prendre en considération. Par exemple, la région CDRH3 des immunoglobulines a une longueur de 16 résidus chez l'homme, versus 12 chez la souris (478) et 14 chez le cheval (479), suggérant que ces modèles pourraient ne pas être pertinents pour prédire la réponse humorale chez l'homme. De plus, un choix limité de réactifs spécifiques des antigènes de rat et cheval restreint un peu plus l'étude de la réponse immunitaire chez ces modèles.

Néanmoins, le modèle rhesus macaque semble être le modèle intermédiaire pertinent pour l'étude de la réponse humorale (147) et cellulaire (480), ainsi que l'évaluation de l'innocuité d'une formulation vaccinale avant les tests cliniques chez l'homme.

Finalement, un dernier challenge est le recrutement de sujets à haut risques d'infection, dont notamment les UDI, pour les essais cliniques (161). Avec le succès actuel des AAD pour le traitement du VHC, certains chercheurs ont soulevé la possibilité de tester une stratégie vaccinale chez des sujets sains, suivi d'une infection par le VHC soigneusement surveillée afin d'intervenir en cas de persistance. L'infection intentionnelle de sujets sains vaccinés semble peu éthique, cependant cette approche a été utilisée dans le cadre d'autres maladies infectieuses (481), dont la malaria (482) et plus récemment le COVID-19 (483).

En conclusion, un avancement important s'est produit ces dernières années dans le développement d'une stratégie vaccinale contre le VHC. Il reste toutefois encore à ce jour des défis importants. Les surpasser nécessitera des efforts collaboratifs de la communauté scientifique afin de définir les paramètres de l'immunité protectrice, établir des cohortes pertinentes et conduire les essais cliniques vaccinaux.

1.9. Analyse transcriptomique de la réponse immunitaire

1.9.1 Profil d'expression de génique

1.9.1.1. Principe

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des transcrits d'ARN d'un échantillon cellulaire à un temps et une condition donnée. En effet, l'analyse transcriptomique permet de déterminer à un instant donné quels sont les gènes exprimés (i.e. aspect qualitatif) et le niveau d'expression de chacun de ces transcrits (i.e. aspect quantitatif) à l'échelle de la cellule unique (*single cell RNA-seq* ou scRNA-seq), d'un ensemble de cellules (e.g. PBMC) ou encore d'un tissu (e.g. biopsies hépatiques).

1.9.1.2. Technologies

Depuis les années 1990, un nombre grandissant de technologies a été développé afin de déterminer le transcriptome d'un échantillon biologique (484). Les deux approches principales utilisées à ce jour sont la technique dite de **microarray** et le séquençage à haut débit de l'ensemble des transcrits d'ARN appelé **RNA-seq** (de l'anglais *RNA-sequencing*).

La technique de **microarray** repose sur le principe d'hybridation, i.e. la capacité d'un brin simple d'ADN de se reformer en double hélice en présence d'un brin complémentaire. Brièvement, les ARN messagers (ARNm) extrait d'un échantillon biologique sont dans un premier temps rétro-transcrits en ADNc et étiquetés d'un fluorochrome.

Ces ADNc sont ensuite hybridés à une collection de fragments d'ADN fixés à un support solide et de séquences connues représentant l'ensemble des gènes d'intérêts. L'intensité du signal détectée permet de déterminer le niveau d'expression d'un gène donné.

La technique **RNA-seq**, quant à elle, repose sur le séquençage à haut débit de nouvelle génération (NGS, de l'anglais *next-generation sequencing*), telle qu'Illumina. Brièvement, cette technologie repose sur la préparation de bibliothèques composées de fragments d'ADNc couplés à des adaptateurs de séquençage à une (*single-end*) ou aux deux (*paired-end*) extrémités. Après une étape d'amplification en pont permettant d'amplifier le signal, chaque fragment est séquençé par synthèse. Les séquences sont ensuite alignées à un génome de référence puis quantifiées afin de déterminer le niveau d'expression de chaque transcrite pour un échantillon donné (484).

S'ensuit une étape de normalisation afin de supprimer toutes les variations techniques indésirables entre tous les échantillons séquençés comme, par exemple, une profondeur de séquençage (i.e. nombre de lectures ou « *reads* ») différente (485).

Bien que plus onéreuse, la technologie RNA-seq présente de nombreux avantages sur l'approche micro-array. En effet, la technologie RNA-seq offre la possibilité de détecter de nouveaux transcrits, polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP, de l'anglais *single nucleotide polymorphism*) et autres changements auparavant inconnus que l'approche micro-array via les sondes de séquences connues ne peuvent pas détecter. Cette approche permet également la détection de transcrits rare ou de faible abondance dû à une sensibilité plus élevée (486).

1.9.2. Analyse transcriptomique de la réponse immunitaire

L'étude des signatures transcriptomiques représente une approche puissante pour une caractérisation approfondie de la réponse immunitaire induite en réponse aux infections virales chez l'Homme. Dans le cas de cette thèse, le suivi longitudinal d'UDI au cours de multiples infections par le VHC représente une opportunité unique d'étudier la réponse immunitaire au niveau transcriptomique à partir des PBMC totaux, et ce, en comparaison d'un état basal de pré-(ré)infection.

L'analyse dite d'expression différentielle des gènes (DEG, de l'anglais *differentially expressed genes*) permet de comparer un état biologique (e.g. phase aigüe de l'infection) à un état basal (e.g. pré-infection) au niveau transcriptomique. Les DEG sont déterminés par l'utilisation d'un test paramétrique (*t*-Test) et sont triés, avec en haut et en bas de la liste les gènes régulés à la hausse et à la baisse dans le phénotype d'intérêt (i.e. phase aigüe de l'infection), respectivement. Néanmoins, la compréhension des processus immunologiques au cours d'une infection par l'analyse seule des DEGs est difficile et laborieuse. Pour cette raison, une analyse des données transcriptomiques puissante a été développée qui consiste en l'enrichissement de plusieurs ensembles de gènes (GSEA, de l'anglais *Gene Set Enrichment Analysis*) associés à une signature moléculaire (487).

1.9.2.1. Enrichissement des ensembles de gènes (GSEA)

GSEA détermine si un ensemble de gènes défini *a priori* (ou module) présente une différence statistiquement significative entre deux phénotypes (Figure 13). Le score d'enrichissement (ES) calculé pour chaque module reflète le degré de surreprésentation d'un ensemble de gènes aux extrémités de la liste DEG. Les ES de chaque module sont ensuite normalisés (NES, de l'anglais *normalized enrichment score*) afin de tenir compte de la taille du module (i.e. nombre de gènes formant le module). Finalement, une dernière étape de calcul du taux de fausses découvertes (FDR, de l'anglais *false discovery rates*) défini par Benjamini et Hochberg (488), permet de déterminer si chaque NES représente un résultat faussement positif (487).

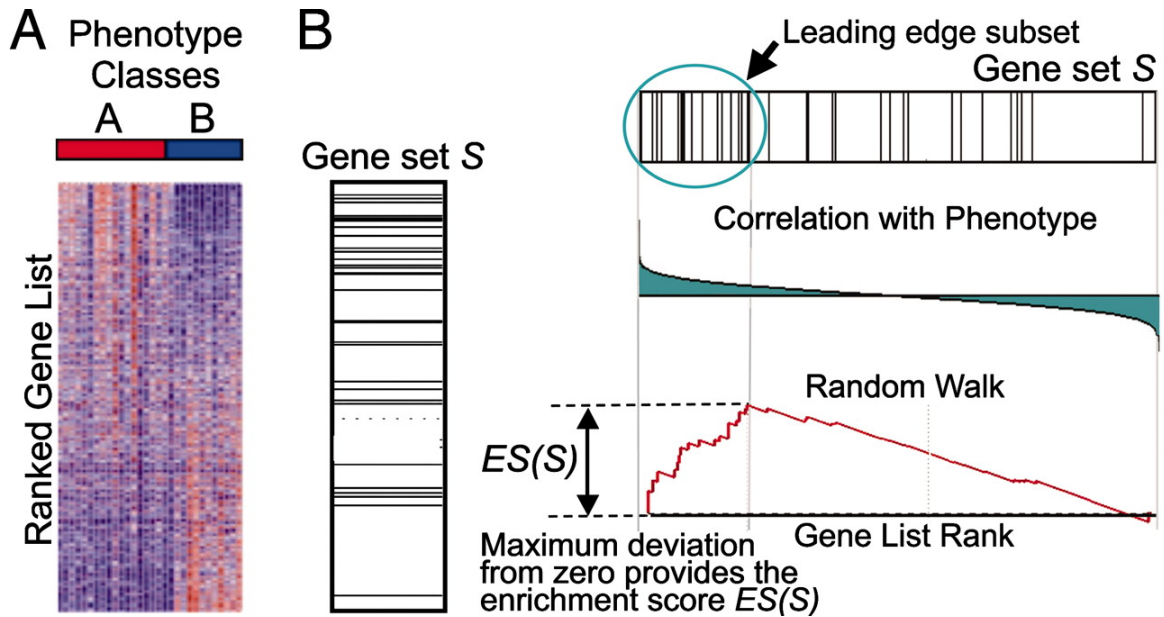


Figure 14 | Illustration de la méthode d'analyse GSEA (Adapté de Subramanian *et al.* (487)). (A) GSEA utilise une liste de gènes triés par corrélation avec le phénotype étudié. (B) L'emplacement des gènes dans un ensemble de gènes prédéfinis (*Gene set S*) permet de déterminer le score d'enrichissement (ES) maximal. L'ampleur de l'incrémentation dépend de la corrélation du gène avec le phénotype étudié. Le sous-ensemble appelé « leading-edge » constitue un groupe de gènes qui contribuent le plus au ES.

1.9.2.2. Base de données

De nombreuses bases de données sont mises à la disposition des chercheurs pour l'analyse transcriptomique. La base de données des signatures moléculaires (MSigDB) constitue l'une des principales collections d'ensembles de gènes associés à des processus biologiques (487).

Néanmoins, deux autres bases de données ont été spécialement conçues pour l'étude de la réponse immunitaire à partir de PBMC totaux : **BTM** (de l'anglais *blood transcriptome modules* (489)) et **LM22** (de l'anglais *leukocyte signature matrix* (490)).

Les **BTM** ont été développés par Chaussabel *et al.* (489). À partir d'un grand nombre d'études du domaine public étudiant la réponse immunitaire du sang périphérique au cours de nombreuses conditions physiologiques et pathologiques, Chaussabel *et al.* ont pu identifier des réseaux de gènes co-régulés associés à des sous-populations cellulaires, des fonctions cellulaires spécifiques ou encore, à des voies de signalisations.

LM22 a été établi par Newman *et al.* à partir d'une méthode appelée CIBERSORT qui permet de caractériser la composition cellulaire de tissus complexes à partir de leurs profils d'expressions géniques. LM22 contient 547 gènes permettant de distinguer 22 types de cellules hématopoïétiques humaines, incluant, par exemple, les lymphocytes B et CD4 mémoires (490).

1.9.2.3. Analyse d'enrichissement au niveau de l'échantillon

Initialement établie pour l'analyse transcriptomique spécifique aux échantillons individuels de tumeur, l'analyse d'enrichissement au niveau de l'échantillon (**SLEA**, de l'anglais *sample level enrichment analysis*) peut également être appliquée pour l'étude transcriptomique de la réponse immunitaire à partir des PBMC totaux (491). À l'inverse de GSEA, SLEA ne prend pas en compte le phénotype des échantillons étudiés. Cette analyse permet le calcul d'un score d'enrichissement (*z-score*) par échantillon et par module de gènes. SLEA compare l'expression moyenne des gènes au sein de chaque module à l'expression moyenne de 1000 modules générés aléatoirement de la même taille. Le *z-score* résultant est ensuite utilisé pour refléter la perturbation globale des modules d'intérêts dans un échantillon donné.

1.9.3. Réponse transcriptomique de la phase aiguë de l'infection par le VHC

Quelques études à ce jour ont utilisé une approche transcriptomique pour l'étude de la réponse immunitaire au cours, et après traitement, de l'infection par le VHC.

1.9.3.1. Biopsies hépatiques

Les premières études de l'infection aiguë par le VHC réalisés à partir de biopsie hépatique provenant d'un nombre limité de chimpanzés ont démontré, grâce à une approche de microarray, une expression élevée de gènes stimulés par l'interféron, et ce, indépendamment de l'issue de l'infection (492-494). La résolution spontanée chez le même modèle a été associée à une expression élevée de gènes associés à une migration lymphocytaires vers le foie tels que IP-10 et CMH-II (492).

A partir d'échantillons de biopsie hépatique humaine, et toujours par une approche de microarray, Dill *et al.* ont démontré une expression élevée de gènes stimulés par l'IFN- γ au cours de l'infection aiguë *versus* IFN- α chez les sujets chroniques (495). L'identité cellulaire est codée par le paysage épigénétique qui produit un modèle unique d'accessibilité et de modification de la chromatine. Une étude récente a démontré grâce à une approche RNA-seq et Chip-seq sur des tissus hépatiques humains que le VHC induit des modifications épigénétiques qui non seulement persistent après une RVS induit par les AAD ou PEG-IFN/RBV, mais qui sont également associées à un risque de développer un CHC (496). Ces résultats suggèrent que l'infection par le VHC peut laisser une empreinte épigénétique irréversible associée à un pronostic défavorable de développer un CHC.

1.9.3.2. PBMC totaux

Notre laboratoire a étudié les signatures transcriptomiques de la réponse immunitaire avant, pendant et après résolution spontanée de l'infection par le VHC à partir d'échantillons prélevés de sujets UDI (497). Via l'utilisation de la base de données BTM, nous avons observé une régulation à la hausse des modules associés à une réponse immunitaire innée et inflammatoire, ainsi qu'une régulation à la baisse des modules associés aux lymphocytes B. L'expression de ces modules revient rapidement à un niveau basal (i.e. pré-infection) après résolution spontanée de l'infection.

Une analyse comparative a démontré que l'infection aiguë par le VHC partage de nombreuses caractéristiques avec la réponse immunitaire au cours de l'infection aiguë par le VD, reflétant probablement des signatures antivirales communes en réponse aux virus à ARN (497).

1.9.3.3. Lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC

Une étude par Wolski *et al.* a comparé pour la première fois les différences transcriptionnelles entre les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC isolés au cours de la phase aiguë chez des sujets ayant résolu l'infection *versus* ceux ayant développé une infection chronique (205). Cette étude a identifié une dérégulation tôt au cours de l'infection d'un module associé au métabolisme, formé de gènes liés à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), chez les sujets chroniques (205). Les lymphocytes T mémoires sont dépendants de OXPHOS pour répondre à leur besoin énergétique (498, 499), suggérant que l'activation perpétuelle des lymphocytes T CD8 chez les sujets chronique empêcherait d'activer le programme métabolique qui favoriserait leur différenciation en cellules mémoires (205). Un pattern similaire de dérégulation métabolique a également été détecté dans le cas des infections par le VIH (500) et le VHB (501), mais aussi dans le modèle murin d'infection par le LCMV (206), suggérant qu'il s'agit d'un mécanisme commun partagé entre différents modèles d'épuisement des lymphocytes T CD8. Plusieurs études ont démontré l'existence de profils transcriptionnels et épigénétiques associés à l'épuisement des lymphocytes T CD8 dans le contexte d'infections virales et de cancer (212, 502-504). Trois études récentes ont étudié le changement des profils transcriptionnels et épigénétiques des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC épuisés après résolution de l'infection chronique induite par les AAD (505-507). En effet, une population de CD8-ML spécifiques du VHC (TCF1+ CD127+ PD1+) est maintenue après traitement par les AAD (207). Cette population présente une polyfonctionnalité (i.e. production d'IFN- γ , TNF, IL-2 et CD107A) moindre en comparaison des lymphocytes T mémoires *bona fide* (207, 506).

L'étude du paysage épigénétique de cette population a démontré que ces cellules conservent des « cicatrices » épigénétiques aux régions associées à un profil d'épuisement, comme l'expression du gène TOX, limitant ainsi leur potentiel protecteur associé au phénotype mémoire (505-507).

1.9.4. Réponse transcriptomique des stratégies vaccinales contre le VHC

L'approche transcriptomique a été utilisée avec succès pour l'étude de la réponse immunitaire induite par différentes stratégies vaccinales contre, entre autres, le VFJ (YF-17D (508, 509)), l'Influenza (510), ou encore le VIH (511, 512).

À ce jour, une seule étude a été publiée sur l'étude transcriptomique de la réponse immunitaire induite par la stratégie amorce/rappel ChAd3/MVA-NS testée auprès de sujets sains (Essai clinique de phase I ; voir section 1.9.2.2.) (513). Hartnell et al. ont analysé les signatures transcriptomiques induites 24h post-amorce (ChAd3) et rappel (MVA) via l'enrichissement de modules « *Gene Ontology* » (GO) appartenant à la base de données MSigDB. Cette étude a reporté une régulation à la hausse de modules de gènes associés à l'inflammation et la signalisation de l'interféron 24h post-amorce, signatures aussi reportées après vaccination par le vecteur Adénovirus de sérotype 5 contenant les protéines *gag/pol/nef* du VIH (511). Une forte régulation à la hausse de la réponse inflammatoire fut aussi détectée post-MVA (513). Néanmoins, des analyses plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer l'existence de signatures transcriptomiques prédictives de l'efficacité de la stratégie vaccinale contre le VHC chez l'Homme.

1.10. Comblent les lacunes en matière de connaissances des corrélats de l'immunité protectrice contre le VHC

Le modèle VHC permet l'étude de la réponse immunitaire aux niveaux transcriptomique, épigénétique, clonotypique, phénotypique, ou encore fonctionnelle avant, pendant et après résolution spontanée de l'infection *versus* chronique, traitement par les AAD, réinfections, ou encore vaccination, faisant ainsi du VHC un modèle unique pour l'étude approfondie de l'immunologie anti-virale chez l'Homme.

Depuis 2011, l'introduction des AAD a permis le traitement de la grande majorité des cas d'infections chroniques par le VHC (~95%) (38). Toutefois, de nombreux facteurs dont un coût élevé et la non-protection contre les réinfections par les AAD (voir section 1.8.3.), incitent au développement d'un vaccin prophylactique pour freiner efficacement et rapidement l'épidémie du VHC (514). La seule stratégie vaccinale à atteindre la phase II d'essai clinique à ce jour (ChAd3/MVA-NS) n'a pas abouti en une protection contre l'établissement d'une infection chronique par le VHC (469). Une meilleure compréhension de ce qui constitue une réponse immunitaire protectrice reste donc cruciale pour le développement d'un vaccin pan-génotypique efficace contre le VHC (voir section 1.9.2.2.). Les individus à haut risque d'infection comme les UDI sont continuellement réexposés au VHC, et donc réinfectés, même s'ils ont spontanément éliminé une infection primaire (6). Ils représentent donc une opportunité unique d'étudier la réponse immunitaire de manière longitudinale et d'identifier les corrélats de l'immunité protectrice.

L'objectif global de ce doctorat était de définir les corrélats de l'immunité protectrice au cours de multiples infections naturelles par le VHC aux niveaux transcriptomique, clonotypique et fonctionnel.

Chapitre 2 | Hypothèses et Objectifs

L'expansion des lymphocytes T CD8 polyfonctionnels spécifiques du VHC a été associée à la clairance virale au cours des infections primaires et secondaires par le VHC (211, 423, 424). La caractérisation de ces cellules au niveau clonotypique est cruciale pour développer un vaccin puissant favorisant leurs expansions sélectives. Des lymphocytes T CD8 publics ont été détectés chez plusieurs individus et associés à un meilleur contrôle des infections par le cytomégalovirus (CMV (515)) et le VIH (516), alors qu'un répertoire plus diversifié ou « privé » ne l'était pas. Seules deux études ont révélé la présence de clonotypes publics spécifiques du VHC après expansion *in vitro* par les épitopes gE2³⁹⁸SLASLFTQGA⁴⁰⁷, et NS3¹³⁹5HSK¹⁴⁰³DEL¹⁴⁰³ (HSK) ou ¹⁴³⁵ATDALMTGY¹⁴⁴³ (ATD), et ce, indépendamment de l'issue de l'infection (11, 12). L'expansion de clonotypes publics en réponse à d'autres épitopes immunodominants du VHC et s'ils corrèlent avec la résolution spontanée de l'infection reste inconnue à ce jour. La résolution spontanée de multiples infections par le VHC a été associée à l'expansion de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope immunodominant ¹⁰⁷³CINGVCWTV¹⁰⁸¹ (NS3-1073) (236, 237, 424). De plus, un pool préexistant de lymphocytes T CD8 mémoires spécifiques de l'épitope NS3-1073, induit par des infections hétérologues (i.e. cross-réactifs), a été caractérisé auprès d'une cohorte de sujets sains séronégatifs (SN; i.e. non infectés par le VHC) (235).

Le **premier objectif** (Chapitre 3 – Manuscrit 1) était de caractériser le répertoire des TCR des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3 1073-1081 (CINGVCWTV) restreint par HLA-A2 au cours de la phase aiguë auprès de sujets UDI ayant résolu (SR) ou non (CI) une infection primaire.

Nous avons émis l'**hypothèse** que la résolution spontanée serait associée à l'expansion préférentielle d'un répertoire de TCR étroit (i.e. incluant un nombre limité de clonotypes) mais public composé de clonotypes hautement fonctionnels. Les TCR publics préférentiellement étendus incluront des clonotypes cross-réactifs partagés avec d'autres répertoires spécifiques d'épitopes viraux.

Un nombre limité d'études suivant les UDI à travers des épisodes consécutifs d'infections par le VHC ont déjà défini certains corrélats de l'immunité protectrice naturelle. La résolution spontanée d'une réinfection par le VHC était associée à une durée et à une ampleur plus courte de la virémie, à une réponse immunitaire cellulaire élargie et, dans 60 % des cas, à la génération de nAbs (416). La prolifération de cellules mémoires polyfonctionnelles CD4+ et CD8+, ainsi qu'un répertoire plus ciblé de CD8 TCR spécifiques du VHC ont été montré par notre laboratoire comme des corrélats supplémentaires de la protection immunitaire (423, 424). Toutefois, une meilleure caractérisation des paramètres de l'immunité protectrice au cours des réinfections naturelles par le VHC reste nécessaire. Nos résultats au cours d'une infection primaire par le VHC ont démontré au niveau transcriptomique que la résolution spontanée est associée à une induction rapide des modules associés à l'activation immunitaire innée et à la signalisation de l'interféron, ainsi qu'une régulation à la baisse des modules associés à une réponse humorale. Ces changements reviennent au niveau basal (i.e. pré-infection) après résolution de l'infection (497). Les signatures transcriptomiques des réponses mémoire lors d'une réexposition virale par le VHC chez l'homme restent inexplorées.

Notre **second objectif** (Chapitre 4 – Manuscrit 2) était de caractériser les signatures transcriptomiques des réponses mémoire lors d'une réexposition virale par le VHC chez les sujets ayant résolu deux infections consécutives.

Nous avons émis l'**hypothèse** que la résolution de l'infection secondaire serait associée à une activation moindre des modules associés à une réponse immunitaire innée, en comparaison de la première infection par le VHC. Les signatures transcriptomiques au cours de la phase aigüe précoce seront associées à la prolifération des cellules T CD8 et CD4 mémoires. Parallèlement, nous émettons l'hypothèse d'une régulation à la hausse des modules associés à l'expansion et aux fonctions des cellules B. Ces signatures transcriptomiques seraient confirmées au niveau fonctionnel.

Chapitre 3 | Manuscrit 1

**Expansion of Unique Hepatitis C Virus Specific Public CD8⁺ T Cell Clonotypes
During Acute Infection and Reinfection**

Publié dans Journal of Immunology (Juin 2021)

DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001386>

Authors' contributions: **Sabrina Mazouz** designed and performed experiments (cell sorting, ICS, ELISPOT, epitope sequencing), analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript; **Maude Boisvert** designed experiments and wrote the manuscript; **Mohamed S. Abdel-Hakeem** designed and performed experiments (ELISPOT); **Omar Khedr** analyzed data (computational analysis); **Julie Bruneau** recruited and followed subjects and provided clinical data; **Naglaa H. Shoukry** obtained funds, designed experiments and wrote the manuscript.

Expansion of Unique Hepatitis C Virus Specific Public CD8⁺ T Cell Clonotypes during Acute Infection and Reinfection

Sabrina Mazouz,^{*,†} Maude Boisvert,^{*} Mohamed S. Abdel-Hakeem,^{*,†,¶} Omar Khedr,^{*} Julie Bruneau,^{*,‡} and Naglaa H. Shoukry^{*,§}

^{*}Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada;

[†]Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

[‡]Département de médecine familiale et de médecine d'urgence, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

[§]Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

[¶]Present affiliation: Institute for Immunology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA

Address correspondence and reprint requests to: Dr. Naglaa H. Shoukry, Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Tour Viger, Local R09.414, 900 Rue St-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Canada.

E-mail address: naglaa.shoukry@umontreal.ca

Running Title: Expansion of HCV-specific public CD8⁺ T cell clonotypes

Funding: This work was supported by grants from the National Institutes of Health (NIH) U01AI131313, R01AI136533 and U19AI159819, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (PJT-173467) Alberta Innovates-Health Solutions, and Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI). SM is supported by a doctoral fellowship from the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). CanHepC is funded by a joint initiative of the CIHR (NHC142832) and the Public Health Agency of Canada. MB received postdoctoral fellowships from the FRQS, the American Liver Foundation and CanHepC. MSA received doctoral fellowships from CIHR and CanHepC. JB is the Canada Research Chair in Addiction Medicine. The funders had no role in the design and conduct of the study in the collection, analysis, and interpretation of the data, and in the preparation, review, or approval of the manuscript

Abbreviations used in this article: EDI, estimated date of infection; HCV, hepatitis C virus; PWID, people who inject drugs

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection resolves spontaneously in approximately 25% of acutely infected subjects where viral clearance is mediated primarily by virus specific CD8⁺ T cells. Previous cross-sectional analysis of the CD8⁺ T cell receptor (TCR) repertoire targeting two immunodominant HCV epitopes reported widespread use of public TCRs shared by different subjects, irrespective of infection outcome. However, little is known about the evolution of the public TCR repertoire during acute HCV and whether cross-reactivity to other antigens can influence infectious outcome. Here, we analyzed the CD8⁺ TCR repertoire specific to the immunodominant and cross-reactive HLA-A2 restricted NS3-1073 epitope during acute HCV in individuals progressing to either spontaneous resolution or chronic infection, and at ~1-year following viral clearance. TCR repertoire diversity was comparable among all groups with preferential usage of the V04 and V06 gene families. We identified a set of thirteen public clonotypes in HCV-infected subjects independent of infection outcome. Six public clonotypes used the V04 gene family. Several public clonotypes were long-lived in resolvers and expanded upon reinfection. By mining publicly available data, we identified several low frequency CDR3 sequences in the HCV-specific repertoire matching TCRs specific for other HLA-A2 restricted epitopes from melanoma, cytomegalovirus, influenza A, Epstein-Barr and yellow fever viruses but they were of low frequency and limited cross-reactivity. In conclusion, we identified thirteen new public CD8⁺ TCR clonotypes unique to HCV that expanded during acute infection and reinfection. The low frequency of cross-reactive TCRs suggest that they are not major determinants of infectious outcome.

Key Points:

- Identified thirteen unique public clonotypes specific for the HCV NS3-1073 epitope
- Public clonotypes expanded during acute HCV infection and reinfection
- Low frequency of cross-reactive TCRs targeting other HLA-A2 restricted epitopes

INTRODUCTION

CD8⁺ T cells recognize antigens presented by class I major histocompatibility complex (MHC) molecules via their T cell receptors (TCR), an $\alpha\beta$ heterodimer. TCR repertoire diversity is achieved through germline variable (V), diversity (D) and junction (J) gene segments rearrangements and addition or deletion of nucleotides between segments, resulting in a specific CD8⁺ TCR or clonotype. The TCRAV and TCRBV for the α and β chains, respectively, encodes the complementarity-determining regions 1 and 2 (CDR1 and CDR2), that interact with the MHC molecule (1). Antigen-binding specificity is determined by the most variable region of the TCR, the CDR3 region, formed by the V-J α and V(D)J β junctions. An identical clonotype or CDR3 amino acid (AA) sequence detected in several individuals, termed “public”, was associated with better control of viral infections, including cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV), while less common or “private” repertoires were not (2-4).

Hepatitis C virus (HCV) infection has two dichotomous outcomes where approximately 25% of acutely infected subjects resolve spontaneously while the rest develop persistent infection. Expansion of HCV-specific CD8⁺ T cells targeting multiple epitopes (i.e. broad) and producing several cytokines (i.e. polyfunctional) is essential to clear acute primary infection (5-7). Hence, HCV represents a unique opportunity to examine the protective capacity of virus-specific CD8⁺ T cell public clonotypes. Cross-sectional studies reported the presence of public TCRs recognizing the hypervariable region 1 (HVR1) ³⁹⁸SLASLFTQGA⁴⁰⁷ epitope of the E2 glycoprotein, and the non-structural 3 (NS3) ¹³⁹⁵HSKKKCDEL¹⁴⁰³ (HSK) or ¹⁴³⁵ATDALMTGY¹⁴⁴³ (ATD) HCV epitopes, irrespective of HCV infectious outcome (8, 9). These studies mostly relied on *in vitro* expansion of antigen-specific T cells prior to analysis that may have favored expansion of certain TCR clonotypes. Furthermore, very limited analysis was performed early during acute infection. Whether other immunodominant HCV epitopes favor the expansion of public clonotypes and whether they correlate with spontaneous resolution of acute infection remains unknown.

The HLA-A2 restricted NS3-1073 ¹⁰⁷³CINGVCWTV¹⁰⁸¹ epitope, derived from the highly immunogenic NS3 protein, is one of the immunodominant epitopes during HCV infection (10-12). Spontaneous clearance of acute HCV was associated with an NS3-1073

specific CD8⁺ T cell response (13-15). Long-lived NS3-1073 specific memory CD8⁺ T cells were detected two decades after HCV spontaneous clearance suggesting it may contribute to long-term protective immunity (10). Indeed, our group has previously demonstrated expansion of memory NS3-1073 specific CD8⁺ T cells in HCV resolvers following virus re-exposure and reinfection (5). In individuals who spontaneously resolved their reinfection, we observed focusing of the TCR repertoire with rapid and selective expansion of memory CD8⁺ T cell clonotypes with the highest functional avidity (16).

CD8⁺ T cells specific to the HCV NS3-1073 epitope are also known to be cross-reactive to several HLA-A2 restricted epitopes. The first cross-reactivity reported was against the NA-231 epitope of influenza virus (17). Other cross-reactivities were later identified against cytomegalovirus, (CMV; pp65) and Epstein Barr virus, (EBV; LMP2) (17-19). In addition, a pre-existing pool of memory HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells, induced by heterologous infections, was characterized in a cohort of healthy HCV-seronegative subjects (19). These memory HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells influenced the T cell response to HCV peptide vaccine (19). These studies suggested that this cross-reactivity may contribute to enhanced spontaneous clearance or pathogenesis of acute HCV infection.

Here, we characterized and compared the HCV NS3-1073 specific TCR repertoire during the very early acute phase of HCV infection and long-term follow-up in spontaneous resolvers (SR) and during acute infection in subjects who developed chronic infection (CI). Our main objective was to characterize the presence of public clonotypes against this immunodominant epitope and their potential association with spontaneous HCV resolution directly *ex-vivo*. We identified a common set of public clonotypes independent of infection outcome. While several CDR3 sequences were shared with other non-HCV HLA-A2 restricted epitopes, these potentially cross-reactive clonotypes did not expand during acute HCV infection. The public clonotypes we identified were unique to HCV.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Study subjects were recruited among people who inject drugs (PWID) enrolled in the Montreal Hepatitis C Cohort (HEPCO) (20). Subjects were followed every 3 months for HCV infection. Acute HCV primary infection was defined as a positive HCV RNA and/or anti-HCV antibody positive test following a negative test in the past 24 weeks. The estimated date of infection (EDI) was calculated as the median time between last negative and first positive RNA or antibody test. Spontaneous resolution was defined as viral clearance (HCV RNA negative) at ≤ 24 weeks (SR; n=8), and chronic infection was defined as HCV RNA positive at 24 weeks (CI; n=6). For the purpose of this study, two different time points were used: acute (< 24 weeks or 168 days) and follow-up (> 49 weeks or 343 days). Two HCV spontaneously resolved subjects who experienced a documented reinfection episode were recruited within the same cohort where reinfection was defined as a positive HCV-RNA test following two negative tests ≥ 60 days apart. The detailed analysis of their immune response and T cell repertoire analysis were described previously (5, 16). Subjects' demographics are described in Table 1. This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the CRCHUM (Protocol SL05.014).

Tetramer staining, flow cytometry and cell sorting

The MHC class I monomer, HLA-A2 bound to the HCV NS3 peptide AA 1073–1081 (CINGVCWTV) [A2/NS3-1073], was synthesized by the NIH Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA). Tetramers were prepared by adding 10 μ l of phycoerythrin (PE) labeled ExtrAvidin (Sigma, St. Louis, MO) five times, with 10 min incubation at room temperature after each addition. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were thawed and CD8⁺ T cells were negatively selected using the MACS CD8⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA). Tetramer staining and cell surface staining were performed on isolated CD8⁺ T cells as previously described (16). Directly conjugated monoclonal antibodies against the following cell-surface markers were used: CD3–Pacific Blue (clone UCHT1), CD8–Alexa Fluor® 700 (clone RPA-T8) and CD45RO–BB515 (clone UCHL1), all from BD Biosciences, San Diego, CA. The LIVE/DEAD® fixable aqua dead cell Stain Kit (Molecular Probes™ Thermo Fisher

Scientific, Burlington, ON) was used to identify live cells. Cell sorting was performed using a BD Aria II cell sorter equipped with blue (488 nm), red (633 nm), and violet (405 nm) lasers (BD Biosciences) while multiparameter flow cytometry was performed using a BD LSRII instrument with the same setup and an additional yellow-green laser (561 nm) using FACSDiva software version 6.1.3 (BD Biosciences) at the CRCHUM flow cytometry core. Data files were analyzed using FlowJo software version 10.4.11 (BD Biosciences).

TCR V β -chain sequencing and analysis

FACS-sorted HCV-specific CD8⁺ T cells from each subject were sent to Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) for genomic DNA extraction followed by TCR β sequencing, as previously described (16). Data analysis were performed using ImmunoSEQTM Analyzer software (v3.0) and R v3.5.1. All TCR repertoires were cleaned to remove sequences with a stop codon and those that are out of frame. The number of FACS-sorted CD8⁺ T cells, total and unique productive sequences, and clonality for each sample are detailed in Supplementary Table S1. Diversity indices (Simpson diversity, Shannon entropy, CDR3 length and NT additions) were provided by Adaptive Biotechnologies.

HCV NS3-1073 HCV epitope sequencing

HCV RNA was extracted from 500 μ L of plasma EDTA samples using QIAamp MinElute Virus spin kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's protocol. As previously described (21), purified viral RNA was reverse transcribed, PCR amplified, cloned and sequenced at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montréal, QC).

VDJ database and computational analysis

We extracted HLA-A2 restricted antigen-specific TCR sequences from the VDJ database [<https://vdjdb.cdr3.net/>]. Using R [<https://www.R-project.org/>] (22), we identified exact CDR3 AA sequence matches within this database (23) and our HCV NS3-1073 TCR repertoire dataset. Frequencies of identified CDR3 AA sequences in a particular subject's

repertoire were summed up to quantify the percentage of clonotypes identical to other epitope(s) specific TCR repertoire.

Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay

Interferon- γ (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays were performed using 2×10^5 cryopreserved PBMCs, as previously described (24). The following peptides were used for this assay: HCV (NS3; CINGVCWTV), Flu (NA; CVNGSCFTV), CMV (pp65; NLVPMVATV), EBV (BMLF1; GLCTLVAML), Flu (M1; GILGFVFTL), YFV (NS4B; LLWNGPMAV), Melanoma (MLANA; ELAGIGILTV). The HCV NS3-1073 peptide was synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (McGill University, Montréal, QC). The Flu NA-231 peptide was synthesized by JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany), while the other four were synthesized by ProImmune (Florida, USA).

Expansion of HCV-specific CD8⁺ T cells, peptide stimulation and intracellular staining (ICS)

HCV-specific CD8⁺ T cells were expanded as previously described (25). Briefly, freshly thawed PBMCs were seeded in a 48-wells plate at a concentration of 2×10^6 cells per well, in R10 (RPMI 1640 + 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) supplemented with penicillin + streptomycin (pen/strep, 1X, Wisent) and 14 mM HEPES (Wisent) (R10-P/S-HEPES). Cells were stimulated with 10 μ g/ml HCV NS3 peptide (NS3-1073-1081; CINGVCWTV) for 2 weeks at 37°C. Half of the medium was replenished every 3 days with R10-P/S-HEPES supplemented with 40U/ml rIL-2 (NIH-AIDS Reagents Program) (R10-P/S-Hepes-IL-2, first rIL-2 addition on day 3). Expanded HCV-specific CD8⁺ T cells were then cryopreserved in freeze mix (FBS + 10% DMSO) at a concentration of 10^7 cells/ml. Thawed cells were re-stimulated in a 48-wells plate at a concentration of 10^6 cells per well in presence of 2×10^6 non-autologous irradiated (30 Gy) feeder cells and 0.01 μ g/ml anti-CD3 (Beckman Coulter), in R10-P/S-IL-2. Half of the media was replenished every 3 days with R10-P/S-IL-2. After 2 weeks, autologous EBV transformed B cell line (BLCLs), suspended in R-10 medium, were irradiated at 100 Gy and prepulsed with either no peptide, 15 μ g/ml of HCV NS3 peptide (NS3-1073-1081; CINGVCWTV),

Flu peptide (NA-231-239; CVNGSCFTV) or CMV peptide (pp65-495; NLVPMVATV) for 1 h at 37°C. BLCLs were then washed and incubated with HCV-specific T cells at a ratio of 10:1 (T cell: BLCLs) for 6 hours in AIM-V medium (Life Technologies) supplemented with 10% human serum (Wisent) and anti-CD107a-BUV395 antibody (clone H4A3; BD Bioscience). After 1 hour of stimulation, 10 µg/ml Brefeldin A (BFA, Sigma) and 6 µg/ml monensin (Sigma) were added to each well. At the end of the stimulation, cells were washed using FACS buffer (PBS, 1% FCS) and surface staining was performed using the following directly conjugated monoclonal antibodies: CD3–Pacific Blue (clone UCHT1), CD4-BV605 (clone RPA-T4), and CD8-APC-H7 (clone SK1) and live cells were identified as described above. Cells were then permeabilized with CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) for 15 minutes at 4°C in the dark, washed using Perm/Wash buffer (BD Biosciences), then incubated for 30 min at 4°C in the dark with anti-IFN γ -PE-Cy7 (clone B27), anti-TNF- α -PerCP-Cy5.5 (clone MAb11) and anti-IL-2-APC (clone MQ1-17H12) (All from BD Biosciences). Cells were then washed and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA, Sigma Aldrich) in PBS and analyzed by FACS as described above. Boolean gating and SPICE software were used for polyfunctionality analysis (26).

Data availability

Raw data of all TCR sequences are available at <https://clients.adaptivebiotech.com/pub/mazouz-2021-ji> (DOI: 10.21417/SM2021JI).

RESULTS

Comparable HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cell receptor (TCR) repertoire diversity regardless of HCV infection outcome

We analyzed the TCR repertoire of FACS-sorted MHC class I tetramer reactive CD8⁺ T cells specific for the immunodominant HLA-A*0201 restricted NS3-1073 epitope in HCV infected subjects (n=14). Our cohort included samples collected during acute HCV infection (≤ 168 days post estimated day of infection (EDI)) from either spontaneous resolvers (SR-Acute; n=4) or subjects that developed a chronic infection (CI-Acute; n=6), as well as samples at a follow-up time point (≥ 347 days post EDI) following HCV clearance in the SR group (SR-Follow-up; n=8) (Table 1). Four SR subjects had paired samples at both the acute and follow-up time points. Because the frequencies of NS3-1073 specific CD8⁺ T cells are dramatically reduced with progression towards chronic infection, we could not sort and analyze the repertoire of NS3-1073 specific CD8⁺ T cells in CI subjects at follow-up. The frequencies of HLA-A2/NS3-1073 tetramer⁺ CD8⁺ T cells were not significantly different between groups (Figure 1A, Supplementary Table S1). In addition, we sorted and sequenced the TCR repertoire of total naïve CD45RO⁻CD8⁺ T cells from two samples: SR.5-Acute and CI.5-Acute as controls for each group. TCR deep-sequencing information including number of sorted cells, productive total/unique sequences and clonality are presented in Supplementary Table S1.

We compared the diversity of the repertoire in SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute samples using the Simpson diversity index which integrates the number of clonotypes as well as their abundance (27) and ranges from 0 (high diversity, i.e. large repertoire) to 1 (low diversity, i.e. narrow repertoire) (Figure 1B). We also examined the Shannon diversity which integrates both the abundance and evenness (i.e. similarity of frequencies) of all clonotypes (28) and ranges from 0 (low diversity) to 1 (high diversity) (Figure 1C). Both analyses demonstrated high diversity in all groups but no significant differences between groups (Figures 1B and 1C). As shown by tree maps, the majority of samples displayed a broad TCR repertoire, with the top 10 sequences representing less than 25% of the total TCR repertoire in most samples (3/4 SR-Acute, 7/8 SR-Follow-up, 4/6 CI-Acute) (Figure 1D). Only three samples (SR.1-Acute, SR.1-Follow-up and CI.1-Acute) were more focused with the top 10 sequences representing 55.8%, 43.5% and 56.3% of

their NS3-1073 specific TCR repertoire, respectively (Figure 1D). Altogether, the accumulated frequencies of the top 10 TCR clonotypes showed no significant differences between the three groups (Figure 1E).

Next, we assessed the CDR3 AA length distribution. The naïve CD45RO⁺CD8⁺ TCR repertoires from SR.5-Acute and CI.5-Acute displayed a normal Gaussian distribution indicated by a coefficient of determination (R^2) close to 1 (Supplementary Figure S1A, right). In contrast, the HCV NS3-1073 specific TCR repertoires were more skewed (R^2 ranged from 0.6 to 0.96) in all samples suggesting antigen-specific clonotypic expansion (Supplementary Figures S1A, left). The CDR3 lengths were skewed but no particular AA length was preferentially overrepresented (Supplementary Figures S1A, left). There were no significant differences in the CDR3 AA length distribution between SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute (represented as R^2 , Supplementary Figure S1B).

Altogether, these data suggest that SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute samples had similar highly diverse HCV NS3-1073 specific TCR repertoire.

V04 and V06 gene families are preferentially utilized in all groups

To further characterize the HCV NS3-1073 specific TCR repertoire, we analyzed and compared the V gene usage between all groups. As we previously described (16), we stratified clonotypes at the nucleotide level into four distinct categories according to their abundance within the total repertoire analyzed in each subject: Dominant (frequencies $\geq 1\%$); sub-dominant ($\geq 0.5\%$); low abundance ($\geq 0.1\%$); and lowest abundance clonotypes ($< 0.1\%$). Hereinafter, all HCV NS3-1073 specific TCR repertoire results presented will focus on dominant, sub-dominant and low abundance clonotypes only. The detailed raw TCR sequencing data for each subject are available online as described in Material and Methods. Using a threshold frequency of $\geq 10\%$, the most frequently used V gene families were V02 to V07 and V09, irrespective of HCV infection outcome. Figure 2A shows V02 to V09 families, while all families are shown in Supplementary Figure S2A. V04 and V06 were the two V gene families preferentially used in all groups. Also, V04 was significantly more utilized as compared to V06 ($p \leq 0.05$) at the follow-up time-point in SR (Figure 2A). By examining paired naïve and acute samples from SR.5 and CI.5, we observed that the preferential usage of V04 and V06 was not associated with their overrepresentation within

the naïve pool (Supplementary Figure S2B). V02 was significantly enriched in CI-Acute as compared to SR-Follow-up ($p \leq 0.05$) but this was mainly driven by one outlier. Similarly, V09 was significantly enriched in SR-Acute as compared to SR-Follow-up ($p \leq 0.01$) and CI-Acute ($p \leq 0.001$) samples due to another outlier.

Next, we examined whether preferential usage of these V genes was sustained after resolution of acute HCV infection. We compared the TCR repertoire of paired samples from four SR subjects during acute infection and at a follow-up time point at > 49 weeks after HCV infection (range 367 to 503 days post EDI). The V gene family usage profiles remained comparable at follow-up (Figure 2B). The V04 and V06 remained within the top four preferentially utilized families by all subjects (Figures 2B, 2C and 2D). Altogether, these data demonstrate preferential V04 and V06 usage in all groups during acute infection. This preferential usage was sustained at follow-up in SR subjects.

Expansion of thirteen HCV NS3-1073 specific public clonotypes irrespective of acute infection outcome and their longevity post spontaneous clearance

Next, we performed an in-depth analysis of all CDR3 sequences within the repertoire to identify public TCR clonotypes (CDR3 AA sequence) that are present in multiple individuals (reviewed in (29)). First, we sought to identify the number of common identical CDR3 sequences in all potential pairwise combinations among dominant, sub-dominant and low abundance clonotypes (Figure 3A). As expected, the highest number of shared clonotypes were between samples belonging to the same subject at two different time-points (e.g. SR.1- Acute and SR.1-Follow-up). On the other hand, CI.4-Acute did not share any clonotypes with SR.5-Acute, SR.5-Follow-up and SR.8-Follow-up. All other pairwise comparisons revealed the presence of 1 to 11 identical CDR3 sequences (Figure 3A). To refine our analyses, a given clonotype was designated as “public” if it was present in at least two subjects at a cumulative frequency of $\geq 0.5\%$, irrespective of infection outcome. Using these criteria, we identified a set of thirteen public clonotypes (Figure 3B, Supplementary Table S2). These public clonotypes and their cumulative frequencies in each sample are summarized in Supplementary Table S2. Six public clonotypes (1, 3, 4, 7, 10 and 13) utilized the V04 gene family. Two of them (public clonotypes 7 and 10) were highly related as they were both 13 AA long with only one AA difference (Supplementary

Table S2). These public clonotypes did not segregate samples by group, underscoring that their expansion was independent of infection outcome (Figure 3B). One public TCR clonotype (CASSQEPGAPNTGELFF (V04-02/J02-02)), hereinafter termed public clonotype 1, was detected in most samples (12/14) (Figure 3B). The cumulative frequencies of this public clonotype were not significantly different between all groups (Figure 3C). Other public clonotypes were detected in fewer subjects and at lower frequencies. Public clonotypes 2, 7, 10, 11 and 12 were primarily detected in resolvers while public clonotype 13 was detected only in chronics. Public clonotype 1 was long-lived and detectable at the follow-up time point in subjects SR.1, SR.5, SR.7 and SR.8 at a frequency of 0.28-2.65% at 1-2 years post infection (Figure 3B, Supplementary Table S2). Other public clonotypes that were present during the acute phase at a frequency of >1% were also maintained at a high frequency at the follow-up time point. Altogether, these results suggest that HCV infection can prime the expansion of several public clonotypes. Several of these public clonotypes including the dominant public clonotype 1 were long-lived and detectable in resolvers post HCV clearance.

The TCR-alpha chain is an important determinant of the functionality of a public clonotype. However, it is technically challenging to identify the TCR $\alpha\beta$ paired sequences from bulk sequencing data. To gain an insight about the TCR $\alpha\beta$ pairing of the identified public clonotypes, we examined publicly available data. Eltahla et al. examined paired TCR $\alpha\beta$ sequences via single cell RNA-seq of NS3-1073 specific CD8⁺ T cells from one subject who had spontaneously resolved primary HCV infection (30). Three of the public clonotypes we identified, including the dominant public clonotype 1, and public clonotypes 2 and 5, were also detected by Eltahla et al. together with their corresponding TCR α sequences (Figure 3D). These data confirm the presence of these public clonotypes in another unrelated study subject and potential paired TCR α sequences. However, additional studies are required to clone and analyze the impact of the different TCR α chain sequences on the functionality of these public clonotypes

Expansion of HCV NS3-1073 specific public clonotypes is independent of autologous virus sequence

To assess whether the preferential expansion of certain public clonotypes was associated with a specific viral variant, we sequenced the region spanning the NS3-1073 epitope in autologous virus isolated from the plasma of subjects who had high viral loads that were high enough to sequence (n=9, Table 1). Compared to the epitope reference sequence (CINGVCWTV), we did not detect any sequence variation in the autologous virus in the CI group. However, we detected variant viral sequences in three of the sequences SR-Acute samples (SR.5, SR.7 and SR.8). All three subjects exhibited an expansion of public clonotype 1. Furthermore, the viral variants were not the same in all subjects, suggesting that a particular HCV NS3-1073 viral sequence is not the main driver of expansion of this public clonotype and that this public clonotype may have the flexibility to recognize multiple variants of the same epitope.

Limited overlap between public clonotypes and HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells from seronegative subjects

Next, we sought to examine whether the dominant public clonotypes we detected were enriched due to a pre-existing pool of cross-reactive memory CD8⁺ T cells prior to HCV infection. Zhang *et al* had previously reported the presence of naïve and memory HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells in HCV seronegative subjects (19) suggesting that these T cells might, in part, be primed by previous heterologous infections. We searched for exact matches between the data from Zhang *et al* and ours. We identified four TCR clonotypes from our data set that were also present in seronegative subjects. These four clonotypes contained only one public clonotype (public clonotype 4) while the other three clonotypes did not meet our public clonotype criteria (Table 2). These results suggest that the public clonotypes detected in our study are unlikely to have originated from a memory pool of cross-reactive CD8⁺ T cells.

Expansion of NS3-1073 specific public clonotypes during HCV reinfection and spontaneous clearance

Next, we examined whether the public clonotypes that we identified and were long-lived, would preferentially expand upon HCV re-exposure and reinfection. We had previously published a longitudinal analysis of the HCV NS3-1073 specific TCR repertoires from two HCV resolvers with a documented HCV reinfection episode where one spontaneously cleared (SR/SR-1) while the other became persistently infected (SR/CI-2) (16). This divergent outcome was associated with different levels of expansion of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells in each subject (Figure 4A). In subject SR/SR-1, NS3-1073 specific CD8⁺ T cells expanded from 0.46% to 3.37% during peak reinfection (3 weeks post detection of reinfection) where ~58% of tetramer⁺ cells exhibited a CD127⁻ effector phenotype. The frequency then stabilized at 0.57% at late reinfection (24 weeks). In subject SR/CI-2, NS3-1073 specific CD8⁺ T cells were at 0.70% at pre-reinfection, decreased to 0.32% during peak reinfection (week 4) and then stabilized at 0.63% at late reinfection (week 24). Autologous virus sequencing in SR/CI-2 revealed a variant of the NS3-1073 epitope (Table 1) that was not recognized by the pre-existing memory CD8⁺ T cells which may explain the limited expansion of the NS3-1073 population in that subject. (5).

Within the NS3-1073 specific FACS-sorted CD8⁺ T cells, public clonotype 1 was only detected in subject SR/CI-2. Although, the overall tetramer frequency did not increase, this public clonotype expanded 2.49 folds at peak reinfection and remained within the dominant pool at late reinfection (Figure 4A). Public clonotypes 2, 3 and 6 were present in both subjects. Public clonotype 2 was detectable at pre-reinfection at a frequency of 1.62% and 1.10% of the repertoire in SR/SR-1 and SR/CI-2, respectively. At peak reinfection, it expanded only in SR/SR-1 to 3.85% of the effector (CD127⁻) and 0.90% of the memory (CD127⁺) CD8⁺ T cells repertoire. Public clonotype 3 slightly expanded (1.2 folds) in SR/CI-2 subject. Public clonotype 6 was detectable at pre-reinfection at a higher frequency in SR/SR-1 (2.10%) as compared to SR/CI-2 (0.28%). It expanded to 2.25% of memory CD127⁺ T cells and to 1.53% of effector CD127⁻ T cells in SR/SR-1. It also expanded 1.57 folds in SR/CI-2. Public clonotypes 5 and 12 were only detectable in SR/CI-2 and were at low frequencies ($\leq 0.21\%$) at either pre-reinfection or late reinfection, respectively, and therefore are unlikely to have played a key role during reinfection (Figure 4A).

We had previously established T cell clones from SR/SR-1 (clones R1 to R5) (16), so we examined them for the presence of the public clonotypes identified in this study. Two clones had public clonotypes, clone R2 carried public clonotype 2, and clone R4 carried a mix of public clonotypes 2 and 6 (Figure 4B). These T cell clones also displayed high functional avidity (16) and polyfunctionality indices (Figure 4C). In summary, these data suggest that pre-existing public clonotypes of NS3-1073 specific CD8⁺ T cells can expand upon HCV re-exposure and reinfection, are polyfunctional, and may contribute to viral clearance.

Shared clonotypes between HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells and CD8⁺ T cells recognizing other HLA-A2 restricted epitopes

Previous studies reported that HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells can be cross-reactive and can recognize HLA-A2 restricted epitopes from other viruses including influenza (NA-231), cytomegalovirus, (CMV; pp65), and Epstein-Barr virus, (EBV; LMP2) (17-19). However, these studies did not examine the TCR repertoires of cross-reactive T cells and it is unknown whether the same clonotypes/public TCRs are expanded during these different viral infections. Thus, we sought to identify HCV NS3-1073 specific clonotypes

that are common with T cell repertoires specific for other HLA-A2 restricted epitopes and that may be cross-reactive. Using the online VDJ database developed by Shugay et al. (23) and CDR3 sequences from a study of the TCR repertoire following yellow fever virus (YFV) vaccination by Pogorelyy et al. (31), we searched for exact matches between TCR clonotypes identified in our study and known clonotypes specific to various HLA-A2-restricted epitopes. The resulting list of shared CDR3 AA sequences, their cumulative frequencies in each subject and the cognate epitope(s) are presented in Table 3 and Figure 5A. Shared CDR3 AA sequences were found in three SR-Acute, six SR-Follow-up and three CI-Acute samples. These shared clonotypes were specific to different antigens including: pp65 (CMV) (32), BMLF1 (EBV) (33), M1 (influenza) (32), NS4B (yellow fever virus, YFV) (34) and MLANA (Melanoma) (35) (Table 3, Figure 5A). However, these clonotypes represented only minor fractions of the repertoire of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells. The lowest frequency was 0.19% for YFV vaccine TCR in SR.7-Acute while the highest was MLANA (Melanoma) at a frequency of 2.45% in CI.3-Acute (Table 3, Figure 5A).

The majority of the identified clonotypes were private (present in only one subject). Only one clonotype previously reported to be reactive to the M1 epitope (Influenza) (CASSQVQGTYEQYF) (32) was detected in three subjects, but the frequencies were below 0.5% in two of these subjects, therefore not meeting our criteria for designation as a public clonotype (Table 3). Interestingly, none of the HCV NS3-1073 public clonotypes (Supplementary Table S2) were shared with other HLA-A2 restricted antigens suggesting that these public clonotypes are unique to HCV. Overall, despite the multiple shared clonotypes identified, they represented only a minor fraction of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells repertoires (generally < 1%) and they were thus unlikely to have contributed to viral clearance.

Limited recognition of HLA-A2 restricted epitopes by HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells

Next, we assessed the *in vitro* cross-reactivity of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells with other viral antigens. We selected three resolver follow-up samples from subjects SR.1, SR.2 and SR.3 and one chronic acute (CI.3-Acute) sample because they expressed TCR clonotypes shared with other HLA-A2 restricted epitopes (Figure 5A). SR.4-Follow-up sample was used as a control since it did not contain any shared clonotypes. We used a dose-response IFN γ ELISPOT assay to compare directly *ex vivo*, the reactivity of PBMC samples to the HCV NS3-1073 epitope and the other potentially cross-reactive epitopes based on the shared TCR repertoire of each subject as depicted in Figure 5A and Table 3. We also examined the response against the Flu NA-231 epitope known to be cross-reactive with HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells (17, 19). All samples tested, showed a strong response to HCV NS3-1073 and limited responses to the other HLA-A2 restricted epitopes (Figure 5B).

To test whether any responses were missed because of low frequencies of cross-reactive CD8⁺ T cells, we expanded NS3-1073-specific CD8⁺ T cells *in vitro* by stimulation with the cognate peptide for 14 days as described in Materials and Methods. We then tested the polyfunctionality of these expanded cells by intracellular cytokine staining following stimulation with NS3-1073, CMV (pp65) or Flu (NA-231) and evaluated the production of IFN γ , TNF α , IL-2 and the degranulation marker CD107a (Figure 5C). We selected two samples, SR.2-Follow-up and SR.4-follow-up because they had high frequencies of NS3-1073 tetramer⁺ CD8⁺ T cells (Supplementary Table S1). They also exhibited different levels of V04 gene usage (21.57% versus 15.9%) and public clonotype 1 (6.86% versus 0.47%). Although SR.4-Acute expressed more IFN γ at the individual cytokine level, SR.2-Acute displayed a higher frequency of CD8⁺ T cells producing more than one effector function (Figure 5C). In contrast, very limited responses were detected following stimulation with pp65 (CMV) or NA-231 (Flu) where only low levels of CD107a were detected (Figure 5C).

In summary, these results demonstrate that HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells share a very limited number of clonotypes with other HLA-A2 restricted epitopes and

consequently exhibit low cross-reactivity suggesting that they were not primed by other pathogens prior to HCV infection.

DISCUSSION

We characterized and tracked directly *ex-vivo*, the TCR repertoire of the HCV-1073 specific CD8⁺ T cells during acute HCV in spontaneous resolvers and subjects progressing to chronic infection, as well as at ~1 year post HCV resolution in resolvers. TCR repertoires responding to the conserved NS3-1073 epitope were highly diverse with preferential usage of the V04 and V06 families regardless of infection outcome. We identified thirteen public clonotypes unique to HCV that were shared across several subjects. Several of these public clonotypes were long-lived in resolvers and re-expanded upon reinfection. In addition, we identified a set of TCR clonotypes shared with other HLA-A2 restricted epitopes suggesting potential cross-reactivity. However, these clonotypes were of low frequency and demonstrated limited cross-reactivity in *in vitro* assays and are thus unlikely to have played a major role in determining the outcome of primary acute HCV infection.

We demonstrated that the HCV NS3-1073 specific TCR β repertoire was diverse during early acute infection irrespective of infection outcome and that this diversity persisted at long-term follow-up. Several studies demonstrated that a diverse CD8⁺ TCR repertoire is important in recognizing escape mutations in targeted epitopes that may arise during HIV or HCV infections (36-39). These studies suggested that having a more diverse repertoire early during acute infection allows refined selection of the most effective clonotype against the infecting virus sequence and potential escape mutations. Here, we identified different viral variants of the HCV NS3-1073 epitope in resolvers. These variants are known to affect either HLA-A2 binding or TCR recognition (40, 41). The fact that subjects SR.5 and SR.8 spontaneously cleared their acute infection suggest that the diverse repertoire and the public TCRs identified in these subjects were flexible and were able to recognize both the reference sequence (used in the tetramers) and the autologous sequences effectively.

We identified a set of thirteen NS3-1073 specific public clonotypes with different expansion profiles. This might be explained by the usage of a different α chain leading to a TCR $\alpha\beta$ clonotype of higher or lesser affinity to the cognate epitope. We could not examine the TCR $\alpha\beta$ paired sequences in our study but were able to identify three of them from publicly available data (30). This approach remains very limited to one subject and three sequences. Additional studies using single cell sequencing approaches coupled with

cloning of the receptor(s) of interest and functional analysis would provide better insights about the role of the α chain, the $\alpha\beta$ pairing and a more accurate measure of functional avidity.

NS3-1073 specific public clonotypes were maintained within the memory pool and re-expanded upon reinfection. We had previously reported that the NS3-1073 specific TCR repertoire becomes focused upon reinfection with preferential expansion of CD8⁺ T cell clonotypes of high functional avidity (16). So, it is also possible that the expanded public TCRs are those with the highest functional avidity. Indeed, data from individual clones generated from subject SR/SR-1 contained two of the public clonotypes identified in this study. These clonotypes were of high functional avidity and polyfunctionality indices. Additional testing using a broader panel of T cell clones will be required to validate that possibility.

The high prevalence of public clonotypes observed during acute HCV was also characterized by preferential usage of the V04 gene family. One single TCR clonotype in particular (TRBV4-02/TRBJ02-02) was identified in 12 out of 14 subjects. Other public clonotypes using the V04 gene family, specific to the CMV pp65 (42) and HIV p24 Gag-derived KK10 epitopes (3), were previously reported. The presence of such public clonotypes and their maintenance within the long-term memory pool were found to be shaped by convergent recombination (43). Indeed, our data demonstrate that combinatorial (Supplementary Table S2) and/or junctional (data not shown) diversities contribute to generating the same amino acid sequence.

We identified CDR3 AA sequences shared with other HLA-A2 restricted epitopes. Wedemeyer *et al.* were the first to characterize HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells cross-reactivity to the NA-231 epitope from the influenza virus (17). Yet, it was later shown that this HCV NS3-1073/NA-231 cross-reactivity is of low affinity (44), and that their structural conformation and their specific TCR repertoires are distinct (45). This is in line with our results where no HCV NS3-1073/FLU NA-231 shared CDR3 AA sequence were identified. Zhang *et al.* had tested the directionality of this cross-reactivity and showed that HCV NS3-1073 peptides can induce CMV (pp65-495), Flu (M1-58) and EBV (LMP2-426) CD8⁺ T cells expansion (i.e. “reverse” cross-reactivity) and not vice-versa

(19, 44). Altogether, our data and others suggest that cross-reactivity of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells with other epitopes is more likely after HCV exposure.

We identified shared CDR3 AA sequences with multiple HLA-A2 restricted epitopes. Yet, the majority of shared clonotypes were of low frequency. While we identified public clonotypes 4 that was also present in the seronegative cohort, none of the public clonotypes identified in our study were shared with other HLA-A2 restricted epitopes. Technical confounders like the use of different sequencing approaches and *in vitro* expansion prior to analysis may have limited our capacity to identify exactly matched CDR3 sequences. Nevertheless, there was little to no functional cross-reactivity of HCV NS3-1073 specific T cells in response to any of the shared HLA-A2 restricted epitopes. Overall, shared clonotypes represented only a minor fraction of the HCV NS3-1073 specific TCR repertoire. Thus, even though a pool of cross-reactive memory CD8⁺ T cells may exist prior to HCV infection, they play a limited role during primary HCV infection but may contribute to HCV-related liver disease severity as previously observed (18, 46).

In conclusion, our results demonstrate preferential usage of V04 and V06 gene families, as well as the expansion of public TCR clonotypes unique to HCV, irrespective of infection outcome or autologous virus sequence. Additional studies examining the functional avidity of such public clonotypes and characterization of the TCR repertoire of other immunodominant HCV epitopes are required. Our data contribute to publicly available TCR repertoire databases, that can be utilized to predict specificities of expanded T cells in specific pathological conditions or infections (47), improve the development of algorithms to identify HCV-specific TCR clonotypes and their relationship to other specificities, and tracking HCV specific clonotypes during future clinical trials for HCV vaccines (31, 48, 49).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all study subjects for participating in this study and we thank Dominique Gauchat and Philippe St-Onge of the flow cytometry core of the CRCHUM for their technical help with cell sorting experiments.

REFERENCES

1. Turner, S. J., N. L. La Gruta, K. Kedzierska, P. G. Thomas, and P. C. Doherty. 2009. Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr Opin Immunol* 21: 286-290.
2. Trautmann, L., M. Rimbart, K. Echasserieau, X. Saulquin, B. Neveu, J. Dechanet, V. Cerundolo, and M. Bonneville. 2005. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 175: 6123-6132.
3. Iglesias, M. C., J. R. Almeida, S. Fastenackels, D. J. van Bockel, M. Hashimoto, V. Venturi, E. Gostick, A. Urrutia, L. Wooldridge, M. Clement, S. Gras, P. G. Wilmann, B. Autran, A. Moris, J. Rossjohn, M. P. Davenport, M. Takiguchi, C. Brander, D. C. Douek, A. D. Kelleher, D. A. Price, and V. Appay. 2011. Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138-2149.
4. Ladell, K., M. Hashimoto, M. C. Iglesias, P. G. Wilmann, J. E. McLaren, S. Gras, T. Chikata, N. Kuse, S. Fastenackels, E. Gostick, J. S. Bridgeman, V. Venturi, Z. A. Arkoub, H. Agut, D. J. van Bockel, J. R. Almeida, D. C. Douek, L. Meyer, A. Venet, M. Takiguchi, J. Rossjohn, D. A. Price, and V. Appay. 2013. A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8+ T cells. *Immunity* 38: 425-436.
5. Abdel-Hakeem, M. S., N. Bedard, D. Murphy, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2014. Signatures of protective memory immune responses during hepatitis C virus reinfection. *Gastroenterology* 147: 870-881 e878.
6. Osburn, W. O., B. E. Fisher, K. A. Dowd, G. Urban, L. Liu, S. C. Ray, D. L. Thomas, and A. L. Cox. 2010. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 138: 315-324.
7. Pestka, J. M., M. B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H. E. Blum, M. Roggendorf, and T. F. Baumert. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6025-6030.
8. Tsai, S. L., Y. M. Chen, M. H. Chen, C. Y. Huang, I. S. Sheen, C. T. Yeh, J. H. Huang, G. C. Kuo, and Y. F. Liaw. 1998. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 115: 954-965.
9. Miles, J. J., D. Thammanichanond, S. Moneer, U. K. Nivarthi, L. Kjer-Nielsen, S. L. Tracy, C. K. Aitken, R. M. Brennan, W. Zeng, L. Marquart, D. Jackson, S. R. Burrows, D. S. Bowden, J. Torresi, M. Hellard, J. Rossjohn, J. McCluskey, and M. Bharadwaj. 2011. Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection. *J Immunol* 186: 901-912.

10. Takaki, A., M. Wiese, G. Maertens, E. Depla, U. Seifert, A. Liebetrau, J. L. Miller, M. P. Manns, and B. Rehermann. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6: 578-582.
11. Ward, S., G. Lauer, R. Isba, B. Walker, and P. Klenerman. 2002. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* 128: 195-203.
12. Lauer, G. M., M. Lucas, J. Timm, K. Ouchi, A. Y. Kim, C. L. Day, J. Schulze Zur Wiesch, G. Paranhos-Baccala, I. Sheridan, D. R. Casson, M. Reiser, R. T. Gandhi, B. Li, T. M. Allen, R. T. Chung, P. Klenerman, and B. D. Walker. 2005. Full-breadth analysis of CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol* 79: 12979-12988.
13. Lechner, F., D. K. Wong, P. R. Dunbar, R. Chapman, R. T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B. D. Walker. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191: 1499-1512.
14. Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194: 1395-1406.
15. Gruner, N. H., T. J. Gerlach, M. C. Jung, H. M. Diepolder, C. A. Schirren, W. W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiari, A. Cerny, and G. R. Pape. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181: 1528-1536.
16. Abdel-Hakeem, M. S., M. Boisvert, J. Bruneau, H. Soudeyns, and N. H. Shoukry. 2017. Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog* 13: e1006191.
17. Wedemeyer, H., E. Mizukoshi, A. R. Davis, J. R. Bennink, and B. Rehermann. 2001. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 75: 11392-11400.
18. Urbani, S., B. Amadei, P. Fiscaro, M. Pilli, G. Missale, A. Bertoletti, and C. Ferrari. 2005. Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 201: 675-680.
19. Zhang, S., R. K. Bakshi, P. V. Suneetha, P. Fytli, D. A. Antunes, G. F. Vieira, R. Jacobs, C. S. Klade, M. P. Manns, A. R. Kraft, H. Wedemeyer, V. Schlaphoff, and M. Cornberg. 2015. Frequency, Private Specificity, and Cross-Reactivity of Preexisting Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8+ T Cells in HCV-Seronegative Individuals: Implications for Vaccine Responses. *J Virol* 89: 8304-8317.
20. Grebely, J., M. D. Morris, T. M. Rice, J. Bruneau, A. L. Cox, A. Y. Kim, B. H. McGovern, N. H. Shoukry, G. Lauer, L. Maher, A. R. Lloyd, M. Hellard, M. Prins, G. J.

- Dore, K. Page, and C. S. G. In. 2013. Cohort profile: the international collaboration of incident HIV and hepatitis C in injecting cohorts (InC3) study. *Int J Epidemiol* 42: 1649-1659.
21. Badr, G., N. Bedard, M. S. Abdel-Hakeem, L. Trautmann, B. Willems, J. P. Villeneuve, E. K. Haddad, R. P. Sekaly, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2008. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *J Virol* 82: 10017-10031.
22. Team, R. C. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. *Vienna*.
23. Shugay, M., D. V. Bagaev, I. V. Zvyagin, R. M. Vroomans, J. C. Crawford, G. Dolton, E. A. Komech, A. L. Sycheva, A. E. Koneva, E. S. Egorov, A. V. Eliseev, E. Van Dyk, P. Dash, M. Attaf, C. Rius, K. Ladell, J. E. McLaren, K. K. Matthews, E. B. Clemens, D. C. Douek, F. Luciani, D. van Baarle, K. Kedzierska, C. Kesmir, P. G. Thomas, D. A. Price, A. K. Sewell, and D. M. Chudakov. 2018. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res* 46: D419-D427.
24. Pelletier, S., C. Drouin, N. Bedard, S. I. Khakoo, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2010. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J Hepatol* 53: 805-816.
25. Wieland, D., J. Kemming, A. Schuch, F. Emmerich, P. Knolle, C. Neumann-Haefelin, W. Held, D. Zehn, M. Hofmann, and R. Thimme. 2017. TCF1(+) hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nature communications* 8: 15050.
26. Roederer, M., J. L. Nozzi, and M. C. Nason. 2011. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A* 79: 167-174.
27. EH., S. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. 163: 688.
28. Shannon, C. E. 1948. The mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27: 379-423.
29. Li, H., C. Ye, G. Ji, and J. Han. 2012. Determinants of public T cell responses. *Cell Research* 22: 33-42.
30. Eltahla, A. A., S. Rizzetto, M. R. Pirozyan, B. D. Betz-Stablein, V. Venturi, K. Kedzierska, A. R. Lloyd, R. A. Bull, and F. Luciani. 2016. Linking the T cell receptor to the single cell transcriptome in antigen-specific human T cells. *Immunol Cell Biol* 94: 604-611.
31. Pogorelyy, M. V., A. A. Minervina, M. P. Touzel, A. L. Sycheva, E. A. Komech, E. I. Kovalenko, G. G. Karganova, E. S. Egorov, A. Y. Komkov, D. M. Chudakov, I. Z. Mamedov, T. Mora, A. M. Walczak, and Y. B. Lebedev. 2018. Precise tracking of vaccine-

responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 12704-12709.

32. Chen, G., X. Yang, A. Ko, X. Sun, M. Gao, Y. Zhang, A. Shi, R. A. Mariuzza, and N. P. Weng. 2017. Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8(+) TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Rep* 19: 569-583.

33. Annels, N. E., M. F. Callan, L. Tan, and A. B. Rickinson. 2000. Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *J Immunol* 165: 4831-4841.

34. Lee, E. S., P. G. Thomas, J. E. Mold, and A. J. Yates. 2017. Identifying T Cell Receptors from High-Throughput Sequencing: Dealing with Promiscuity in TCRalpha and TCRbeta Pairing. *PLoS Comput Biol* 13: e1005313.

35. Rius, C., M. Attaf, K. Tungatt, V. Bianchi, M. Legut, A. Bovay, M. Donia, P. Thor Straten, M. Peakman, I. M. Svane, S. Ott, T. Connor, B. Szomolay, G. Dolton, and A. K. Sewell. 2018. Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations. *J Immunol* 200: 2263-2279.

36. Wolfl, M., A. Rutebemberwa, T. Mosbrugger, Q. Mao, H. M. Li, D. Netski, S. C. Ray, D. Pardoll, J. Sidney, A. Sette, T. Allen, T. Kuntzen, D. G. Kavanagh, J. Kuball, P. D. Greenberg, and A. L. Cox. 2008. Hepatitis C virus immune escape via exploitation of a hole in the T cell repertoire. *J Immunol* 181: 6435-6446.

37. Meyer-Olson, D., N. H. Shoukry, K. W. Brady, H. Kim, D. P. Olson, K. Hartman, A. K. Shintani, C. M. Walker, and S. A. Kalams. 2004. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med* 200: 307-319.

38. Yang, O. O., P. T. Sarkis, A. Ali, J. D. Harlow, C. Brander, S. A. Kalams, and B. D. Walker. 2003. Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 197: 1365-1375.

39. Douek, D. C., M. R. Betts, J. M. Brenchley, B. J. Hill, D. R. Ambrozak, K. L. Ngai, N. J. Karandikar, J. P. Casazza, and R. A. Koup. 2002. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol* 168: 3099-3104.

40. Fytily, P., G. N. Dalekos, V. Schlaphoff, P. V. Suneetha, C. Sarrazin, W. Zauner, K. Zachou, T. Berg, M. P. Manns, C. S. Klade, M. Cornberg, and H. Wedemeyer. 2008. Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073. *Vaccine* 26: 3818-3826.

41. Soderholm, J., G. Ahlen, A. Kaul, L. Frelin, M. Alheim, C. Barnfield, P. Liljestrom, O. Weiland, D. R. Milich, R. Bartenschlager, and M. Sallberg. 2006. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 55: 266-274.

42. Huth, A., X. Liang, S. Krebs, H. Blum, and A. Moosmann. 2019. Antigen-Specific TCR Signatures of Cytomegalovirus Infection. *J Immunol* 202: 979-990.
43. Venturi, V., M. F. Quigley, H. Y. Greenaway, P. C. Ng, Z. S. Ende, T. McIntosh, T. E. Asher, J. R. Almeida, S. Levy, D. A. Price, M. P. Davenport, and D. C. Douek. 2011. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol* 186: 4285-4294.
44. Kasprowicz, V., S. M. Ward, A. Turner, A. Grammatikos, B. E. Nolan, L. Lewis-Ximenez, C. Sharp, J. Woodruff, V. M. Fleming, S. Sims, B. D. Walker, A. K. Sewell, G. M. Lauer, and P. Klenerman. 2008. Defining the directionality and quality of influenza virus-specific CD8⁺ T cell cross-reactivity in individuals infected with hepatitis C virus. *J Clin Invest* 118: 1143-1153.
45. Grant, E. J., T. M. Josephs, S. A. Valkenburg, L. Wooldridge, M. Hellard, J. Rossjohn, M. Bharadwaj, K. Kedzierska, and S. Gras. 2016. Lack of Heterologous Cross-reactivity toward HLA-A*02:01 Restricted Viral Epitopes Is Underpinned by Distinct alphabeta T Cell Receptor Signatures. *J Biol Chem* 291: 24335-24351.
46. Vali, B., R. Tohn, M. J. Cohen, A. Sakhdari, P. M. Sheth, F. Y. Yue, D. Wong, C. Kovacs, R. Kaul, and M. A. Ostrowski. 2011. Characterization of cross-reactive CD8⁺ T-cell recognition of HLA-A2-restricted HIV-Gag (SLYNTVATL) and HCV-NS5b (ALYDVVSKL) epitopes in individuals infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. *J Virol* 85: 254-263.
47. Gantner, P., A. Pagliuzza, M. Pardons, M. Ramgopal, J. P. Routy, R. Fromentin, and N. Chomont. 2020. Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat Commun* 11: 4089.
48. Glanville, J., H. Huang, A. Nau, O. Hatton, L. E. Wagar, F. Rubelt, X. Ji, A. Han, S. M. Krams, C. Pettus, N. Haas, C. S. L. Arlehamn, A. Sette, S. D. Boyd, T. J. Scriba, O. M. Martinez, and M. M. Davis. 2017. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* 547: 94-98.
49. Pogorelyy, M. V., A. A. Minervina, D. M. Chudakov, I. Z. Mamedov, Y. B. Lebedev, T. Mora, and A. M. Walczak. 2018. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *Elife* 7.

Table 1. Study subjects' characteristics and demographics

| Subject ID | Sex | Age at infection or reinfection* (years) | Time Point studied | EDI ^a | Genotype | Plasma HCV RNA (IU/mL) | NS3-1073 autologous sequence ^c |
|------------|-----|--|--------------------|----------------------|----------|------------------------|--|
| | | | | | | | CINGVCWTV ^d |
| SR.1 | F | 36 | Acute | 155 | 1 | <15 | ND |
| | | | Follow-up | 413 | | Undetectable | ND |
| SR.2 | M | 45 | Follow-up | 430 | 1 | Undetectable | ND |
| SR.3 | M | 42 | Follow-up | Unknown ^b | N/A | Undetectable | ND |
| SR.4 | M | 40 | Follow-up | 347 | 1 | Undetectable | ND |
| SR.5 | F | 22 | Acute | 29 | 1a | 10 397 | ----- (1/6) ----A---- (5/6) |
| | | | Follow-up | 503 | | Undetectable | ND |
| SR.6 | M | 31 | Follow-up | Unknown ^b | N/A | Undetectable | ND |
| SR.7 | F | 21 | Acute | 75 | 1 | 4 107 | ----- (2/7) -V----- (4/7) R----- (1/7) |
| | | | Follow-up | 389 | | Undetectable | ND |
| SR.8 | M | 36 | Acute | 168 | 1a | 16 667 | ----- (4/5) -----A (1/5) |
| | | | Follow-up | 367 | | Undetectable | ND |
| CI.1 | M | 38 | Acute | 77 | 1a | 18 000 | ----- (8/8) |
| CI.2 | F | 28 | Acute | 68 | 1a | 3 192 | ----- (8/8) |
| CI.3 | M | 56 | Acute | 91 | 1a | 5 128 614 | ----- (6/6) |
| CI.4 | M | 48 | Acute | 89 | 1a | 11 487 369 | ----- (8/8) |
| CI.5 | M | 32 | Acute | 83 | 1a | 2 106 667 | ----- (5/5) |
| CI.6 | M | 21 | Acute | 46 | 1a | 10 567 | ----- (8/8) |
| SR/SR-1*‡ | M | 53 | Pre-reinfection | -375 | 1 | Negative | ND |
| | | | Peak reinfection | 32 | | Undetectable | ND |
| | | | Late reinfection | 180 | | Undetectable | ND |
| SR/CI-2*‡ | M | 29 | Pre-reinfection | -60 | 1a | Negative | ND |
| | | | Peak reinfection | 70 | | 644 | ----A---- (10/10) |
| | | | Late reinfection | 170 | | Positive (ND) | -----L-I (8/8) |

^a E.D.I.: Estimated Day post-Infection.

^b Subject was HCV antibody positive, HCV RNA negative (Resolver) at time of recruitment with no previous infection history

^c Number of individual molecular clones sequenced

^d HCV H77 (Genotype 1a) reference sequence

‡ The data in this Table were previously published in Abdel-Hakeem MS *et al.* 2014 (5)

N/A: Not Available; ND: Not Done

Table 2. Overlap between NS3-1073 specific clonotypes from seronegative subjects^a and our dataset

| Public Clonotype Number | CDR3 Amino Acid Sequence | Subject ID | Acute | | | Follow-Up | | |
|-------------------------|--------------------------|------------|--------|---------------|-------|-----------|---------------|-------|
| | | | V Gene | Frequency (%) | Total | V Gene | Frequency (%) | Total |
| 4 | CASSQEVAGGNEQFF | SR.1 | V04-02 | 1.17 | 1.35 | V04-02 | 1.70 | 1.83 |
| | | | V04-03 | 0.18 | | V04-03 | 0.13 | |
| | | SR.7 | V04-03 | 0 | 0 | V04-03 | 0.20 | 0.20 |
| | | SR.8 | | 0.58 | 0.58 | | 1.77 | 1.77 |
| | | CI.2 | V04-02 | 0.51 | 0.51 | ND | | |
| | | CI.3 | | 0.12 | 0.12 | ND | | |
| CI.5 | V03 | 1.70 | 1.70 | ND | | | | |
| N/A | CASSPLGSSYEQYF | SR.3 | ND | | | V27-01 | 0.13 | 0.13 |
| | CASSLAGQAYEQYF | SR.7 | V27-01 | 0.19 | 0.19 | V27-01 | 0.20 | 0.20 |
| | CASSEDGMNTEAFF | SR.8 | V10-02 | 0.19 | 0.19 | V10-02 | 0 | 0 |

^aData from Zhang et al. (19)

ND: Not Done

N/A: Not Available

Table 3. List of NS3-1073 specific clonotype shared with other HLA-A2 restricted epitopes

| Subject ID | CDR3 Amino Acid Sequence | Acute | | | Follow-up | | | VDJ Database (23) | | | |
|------------|--------------------------|--------|---------------|--------|-----------|---------------|-------|----------------------------|---------|------------|-----------|
| | | V Gene | Frequency (%) | Total | V Gene | Frequency (%) | Total | Origin | Protein | Epitope | Reference |
| SR.5 | CASSLAPGATNEKLF F | V07-06 | 0 | 0 | V07-06 | 0.28 | 0.28 | CMV | pp65 | NLVPMVATV | 32 |
| SR.7 | CASSSDNEQFF | V03 | 0 | 0 | V03 | 0.20 | 0.20 | | | | |
| CI.3 | CASSLASSTEAFF | V05-08 | 0.17 | 0.17 | ND | | | | | | |
| CI.4 | CASSLVNEQFF | V13-01 | 0.15 | 0.15 | ND | | | | | | |
| CI.4 | CASSLLVAGVYEQYF | V07-09 | 0.15 | 0.15 | ND | | | | | | |
| CI.5 | CASSLGLYEQYF | V07-09 | 0.40 | 0.40 | ND | | | | | | |
| SR.3 | CASSVGNEQFF | ND | | | V09-01 | 0.13 | 0.13 | EBV | BMLF1 | GLCTLVAML | 33 |
| SR.1 | CASSQVQGTYEQYF | V03 | 0.36 | 0.36 | V03 | 0.39 | 0.39 | Influenza A | M1 | GILGFVFTL | 32 |
| SR.2 | | ND | | | | 1.50 | 1.50 | | | | |
| CI.3 | | V03 | 0.13 | 0.13 | ND | | | | | | |
| SR.1 | CASSQGQANEKLF | V04-02 | 0 | 0 | V04-02 | 0.39 | 0.39 | Yellow Fever Virus | NS4B | LLWNGPMAV | 34 |
| CI.3 | | | 0.17 | 0.17 | ND | | | | | | |
| SR.6 | CASSLVAESSYEQYF | ND | | | V05 | 0.17 | 0.34 | Yellow Fever Virus Vaccine | | | |
| | | | | V05-06 | 0.17 | | | | | | |
| SR.7 | CASSRAGGDYEQYF | V28-01 | 0.19 | 0.19 | V28-01 | 0.20 | 0.20 | | | | |
| SR.8 | CASSPNNEQFF | V07-06 | 0.19 | 0.19 | V07-06 | 0 | 0 | | | | |
| SR.8 | CASSTNTDTQYF | V11-01 | 0.19 | 0.19 | V11-01 | 0 | 0 | | | | |
| SR.7 | CASSGQGSYEQYF | V12 | 0.26 | 0.26 | V12 | 0 | 0 | | | | |
| CI.5 | | | 0.26 | 0.26 | ND | | | | | | |
| CI.3 | CAS TLGGGTEAFF | V05-06 | 2.45 | 2.45 | ND | | | Homosapiens (Melanoma) | MLANA | ELAGIGILTV | 35 |
| CI.4 | CASSLSGQGYEQYF | V27-01 | 0.15 | 0.15 | ND | | | | | | |

ND: Not Done

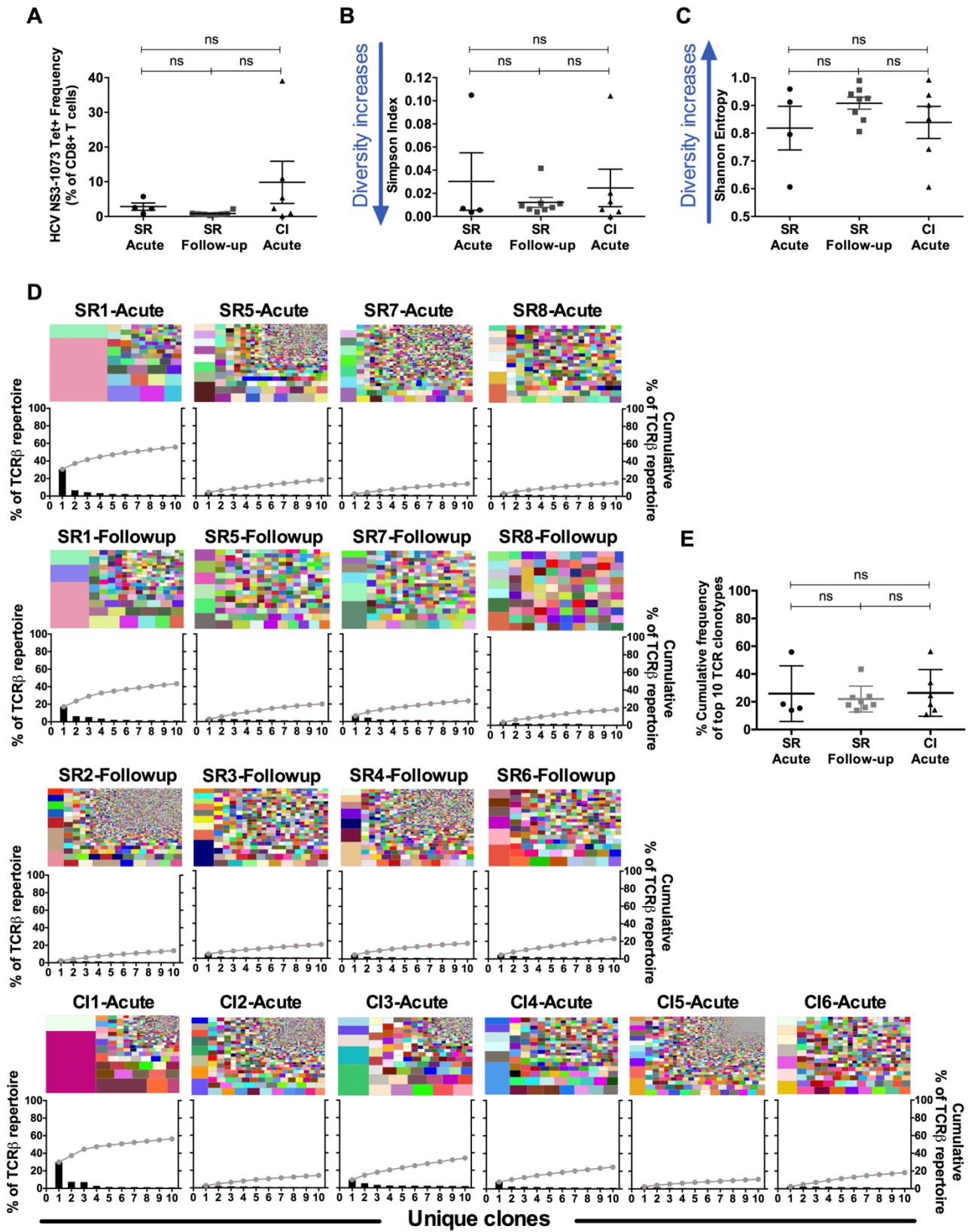


Figure 1. Comparable NS3-1073 specific CD8⁺ T cell repertoire (TCR) diversity between SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute

Analysis of the TCR β repertoire of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells sorted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of SR subjects during either acute HCV (n=4) or follow-up (n=8) and CI subjects during acute HCV (n=6) as indicated in Table 1. **(A)** Frequency of NS3-1073 specific CD8⁺ T cells. **(B)** Simpson Diversity and **(C)** Shannon Entropy of all the repertoires are shown. **(D)** Tree maps show each samples' TCR repertoire. Each colored square represents a CDR3 clonotype and its proportion to the TCR repertoire. Clonotypes in common between paired samples (e.g. SR1-Acute and SR1-Follow-up) are represented using the same color. Apart from paired samples, colors were chosen randomly and don't match between tree maps. Graphs below each tree maps show the individual CDR3 clonotype frequency (left y axis) and the accumulated frequency (dotted grey line) of the top 10 expanded clonotypes (right y axis). **(E)** Cumulative frequencies of the top 10 clonotypes.

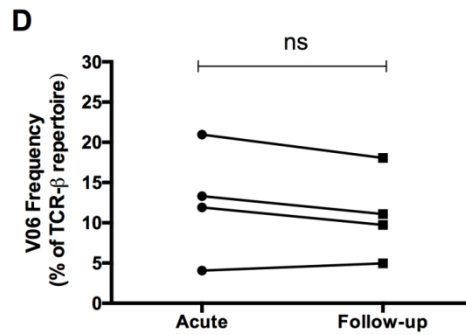
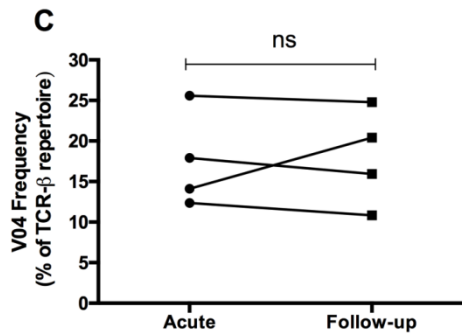
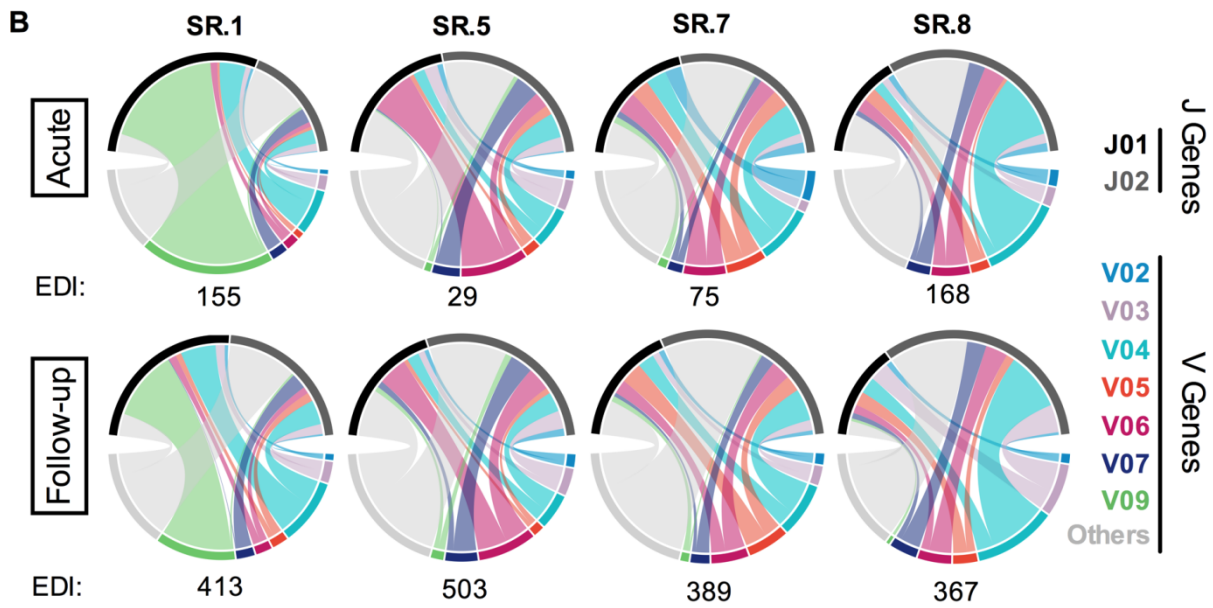
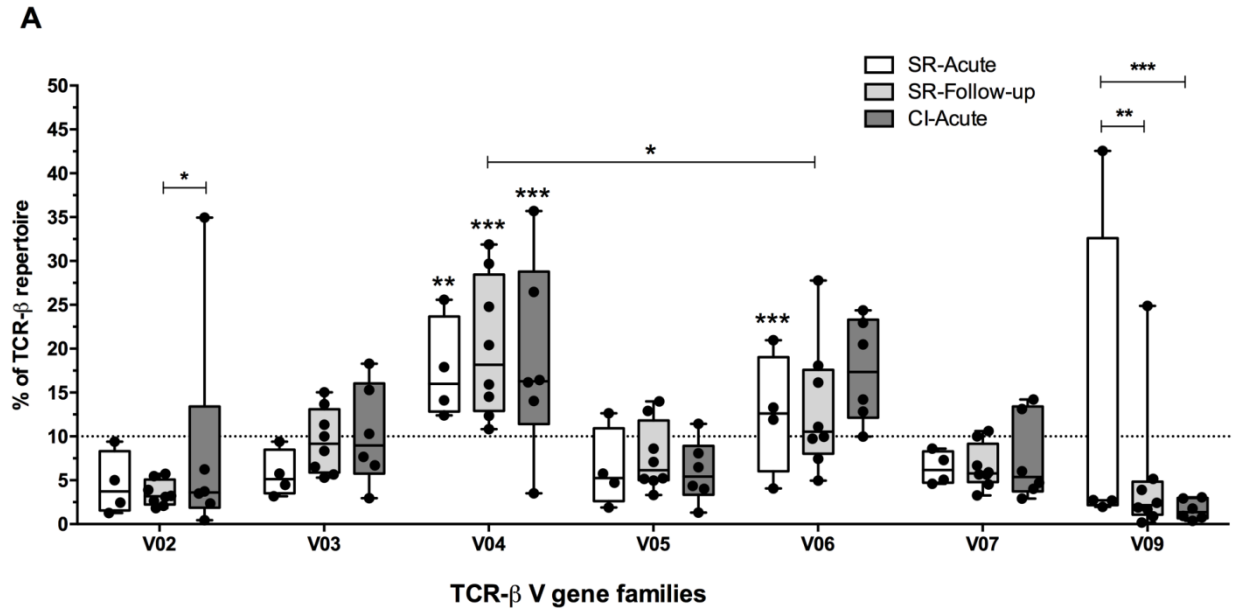


Figure 2. V04 and V06 V gene families are preferentially utilized by HCV NS3-1073 specific CD8+ T cells from all groups

(A) Frequency of preferentially used TCRBV families among dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant ($\geq 0.5\%$) and low abundance clonotypes ($\geq 0.1\%$) in SR samples collected during acute (n=4) and follow-up (n=8) and CI-acute samples (n=6). Two-way ANOVA; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ****: $p \leq 0.0001$. In this figure, we are only showing V gene families of frequency $>10\%$ and highlighting only key families and those that are significant as compared to at least three other families. See Supplementary Figure S3. **(B)** Evolution of V and corresponding J genes usage in paired samples from four SR subjects at the acute and follow-up time points, shown as pie charts representing frequencies of dominant, sub-dominant and low frequency clonotypes (EDI.: Estimated Day post-Infection.). The size of the colored arcs is proportional to V genes frequencies and the corresponding V-J pair. **(C)** Cumulative frequency of V04 and **(D)** V06 usage within dominant, sub-dominant and low frequency clonotypes in paired samples collected at acute and follow-up time points. Student *t*-test; ns: not significant.

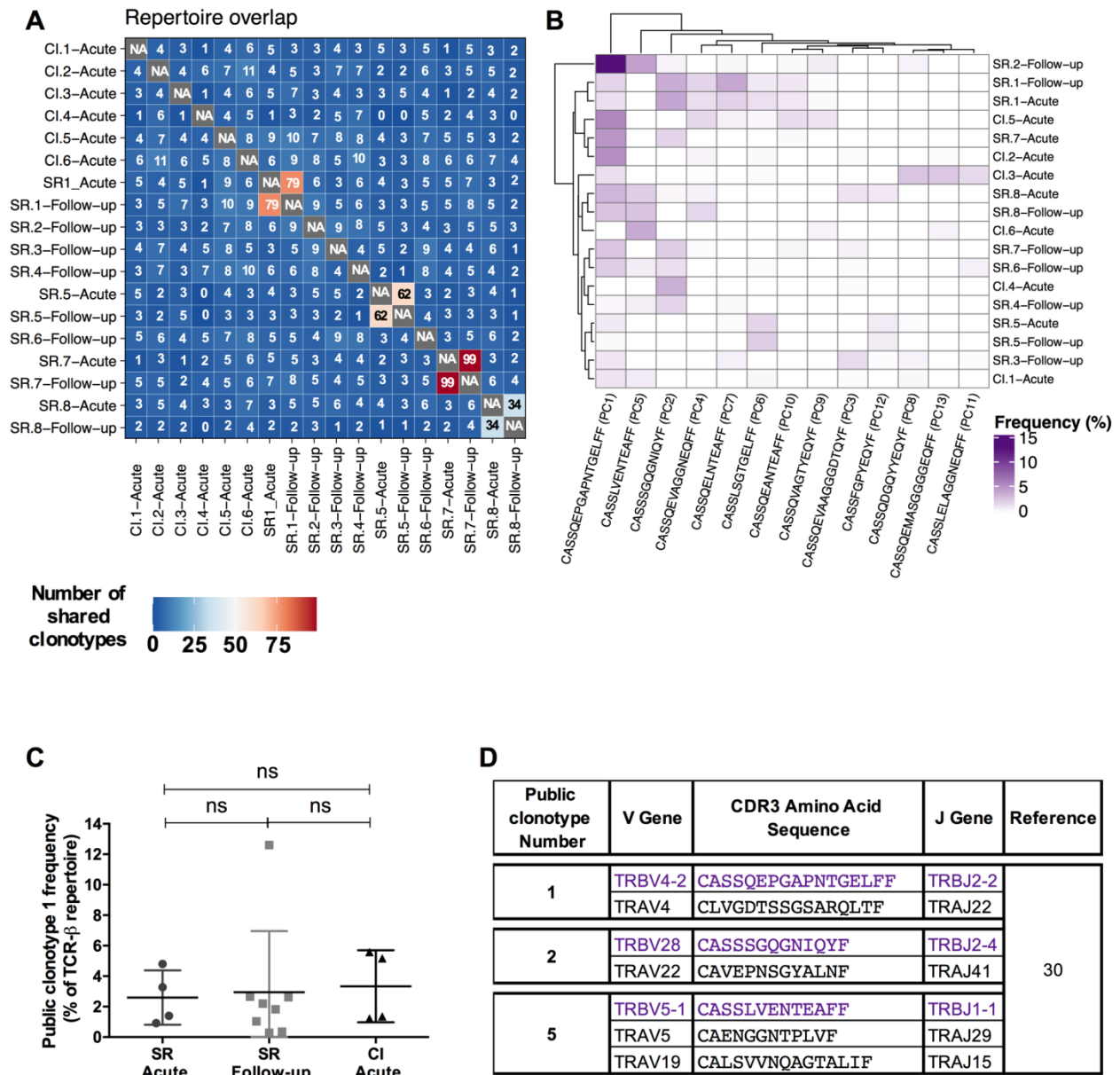
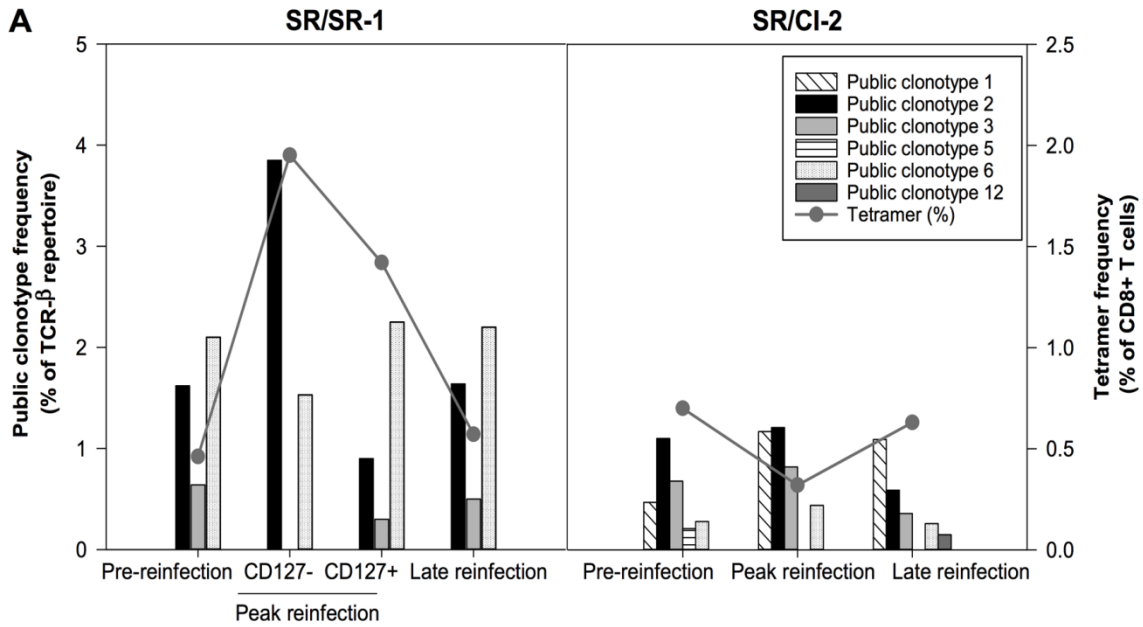


Figure 3. Identification of a set of public clonotypes irrespective of infection outcome.

(A) The number of CDR3 AA sequence among dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant (0.50–0.99%) and low abundance (0.49–0.10%) clonotypes of HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells in common between samples illustrated as a heatmap. A clonotype was termed “public” if it was present in at least two subjects at a cumulative frequency $\geq 0.5\%$, irrespective of infection outcome. (B) Heatmap show the cumulative frequencies within dominant, sub-dominant and low abundance CDR3 AA sequence of identified public

clonotypes. **(C)** Cumulative frequencies of public clonotype 1 within dominant, sub-dominant and low abundance clonotypes SR samples collected during acute (n=4) and follow-up (n=8) and CI-acute samples (n=6). One-way ANOVA; ns: not significant. **(D)** Corresponding alpha chain of three public clonotypes identified from Eltahla et al (31).



B

| Clone | Amino acid sequence | TRBV | Public clonotype number | Sequence frequency (%) | Clonotype frequency at peak reinfection (%) |
|-------|---------------------|----------|-------------------------|------------------------|---|
| R1 | CASSVDEGNTGELFF | 09-01 | | 92.1 | 0.7 |
| | CSAWTGSATEAFF | 20 | | 7.2 | 33.4 |
| R2 | CASISSNQPHF | 07-09 | | 57.8 | 5.2 |
| | CASSSGQGNIQYF | 28-01*01 | 2 | 35.4 | 3.6 |
| R3 | CASSLSGGNQETQYF | 27-01*01 | | 97.8 | ND |
| R4 | CASSLSGTGELFF | 12 | 6 | 59.2 | 2.5 |
| | CASSSGQGNIQYF | 28-01*01 | 2 | 34.5 | 3.6 |
| R5 | CATSEPAGLAGGNNEQFF | 24 | | 87.4 | < 0.01 |
| | CASSPGTSDPANYGYTF | 27-01*01 | | 12.5 | 8.0 |

ND: Not detected

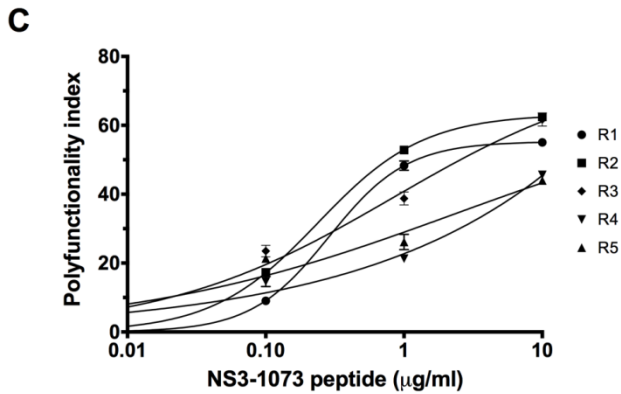


Figure 4. Expansion profile and polyfunctionality of public clonotypes during HCV reinfection

(A) Cumulative frequencies of public clonotypes within dominant, sub-dominant and low abundance clonotypes of subject SR/SR-1 who cleared HCV reinfection and subject SR/CI-2 who developed chronic infection. The TCR repertoire is examined at pre-reinfection, peak reinfection and late reinfection time points, as previously described by Abdel-Hakeem, Boisvert et al. (16). For subject SR/SR-1, effector (CD127-) and memory (CD127+) two CD8 T cell subsets were examined at the peak reinfection time point. **(B)** TCR deep sequencing of CD8 T cell lines derived from SR/SR1 PBMCs. **(C)** Polyfunctionality index of one representative experiment in duplicate representing the degree of polyfunctionality of each CD8 T cell line at each peptide concentration (data from Abdel-Hakeem, Boisvert et al. (16)).

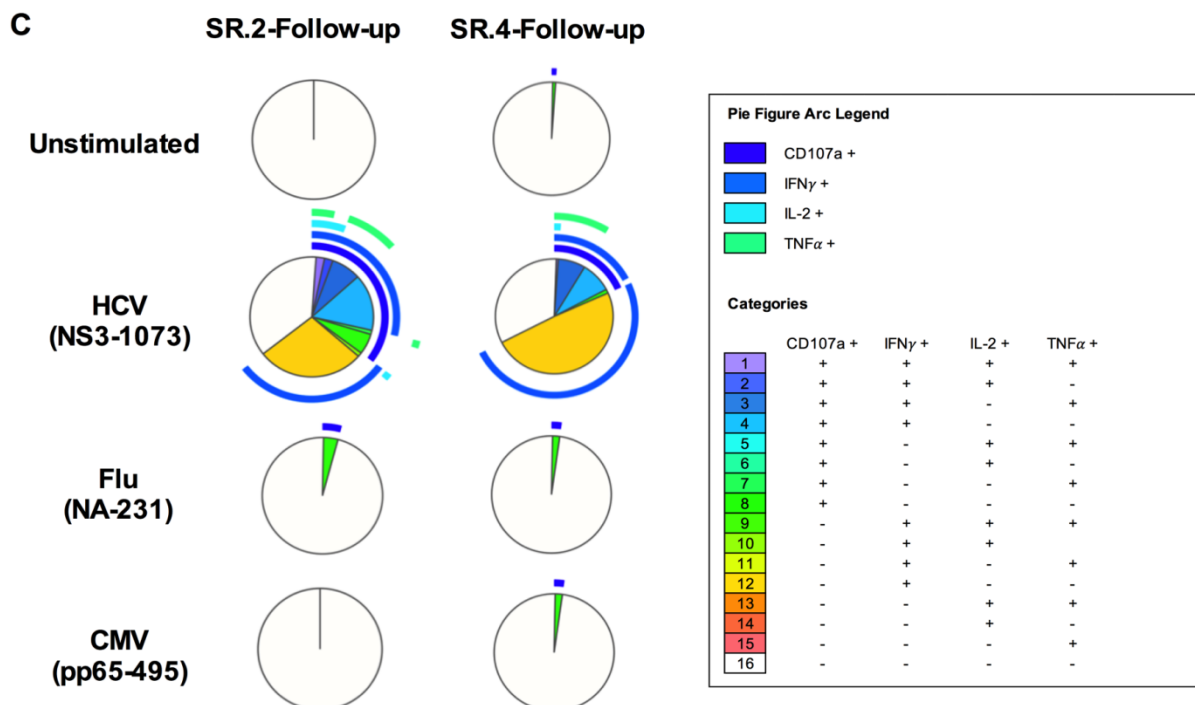
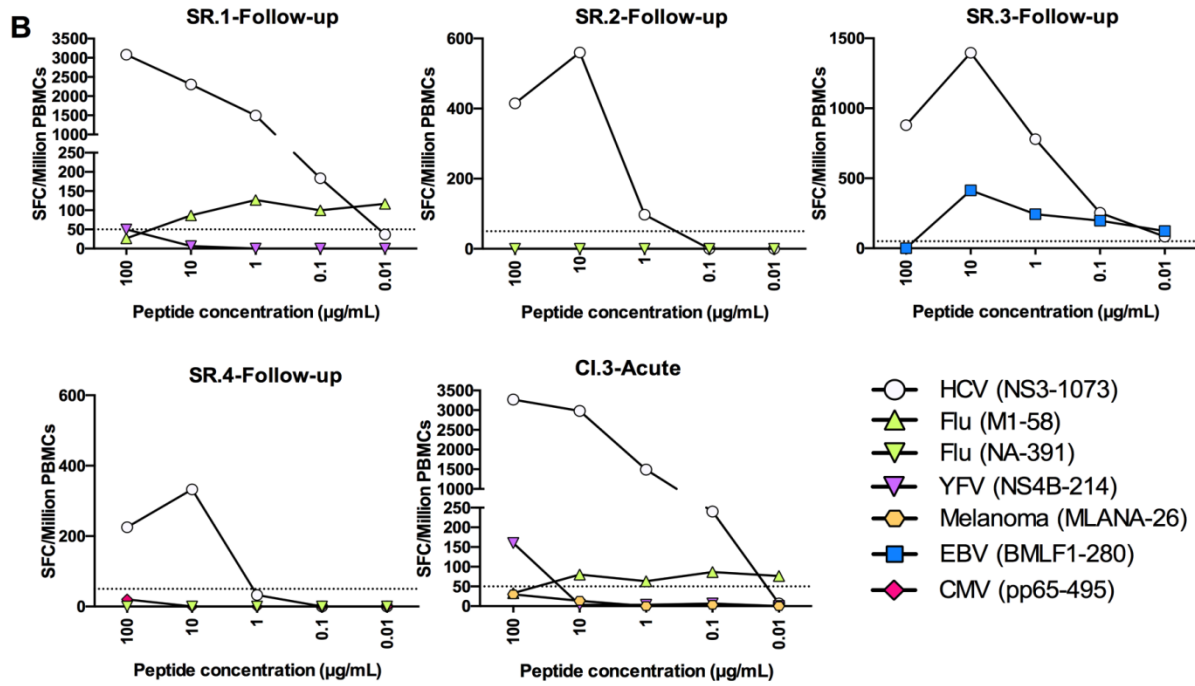
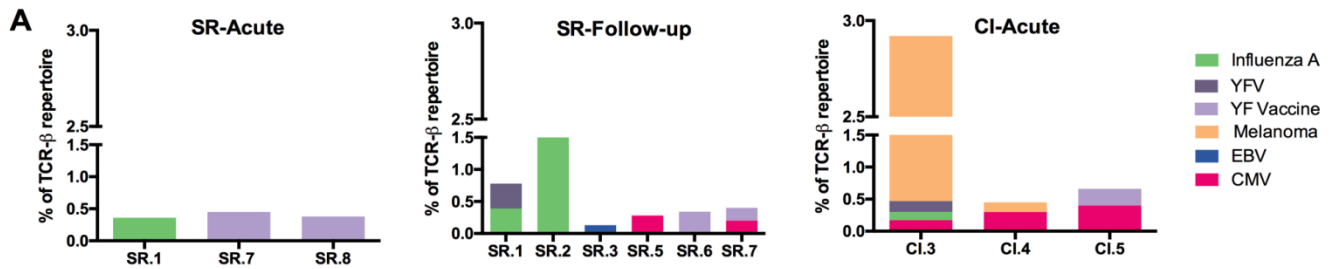


Figure 5. Limited recognition of HLA-A2 restricted epitopes by HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells.

(A) Frequencies and specificities of shared TCR clonotypes between HCV-specific CD8⁺ T cells from the indicated samples of HCV infected subjects and other HLA-A2 restricted epitopes from the VDJ database. **(B)** PBMCs from four SR-follow-up samples that showed shared TCR clonotypes with other HLA-A2 restricted epitopes were tested in an IFN- γ ELISPOT assay against the HCV (NS3 1073) epitope together with the potentially cross reactive epitope based on the shared TCR clonotypes represented in **(A)** and Table 3. These included: Flu (NA-231 and M1-58), YFV (NS4B-214), Melanoma (MLANA-26), EBV (BMLF1-280) or CMV (pp65-495) peptides. The frequencies of IFN- γ spot forming cell (SFC) per million PBMCs are shown for each sample. **(C)** HCV NS3-1073 specific CD8 T cells were expanded from the PBMCs of subjects SR.2 and SR.4 (Follow-up time point) with the NS3-1073 peptide as indicated in Materials and Methods. Expanded HCV-specific CD8 T cells were stimulated with autologous BLCLs prepulsed or not with either HCV (NS3 1073), Flu (NA-231) or CMV (pp65-495) peptides for 6 hours. Functionality was examined by flow cytometry. Boolean gating and SPICE software were used to assess polyfunctionality profile for total CD8⁺ T cells in each subject.

Supplementary Materials

Supplementary Figures

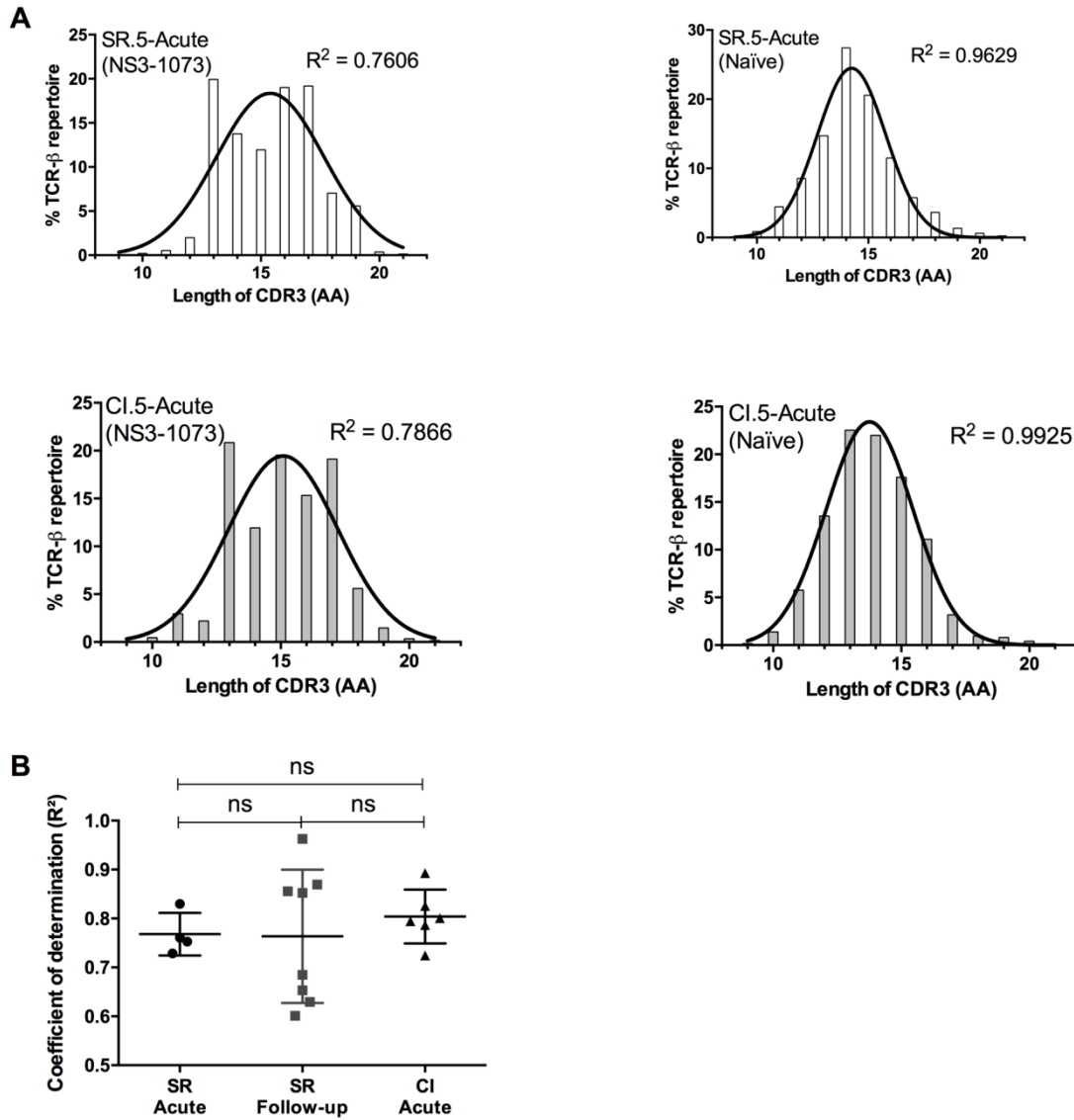
Fig. S1. Comparable NS3-1073 specific CD8⁺ T cell repertoire (TCR) CDR3 length between SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute.

Fig. S2. V gene family usage of HCV NS3-1073 specific and naïve CD8⁺ T cells.

Supplementary Tables

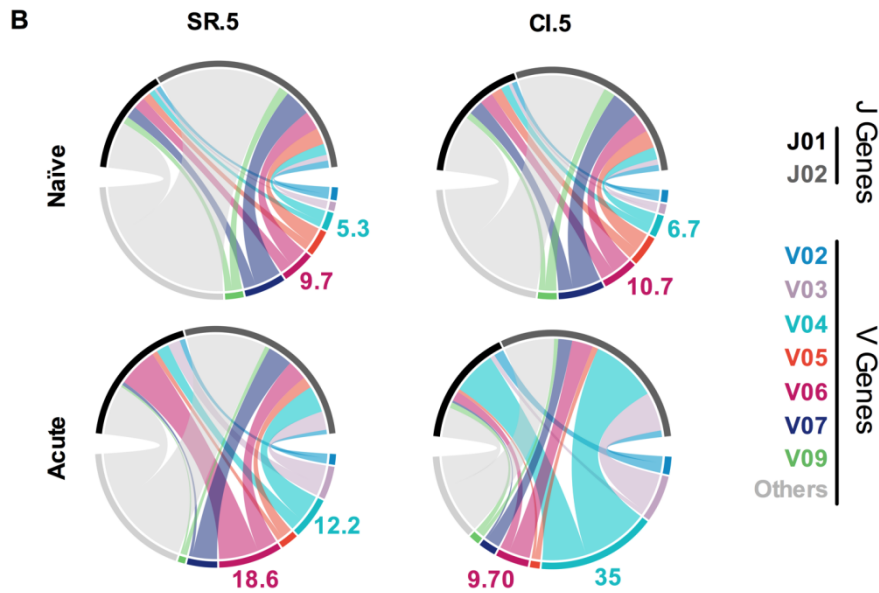
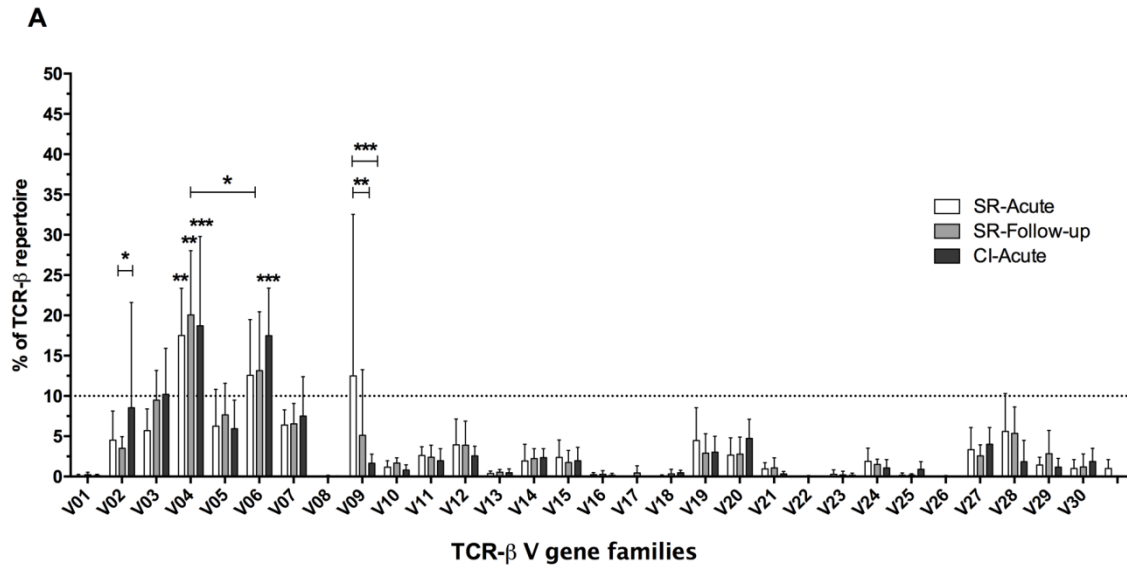
Table S1. TCR deep-sequencing summary information

Table S2. HCV Public Clonotypes List



Supplementary Figure S1. Comparable NS3-1073 specific CD8⁺ T cell repertoire (TCR) CDR3 length between SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute.

(A) Representative CDR3 amino acid (AA) length distribution analysis of the HCV-specific (left) and naïve (right) repertoire of SR.5 (Top) and CI.5 (Bottom) subjects. (B) Pooled data of the coefficient of determination (R^2) to compare CDR3 length distribution in all SR and CI subjects. One-way ANOVA; ns: not significant.



Supplementary Figure S2. V gene family usage of HCV NS3-1073 specific and naïve CD8⁺ T cells.

(A) Frequency of all TCRBV families among dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant ($\geq 0.5\%$) and low abundance clonotypes ($\geq 0.1\%$) in SR subjects during acute ($n=4$) and follow-up ($n=8$) as well as CI-acute ($n=6$). Two-way ANOVA; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ****: $p \leq 0.0001$. The dotted line indicates the 10% threshold used to select highly utilized V gene families. For simplicity, only key V gene families and those significant compared to at least three other families are highlighted. (B) V and corresponding J gene usage of HCV naïve (top)

and HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells (bottom) from SR.5-Follow-up and CI.5-Acute samples shown as chord diagrams representing frequencies of the dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant ($\geq 0.5\%$), low frequency ($\geq 0.1\%$) and lowest abundance ($<0.1\%$) clonotypes. The size of the colored arcs is proportional to V genes frequencies and the corresponding V-J pair

Supplementary Table S1: TCR deep-sequencing summary information

| Sample Name | HCV NS3-1073 Tet+ Frequency (% of CD8⁺ T cells) | Sorted Cells (Number) | Productive Sequences (Total) | Productive Sequences (Unique)^a | Clonality^b |
|--------------------|---|------------------------------|-------------------------------------|--|------------------------------|
| SR.1-Acute | 2.55 | 25 815 | 8 422 | 783 | 0.3935 |
| SR.1-Follow-up | 2.16 | 5 459 | 766 | 244 | 0.1941 |
| SR.2-Follow-up | 0.83 | 27 279 | 9 834 | 3 399 | 0.1525 |
| SR.3-Follow-up | 0.63 | 1 505 | 777 | 461 | 0.0590 |
| SR.4-Follow-up | 0.89 | 14 051 | 4 691 | 1 475 | 0.1240 |
| SR.5-Acute | 5.74 | 49 531 | 15 141 | 2 093 | 0.2043 |
| SR.5-Follow-up | 0.73 | 3 041 | 362 | 241 | 0.0445 |
| SR.6-Follow-up | 0.51 | 910 | 595 | 299 | 0.0759 |
| SR.7-Acute | 2.30 | 10 888 | 2 900 | 1 306 | 0.0875 |
| SR.7-Follow-up | 0.70 | 3 871 | 496 | 299 | 0.0742 |
| SR.8-Acute | 0.77 | 2 753 | 521 | 339 | 0.0405 |
| SR.8-Follow-up | 0.27 | 756 | 113 | 103 | 0.0101 |
| CI.1-Acute | 2.33 | 15 485 | 8 699 | 653 | 0.3935 |
| CI.2-Acute | 5.42 | 35 471 | 9 739 | 1 805 | 0.1476 |
| CI.3-Acute | 11.03 | 27 433 | 8 421 | 650 | 0.2568 |
| CI.4-Acute | 0.95 | 2 714 | 675 | 302 | 0.0980 |
| CI.5-Acute | 39.08 | 285 445 | 61 180 | 5 103 | 0.18 |
| CI.6-Acute | 0.19 | 2 092 | 718 | 402 | 0.0617 |

^aThe number of sequences in the sample that are in-frame and do not contain a STOP codon.

^bClonality measures the TCR repertoire distribution. It ranges from 0 (all clonotypes are equally abundant) to 1 (all clonotypes originated from a unique progenitor cell).

Table S2. HCV Public Clonotypes List

| Public Clonotype Number | CDR3 Amino Acid Sequence | Subject ID | Acute | | | Follow-up | | | |
|-------------------------|--------------------------|------------|-------------------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|------|
| | | | V Gene | Frequency (%) | Total (%) | V Gene | Frequency (%) | Total (%) | |
| 1 | CASSQEPGAPNTGELFF | SR.1 | V04-02 | 1.40 | 1.40 | V04-02 | 1.70 | 1.83 | |
| | | | | | | V05-04 | 0.13 | | |
| | | SR.2 | ND | | | | 12.6 | 12.6 | |
| | | SR.3 | ND | | | | 1.03 | 1.03 | |
| | | SR.4 | ND | | | | 0.36 | 0.36 | |
| | | SR.5 | V04-02 | 0.92 | 0.92 | V04-02 | 0.28 | 0.28 | |
| | | SR.6 | ND | | | | | 2.20 | 2.20 |
| | | SR.7 | V04-02 | 4.80 | 4.80 | | 2.62 | 2.62 | |
| | | SR.8 | | 3.27 | 3.27 | | 2.65 | 2.65 | |
| | | CI.1 | | 1.23 | 1.23 | ND | | | |
| | | CI.2 | | 5.17 | 5.17 | ND | | | |
| | | CI.3 | | 1.36 | 1.36 | ND | | | |
| | | CI.5 | 5.58 | 5.58 | ND | | | | |
| 2 | CASSSGQGNIQYF | SR.1 | V28-01 | 4.04 | 4.04 | V28-01 | 3.66 | 3.66 | |
| | | SR.2 | ND | | | | | 0.56 | 0.56 |
| | | SR.4 | ND | | | | | 1.81 | 1.81 |
| | | SR.6 | ND | | | | | 1.35 | 1.35 |
| | | SR.7 | V28-01 | 1.88 | 1.88 | | | 2.22 | 2.22 |
| | | SR.8 | | 0.38 | 0.38 | | 0 | 0 | |
| | | CI.4 | | 3.58 | 3.58 | ND | | | |
| | | 3 | CASSQEVAAGGGDTQYF | SR.3 | ND | | | V04-03 | 1.42 |
| | | | | | | V07-02 | 0.13 | | |
| SR.6 | ND | | | V03 | 0.17 | 0.17 | | | |
| SR.7 | V04-03 | | | 0 | 0 | V04-03 | 0.60 | 0.60 | |
| SR.8 | | | | 1.15 | 1.15 | | | 0 | 0 |
| CI.1 | | | | 0.13 | 0.13 | ND | | | |
| CI.2 | | | | 0.21 | 0.21 | ND | | | |
| CI.4 | V07-08 | 0.15 | 0.15 | ND | | | | | |
| 4 | CASSQEVAGGNEQFF | SR.1 | V04-02 | 1.17 | 1.35 | V04-02 | 1.70 | 1.83 | |
| | | | V04-03 | 0.18 | | V04-03 | 0.13 | | |
| | | SR.7 | V04-03 | 0 | 0 | V04-03 | 0.20 | 0.20 | |
| | | SR.8 | | 0.58 | 0.58 | | | 1.77 | 1.77 |
| | | CI.2 | V04-02 | 0.51 | 0.51 | ND | | | |
| | | CI.3 | | 0.12 | 0.12 | ND | | | |
| | | CI.5 | V03 | 1.70 | 1.70 | ND | | | |
| 5 | CASSLVENTEAF | SR.2 | ND | | | V05-01 | 4.30 | 4.30 | |
| | | SR.4 | ND | | | | | 0.78 | 0.78 |
| | | SR.6 | ND | | | | | 0.84 | 0.84 |
| | | SR.8 | V05-01 | 2.12 | 2.12 | | 2.65 | 2.65 | |
| | | CI.1 | | 0.80 | 0.80 | ND | | | |
| | | CI.6 | | 3.76 | 3.76 | ND | | | |
| 6 | CASSLSGTGELFF | SR.1 | V12 | 1.33 | 1.33 | V12 | 0.92 | 0.92 | |
| | | SR.5 | | 1.84 | 1.84 | | | 2.22 | 2.22 |
| | | SR.6 | ND | | | | | 0.17 | 0.17 |
| | | CI.1 | V12 | 0.35 | 0.35 | ND | | | |
| | | CI.2 | | 0.27 | 0.27 | ND | | | |
| | | CI.3 | | 0.15 | 0.15 | ND | | | |
| | | CI.5 | | V03 | 0.41 | 0.41 | ND | | |
| 7 | CASSQELNTEAF | SR.1 | V04-02 | 1.96 | 1.96 | V04-02 | 3.80 | 3.93 | |
| | | | | | | V05-04 | 0.13 | | |
| | | SR.2 | ND | | | | 0.31 | 0.31 | |
| | | SR.3 | ND | | | V04-02 | 0.52 | 0.65 | |
| | | SR.4 | ND | | | V04-03 | 0.13 | | |
| | | SR.5 | V04-02 | 0.18 | 0.18 | V04-02 | 0.28 | 0.28 | |
| | | CI.5 | | 0.59 | 0.59 | ND | | | |

| | | | | | | | | |
|----|------------------|------|--------|------|--------|--------|------|------|
| 8 | CASSQDGQYEQYF | SR.2 | ND | | V14-01 | 0.52 | 0.52 | |
| | | SR.3 | ND | | | 0.52 | 0.52 | |
| | | SR.5 | V14-01 | 0.16 | | 0.16 | 0 | 0 |
| | | CL.1 | | 0.34 | 0.34 | ND | | |
| | | CL.3 | | 2.55 | 2.55 | ND | | |
| 9 | CASSQVAGTYEQYF | SR.1 | V03 | 0.29 | 0.29 | V03 | 0.13 | 0.13 |
| | | SR.2 | ND | | 0.81 | | 0.81 | |
| | | CL.5 | V03 | 1.23 | 1.23 | ND | | |
| | | CL.6 | | 0.56 | 0.56 | ND | | |
| 10 | CASSQEANTEAFF | SR.1 | V04-02 | 0.96 | 0.96 | V04-02 | 0.92 | 1.05 |
| | | SR.2 | ND | | V07-02 | 0.13 | | |
| | | SR.7 | V04-02 | 0.26 | 0.26 | V04-02 | 0.27 | 0.27 |
| | | CL.5 | | 1.49 | 1.49 | 0.40 | 0.40 | |
| | | | | | | | ND | |
| 11 | CASSLELAGGNEQFF | SR.3 | ND | | V27-01 | 0.13 | 0.13 | |
| | | SR.6 | ND | | | 0.68 | 0.68 | |
| | | CL.3 | V27-01 | 1.62 | 1.62 | ND | | |
| 12 | CASSFGPYEQYF | SR.3 | ND | | V12 | 0.13 | 0.13 | |
| | | SR.5 | V12 | 0.86 | | 0.86 | 0.83 | 0.83 |
| | | SR.8 | | 0.96 | | 0.96 | 0 | 0 |
| 13 | CASSQEMASGGGEQFF | CL.2 | V04-02 | 0.19 | 0.19 | ND | | |
| | | CL.3 | | 2.42 | 2.42 | ND | | |
| | | CL.6 | | 0.56 | 0.56 | ND | | |

ND: Not Done

Chapitre 4 | Manuscrit 2

Concerted HCV-specific T and B cell responses during acute HCV reinfection and clearance

Manuscript in preparation for submission to Journal of Experimental Medicine

Authors' contributions: **Sabrina Mazouz** designed and performed experiments (RNA extraction, Flow cytometry, ELISPOT), analyzed and interpreted data (computational analysis and immunological data), and wrote the manuscript; **Eduardo Salinas** designed and performed experiments (Neutralizing antibodies assays) and interpreted data; **Nathalie Bédard** performed experiments (Flow cytometry and ELISA); **Ali Filali** analyzed data (computational analysis), **Omar Khedr** analyzed data (computational analysis); **Mohamed S. Abdel-Hakeem** designed and performed experiments (ELISPOT), revised the manuscript; **Asiyah Siddique** designed and performed experiments (ELISPOT); **Julie Bruneau** recruited and followed subjects and provided clinical data; **Arash Grakoui** and **Naglaa H. Shoukry** obtained funds, designed experiments, interpreted data and revised the manuscript.

Concerted HCV-specific T and B cell responses during acute HCV reinfection and clearance

Sabrina Mazouz^{1,2}, Eduardo Salinas^{3}, Nathalie Bédard^{1*}, Ali Filali¹, Omar Khedr¹, Mohamed S. Abdel-Hakeem^{1,2,4}, Asiyah Siddique^{1,2}, Julie Bruneau^{1,5}, Arash Grakoui³ and Naglaa H. Shoukry^{1,6}*

¹Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

²Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

³School of Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA.

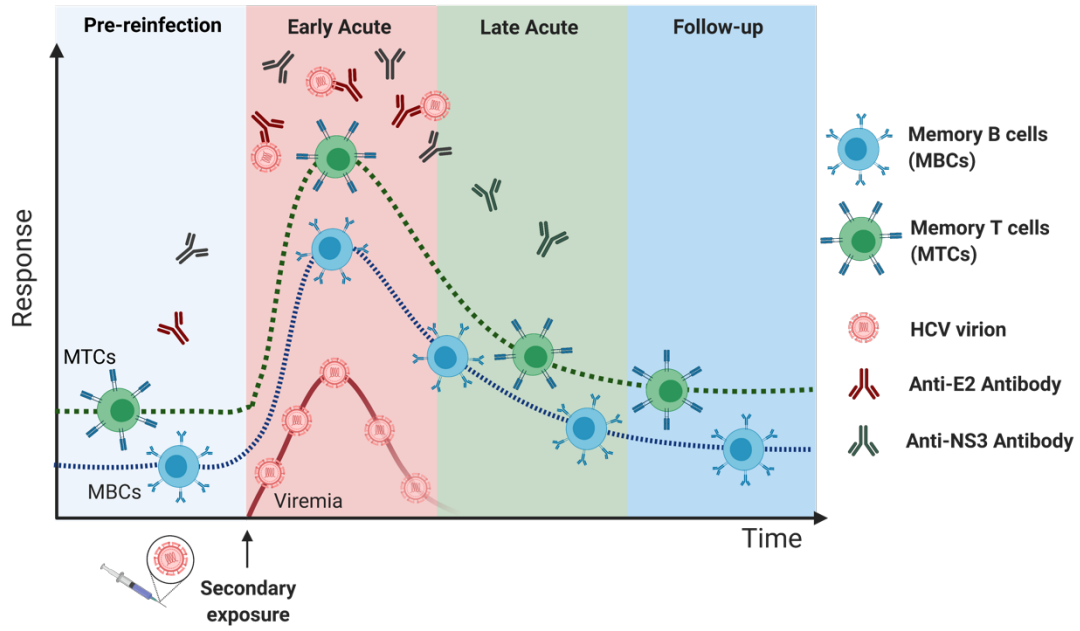
⁴Present affiliation: Department of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA.

⁵Département de médecine familiale et de médecine d'urgence, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁶Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

* Both authors contributed equally to this manuscript.

Graphical abstract



Abstract

Successive episodes of hepatitis C virus infection represent a unique natural rechallenge experiment to define correlates of long-term protective immunity and inform vaccine development. We applied a systems immunology approach to characterize longitudinal changes in the peripheral blood transcriptomic signatures, T and B cell recall responses in eight subjects who spontaneously resolved two successive episodes of HCV infection. Furthermore, we compared the transcriptomic signatures of primary and secondary resolving HCV infections, with an HCV nonstructural protein vaccine regimen of recombinant chimpanzee adenovirus 3 vector (ChAd3-NS) prime followed by modified vaccinia Ankara (MVA-NS) boost. We identified a plasma cell transcriptomic signature during early acute HCV reinfection that was absent in primary infection and following HCV vaccine boost. Spontaneous resolution of HCV reinfection was associated with rapid expansion of glycoprotein E2-specific memory B cells in 3 subjects and transient increase in E2-specific neutralizing antibodies in 6 subjects. Concurrently, there was an increase in the breadth and magnitude of HCV-specific T cells in 7 subjects, suggesting a cooperative role for antibodies and T cells in clearance of HCV reinfection.

Introduction

Worldwide, 58 million individuals are chronically infected with hepatitis C virus (HCV). Around a quarter of acutely infected individuals will spontaneously clear the infection, while the majority develops persistent infection, a leading cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Hoofnagle, 2002). Since 2014, the introduction of direct-acting antivirals (DAA) enabled the cure of chronic HCV in the majority of treated subjects (~95%) (Zoulim et al., 2015). However, DAA treatments are expensive and do not protect against reinfection. Altogether, these factors urge the development of a prophylactic vaccine to efficiently and rapidly curb the HCV epidemic (Cox, 2020).

High risk populations like people who inject drugs (PWID) are continuously re-exposed to HCV and thus get reinfected even if they have spontaneously cleared a primary infection (Sacks-Davis et al., 2012). Spontaneous resolution of an HCV reinfection has been associated with a shorter duration and magnitude of viremia, a broadened cellular immune response and, in 60% of cases, generation of cross-reactive antibodies (Osburn et al., 2010). We have demonstrated that the expansion of polyfunctional memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as that of a more focused HCV-specific CD8⁺ T-cell receptor repertoire comprised of public clonotypes correlated with protective immunity (Abdel-Hakeem et al., 2014; Abdel-Hakeem et al., 2017; Mazouz et al., 2021). Yet, deeper insights into what constitutes a potent protective immune response in real life settings is crucial for the development of a prophylactic HCV vaccine.

To date, only one HCV vaccine has reached phase II clinical trials in humans. This T-cell based vaccine strategy is comprised of the chimpanzee adenovirus 3 (ChAd3) encoding the HCV genotype 1b non-structural (NS) proteins followed by a modified vaccinia Ankara (MVA) boost (ChAd3-NS/MVA-NS). While strong CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses were induced in healthy volunteers (Swadling et al., 2014), the vaccine eventually failed to protect against persistent infection in PWID —although a reduction in HCV viraemia was observed in ChAd3-NS/MVA-NS HCV vaccinees following infection (Page et al., 2021). The immunological mechanisms underlying the vaccine's failure to protect against chronic infection in PWID are not yet understood.

Systems immunology represents a powerful approach for an in-depth characterization of the early transcriptomic signatures induced by viral infections in humans (Kwissa et al., 2014; Rosenberg et al., 2018). Similarly, systems vaccinology was successfully applied to study the transcriptomic response to either licensed vaccines including Yellow Fever 17D (YF-17D) (Gaucher et al., 2008; Querec et al., 2009) and Influenza (Nakaya et al., 2011), or candidate vaccines against HIV (Thiebaut et al., 2019; Zak et al., 2012). We have previously performed longitudinal transcriptomic analysis of the immune response in the peripheral blood during acute resolving HCV infection (Rosenberg et al., 2018). We observed strong innate antiviral signatures early during acute infection that returned to baseline levels following viral clearance. These innate signatures were also shared with other flaviviruses such as Dengue and YF-17D (Rosenberg et al., 2018). However, we observed limited adaptive immune responses suggesting that they may be restricted to a small cellular subset or be compartmentalized in the liver. Transcriptomic signatures of the recall immune response upon HCV re-exposure and reinfection and whether this response can be mimicked by HCV vaccines remain unexplored.

Herein, we applied a systems immunology approach to characterize the peripheral blood transcriptomic signatures during natural cases of HCV reinfection and to compare changes relative to those previously reported using data from primary infection in the same cohort (Rosenberg et al., 2018) and following ChAd3-NS/MVA-NS vaccination in healthy individuals (Hartnell et al., 2018). Finally, we used different functional immunological approaches to study concurrently the longitudinal HCV-specific T and B cells responses during reinfection in PWID. We identified a plasma cell transcriptomic signature in viremia positive time points unique to acute HCV reinfection. This signature was not detectable during either primary infection or following HCV vaccine boost. Acute HCV reinfection and clearance was accompanied by a transient increase in anti-glycoprotein E2 antibody responses as well as increased breadth and magnitude of virus-specific T cells, suggesting a role for both arms of the adaptive immune response.

Results and Discussion

A robust host response in the Early acute phase of reinfection in PWID

The Montreal hepatitis C cohort (HEPCO) recruits and follows PWID subjects during multiple episodes of HCV infection, representing a unique opportunity to study the immune response during acute reinfection (Sacks-Davis et al., 2015). For this study, we selected 8 subjects from the HEPCO cohort who became reinfected after spontaneously clearing a primary HCV infection. All of them successfully resolved the subsequent infection. Subject demographics and clinical data are summarized in **Table 1**. Total PBMC samples of 7 subjects collected at 4 distinct time points during reinfection were used for RNA extraction and subsequent RNA-sequencing (RNA-seq): Pre-reinfection (baseline), Early acute (earliest available time point post estimated date of reinfection; ~ 2-9 weeks), Late acute (~ 14-26 weeks) and long-term follow-up (~ 28-71 weeks) (**Fig. 1A**).

We employed principal component analysis (PCA) using the top 500 most variable genes to visualize the variation in gene expression at the different time points tested (**Fig. 1B**). PCA shows a nearly complete separation of Early acute time points from those of pre-reinfection along the PC1 (19.2%) and PC2 (12.2%) axes. These variations are reduced gradually, with the follow-up time points overlapping baseline with some variability within the PC1 (19.2%) and PC2 axes. Our previous PCA analysis of longitudinal RNA-seq samples collected during primary HCV infections demonstrated a clear separation of viremia positive time points (Rosenberg et al., 2018). Reinfection samples, however, did not completely segregate based on their viremia status (**Fig. 1B**). Nevertheless, to facilitate comparison between transcriptomic signatures of primary infection *versus* HCV reinfection, a similar approach of stratifying the Early and Late acute time points based on viremia status positive (+) or negative (-), was used for subsequent transcriptomic analyses.

Next, we applied a paired linear model to compare each time point from all samples to their pre-reinfection baseline. A total of 599 genes were differentially expressed at the Early acute (+) time point (387 upregulated and 212 downregulated), while none were identified in other groups (FDR<0.10, **Fig. 1C**). In summary, the strongest host response detected at the transcriptomic level occurs at the Early acute time point following HCV reinfection.

Strong host response one day post-vaccine prime and boost in healthy subjects

Next, we used publicly available data to define whether similar transcriptome changes are induced by the T cell-based HCV vaccine strategy of ChAd3-NS prime followed by an MVA boost in healthy subjects (Hartnell et al., 2018). PBMC samples were collected at four time points post-vaccine prime (d0, d1, d4 and d7) and boost (d56, d57, d60 and d63) and transcriptome changes were evaluated by microarray analysis (**Fig. 1D**). PCA shows a complete separation of d1 and d57 from other prime and boost time points along the PC1 axis, accounting for 61.3 % of the variability (**Fig. 1E**). We applied a paired linear model to compare each time point to its baseline, and a total of 1172 genes were differentially expressed at d1 (387 upregulated and 785 downregulated), while 3441 genes were differentially expressed at d57 (1948 upregulated and 1493 downregulated) (FDR<0.05, **Fig. 1F**). Thus, prominent changes were detected 24 h post-vaccination, with the MVA-NS boost eliciting slightly stronger transcriptomic changes but with a similar transcriptomic signature. These results also highlight a quick return to baseline as early as 4 days after vaccination.

Enriched B cell signatures in Early acute reinfection samples as compared to primary infection.

Our previous transcriptomic analysis of primary HCV infection ([P]) (Rosenberg et al., 2018) and the analysis performed in the present reinfection study ([R], **Fig. 1C**) demonstrated that the most pronounced transcriptome changes occur at the Early acute time point in both episodes. So, we sought to identify genes differentially increased in acute reinfection versus primary infection, compared to their respective baselines, using the following contrast: $(R_{\text{EARLY-ACUTE}} - R_{\text{PRE-REINFECTION}}) - (P_{\text{EARLY-ACUTE}} - P_{\text{PRE-INFECTION}})$. The resulting ranked gene list was used to run gene set enrichment analysis (GSEA) using two databases specifically designed to study immune responses in peripheral blood: Leukocyte signature matrix (LM22, (Newman et al., 2015)) and blood transcriptome modules (BTM, (Chaussabel et al., 2008)). Resolution of primary HCV infection was characterized by a strong upregulation of innate immune cells, inflammatory and interferon/antiviral-sensing signatures at Early acute.

In contrast, the resolution of the secondary infection was characterized by a strong upregulation of B and T cell signatures (**Fig. 2A and Table S1**).

Next, we ran GSEA using the following contrasts: ($R_{\text{TIME-POINTS}} - R_{\text{PRE-REINFECTION}}$). All LM22 and a representative subset of BTMs are presented as a heatmap in **Figs. 2B-D**, while all modules are presented in **Table S1**. At the Early acute reinfection, GSEA showed global downregulation of modules associated with innate immunity (**Fig. 2B**). In contrast, we observed an upregulation of modules associated with an adaptive immune response including:

T_CELL_CD4_MEMORY_ACTIVATED, T_CELL_FOLLICULAR_HELPER, plasma cells and B cells, immunoglobulins (M156.0), PLASMA_CELLS and T_CELL_CD8. Our results at the transcriptomic level show that, unlike the innate immunity-dominated signature present in acute primary infection, HCV reinfection is characterized by adaptive T and B cell signatures, consistent with induction of immune memory responses that result in shorter duration and magnitude of viremia during HCV reinfection, as previously described. (Osburn et al., 2010)(Abdel-Hakeem et al., 2014). It is important to note that, given the more rapid course of reinfection, we may have missed very early transient innate immune signatures. Indeed, clearance of heterologous HCV re-challenge in the chimpanzee model was associated with a higher hepatic expression of ISG, as well as type I and II interferons (Barth et al., 2011). While T cell activation is maintained at Late Acute (-), B cell signatures were downregulated following HCV reinfection clearance (**Figs. 2C-D**). To ensure that the observed humoral signatures are not a result of an outlier, we applied sample level enrichment analysis (SLEA) using leading edge genes of the $R_{\text{EARLY-ACUTE}} - R_{\text{PRE-REINFECTION}}$ contrast (**Figs. S1A-C**). All subjects, except SR2 and SR6 exhibited upregulation of B cell and plasma cell modules at Early acute as compared to pre-reinfection, with SR5 presenting the highest increase (**Fig. S1B**). In conclusion, the upregulation of modules associated with a humoral immune response observed at Early acute reinfection is a common transcriptomic signature.

Strong T cell but weak B cell transcriptomic signatures post-HCV vaccine boost in healthy individuals

Next, we wanted to compare the transcriptomic changes induced by the T cell-based HCV vaccine prime (VP) and Boost (VB) with primary infection and reinfection signatures, respectively. The following contrasts were utilized for GSEA: ($VP_{\text{TIME-POINTS}} - VP_{\text{BASELINE (d0)}}$) and ($VB_{\text{TIME-POINTS}} - VB_{\text{BASELINE (d56)}}$) (**Fig. 2B-D, Table S1**). We observed at one day post-ChAd (d1) and post-MVA (d57) a shared upregulation of modules associated with innate immune cells, inflammatory and interferon/antiviral-sensing categories (**Fig. 2B?, Table S1**). These signatures rapidly waned and were followed by a transient or sustained upregulation of T cell modules at d4 and days 60-63, respectively (**Fig. 2D**). At d7 post-prime, we observed an upregulation of B cell and plasma cell modules (**Fig. 2C**). While the upregulation of plasma cell modules observed post-prime could potentially reflect an HCV-specific antibody response towards NS viral proteins, the absence of these signatures post-boost suggests a non-existent recall response (**Fig. 2C**). Thus, the humoral response signatures observed at d7 may potentially reflect a response towards the ChAd vector. Indeed, high levels of ChAd3 neutralizing antibodies (nAbs) were detected post-prime in healthy subjects (Capone et al., 2020). While no correlation was observed between pre-vaccination anti-ChAd3 nAbs titers and vaccine immunogenicity (Capone et al., 2020), anti-adenoviral nAbs titers above 200, defined as the reciprocal of the 50% neutralization end point, were previously shown to reduce immunogenicity towards the insert antigens (Frahm et al., 2012) and may be one of mechanisms underlying the reduced vaccine efficacy in PWID ([Page et al., 2021](#)).

HCV-specific antibodies in plasma increase at Early acute post-reinfection

Since we observed a strong plasma cell signature post-reinfection, we sought to evaluate the longitudinal polyclonal HCV-specific antibody responses by measuring relative levels of E2- and NS3-specific antibodies (IgG) in plasma by ELISA (**Fig. S2A**). We detected an E2-specific antibody response at pre-reinfection in 4 subjects (SR2, SR5, SR6 and SR8) against E2 from the H77 strain (genotype 1a; gt1a) and in 3 subjects (SR5, SR6 and SR8) against E2 from the J6 strain (gt2a).

The anti-E2 antibody response increased significantly at the Early acute time point as compared to pre-reinfection, and rapidly decreased by the Late acute time points for all subjects except SR8 (**Fig. S2A**). At pre-reinfection, plasma from 5 of 8 subjects (SR1, SR2, SR4, SR6 and SR8) contained antibodies against NS3 (gt1a). We detected a significant increase in anti-NS3 antibodies at Early acute as compared to pre-reinfection. This response was sustained at Late acute and decreased at Follow-up for all subjects except SR2 (**Fig. S2A**). Altogether, a strong anti-E2 and NS3 response was detected by ELISA at Early acute following reinfection.

HCV-specific antibodies in plasma neutralize genotype 1a but not genotypes 2a and 3a HCVpp

Next, we proceeded to evaluate the longitudinal nAb responses in plasma against HCV pseudoparticles (HCVpp) from genotypes 1a (H77), 2a (J6/JFH1), and 3a (S52). Herein, a neutralizing activity $\geq 50\%$ was considered positive. For H77 HCVpp, neutralization was detected in three subjects (SR2, SR5 and SR8) at pre-reinfection (**Fig. S2B**). Yet, such nAbs did not provide sterilizing immunity, *i.e.* did not prevent the establishment of the HCV reinfection. The neutralizing activity in plasma increased significantly in 6 out of 8 subjects at Early acute. For SR3, SR5 and SR8, the neutralizing activity remained positive at the Late acute and follow-up time points. These results are consistent with a previous report which associated spontaneous clearance of HCV reinfections with the generation of nAbs against H77 (Osburn et al., 2010). All subjects neutralized J6/JFH1 (gt2a) and S52 (gt3a) HCVpp poorly for all time points. Only SR5 at Early acute neutralized S52 (gt3a) at 48%, denoting a transient cross-neutralizing capacity (**Fig. S2B**). In summary, our data show that while E2-specific antibodies were detected against gt1a and gt2a, they were not capable of neutralizing non-gt1 HCVpp. Interestingly, all subjects were reinfected with either genotype 1a or 1b, which could explain poor cross-neutralizing (*i.e.* against gt2a and gt3a) capacities of plasma samples.

Next, we examined the correlation between the transcriptomic signature and antibody responses. The LM22 plasma cell module SLEA z-scores (**Fig. S1C**) correlated positively with HCV-specific antibody responses and antibody neutralization but was only significant with the strongest antibody response detected (NS3) (**Fig. S2C**).

This suggests that the humoral transcriptomic signatures observed during acute reinfection reflect an HCV-specific B cell response.

Early activation and expansion of E2-specific memory B cells following HCV re-exposure

Next, we evaluated the longitudinal kinetic of E2-specific class-switched memory B cells (MBCs) using fluorescent J6-E2 tetramers (**Fig. 3A**) (Boisvert et al., 2016). Dual labeling was used to identify double-positive E2-specific MBCs (CD19⁺CD27⁺IgM⁻E2-tetramer⁺). The frequency of E2-specific MBCs peaked at Early acute in 3 out of 8 subjects (SR3, SR7 and SR8) and rapidly declined by Late acute (**Fig. 3B**). To better characterize the phenotype of these E2-specific MBCs, we concatenated the CD19⁺ B cell population of the three subjects with the highest tetramer⁺ frequency at Early acute and applied global high-dimensional mapping of the flow cytometric data (**Fig. 3C**). A t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) representation coupled with FlowSOM analysis allowed the identification of 8 B cell clusters (**Fig. 3C-E**). According to the mean fluorescence intensity of each protein marker, cluster 3 delineates the E2-specific MBCs population. This cluster is characterized by the expression of a high level of CD20 and an intermediate one for the activation-related markers CD24 and CD71, suggesting recent antigenic stimulation (**Fig. 3C-E**). The phenotype of E2-specific MBCs was confirmed through manual gating (**Fig. 3F**). At the Early acute time point, a resting phenotype (CD71⁻) was observed in 32.7% of E2-specific MBCs, while the majority (66.7%) had an activated phenotype (CD71⁺CD20^{hi}CD38^{int-lo}). Conversely, as their frequency decreased, the majority of E2-specific MBCs at Late acute had a dominant resting phenotype (62.6%) (**Fig. 3G**). These data show rapid expansion of E2-specific MBCs at Early acute followed by a decline in frequency and activation as the virus is cleared. We previously reported an increased frequency of E2-specific MBCs at Late acute, preceded by a peak of activated circulating T_{FH} during primary infection in resolvers (Salinas et al., 2021). In the present study, we detected a rapid expansion of E2-specific MBCs at Early acute followed by a decline in their frequency and activation as the virus is cleared, consistent with a rapid and strong recall response. The role of T_{FH} during reinfection remains to be elucidated.

Concerted increase in HCV-specific T and B cell responses at Early acute reinfection

Next, we assessed the contribution of antibodies versus T cells in mediating viral clearance upon reinfection. The compiled data for each subject are summarized in Figure 4. We evaluated the magnitude and breadth of the HCV-specific T cell response longitudinally using an IFN- γ ELISpot assay against a panel of overlapping peptide pools representing either the HCV genotype 1a (H77) or 1b (J4) polyprotein (**Fig. 4**). In addition, in subjects for whom an MHC class I tetramer was available, we evaluated the longitudinal frequency of HCV-specific CD8⁺ T cells. Consistent with our previous study (Abdel-Hakeem et al., 2014), we observed an increase in the magnitude and breadth of the HCV-specific T cells measured by ELISpot in all subjects following reinfection, except SR3. Similarly, subjects SR2, SR7 and SR8 displayed higher HCV-specific CD8⁺ T cells frequencies post-reinfection (**Fig. 4, top panels**). With the exception of subjects SR1 and SR4, resolution of reinfection was also associated with the presence of E2-specific antibodies at the Early acute time point as measured by ELISA (**Fig 4, second panels**). Yet, only three subjects (SR3, SR7 and SR8), had detectable E2-specific MBCs at Early Acute (**Fig. 4, third panels**). For three subjects (SR2, SR5 and SR6), although, there was no expansion of E2-specific MBCs and variable E2-specific antibody levels as measured by ELISA, they displayed a positive nAb response towards gt1a HCVpp especially at the Early acute time point (**Fig. 4, bottom panels**). Expansion of E2-tetramer⁺ B cells may have been missed in these subjects due to rapid HCV clearance. It is also possible that the E2-specific MBCs targeting autologous E2 of gt1a had limited reactivity/affinity towards the E2 gt2a tetramers. Interestingly, the peak of the B cell response detected in subject SR7 preceded the peak of the T cell response, suggesting that the humoral response may have initially controlled the acute reinfection in this subject. In summary, the majority of subjects displayed increased E2-specific antibody responses and/or neutralizing capacities towards H77 HCVpp at Early acute together with HCV-specific T cells albeit to different magnitudes. These results are consistent with the upregulation of T and B cell modules (**Figs. 2C-D**) and suggest that resolution of HCV reinfection is characterized by a concerted HCV-specific T and B cell responses.

Concluding remarks

A better understanding of the correlates of protective immunity against HCV in real life settings is required for a better development of the next generation HCV vaccines. Here, we demonstrated that spontaneous resolution of HCV reinfection was characterized by a transient increase in E2-specific neutralizing antibody response. As previously reported (Osburn et al., 2014), this antibody response rapidly waned after the control of viremia, consistent with the absence of plasma cell signatures at HCV-RNA negative time points. Plasma samples mainly neutralized gt1a HCVpp, yet we cannot completely exclude that at the monoclonal level, some antibodies circulating at low level in blood could potentially neutralize heterologous strains. Indeed, Merat et al. previously identified broadly neutralizing Abs (bnAbs) at the monoclonal level, targeting the AR3 and AR4 regions of the E2 glycoprotein in subjects capable of clearing multiple HCV infections (Merat et al., 2019). Such AR3-specific bnAbs were detected up to 5 years post-clearance of a primary infection, suggesting that such response could help prevent virus persistence upon reinfection.

We observed a concurrent increase of HCV-specific B and T cell responses at Early acute at the transcriptomic and functional levels. Although, in our study the concurrent impact of both immune responses on the infecting viral sequence is not known, our laboratory has previously shown that spontaneous resolution of HCV reinfections was associated with an expansion of polyfunctional clonotypes recruited from preexisting memory pools (Abdel-Hakeem et al., 2014; Abdel-Hakeem et al., 2017; Mazouz et al., 2021). In addition, Kinchen et al. demonstrated the capacity of nAbs to induce an immune pressure leading to mutations within the CD81 binding site of the E2 glycoprotein, eventually resulting in a loss of viral fitness (Kinchen et al., 2018). It is therefore tempting to hypothesize that both these arms of adaptive immunity play a key role in HCV reinfection clearance. Interestingly, SR7 showed a different kinetic, displaying a strong nAbs response prior to the peak of T cell responses. This suggests that nAbs may have initially controlled the infection while the delayed peak of T cell response eventually led to HCV clearance. Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

Comparing real life HCV infections with vaccine-induced transcriptomic signatures in humans underscored the absence of plasma cell modules in post-MVA-NS vaccination as compared to acute reinfection. Because these viral vectored vaccines do not contain the glycoproteins E1 and E2, the absence of nAbs in response to this vaccine is expected. While different time frames between vaccine and natural infection time points may limit comparisons, the presence of an E2-specific antibody response in real-life cases of HCV reinfection and clearance provide an important rationale for a combination T cell-based and a bnAbs-inducing vaccine to prevent chronic HCV infection. AR3-specific bnAbs were previously detected in humans vaccinated with a recombinant E1E2 immunogen derived from a gt1a isolate (HCV-1), albeit at a low potency, suggesting that the induction of such bnAb responses by a vaccination is possible (Chen et al., 2020; Frey et al., 2010). The transcriptomic signature associated with HCV re-exposure and clearance described in the present manuscript can be used as benchmarks to evaluate novel HCV vaccines.

Materials and Methods

Human ethics statement

All subjects provided written, informed consent prior to enrollment within the HEPCO cohort. The ethics committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) approved this study (Protocol SL05.014), which was conducted according to the ethical principles defined in the Declaration of Helsinki.

Study subjects and samples

Study subjects are PWIDs recruited within the HEPCO cohort who spontaneously cleared an acute HCV primary infection. As previously described (Sacks-Davis et al., 2015), clearance of a primary HCV infection was determined as two consecutive negative HCV RNA tests (Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HCV Qualitative Test, version 2.0; Limit of detection: 15 IU/ml). A subsequent HCV reinfection was defined as reappearance of HCV RNA. The median between the last negative and first positive HCV RNA test was used to determine the estimated date of reinfection (EDI). Study subjects were considered resolvers if HCV RNA were no longer detected 6 months post-EDI. Whole peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) samples collected at four different time points were utilized: 1) Pre-reinfection baseline (Variable); 2) Early acute (2 ± 9 weeks, mean 7 weeks); 3) Late acute (14 ± 26 weeks, mean 19 weeks); and iv) Follow up (28 ± 71 weeks, mean 41 weeks). Subjects' demographics (e.g., age and sex), as well as key characteristics and estimated days post-reinfection are presented in Tables 1 and 2.

RNA-seq library preparation

Total RNA was extracted from thawed cryopreserved PBMC samples using the RNEasy Mini kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The RNA quality was assessed using the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies). All RNA samples displayed an RNA integrity numbers (RIN) score superior to 8. RNA samples were sent to the Genome Quebec Innovation Center for RNA-seq libraries preparation using the NEB mRNA stranded library preparation. Libraries were grouped by patient, in order to lessen the batch effect, and sequenced in multiplex on the illumina HiSeq4000 SR100 to generate 100 bp single-end reads (range $2.5\times 10^7 \pm 6\times 10^7$ total reads per library). Reads were

obtained already aligned to the human genome (hg19). Read counts per gene were determined using HTSeq-count (v0.6.1p1) (Anders et al., 2015).

Gene expression analysis

All the following analyses were performed within the R statistical framework (version 3.6.2) (Gentleman et al., 2004; Team, 2018) and Bioconductor (Gentleman et al., 2004), using reinfection samples, as well as primary HCV infection RNA-seq data from our previous study (Rosenberg et al., 2018). Principal component analysis (PCA) was performed as previously described (Rosenberg et al., 2018) using the top 500 most variable genes across all resolver samples. Prior to normalization using the trimmed mean of M values (TMM) method from the edgeR package (Robinson and Oshlack, 2010), genes with low expression values were removed. Genes with more than one read count per million (cpm) in at least three samples were included in the following analysis (15422 genes in total). Counts were then transformed to log₂ CPM using the voom function (Law et al., 2014) of the limma package (Ritchie et al., 2015). For each HCV infection (primary [P] and reinfection [R]), a paired linear model was fitted with a donor blocking factor in which we compared each time point to its baseline. The resulting lists of pre-ranked genes given by *LIMMA* moderated *t*-statistic were used to perform gene set enrichment analysis (GSEA) (Subramanian et al., 2005), using the fgsea function from the fgsea package (Sergushichev, 2016). The leukocyte gene signature matrix (LM22) (Newman et al., 2015), as well as blood transcription modules (Li et al., 2014) were used as gene sets for GSEA. Results were corrected for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini Y, 1995). Heatmaps were generated using the complex heatmaps package (Gu et al., 2016). Sample level enrichment analysis (SLEA) was used to summarize the transcriptional level of each gene set and the sample level. SLEA compares the mean expression of genes within each module to the mean expression of 1000 randomly generated modules of the same size. The resulting *z*-score reflects the direction of the pathway in a sample, with a *z*-score > 0 indicating an upregulation and a *z*-score < 0, a down-regulation of the gene module.

HCV vaccine transcriptomic signature

Microarray data for PBMC responses to the HCV vaccine (ChAd3-NSmut prime / MVA-NSmut boost) was graciously provided by Dr. Eleanor Barnes (Hartnell et al., 2018). PCA, differential expression, and GSEA analyses were performed similarly to reinfection samples.

Tetramers

Biotinylated E2 monomers were graciously provided by Dr. Arash Grakoui (Boisvert et al., 2016). Tetramers were prepared by adding phycoerythrin (PE)- (Sigma-Aldrich) or allophycocyanin (APC)-labeled ExtrAvidin (ThermoFisher), 5 times using 7.5 μ l with 10 min incubation at room temperature each time. Tetramer staining was performed using 0.5 μ L of Tetramer-PE and 0.5 μ L of Tetramer-APC per sample. The MHC class I monomers were synthesized by either the National Immune Monitoring Laboratory (Montréal, QC, Canada) or the NIH Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA) and were as follows: HLA-B7 restricted HCV Core peptide aa 41-49 (GPRLGVRAT), HLA-A1 restricted HCV NS3 peptide amino acids (aa) 1436–1444 (ATDALMTGY) [A1/NS3-1436], HLA-A2 restricted HCV NS3 peptide aa 1073–1081 (CINGVCWTV) [A2/NS3-1073], HLA-B27 restricted HCV peptide NS5B peptide aa 2841-2849 (ARMILMTHF) [B27/NS5B-2841]. Tetramers were prepared by adding 10 μ l of phycoerythrin (PE)-labeled ExtrAvidin (Sigma, St. Louis, MO) five times, with 10 min incubation at room temperature after each addition.

Flow cytometry

Cryopreserved PBMCs were thawed and then washed with FACS buffer (PBS 1X, 1% FBS [Sigma-Aldrich], 0.01% sodium azide [Thermo Fisher Scientific]). Tetramer staining was performed for 30 minutes at room temperature (RT). Cells were then rewashed with FACS buffer and stained for 30 minutes at 4°C with surface marker and LIVE/DEAD fixable aqua dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific) to identify live cells. Directly conjugated monoclonal antibodies against the following cell-surface markers were used: CD3 APC-H7 (clone SK7), CD3–BUV496 (clone UCHT1), CD14 V500 (clone M5E2), CD4–BUV737 (clone SK3), CD8–BV786 (clone RPA-T8), CD16 V500 (clone 3G8), CD19 BUV496 (clone SJ25C1), CD21-BUV737 (clone B-ly4), CD24-BV605 (clone

ML5), CD27 APC-R700 (clone M-T271), CD38 BUV395 (clone HB7), CD56 BV510 (clone NCAM16.2), IgD-PE-Cy7 (clone IA6-2), IgM BB515 (clone G20-127), all from BD Biosciences, San Diego, CA. IgG-BV421 (clone M1310G05), CD20 BV785 (clone 2H7), CD71 PerCP-cy5.5 (clone CY1G4) were from BioLegend, San Diego, CA. Cells were washed again and permeabilized using FoxP3 fixation and permeabilization buffer (ThermoFisher Scientific) for 30 minutes at 4°C. Intracellular staining was done for 30 minutes at 4°C. Prior to FACS analysis, cells were fixed using 1% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich). Multiparameter flow cytometry was performed at the flow cytometry core of the CRCHUM using a BD LSRFortessa instrument equipped with five lasers (UV [355 nm], violet [450 nm], blue [488 nm], yellow-green [561nm] and red [640 nm]) and the FACSDiva version 8.0.1 (BD Biosciences). FlowJo (version 10.0.8 for Mac; Tree Star, Inc.) was used to analyze FCS data files.

ELISA assays

ELISA assays were performed as previously described (Khan et al., 2014; Salinas et al., 2021) using 0.5 µg/mL of either in-house generated H77 E2 (genotype 1a) and J6/JFH1 E2 (genotype 2a) glycoproteins, or H77 NS3 protein (Raybiotech, recombinant NS3 (genotype 1a) amino acids 1192 to 1459). Plasma samples were diluted starting at 1:250 with 4-fold dilutions up to 1:16,000. All assays were performed in duplicates. Only the 1:1000 dilution results were shown in this study. The optical density (O.D.) was calculated by subtracting the mean absorbance at 450nm with the mean absorbance at 570nm.

Neutralizing antibodies assays

HCV pseudotyped viruses (HCVpp) expressing a luciferase reporter alongside with the HCV glycoproteins derived from either genotype 1a (H77), genotype 2a (J6/JFH1) or genotype 3a (S52) were generated as previously described (Salinas et al., 2021). Neutralization assays were also performed as previously described (Salinas et al., 2021). Briefly, one day prior to infection human, hepatoma Huh7.5 cells were plated on collagen-coated 96-well plates (Corning). After complement inactivation, plasma samples were diluted (1:25) and mixed with H77, J6/JFH1 or S52 E1/E2 HCVpp for 1 hour at 37°C, then added to Huh 7.5 cells. After 16-18 hours, the plasma-HCVpp inoculum was replaced with

fresh culture media. After 48 hours, cells were processed using the Renilla Luciferase Assay Substrate (1X, Promega). Luminescence was then measured using a Synergy H1 Microplate Reader (Biotek Instruments). The neutralization activity was calculated using the following equation: % neutralization = $(\text{HCVpp}_{\text{infection time point}} - \text{HCVpp}_{\text{mock}}) / \text{HCVpp}_{\text{mock}} \times 100$, where $\text{HCVpp}_{\text{infection time point}}$ represents the luciferase activity of transduced cells in the presence of subject's plasma and $\text{HCVpp}_{\text{mock}}$ represents the luciferase activity of transduced cells in absence of any antibody. Three independent experiments were performed for all neutralization assays.

Enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay

Interferon- γ (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay was performed against 11 pools of overlapping peptides representing the HCV genotype 1a (H77) or the genotype 1b (J4) polyproteins as previously described (Abdel-Hakeem and Shoukry, 2014) or using the Human IFN-gamma ELISpotPRO kit (ALP) from MabTech Inc (Cederlane, Ontario, Canada). Peptides were obtained from the Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (BEI Resources, Manassas, VA, USA). All assays were performed in duplicates directly *ex vivo* on 2×10^5 thawed PBMCs. For each peptide pool, spot forming cells (SFCs) were calculated as the mean number of spots in test wells minus the number of spots in negative control wells and normalized to SFC/ 10^6 PBMCs. Subjects SR4 and SR6 ELISpot results were previously published in (Abdel-Hakeem et al., 2014). Pre-reinfection time-point different from the ones mentioned in Table 1 were used for subjects SR2 (-133) and SR3 (-815).

Statistics

Statistical analyses were performed using either SigmaPlot (Systat Software), Prism versions 6.0 (GraphPad) or R for correlation analyses using the corrplot package. Details of tests are provided in each figure legend. Repeated measure ANOVA with Tukey's post hoc test was used for longitudinal data. For all statistical tests, P values less than 0.05 were considered significant.

RNA-seq data and code availability

All gene expression will be deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus. The R code used to do all analyses and figures will be made available at <https://github.com/>

Acknowledgments: We thank all study subjects for participating in this study and we thank Dominique Gauchat and Philippe St-Onge of the flow cytometry core of the CRCHUM for their technical help with cell sorting experiments.

Funding: This work was supported by grants from the National Institutes of Health (NIH) U01AI131313 to NHS, R01AI136533 and U19AI159819 to NHS and AG, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (PJT-173467) to NHS, and Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI). SM is supported by a doctoral fellowship from the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). CanHepC is funded by a joint initiative of CIHR (HPC-178912) and the Public Health Agency of Canada. MSA received doctoral fellowships from CIHR and CanHepC. JB is the Canada Research Chair in Addiction Medicine.

References

Abdel-Hakeem, M.S., N. Bedard, D. Murphy, J. Bruneau, and N.H. Shoukry. 2014. Signatures of protective memory immune responses during hepatitis C virus reinfection. *Gastroenterology* 147:870-881 e878.

Abdel-Hakeem, M.S., M. Boisvert, J. Bruneau, H. Soudeyins, and N.H. Shoukry. 2017. Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog* 13:e1006191.

Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166-169.

Barth, H., J. Rybczynska, R. Patient, Y. Choi, R.K. Sapp, T.F. Baumert, K. Krawczynski, and T.J. Liang. 2011. Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 54:1135-1148.

Benjamini Y, H.Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B. Methodological* 57(1):289–300:

Boisvert, M., W. Zhang, E.J. Elrod, N.F. Bernard, J.P. Villeneuve, J. Bruneau, J. Marcotrigiano, N.H. Shoukry, and A. Grakoui. 2016. Novel E2 Glycoprotein Tetramer Detects Hepatitis C Virus-Specific Memory B Cells. *J Immunol* 197:4848-4858.

Capone, S., A. Brown, F. Hartnell, M.D. Sorbo, C. Traboni, V. Vassilev, S. Colloca, A. Nicosia, R. Cortese, A. Folgori, P. Klenerman, E. Barnes, and L. Swadling. 2020. Optimising T cell (re)boosting strategies for adenoviral and modified vaccinia Ankara vaccine regimens in humans. *NPJ Vaccines* 5:94.

Chaussabel, D., C. Quinn, J. Shen, P. Patel, C. Glaser, N. Baldwin, D. Stichweh, D. Blankenship, L. Li, I. Munagala, L. Bennett, F. Allantaz, A. Mejias, M. Ardura, E. Kaizer, L. Monnet, W. Allman, H. Randall, D. Johnson, A. Lanier, M. Punaro, K.M. Wittkowski, P. White, J. Fay, G. Klintmalm, O. Ramilo, A.K. Palucka, J. Banchereau, and V. Pascual. 2008. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* 29:150-164.

Chen, F., K. Nagy, D. Chavez, S. Willis, R. McBride, E. Giang, A. Honda, J. Bukh, P. Ordoukhanian, J. Zhu, S. Frey, R. Lanford, and M. Law. 2020. Antibody Responses to Immunization With HCV Envelope Glycoproteins as a Baseline for B-Cell-Based Vaccine Development. *Gastroenterology* 158:1058-1071 e1056.

Cox, A.L. 2020. Challenges and Promise of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10:

Frahm, N., A.C. DeCamp, D.P. Friedrich, D.K. Carter, O.D. Defawe, J.G. Kublin, D.R. Casimiro, A. Duerr, M.N. Robertson, S.P. Buchbinder, Y. Huang, G.A. Spies, S.C. De

Rosa, and M.J. McElrath. 2012. Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. *J Clin Invest* 122:359-367.

Frey, S.E., M. Houghton, S. Coates, S. Abrignani, D. Chien, D. Rosa, P. Pileri, R. Ray, A.M. Di Bisceglie, P. Rinella, H. Hill, M.C. Wolff, V. Schultze, J.H. Han, B. Scharschmidt, and R.B. Belshe. 2010. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 28:6367-6373.

Gaucher, D., R. Therrien, N. Kettaf, B.R. Angermann, G. Boucher, A. Filali-Mouhim, J.M. Moser, R.S. Mehta, D.R. Drake, 3rd, E. Castro, R. Akondy, A. Rinfret, B. Yassine-Diab, E.A. Said, Y. Chouikh, M.J. Cameron, R. Clum, D. Kelvin, R. Somogyi, L.D. Greller, R.S. Balderas, P. Wilkinson, G. Pantaleo, J. Tartaglia, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 205:3119-3131.

Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, and J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.

Gu, Z., R. Eils, and M. Schlesner. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32:2847-2849.

Hartnell, F., A. Brown, S. Capone, J. Kopycinski, C. Bliss, S. Makvandi-Nejad, L. Swadling, E. Ghaffari, P. Cicconi, M. Del Sorbo, R. Sbrocchi, I. Esposito, V. Vassilev, P. Marriott, C.M. Gardiner, C. Bannan, C. Bergin, M. Hoffmann, B. Turner, A. Nicosia, A. Folgori, T. Hanke, E. Barnes, and L. Dorrell. 2018. A Novel Vaccine Strategy Employing Serologically Different Chimpanzee Adenoviral Vectors for the Prevention of HIV-1 and HCV Coinfection. *Front Immunol* 9:3175.

Hoofnagle, J.H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21-29.

Khan, A.G., J. Whidby, M.T. Miller, H. Scarborough, A.V. Zatorski, A. Cygan, A.A. Price, S.A. Yost, C.D. Bohannon, J. Jacob, A. Grakoui, and J. Marcotrigiano. 2014. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* 509:381-384.

Kinchen, V.J., M.N. Zahid, A.I. Flyak, M.G. Soliman, G.H. Learn, S. Wang, E. Davidson, B.J. Doranz, S.C. Ray, A.L. Cox, J.E. Crowe, Jr., P.J. Bjorkman, G.M. Shaw, and J.R. Bailey. 2018. Broadly Neutralizing Antibody Mediated Clearance of Human Hepatitis C Virus Infection. *Cell Host Microbe* 24:717-730 e715.

Kwissa, M., H.I. Nakaya, N. Onlamoon, J. Wrammert, F. Villinger, G.C. Perng, S. Yoksan, K. Pattanapanyasat, K. Chokephaibulkit, R. Ahmed, and B. Pulendran. 2014. Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host Microbe* 16:115-127.

Law, C.W., Y. Chen, W. Shi, and G.K. Smyth. 2014. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology* 15:R29.

Li, S., N. Roupahel, S. Duraisingham, S. Romero-Steiner, S. Presnell, C. Davis, D.S. Schmidt, S.E. Johnson, A. Milton, G. Rajam, S. Kasturi, G.M. Carlone, C. Quinn, D. Chaussabel, A.K. Palucka, M.J. Mulligan, R. Ahmed, D.S. Stephens, H.I. Nakaya, and B. Pulendran. 2014. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat Immunol* 15:195-204.

Mazouz, S., M. Boisvert, M.S. Abdel-Hakeem, O. Khedr, J. Bruneau, and N.H. Shoukry. 2021. Expansion of Unique Hepatitis C Virus-Specific Public CD8(+) T Cell Clonotypes during Acute Infection and Reinfection. *J Immunol* 207:1180-1193.

Merat, S.J., C. Bru, D. van de Berg, R. Molenkamp, A.W. Tarr, S. Koekkoek, N.A. Kootstra, M. Prins, J.K. Ball, A.Q. Bakker, M.D. de Jong, H. Spits, T. Beaumont, and J. Schinkel. 2019. Cross-genotype AR3-specific neutralizing antibodies confer long-term protection in injecting drug users after HCV clearance. *J Hepatol* 71:14-24.

Nakaya, H.I., J. Wrammert, E.K. Lee, L. Racioppi, S. Marie-Kunze, W.N. Haining, A.R. Means, S.P. Kasturi, N. Khan, G.M. Li, M. McCausland, V. Kanchan, K.E. Kokko, S. Li, R. Elbein, A.K. Mehta, A. Aderem, K. Subbarao, R. Ahmed, and B. Pulendran. 2011. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat Immunol* 12:786-795.

Newman, A.M., C.L. Liu, M.R. Green, A.J. Gentles, W. Feng, Y. Xu, C.D. Hoang, M. Diehn, and A.A. Alizadeh. 2015. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 12:453-457.

Osburn, W.O., B.E. Fisher, K.A. Dowd, G. Urban, L. Liu, S.C. Ray, D.L. Thomas, and A.L. Cox. 2010. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 138:315-324.

Osburn, W.O., A.E. Snider, B.L. Wells, R. Latanich, J.R. Bailey, D.L. Thomas, A.L. Cox, and S.C. Ray. 2014. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* 59:2140-2151.

Page, K., M.T. Melia, R.T. Veenhuis, M. Winter, K.E. Rousseau, G. Massaccesi, W.O. Osburn, M. Forman, E. Thomas, K. Thornton, K. Wagner, V. Vassilev, L. Lin, P.J. Lum, L.C. Giudice, E. Stein, A. Asher, S. Chang, R. Gorman, M.G. Ghany, T.J. Liang, M.R. Wierzbicki, E. Scarselli, A. Nicosia, A. Folgori, S. Capone, and A.L. Cox. 2021. Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med* 384:541-549.

Querec, T.D., R.S. Akondy, E.K. Lee, W. Cao, H.I. Nakaya, D. Teuwen, A. Pirani, K. Gernert, J. Deng, B. Marzolf, K. Kennedy, H. Wu, S. Bennouna, H. Oluoch, J. Miller, R.Z. Vencio, M. Mulligan, A. Aderem, R. Ahmed, and B. Pulendran. 2009. Systems biology

approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 10:116-125.

Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, and G.K. Smyth. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47.

Robinson, M.D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology* 11:R25.

Rosenberg, B.R., M. Depla, C.A. Freije, D. Gaucher, S. Mazouz, M. Boisvert, N. Bedard, J. Bruneau, C.M. Rice, and N.H. Shoukry. 2018. Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in patients with spontaneous viral clearance. *PLoS Pathog* 14:e1007290.

Sacks-Davis, R., J. Grebely, G.J. Dore, W. Osburn, A.L. Cox, T.M. Rice, T. Spelman, J. Bruneau, M. Prins, A.Y. Kim, B.H. McGovern, N.H. Shoukry, J. Schinkel, T.M. Allen, M. Morris, B. Hajarizadeh, L. Maher, A.R. Lloyd, K. Page, M. Hellard, and C.s.g. In. 2015. Hepatitis C Virus Reinfection and Spontaneous Clearance of Reinfection--the InC3 Study. *J Infect Dis* 212:1407-1419.

Sacks-Davis, R., D. Horyniak, J. Grebely, and M. Hellard. 2012. Behavioural interventions for preventing hepatitis C infection in people who inject drugs: a global systematic review. *Int J Drug Policy* 23:176-184.

Salinas, E., M. Boisvert, A.A. Upadhyay, N. Bedard, S.A. Nelson, J. Bruneau, C.A. Derdeyn, J. Marcotrigiano, M.J. Evans, S.E. Bosinger, N.H. Shoukry, and A. Grakoui. 2021. Early T follicular helper cell activity accelerates hepatitis C virus-specific B cell expansion. *J Clin Invest* 131:

Sergushichev, A. 2016. An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation. *Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/early/2016/06/20/060012>*

Subramanian, A., P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, and J.P. Mesirov. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550.

Swadling, L., S. Capone, R.D. Antrobus, A. Brown, R. Richardson, E.W. Newell, J. Halliday, C. Kelly, D. Bowen, J. Fergusson, A. Kurioka, V. Ammendola, M. Del Sorbo, F. Grazioli, M.L. Esposito, L. Siani, C. Traboni, A. Hill, S. Colloca, M. Davis, A. Nicosia, R. Cortese, A. Folgori, P. Klenerman, and E. Barnes. 2014. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med* 6:261ra153.

Team, R.C. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. *Vienna*

Thiebaut, R., B.P. Hejblum, H. Hocini, H. Bonnabau, J. Skinner, M. Montes, C. Lacabaratz, L. Richert, K. Palucka, J. Banchereau, and Y. Levy. 2019. Gene Expression Signatures Associated With Immune and Virological Responses to Therapeutic Vaccination With Dendritic Cells in HIV-Infected Individuals. *Front Immunol* 10:874.

Zak, D.E., E. Andersen-Nissen, E.R. Peterson, A. Sato, M.K. Hamilton, J. Borgerding, A.T. Krishnamurty, J.T. Chang, D.J. Adams, T.R. Hensley, A.I. Salter, C.A. Morgan, A.C. Duerr, S.C. De Rosa, A. Aderem, and M.J. McElrath. 2012. Merck Ad5/HIV induces broad innate immune activation that predicts CD8(+) T-cell responses but is attenuated by preexisting Ad5 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E3503-3512.

Zoulim, F., T.J. Liang, A.L. Gerbes, A. Aghemo, S. Deuffic-Burban, G. Dusheiko, M.W. Fried, S. Pol, J.K. Rockstroh, N.A. Terrault, and S. Wiktor. 2015. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* 64:1824-1833.

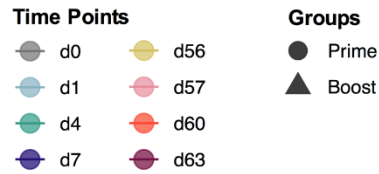
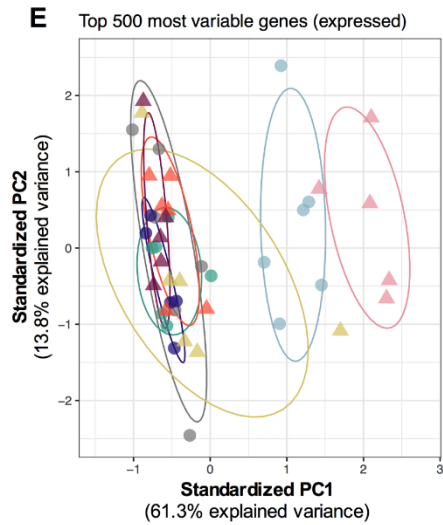
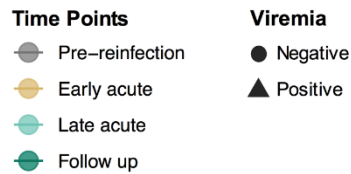
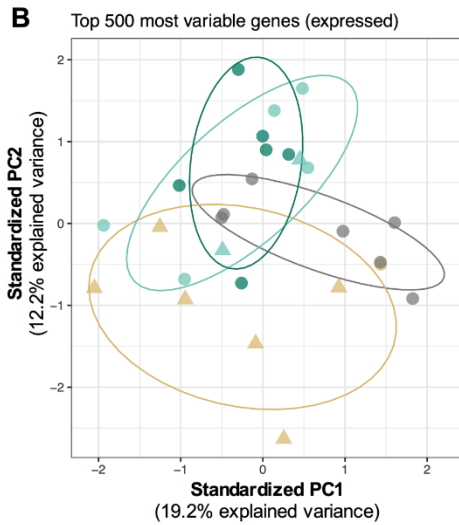
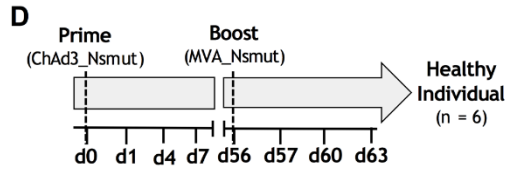
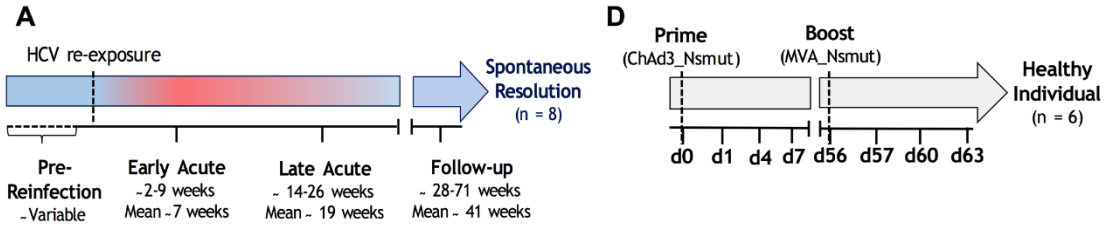
| Subject | Sex | Age at reinfection | Ethnicity | rs12979860 IFNL4 genotype | HCV genotype | Testing interval (days) ^a | Interval between infections (days) ^b | Estimated days post-reinfection | ALT (U/L) | AST (U/L) | HCV viremia | |
|---------|-----|--------------------|-----------|---------------------------|----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|-----------|-----------|-------------|---|
| SR1 | F | 33 | White | CC | 3a | 27 | 91 | Pre-reinfection | -13 | 28 | 19 | - |
| | | | | | 1b – low level of 1a | | | Early Acute | 14 | 26 | 25 | + |
| | | | | | | | | Late Acute | 193 | 28 | 25 | - |
| | | | | | | | | Follow up | 457 | 29 | 25 | - |
| SR2 | M | 50 | White | CC | NA | 98 | 1036 | Pre-reinfection | -44 | 28 | 18 | - |
| | | | | | 1 | | | Early Acute | 54 | 37 | 36 | - |
| | | | | | | | | Late Acute | 109 | 55 | 70 | - |
| | | | | | | | | Follow up | 236 | 25 | 21 | - |
| SR3 | M | 31 | White | CC | 3a | 105 | 2706 | Pre-reinfection | -52 | ND | ND | - |
| | | | | | 1a – 1b | | | Early Acute | 53 | 50 | 175 | + |
| | | | | | | | | Late Acute | 115 | 39 | 28 | + |
| | | | | | | | | Follow up | 199 | 28 | 19 | - |
| SR4 | M | 42 | White | CT | 1a | 91 | 235 | Pre-reinfection | -45 | ND | ND | - |
| | | | | | 1 | | | Early Acute | 46 | 48 | 16 | + |
| | | | | | | | | Late Acute | 122 | 27 | 15 | - |
| | | | | | | | | Follow up | 405 | 34 | 14 | - |
| SR5 | M | 50 | White | CC | NA | 112 | 720 | Pre-reinfection | -56 | ND | ND | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|----|-------|----|----|----|------|-----------------|-----|-----|----|----|---|
| | | | | | NA | | | Early Acute | 64 | ND | ND | + | |
| | | | | | NA | | | Late Acute | 147 | ND | ND | - | |
| | | | | | NA | | | Follow up | 418 | ND | ND | - | |
| SR6 | M | 43 | White | CT | 1 | 92 | 2447 | Pre-reinfection | - | 128 | ND | ND | - |
| | | | | | 1 | | | Early Acute | 46 | 36 | 25 | + | |
| | | | | | 1 | | | Late Acute | 131 | ND | ND | - | |
| | | | | | 1 | | | Follow up | 495 | ND | ND | - | |
| SR7 | M | 34 | White | CC | 1a | 68 | NA | Pre-reinfection | -34 | ND | ND | - | |
| | | | | | 1a | | | Early Acute | 58 | ND | ND | + | |
| | | | | | 1a | | | Late Acute | 147 | ND | ND | + | |
| SR8 | M | 45 | White | NA | 1a | 90 | NA | Pre-reinfection | -45 | ND | ND | - | |
| | | | | | 1a | | | Early Acute | 45 | ND | ND | + | |
| | | | | | 1a | | | Late Acute | 212 | ND | ND | + | |
| | | | | | 1a | | | Follow up | 698 | ND | ND | - | |

Table 1 | Subject demographics and clinical information for samples analyzed by RNA-seq: Resolution group

^a The interval between the last negative and first positive RNA tests that were used to calculate the estimated date of reinfection (EDI).

^b The interval between the first negative test following the primary infection and the estimated date of reinfection.



C

| | Early Acute | Late Acute | Late Acute | Follow-up |
|---------------|-------------|------------|------------|-----------|
| HCV Viremia | + | + | - | - |
| Upregulated | 387 | 0 | 0 | 0 |
| No change | 14825 | 15424 | 15424 | 15424 |
| Downregulated | 212 | 0 | 0 | 0 |

Differential expressed genes relative to Pre-reinfection, FDR < 0.10

F

| | Prime | | | Boost | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | d1 | d4 | d7 | d57 | d60 | d63 |
| Upregulated | 387 | 0 | 0 | 1948 | 0 | 0 |
| No change | 46151 | 47323 | 47323 | 43882 | 47323 | 47300 |
| Downregulated | 785 | 0 | 0 | 1493 | 0 | 23 |

Differential expressed genes relative to d0 and d56 for prime and boost respectively, FDR 0.05

Figure 1 | Study design and differential gene expression analysis.

(A) Reinfection study design. **(B)** Principal component analysis (PCA) of the top 500 genes expressed in the reinfection group. As described in Materials and Methods, patient-specific gene expression variation was removed using the function `removeBatchEffect`. Time points and groups are indicated by different colors and shapes, respectively. The ellipses denote the core area with a confidence interval of 68% for each group. **(C)** Number of differentially expressed genes (DEGs) across all reinfection time points. Pre-reinfection time-points were used as a baseline. Genes differentially expressed are selected using a Benjamin-Hochberg adjusted P value < 0.10 . **(D)** Vaccine study design. Vaccine data were obtained from Hartnell et al. (Hartnell et al., 2018). **(E)** PCA of the top 500 genes expressed in the vaccine group. **(F)** Number of differentially expressed genes (DEGs) across all vaccine samples. d0 and d56 were used as a baseline for prime and boost vaccine time points, respectively. Genes differentially expressed are selected using a Benjamin-Hochberg adjusted P value < 0.05 .

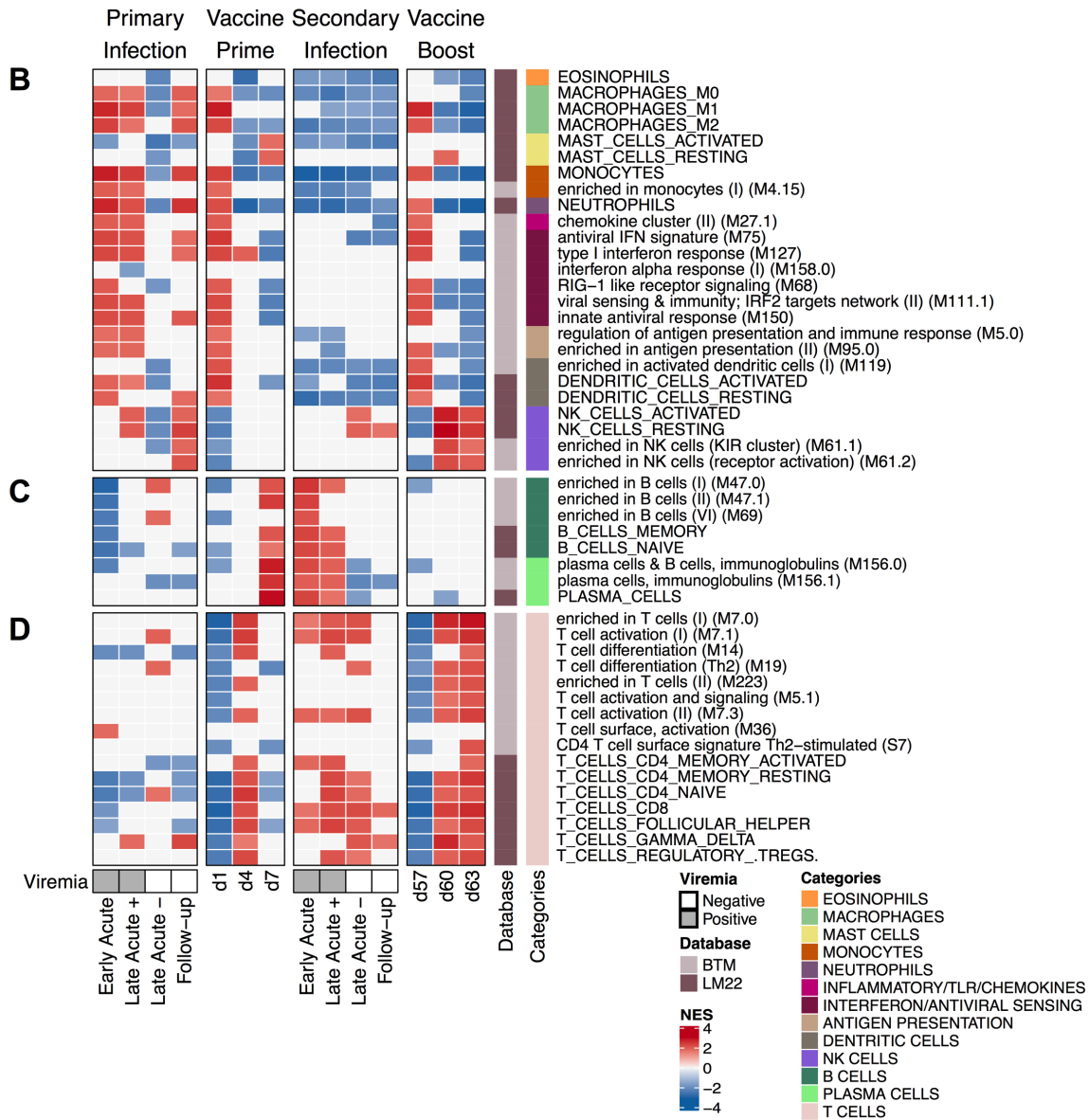
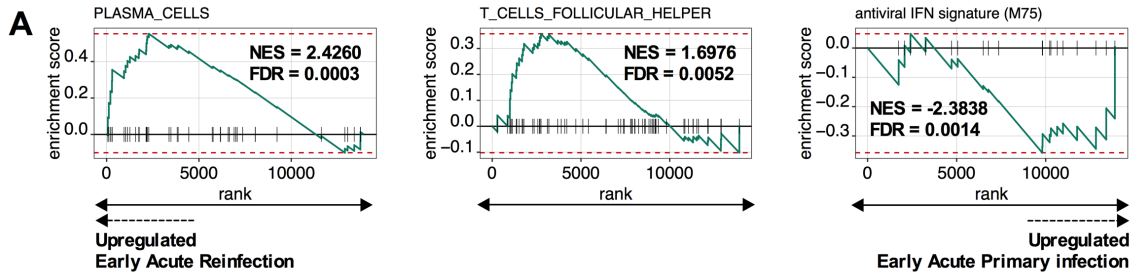


Figure 2 | Upregulation of plasma cell modules at viremia positive time points during reinfection and their absence post-vaccine boosts.

(A) Enrichment plots depicting differential enrichment of LM22 (PLASMA_CELLS and T_CELLS_FOLLICULAR_HELPER) and BTM (antiviral IFN signature (M75)) modules for the Early acute time point of the reinfection ([R]) relative to primary infection ([P]) using the following contrast: $(R_{\text{EARLY-ACUTE}} - R_{\text{PRE-REINFECTION}}) - (P_{\text{EARLY-ACUTE}} - P_{\text{PRE-INFECTION}})$. Primary infection data were obtained from (Rosenberg et al, 2018). Each gene forming the indicated module is represented by vertical black lines along the x -axis. The green line connects enrichment scores (ES) indicated by the y -axis and genes. Red-dashed lines indicate the maximum and minimum ES reached. False discovery rate (FDR) and normalized ES (NES) are presented with each enrichment plot. **(B-D)** Immune cell subsets (LM22 and BTM datasets indicated on sidebar) transcriptomic signature enrichment among the list of ranked differentially expressed genes at primary infection (Resolvers; $n=6$), prime vaccine timepoints ($n=6$), secondary infection (Resolvers; $n=7$) and boost vaccine timepoints ($n=6$). Pre-Infection times were used as a baseline for primary and secondary infections timepoints. d0 and d56 were used as a baseline for prime vaccine and boost vaccine time points, respectively. The x -axis indicates timepoints. The y -axis indicates immune subset enriched in at least one timepoint with a Benjamini–Hochberg-corrected gene set enrichment analysis (GSEA) p value < 0.05 . Colors indicate the normalized enrichment score (NES) and show whether the immune subset was positively enriched (red) or negatively enriched (blue). Each module category is indicated on the color sidebar. Modules are further separated into three: **(B)** innate immune cells, **(C)** B cells and **(D)** T cells. The presence (Grey) or absence (White) of viral RNA is indicated below corresponding primary and secondary infection samples.

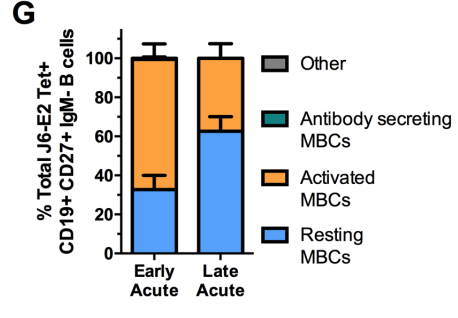
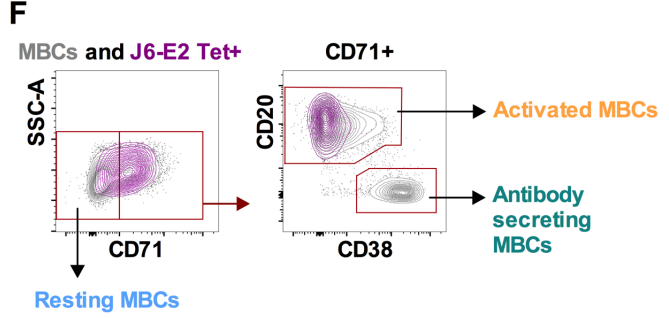
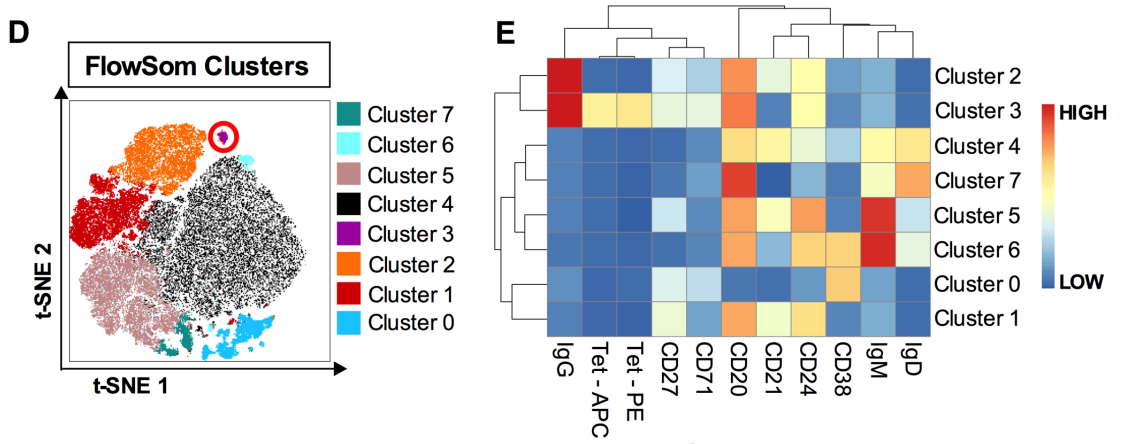
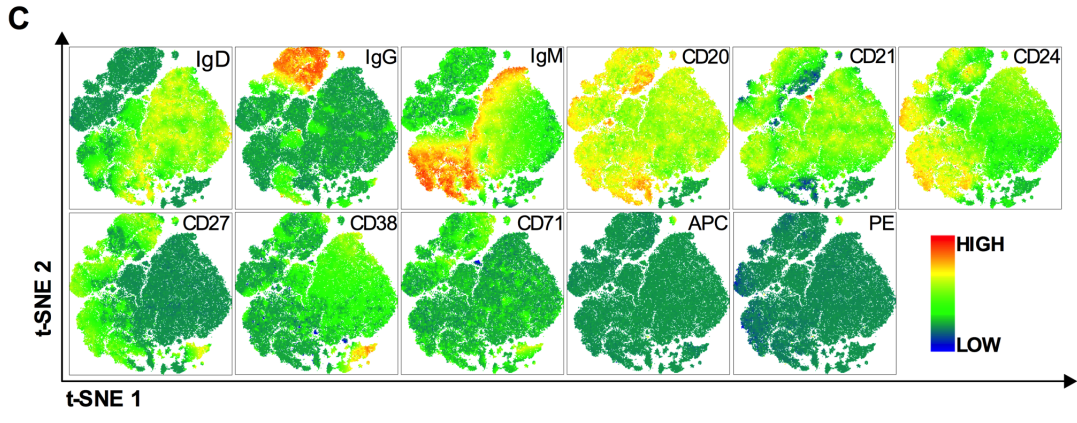
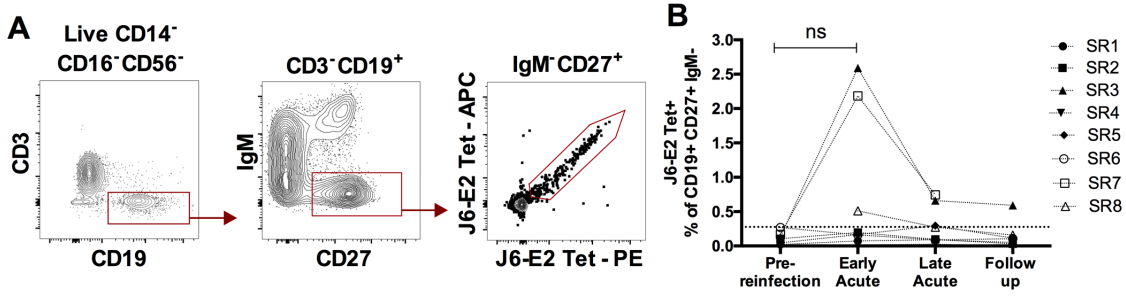


Figure 3 | Activation and expansion of E2-specific MBCs following HCV reinfection

(A) Representative gating strategy for detection of class-switched, E2-specific MBCs ($CD3^-CD14^-CD16^-CD56^-CD19^+CD27^+IgM^-E2tet^+$) in total PBMCs. (B) Longitudinal frequencies of E2-specific ($J6-E2 Tet^+$) MBCs at the indicated time points (see Figure 1A). Threshold of detection of E2-specific MBCs (dotted line) was 0.277% (mean detection + 2SD from 5 naïf PWID). (C) Global t-SNE projection of $CD3^-CD14^-CD16^-CD56^-CD19^+$ B cells from three subjects (SR3, SR7 and SR8) at the Early Acute time point, concatenated and overlaid. Each t-SNE projection reflects the expression of the indicated protein marker. (D) t-SNE projection of B cell clusters identified by FlowSOM clustering. (E) Heatmap shows mean fluorescence intensities (MFI) of each protein marker (columns), for each detected FlowSOM cluster (rows). (E) Representative gating strategy of resting MBCs ($CD71^-$), activated MBCs ($CD71^+CD20^{hi}CD38^{int-lo}$), antibody-secreting MBCs ($CD71^+CD20^{lo}CD38^{hi}$) shown for the total MBCs population (grey contour plots), and HCV E2-specific MBCs (purple contour plots). (F) Phenotypes of E2-specific MBCs in resting (blue), activated (orange), or antibody-secreting (green) states (cells that did not meet these categories are designated as Other and shown in grey) at Early Acute and Late Acute time points ($n = 3$; SR3, SR7 and SR8). Significance was determined by Two-way repeated measure ANOVA with Tukey's post hoc test (ns: not significant).

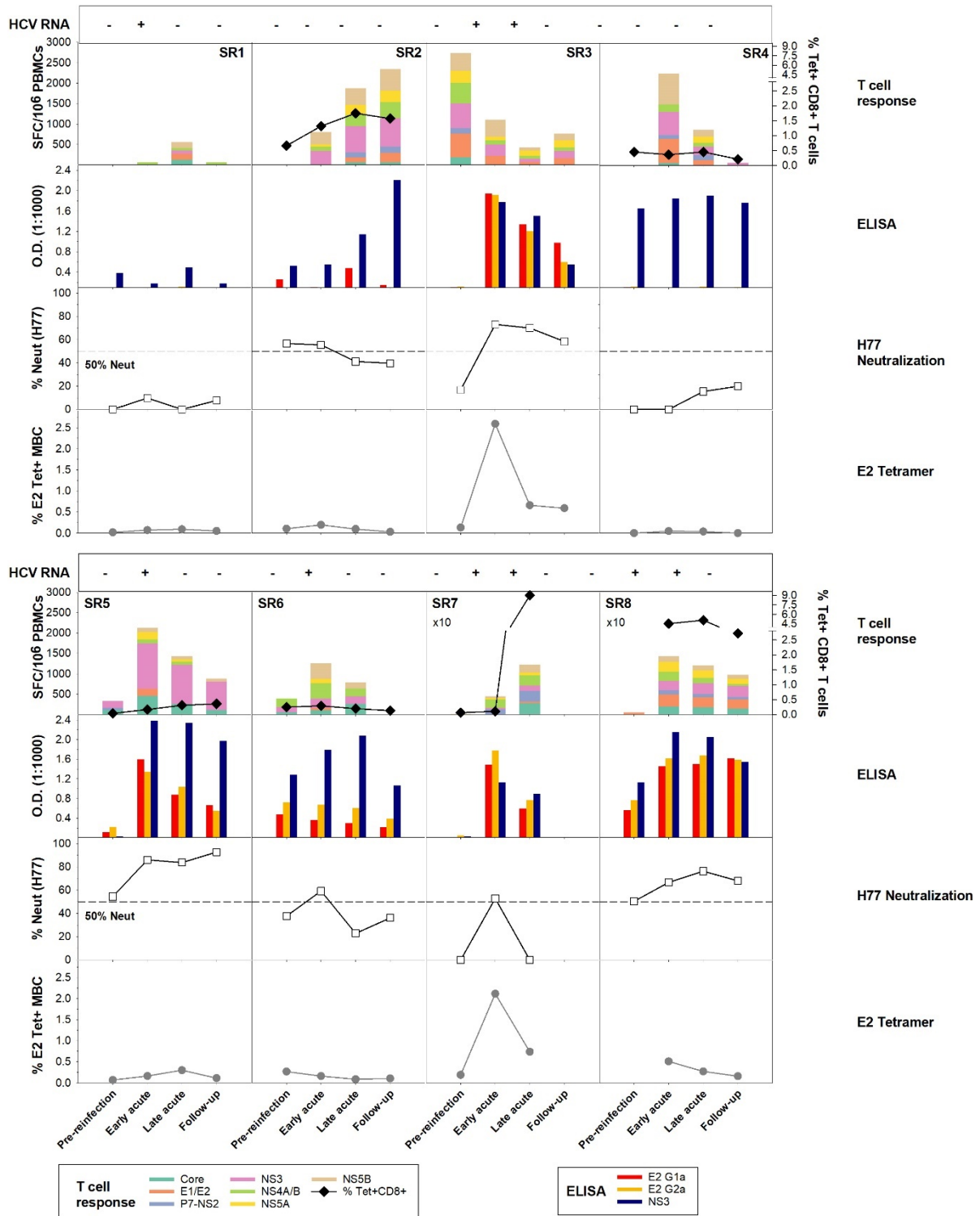
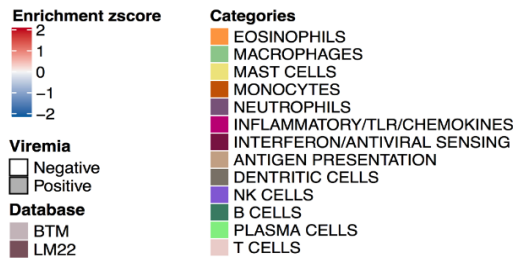
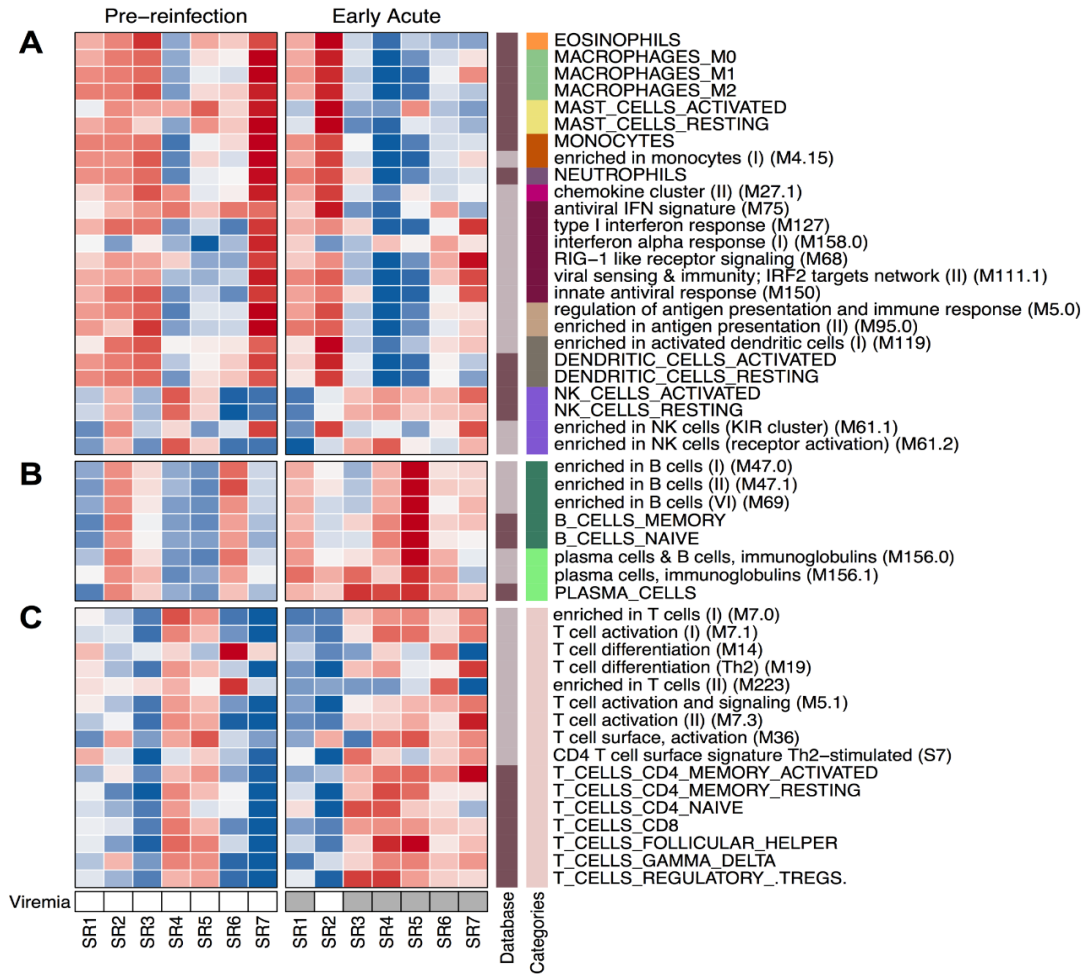


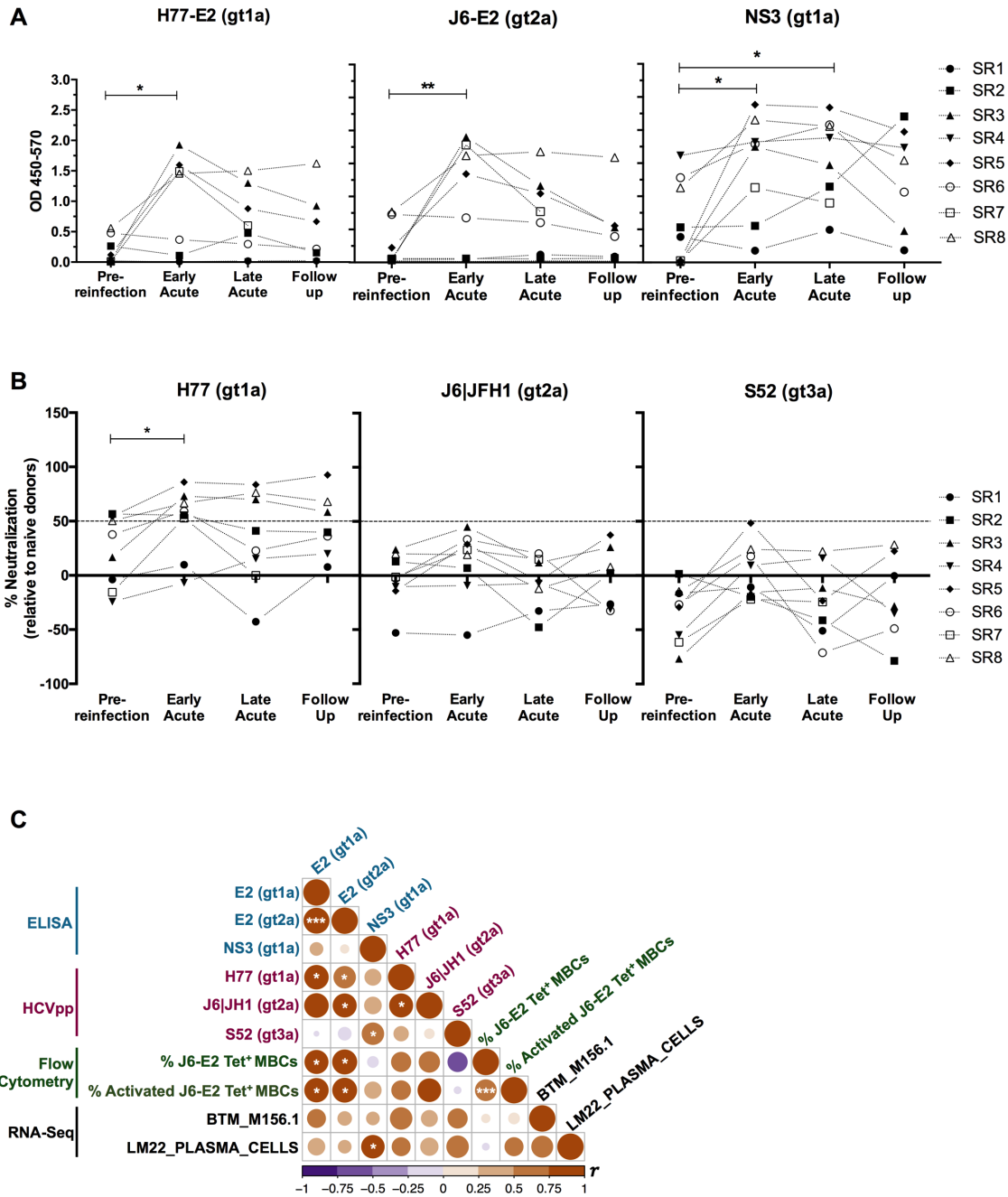
Figure 4 | Concerted increase of HCV-specific T and B cell responses during acute reinfection

Results are presented per subjects with from top to bottom: **(HCV RNA)** Viremia status presented as viremia positive (+) and negative (-). **(Longitudinal IFN- γ ELISpot responses and MHC class I tetramer+ CD8+ T cells)**. PBMCs from the indicated time points were tested in an IFN- γ ELISpot assay against overlapping peptide pools representing the HCV H77 (SR2, SR3, SR5, SR6, SR7 and SR8) or J4 polyprotein (SR1 and SR4). The frequencies of IFN- γ spot forming cell (SFC) per million PBMCs from all subjects are presented in each top graph. When available, longitudinal MHC class I tetramer⁺ CD8⁺ T cells frequencies were assessed. The following tetramers were utilized: A1-1436 (SR2), A2-1073 (SR5), B7-41 (SR7 and SR8) and B27-2841 (SR4 and SR6). Subjects SR4 and SR6 ELISpot results were previously published in (Abdel-Hakeem et al., 2014). Pre-reinfection time-point different from the ones mentioned in Table 1 were used for subjects SR2 (-133) and SR3 (-815). **(ELISA)** Anti-E2 (gt1a and gt2a) and NS3 (Right) IgG responses in plasma measured by ELISA and represented as OD450–570. **(H77 HCVpp)** Plasma neutralizing activity against H77 HCVpp presented as percentage of neutralization relative to naïve donors. The dotted line delineates the 50% neutralization threshold. **(J6-E2 Tetramer)** Longitudinal J6-E2 Tetramer⁺ MBCs frequencies. No PBMC samples were available at pre-reinfection for subject SR8 to evaluate the frequency of J6-E2 Tetramer⁺ MBCs.



Supplementary Figure S1 | Early acute reinfection transcriptional profile is enriched in B and T cells signatures

(A-C) Heatmaps displaying the sample level enrichment analysis (SLEA) z -score of each of the LM22 and BTMs modules using leading edge genes of the Early acute versus pre-reinfection contrast among all reinfected subjects. Rows represent individual modules from either LM22 (light blue) or BTMs (grey). Each module category is indicated on the colored sidebar. Modules are further divided into: (A) innate immune cells, (B) B cells and (C) T cells. Colors indicate the SLEA z -score and show whether the immune subset is upregulated (SLEA z -score > 0 ; red) or downregulated (SLEA z -score < 0 ; blue) in that sample. Columns represent individual subjects' samples at the indicated time points. Detectable versus non detectable viremia is indicated in light grey and white boxes, respectively, all along the bottom of the heatmap.



Supplementary Figure S2 | HCV-specific antibodies in the plasma of spontaneous resolvers increase and neutralize H77 HCVpp.

(A) Longitudinal anti-E2 (Left and Middle panels) and NS3 (Right) IgG responses in plasma measured by ELISA and represented as OD450–570 for each subject (see Figure 1A for time point definitions). HCV antigens are indicated on top of each graph. Each symbol represents one subject ($n = 8$). (B) Longitudinal plasma neutralizing activity from all subjects against H77 HCVpp,

J6/JFH1 HCVpp, and S52 HCVpp at 1:100 dilution, presented as percentage of neutralization relative to HCV-naive donor controls (n = 4). The dotted line delineates the 50% neutralization threshold. Results are presented as the mean of 3 independent experiments. For (A) and (B) repeated measure ANOVA with Tukey's post hoc test was used. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (C) Spearman correlations of all pairwise combinations of the designated parameters at the early acute time point. The intensity of the color and size of the circles reflect the values of corresponding correlations coefficients. Positive correlations are displayed in orange while negative correlations are displayed in purple.

Table S1. LM22 and BTMs modules differentially enriched during HCV infections in PWID

Table S2. LM22 and BTMs modules differentially enriched post HCV vaccine prime and boost in healthy subjects

Table S2. LM22 and BTMs modules differentially enriched post HCV vaccine prime and boost in healthy subjects

| Database | Pathways | Prime | | | | | | | | | Boost | | | | | | | | |
|----------|--|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | | d1 | | | d4 | | | d7 | | | d57 | | | d60 | | | d63 | | |
| | | NES | Pval | Padj | NES | Pval | Padj | NES | Pval | Padj | NES | Pval | Padj | NES | Pval | Padj | NES | Pval | Padj |
| | Activated (LPS) dendritic cell surface signature (S11) | 2,2597 | 0,0002 | 0,0019 | | | | -1,9477 | 0,0004 | 0,0070 | 2,1437 | 0,0002 | 0,0026 | 1,7777 | 0,0056 | 0,0210 | -1,8145 | 0,0015 | 0,0048 |
| | activated dendritic cells (M67) | 2,1117 | 0,0002 | 0,0019 | 1,9766 | 0,0006 | 0,0091 | | | | 2,0738 | 0,0002 | 0,0026 | | | | -2,1624 | 0,0002 | 0,0012 |
| | adhesion and migration, chemotaxis (M91) | | | | | | | | | | -1,6791 | 0,0048 | 0,0289 | | | | | | |
| | antiviral IFN signature (M75) | 2,3974 | 0,0002 | 0,0019 | | | | -2,0215 | 0,0010 | 0,0134 | 2,3032 | 0,0002 | 0,0026 | | | | -2,3688 | 0,0002 | 0,0012 |
| | AP-1 transcription factor network (M20) | | | | | | | | | | | | | -1,6944 | 0,0157 | 0,0494 | -1,8958 | 0,0008 | 0,0029 |
| | B cell development/activation (M58) | | | | 1,8432 | 0,0032 | 0,0206 | | | | | | | | | | -1,8801 | 0,0014 | 0,0046 |
| | BCR signaling (M54) | | | | | | | | | | | | | | | | -1,8903 | 0,0012 | 0,0041 |
| | blood coagulation (M11.1) | | | | | | | | | | | | | -1,9102 | 0,0015 | 0,0085 | -2,3032 | 0,0002 | 0,0012 |
| | C-MYC transcriptional network (M4.12) | | | | 1,8226 | 0,0046 | 0,0264 | | | | | | | 2,0682 | 0,0002 | 0,0028 | 2,2391 | 0,0002 | 0,0012 |
| | CCR1, 7 and cell signaling (M59) | | | | | | | | | | | | | -1,7247 | 0,0125 | 0,0417 | -1,8216 | 0,0033 | 0,0094 |
| | CD1 and other DC receptors (M50) | | | | | | | | | | | | | | | | -1,6748 | 0,0145 | 0,0373 |
| | CD28 costimulation (M12) | -1,6863 | 0,0074 | 0,0345 | | | | | | | -1,6650 | 0,0047 | 0,0289 | | | | | | |
| | CD4 T cell surface signature Th2-stimulated (S7) | -1,8943 | 0,0007 | 0,0051 | | | | -1,8694 | 0,0028 | 0,0310 | -1,7213 | 0,0016 | 0,0111 | | | | | | |
| | cell activation (IL15, IL23, TNF) (M24) | 2,0870 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | 1,9254 | 0,0009 | 0,0072 | | | | -2,1131 | 0,0004 | 0,0017 |
| | cell adhesion (GO) (M117) | -1,9242 | 0,0002 | 0,0019 | 1,8436 | 0,0035 | 0,0216 | | | | -1,7659 | 0,0015 | 0,0105 | | | | | | |
| | cell adhesion (M51) | | | | 1,7850 | 0,0029 | 0,0198 | | | | | | | 1,8077 | 0,0042 | 0,0170 | | | |
| | cell cycle (I) (M4.1) | | | | 2,3536 | 0,0002 | 0,0044 | | | | | | | 2,6728 | 0,0002 | 0,0028 | 3,3849 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell cycle (II) (M4.10) | | | | | | | | | | | | | 1,7714 | 0,0043 | 0,0170 | 2,2277 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell cycle (III) (M103) | | | | 1,9773 | 0,0002 | 0,0044 | | | | | | | 2,1884 | 0,0010 | 0,0062 | 2,7844 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell cycle and growth arrest (M31) | | | | | | | | | | | | | -1,8886 | 0,0019 | 0,0103 | -2,0633 | 0,0004 | 0,0017 |
| | cell cycle and transcription (M4.0) | 2,5684 | 0,0002 | 0,0019 | -1,3828 | 0,0067 | 0,0356 | -1,4610 | 0,0013 | 0,0165 | 2,2832 | 0,0002 | 0,0026 | -1,4895 | 0,0002 | 0,0028 | 2,2763 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell cycle, ATP binding (M144) | | | | | | | | | | | | | 2,0748 | 0,0006 | 0,0050 | 2,0844 | 0,0004 | 0,0017 |
| | cell cycle, mitotic phase (M230) | | | | | | | | | | | | | | | | 1,8463 | 0,0027 | 0,0081 |
| | cell division - E2F transcription network (M4.8) | | | | 2,1621 | 0,0002 | 0,0044 | | | | | | | 1,8111 | 0,0037 | 0,0157 | 2,3638 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell division (M37.3) | | | | 1,7484 | 0,0080 | 0,0409 | | | | | | | | | | 1,9477 | 0,0006 | 0,0022 |
| | cell division (stimulated CD4+ T cells) (M46) | | | | | | | | | | | | | 1,8493 | 0,0031 | 0,0135 | 2,5090 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell division in stimulated CD4 T cells (M4.6) | | | | | | | | | | | | | 1,8427 | 0,0027 | 0,0127 | 2,3490 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell junction (GO) (M4.13) | 1,9184 | 0,0007 | 0,0047 | 1,7308 | 0,0111 | 0,0498 | | | | 1,9339 | 0,0004 | 0,0043 | -1,8568 | 0,0037 | 0,0157 | -2,0880 | 0,0002 | 0,0012 |
| | cell movement, Adhesion & Platelet activation (M30) | 1,8013 | 0,0091 | 0,0403 | 2,1537 | 0,0002 | 0,0044 | | | | | | | | | | | | |
| | chaperonin mediated protein folding (I) (M204.0) | | | | | | | | | | | | | | | | 2,0002 | 0,0006 | 0,0022 |
| | chaperonin mediated protein folding (II) (M204.1) | | | | | | | | | | | | | | | | 2,1200 | 0,0002 | 0,0012 |
| | chemokine cluster (I) (M27.0) | 1,8400 | 0,0061 | 0,0294 | | | | | | | 1,7750 | 0,0058 | 0,0328 | | | | | | |
| | chemokine cluster (II) (M27.1) | 1,9425 | 0,0007 | 0,0047 | | | | | | | 1,8113 | 0,0046 | 0,0287 | | | | | | |
| | chemokines and inflammatory molecules in myeloid cells (M86.0) | 2,0940 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | 1,8725 | 0,0013 | 0,0096 | -2,0213 | 0,0006 | 0,0050 | -2,1150 | 0,0004 | 0,0017 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| chromosome Y linked (M240) | | | | | | | | | 1,8251 | 0,0027 | 0,0127 | | | | | | | | | | |
| complement activation (I) (M112.0) | 2,0531 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | 1,9636 | 0,0007 | 0,0059 | | -1,9679 | 0,0006 | 0,0023 | | | | | | |
| complement and other receptors in DCs (M40) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CORO1A-DEF6 network (I) (M32.2) | -1,7625 | 0,0039 | 0,0208 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cytoskeletal remodeling (enriched for SRF targets) (M34) | | | | 1,8607 | 0,0018 | 0,0153 | | | | | | | | | | | | | | | |
| cytoskeletal remodeling (M32.8) | | | | 1,7544 | 0,0070 | 0,0369 | | | | | | | | | | | | | | | |
| cytoskeleton/actin (SRF transcription targets) (M145.1) | | | | 1,8672 | 0,0035 | 0,0216 | | | | | | | | | | | | | | | |
| DC surface signature (S5) | 2,3286 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DNA repair (M76) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| double positive thymocytes (M126) | -1,7719 | 0,0035 | 0,0197 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E2F transcription factor network (M8) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E2F1 targets (Q3) (M10.0) | | | | 1,8484 | 0,0027 | 0,0188 | | | | | | | | | | | | | | | |
| E2F1 targets (Q4) (M10.1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| endoplasmic reticulum (M37.2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched for TF motif PAX3 (M179) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched for ubiquitination (M138) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in activated dendritic cells (I) (M119) | 2,0653 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in activated dendritic cells (II) (M165) | 2,5415 | 0,0002 | 0,0019 | 1,6396 | 0,0111 | 0,0498 | -2,6827 | 0,0002 | 0,0059 | 2,4519 | 0,0002 | 0,0026 | | | | | | | | | |
| enriched in activated dendritic cells/monocytes (M64) | 1,8111 | 0,0093 | 0,0408 | -2,0114 | 0,0006 | 0,0091 | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in antigen presentation (II) (M95.0) | 1,8763 | 0,0041 | 0,0210 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in antigen presentation (III) (M95.1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in B cells (I) (M47.0) | -2,1063 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in B cells (II) (M47.1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in B cells (III) (M47.2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in B cells (VI) (M69) | -1,9172 | 0,0006 | 0,0044 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in cell cycle (M167) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in DNA interacting proteins (M182) | | | | 1,8963 | 0,0014 | 0,0132 | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in G-protein coupled receptors (M130) | -1,8191 | 0,0013 | 0,0085 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in membrane proteins (M124) | | | | -1,8090 | 0,0057 | 0,0311 | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in monocytes (I) (M4.15) | 1,7798 | 0,0105 | 0,0428 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in monocytes (II) (M11.0) | 2,8030 | 0,0002 | 0,0019 | -2,3178 | 0,0002 | 0,0044 | -2,2804 | 0,0002 | 0,0059 | 2,4787 | 0,0002 | 0,0026 | -2,8843 | 0,0002 | 0,0028 | -3,4267 | 0,0003 | 0,0013 | | | |
| enriched in monocytes (III) (M73) | 1,9070 | 0,0015 | 0,0098 | -1,8547 | 0,0030 | 0,0198 | | | | | | | -2,2931 | 0,0002 | 0,0028 | -2,1515 | 0,0002 | 0,0012 | | | |
| enriched in monocytes (IV) (M118.0) | 2,1428 | 0,0002 | 0,0019 | -2,1995 | 0,0002 | 0,0044 | -2,2183 | 0,0002 | 0,0059 | 1,9623 | 0,0006 | 0,0056 | -2,2902 | 0,0002 | 0,0028 | -2,3508 | 0,0002 | 0,0012 | | | |
| enriched in monocytes (surface) (M118.1) | 1,8907 | 0,0031 | 0,0176 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in myeloid cells and monocytes (M81) | 2,0702 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| enriched in neutrophils (I) (M37.1) | 1,7598 | 0,0059 | 0,0289 | -2,9107 | 0,0002 | 0,0044 | -2,2931 | 0,0002 | 0,0059 | | | | 5396454 | 0,0002 | 0,0028 | -2,8390 | 0,0002 | 0,0012 | | | |
| enriched in neutrophils (II) (M163) | | | | -1,9528 | 0,0008 | 0,0106 | | | | | | | -1,7634 | 0,0085 | 0,0299 | -2,1473 | 0,0002 | 0,0012 | | | |
| enriched in NK cells (I) (M7.2) | -2,5669 | 0,0002 | 0,0019 | 1,8310 | 0,0009 | 0,0106 | | | | | | | -2,6528 | 0,0002 | 0,0026 | 2,8561 | 0,0002 | 0,0028 | 2,4486 | 0,0002 | 0,0012 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| mitotic cell cycle in stimulated CD4 T cells (M4.9) | | | | | | | | | | | | 1,7073 | 0,0112 | 0,0376 | 2,2905 | 0,0002 | 0,0012 | |
| mitotic cell division (M6) | | | | | | | | | | | | 1,8590 | 0,0039 | 0,0160 | 2,5004 | 0,0002 | 0,0012 | |
| Monocyte surface signature (S4) | 2,1929 | 0,0002 | 0,0019 | -2,3031 | 0,0002 | 0,0044 | -2,1417 | 0,0002 | 0,0059 | 1,9329 | 0,0002 | 0,0026 | -2,3798 | 0,0002 | 0,0028 | -3,0541 | 0,0002 | 0,0012 |
| myeloid cell cytokines, metalloproteinases and laminins (M78) | | | | -1,7163 | 0,0109 | 0,0498 | | | | | | | | | | | | |
| myeloid cell enriched receptors and transporters (M4.3) | 2,3031 | 0,0002 | 0,0019 | | | | | | | 2,0623 | 0,0002 | 0,0026 | | | | -2,4590 | 0,0002 | 0,0012 |
| myeloid, dendritic cell activation via NFkB (II) (M43.1) | | | | | | | | | | | | | -1,8920 | 0,0029 | 0,0129 | -1,8662 | 0,0021 | 0,0064 |
| Naive B cell surface signature (S8) | | | | | | | | | | | | | | | | -1,5614 | 0,0144 | 0,0371 |
| NK cell surface signature (S1) | | | | | | | | | | -1,8325 | 0,0002 | 0,0026 | 2,4998 | 0,0002 | 0,0028 | | | |
| nuclear pore complex (M106.0) | | | | 2,3860 | 0,0002 | 0,0044 | | | | | | | 1,8117 | 0,0039 | 0,0160 | 1,8822 | 0,0025 | 0,0075 |
| nuclear pore complex (mitosis) (M106.1) | | | | 1,8151 | 0,0038 | 0,0224 | | | | | | | | | | | | |
| nuclear pore, transport; mRNA splicing, processing (M143) | | | | 1,9401 | 0,0008 | 0,0106 | | | | | | | | | | | | |
| nucleotide metabolism (M181) | | | | 2,0763 | 0,0002 | 0,0044 | 1,9313 | 0,0040 | 0,0417 | | | | | | | 1,9105 | 0,0010 | 0,0034 |
| phosphatidylinositol signaling system (M101) | | | | | | | -2,1872 | 0,0002 | 0,0059 | | | | 1,9715 | 0,0004 | 0,0043 | | | |
| plasma cells & B cells, immunoglobulins (M156.0) | -1,6410 | 0,0108 | 0,0432 | | | | 2,7295 | 0,0002 | 0,0059 | -1,6582 | 0,0064 | 0,0354 | | | | | | |
| plasma cells, immunoglobulins (M156.1) | | | | | | | 2,4748 | 0,0002 | 0,0059 | | | | | | | | | |
| platelet activation - actin binding (M196) | | | | 2,0628 | 0,0004 | 0,0075 | 2,1945 | 0,0004 | 0,0070 | | | | | | | 1,8541 | 0,0029 | 0,0084 |
| platelet activation (I) (M32.0) | | | | | | | | | | | | | -1,9397 | 0,0013 | 0,0076 | | | |
| platelet activation (II) (M32.1) | | | | | | | | | | | | | -2,0951 | 0,0006 | 0,0050 | | | |
| platelet activation (III) (M42) | | | | | | | | | | | | | -1,8917 | 0,0023 | 0,0112 | -1,9739 | 0,0002 | 0,0012 |
| platelet activation & blood coagulation (M199) | | | | 1,9250 | 0,0008 | 0,0106 | | | | | | | | | | | | |
| PLK1 signaling events (M4.2) | | | | 1,6495 | 0,0100 | 0,0481 | | | | | | | 1,9957 | 0,0021 | 0,0110 | 2,7098 | 0,0002 | 0,0012 |
| proinflammatory cytokines and chemokines (M29) | | | | | | | -1,8368 | 0,0024 | 0,0278 | | | | | | | | | |
| proinflammatory dendritic cell, myeloid cell response (M86.1) | 1,9017 | 0,0018 | 0,0109 | | | | | | | 1,8760 | 0,0015 | 0,0107 | | | | -1,7540 | 0,0072 | 0,0201 |
| proteasome (M226) | | | | | | | | | | | | | 2,0591 | 0,0002 | 0,0028 | 2,1046 | 0,0002 | 0,0012 |
| purine nucleotide biosynthesis (M212) | | | | | | | | | | | | | | | | 1,8968 | 0,0019 | 0,0061 |
| putative targets of PAX3 (M89.1) | | | | | | | | | | | | | | | | -1,6906 | 0,0119 | 0,0314 |
| RA, WNT, CSF receptors network (monocyte) (M23) | | | | -1,9677 | 0,0006 | 0,0091 | | | | | | | | | | -1,9059 | 0,0010 | 0,0036 |
| Ran mediated mitosis (M15) | | | | | | | | | | | | | 1,9283 | 0,0006 | 0,0050 | 2,2381 | 0,0002 | 0,0012 |
| recruitment of neutrophils (M132) | 1,7969 | 0,0077 | 0,0354 | -1,9207 | 0,0014 | 0,0132 | | | | | | | | | | -2,1698 | 0,0002 | 0,0012 |
| regulation of antigen presentation and immune response (M5.0) | 1,6774 | 0,0109 | 0,0432 | | | | | | | | | | | | | -1,8413 | 0,0002 | 0,0012 |
| regulation of localization (GO) (M63) | | | | | | | | | | | | | -2,0633 | 0,0002 | 0,0028 | -1,7009 | 0,0121 | 0,0318 |
| regulation of signal transduction (M3) | 2,0248 | 0,0006 | 0,0046 | | | | | | | 1,7337 | 0,0057 | 0,0328 | -1,7571 | 0,0023 | 0,0112 | -2,3240 | 0,0002 | 0,0012 |
| regulation of transcription, transcription factors (M213) | | | | -1,7668 | 0,0076 | 0,0392 | -2,1332 | 0,0004 | 0,0070 | | | | 1,6745 | 0,0146 | 0,0473 | | | |
| respiratory electron transport chain (mitochondrion) (M216) | | | | -1,9048 | 0,0018 | 0,0153 | | | | | | | 2,0828 | 0,0002 | 0,0028 | 2,0839 | 0,0002 | 0,0012 |
| respiratory electron transport chain (mitochondrion) (M219) | | | | | | | | | | | | | 2,1445 | 0,0006 | 0,0050 | 2,1902 | 0,0002 | 0,0012 |
| respiratory electron transport chain (mitochondrion) (M231) | | | | | | | | | | | | | 2,0252 | 0,0004 | 0,0043 | 2,0198 | 0,0004 | 0,0017 |
| respiratory electron transport chain (mitochondrion) (M238) | -1,8033 | 0,0024 | 0,0141 | -1,8388 | 0,0037 | 0,0224 | | | | | | | 2,0557 | 0,0006 | 0,0050 | 2,1555 | 0,0002 | 0,0012 |
| Resting dendritic cell surface signature (S10) | 1,9632 | 0,0006 | 0,0045 | | | | | | | 1,8223 | 0,0008 | 0,0069 | | | | -1,9118 | 0,0002 | 0,0012 |

Chapitre 5 | Discussions et Conclusions

Malgré le développement et l'introduction des traitements AADs depuis 2011, un vaccin prophylactique reste crucial afin de freiner efficacement l'épidémie globale du VHC. L'échec récent de l'approche ChAd3-NS/MVA-NS dans le premier essai clinique à grande échelle d'un vaccin contre le VHC reflète la nécessité d'accroître nos connaissances sur les paramètres de l'immunité protectrice associée à une résolution spontanée de multiples infections naturelles par le VHC.

Le recrutement d'UDIs séronégatifs et leur suivi au cours de multiples infections par le VHC par la cohorte hépatite HEPCO (de l'anglais, *Hepatitis Cohort*) présente à Montréal, Canada, représente une opportunité exceptionnelle d'étudier la réponse immunitaire de manière longitudinale et d'identifier les corrélats de l'immunité protectrice. Cette cohorte unique d'UDIs nous a permis de caractériser et de comparer directement *ex-vivo* le répertoire de TCR β des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope immunodominant NS3-1073 développé au cours de la phase aiguë de la primo-infection chez les sujets ayant résolu l'infection (SR ; n=8) *versus* ceux ayant développé une infection chronique (CI ; n=6). Cette cohorte nous a également permis d'effectuer la caractérisation longitudinale de la réponse immunitaire au niveau transcriptomique, phénotype et fonctionnelle au cours de la résolution spontanée de la réinfection par le VHC (n=8).

Ces approches expérimentales nous ont permis d'identifier treize nouveaux clonotypes publics uniques expansés au cours d'une primo-infection indépendamment de l'issue de l'infection. Nous avons également pu déterminer que la présence d'un pool de lymphocytes T CD8 cross-réactifs joue un rôle limité dans le développement de l'infection primaire par le VHC.

Au cours de la réinfection, nous avons observé une augmentation simultanée des réponses B et T mémoires spécifiques du VHC au stade aigu précoce aux niveaux transcriptomique et fonctionnel, suggérant un rôle collaboratif de la réponse immunitaire cellulaire et humorale dans la clairance de la réinfection par le VHC. Nos résultats soutiennent l'idée de combiner deux stratégies vaccinales induisant à la fois une immunité à médiation cellulaire et une immunité humorale, et ce, afin de reproduire les réponses immunitaires observées dans les cas réels de clairance de la réinfection du VHC.

5.1. Premier Manuscrit - Expansion de lymphocytes T CD8 publics uniques spécifiques au virus de l'hépatite C au cours des infections primaires aiguës et réinfections

5.1.1. Répertoire des TCR β diversifié indépendamment de l'issue de l'infection

Nous avons démontré que le répertoire de TCR β spécifique de l'épitope NS3-1073 était diversifié (i.e. composé d'un grand nombre de clonotypes) au cours de l'infection aiguë précoce, indépendamment de l'issue de l'infection et que cette diversité persistait lors du suivi à long terme (Chapitre 3 - Figure 1 et S1). Plusieurs études ont démontré qu'un répertoire de TCR des lymphocytes T CD8 diversifié était important pour la reconnaissance des mutations d'échappement au niveau des épitopes ciblés pouvant survenir lors des infections par le VIH (517, 518) ou le VHC (234, 237, 390). L'ensemble de ces études suggèrent qu'au début de l'infection aiguë, un répertoire constitué d'un grand nombre de clonotypes permet une sélection affinée de clonotypes flexibles pouvant reconnaître à la fois la séquence virale infectante, ainsi que les potentiels variants viraux émergents. En effet, Wolfl *et al.* ont démontré la présence *in vivo* d'une mutation au niveau d'un résidu impliqué dans le contact épitope–TCR diminuant considérablement la reconnaissance de l'épitope NS3-1406 par les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC (234). L'absence de clonotype flexible et l'incapacité à amorcer efficacement les lymphocytes T CD8 naïfs résultent en la capacité du VHC à exploiter un « trou » dans le répertoire de TCR spécifique de l'épitope NS3-1406, représentant ainsi un mécanisme d'échappement viral (234). De façon similaire, le répertoire de TCR contre l'épitope hautement mutable NS3-1395 du VHC s'est avéré être étroit et associé à des mutations d'échappement virales, par opposition à un large répertoire dirigé contre l'épitope plus conservé NS3-1436 (237).

Ici, nous avons identifié différents variants viraux de l'épitope NS3-1073 à partir du plasma de sujets SR, lorsqu'aucun n'a été détecté chez les sujets CI. L'épitope NS3-1073 s'est précédemment révélé être hautement conservé au fil du temps au cours de l'infection chronique par le VHC (519). Une autre étude a examiné l'impact de l'échange d'alanine à chaque position d'acide aminé de l'épitope NS3-1073 du VHC sur la reconnaissance des lymphocytes T CD8 (520). L'étude a démontré que l'échange unique Valine-Alanine en position cinq ou neuf, observés ici à partir du plasma des sujets SR.5 et SR.8 (Tableau 1), entraînaient une diminution de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 spécifiques de la séquence consensus du génotype 1a (520).

En effet, les mutations en position cinq ou neuf affectent, sans toutefois abroger, respectivement l'affinité de liaison du variant à HLA-A2 et la reconnaissance du variant par les TCR, sans affecter la capacité de réplication du virus (290, 520). Le fait que les sujets SR.5 et SR.8 ont spontanément éliminé leur infection aiguë suggère que le répertoire diversifié et les TCR publics spécifiques de l'épitope NS3-1073 identifiés chez ces sujets étaient flexibles. Ils ont été capables de reconnaître à la fois la séquence de référence (i.e. présentée par les tétramères) et les variants viraux détectés à partir du plasma des sujets SR.5 et SR.8.

5.1.2. Identification de treize clonotypes publics indépendamment de l'issue de l'infection

Dans notre étude, un clonotype donné était désigné comme public s'il était présent chez au moins deux sujets quelle que soit l'issue de l'infection (i.e. SR et CI) à une fréquence cumulée $\geq 0,5$ %. Nous avons identifié un ensemble de treize clonotypes publics spécifiques de l'épitope NS3-1073 (Chapitre 3 - Figure 3B et Tableau S2). Ces clonotypes publics n'ont pas séparé les différents sujets et temps étudiés par groupe, soulignant que leur présence et expansion étaient indépendantes de l'issue de l'infection (Chapitre 3 - Figure 3B). Ces clonotypes publics présentent différents profils d'expansion, pouvant être expliqués par l'utilisation d'une chaîne α différente conduisant à un clonotype TCR $\alpha\beta$ d'affinité plus ou moins grande pour l'épitope. Nous n'avons pas pu examiner les séquences appariées TCR $\alpha\beta$ dans notre étude. En effet, bien qu'il soit possible d'effectuer le séquençage TCR α à partir des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 (i.e. tétramère positive), l'appariement TCR $\alpha\beta$ ne peut pas être déduit de manière fiable à partir de ces données de séquençage. Nous avons tout de même pu identifier trois appariements TCR $\alpha\beta$ à partir de données accessibles au public via la base de données VDJdb (521, 522). Toutefois, cette approche reste très limitée puisque seulement trois séquences présentes chez un même sujet ayant résolu spontanément une primo-infection ont été identifiées (Chapitre 3 - Figure 3D). De plus amples informations sur le rôle de la chaîne α et l'appariement TCR $\alpha\beta$ pourraient être obtenues via l'utilisation d'une approche de séquençage scRNA-seq couplées au clonage du ou des récepteurs d'intérêts et à une analyse fonctionnelle.

La prévalence élevée des clonotypes publics observée au cours de l'infection aiguë par le VHC était également caractérisée par l'utilisation préférentielle de la famille de gènes V04.

Un clonotype TCR en particulier, utilisant les familles de gènes V04-02/J02-02, a été identifié chez 12 des 14 sujets étudiés. D'autres clonotypes publics utilisant la famille de gènes V04, spécifiques des épitopes KK10 (VIH (516)) et pp65 (CMV (523)), ont également été rapportés dans la littérature scientifique. La présence de ces clonotypes publics et leur maintien au sein du pool de lymphocytes T CD8 mémoire à longue durée de vie se sont avérés être façonnés par le mécanisme de recombinaison convergente (524). En effet, Venturi *et al.* ont démontré que non seulement différentes recombinaisons V(D)J convergent pour produire la même séquence nucléotidique, mais aussi différentes séquences nucléotidiques convergent pour coder la même séquence d'acides aminés (524). Conformément avec les observations de Venturi *et al.* (524), nos données démontrent également que les diversités combinatoires (Chapitre 3 - Tableau S2) et/ou jonctionnelles contribuent à générer la même séquence d'acides aminés.

5.1.3. Expansion des clonotypes publics au cours de la réinfection par le VHC

Des lymphocytes T CD8 mémoires à longue durée de vie spécifiques de l'épitope NS3-1073 ont été détectés deux décennies après la clairance spontanée du VHC, suggérant qu'ils peuvent contribuer à une immunité protectrice à long terme (155). Notre laboratoire a précédemment démontré l'expansion des lymphocytes T CD8 mémoires spécifiques à l'épitope NS3-1073 après réexposition virale chez les sujets ayant spontanément résolu une réexposition au VHC (211). Chez ces derniers, nous avons également observé une focalisation du répertoire de TCR avec une expansion rapide et sélective des clonotypes T CD8 mémoires démontrant la plus grande avidité fonctionnelle (424). Nous avons donc souhaité déterminer la présence des clonotypes publics identifiés dans le cas d'une primo-infection au cours de la réinfection à partir des répertoires de TCR spécifiques de l'épitope NS3-1073 longitudinaux de deux sujets ayant résolu (SR/SR-1) ou non (SR/CI-2) une seconde infection par le VHC (424). Nous avons observé différents profils d'expansion des clonotypes publics 2, 3 et 6 chez les deux sujets et du clonotype public 1 chez SR/CI-2 seulement (Chapitre 3 - Figure 4A). Notamment, l'expansion du clonotype public 2 n'a été observé que chez le sujet SR/SR-1. Toutefois, le séquençage du virus autologue à partir du plasma du sujet SR/CI-2 a révélé la présence d'un variant de l'épitope NS3-1073 qui n'était pas reconnu par les lymphocytes CD8 T mémoires préexistants, ce qui peut expliquer l'expansion limitée des clonotypes chez ce sujet (211).

A contrario, l'expansion du clonotype public 1 chez ce même sujet (SR/CI-2) pourrait refléter une possible flexibilité de ce clonotype en réponse au variant de l'épitope détecté chez ce sujet. Il est également possible que les clonotypes publics élargis au cours de la phase aiguë de la réinfection détectés chez le sujet SR/SR-1 soient ceux avec la plus grande avidité fonctionnelle. En effet, des clones individuels générés à partir du sujet SR/SR-1 contenaient deux des clonotypes publics (2 et 6) identifiés dans cette étude (Chapitre 3 - Figure 4B). Ces clones, R2 et R4, présentaient des indices d'avidité fonctionnelle et de polyfonctionnalité élevés (Chapitre 3 - Figure 4C). Néanmoins, des tests supplémentaires utilisant un panel plus large de clones contenant les clonotypes publics identifiés dans notre étude restent nécessaires pour valider ces hypothèses.

5.1.4. Reconnaissance limitée des épitopes restreints par HLA-A*02 par les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073

Les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 du VHC sont connus pour présenter une réactivité croisée avec plusieurs épitopes restreints par HLA-A*02. En effet, des réactivités croisées ont été identifiées contre les épitopes NA-231 de l'influenza, pp65 du CMV et LMP2 du virus d'Epstein Barr (EBV) (156, 235, 525). De plus, un pool préexistant de lymphocytes T CD8 mémoires spécifiques de l'épitope NS3-1073, induit par des infections hétérologues, a été caractérisé dans une cohorte de sujets sains séronégatifs au VHC (235). Toutefois, aucune étude à ce jour n'a identifié ces lymphocytes T CD8 cross-réactifs au niveau clonotypique. Grâce à l'utilisation de la base de données VDJdb (522) regroupant des séquences de TCR de spécificités connues, nous avons pu identifier des clonotypes partagés avec d'autres épitopes restreints HLA-A2 (Chapitre 3 - Tableau 3 et Figure 5A). Ces clonotypes partagés étaient spécifiques des épitopes suivants : pp65 (CMV) (526), BMLF1 (EBV) (527), M1 (Influenza) (526), NS4B (FJ) (528) et MLANA (Mélanome) (529).

La première réactivité croisée signalée dans la littérature scientifique par Wedemeyer *et al.* est contre l'épitope NA-231 de l'influenza (FLU) (525). Urbany *et al.* ont rapporté par la suite l'expansion rapide et élevée des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 cross-réactifs à l'épitope NA-231 au cours d'une infection primaire aiguë fulminante par le VHC chez deux patients présentant de graves lésions hépatiques (8). Toutefois, il a été montré plus tard que cette réactivité croisée NS3-1073 (VHC) /NA-231 (FLU) était de faible affinité (530).

En effet, même si les deux épitopes présentent une homologie de séquence élevée (7 sur 9 AA identiques), leur conformation structurale, et donc les répertoires de TCR spécifiques, sont distincts (531). Ceci est en accord avec nos résultats où aucune séquence CDR3 partagée entre les épitopes NS3-1073 (VHC) et NA-231 (FLU) n'a été identifiée (Chapitre 3 - Tableau 3 et Figure 5A).

Zhang *et al.* ont testé la directionnalité de la réactivité croisée associée à l'épitope NS3-1073 du VHC telle que définie par Kasprowicz *et al.* (235, 530). Ils ont démontré que le peptide NS3-1073 du VHC pouvait induire l'expansion des lymphocytes T CD8 spécifiques des épitopes pp65-495 (CMV), M1-58 (FLU) et LMP2-426 (EBV) et non l'inverse (i.e. absence d'expansion des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073 après stimulation par les différents épitopes viraux) (235). Nous avons effectivement identifié des séquences CDR3 partagées avec les deux premiers épitopes susmentionnés (i.e. pp65-495 (CMV) et M1-58 (FLU)). Nos résultats ainsi que ceux publiés par Zhang *et al.* et Kasprowicz *et al.* suggèrent que la réactivité croisée des lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC NS3-1073 avec d'autres épitopes est plus probable après l'exposition au VHC.

Il est important de noter que la majorité des clonotypes partagés identifiés sont présents au sein des répertoires de TCR à une faible fréquence (Chapitre 3 - Tableau 3). Ces séquences CDR3 partagées ne représentent donc qu'une fraction mineure du répertoire de TCR spécifiques de l'épitope NS3-1073. De plus la majorité des clonotypes partagés identifiés ne sont présents qu'au sein du répertoire de TCR d'un seul sujet (i.e. clonotype « privé »). Par ailleurs, nous avons observé la présence du clonotype public 4 au sein du répertoire de TCR d'un sujet séronégatif (235) (Chapitre 3 - Tableau 3). Néanmoins, aucun des clonotypes publics identifiés dans notre étude n'a été partagé avec le répertoire d'autres épitopes restreints HLA-A*02. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'il est peu probable que les clonotypes publics détectés dans notre étude proviennent d'un pool mémoire de lymphocytes T CD8 à réactivité croisée présents avant infection par le VHC. De plus, nous avons démontré qu'il y avait peu ou pas de réactivité croisée fonctionnelle des lymphocytes T spécifiques de l'épitope NS3-1073 en réponse à l'un des épitopes restreints par HLA-A*02 (Chapitre 3 - Figure 5B et 5C). Ainsi, même si un pool de lymphocytes T CD8 mémoire cross-réactifs peut préexister, celui-ci joue un rôle limité au cours de l'infection primaire par le VHC.

Toutefois, des lymphocytes T CD8 mémoire cross-réactifs préexistants peuvent contribuer à la gravité de la maladie hépatique associée à l'infection, comme observé précédemment par Urbani *et al.* (156), soulignant le besoin de les identifier au niveau clonotypique afin de prévenir leur expansion en réponse à la vaccination contre le VHC.

5.1.5. Limitations de l'étude

Bien que notre étude représente l'avantage premier d'étudier le répertoire de l'épitope NS3-1073 chez les sujets exprimant la même molécule HLA-A*02, il existe toutefois certaines limitations associées à notre approche expérimentale et analytique. En effet, en raison de leur rareté, un seul échantillon de PBMC par sujet a été utilisé pour le tri des T CD8 spécifiques de l'épitope NS3-1073, conduisant ainsi à un nombre différent de TCR β séquencés.

De plus, dû à différentes approches de séquençages des TCR β utilisées par les multiples études présentes dans les bases de données, nous ne pouvons pas exclure d'éventuelles erreurs dans les séquences nucléotidiques incluses lors de la préparation et/ou du séquençage de la bibliothèque (532). Cette limitation limite donc notre comparaison dans laquelle nous visons à identifier exactement les mêmes séquences CDR3 dans plusieurs études.

5.2. Deuxième manuscrit - Réponses concertées des lymphocytes T et B spécifiques du VHC au cours de l'élimination spontanée de la réinfection

5.2.1. Signatures transcriptomiques associées à une réponse humorale au cours de la phase aigüe précoce de la réinfection en comparaison de la primo-infection par le VHC

En comparaison de la primo-infection, nous avons observé une régulation à la hausse des modules associés à une réponse immunitaire adaptative au cours de la phase aigüe précoce de la réinfection (Chapitre 4 - Figure 2C-D). Nos résultats reflètent un rappel rapide des lymphocytes T et B mémoires, cohérent avec une durée et une ampleur réduite de la virémie au cours de la réinfection par le VHC, comme décrit précédemment par Osburn *et al.* (262). En effet, les charges virales détectées chez nos sujets au cours de la phase aigüe de la réinfection étaient très faibles.

Nous avons également détecté une régulation à la baisse des modules associés à une réponse immunitaire innée (Chapitre 4 - Figure 2B). Toutefois, il est important de souligner qu'étant donné l'évolution plus rapide de la réinfection par rapport à la primo-infection, nous avons peut-être manqué des signatures immunitaires innées transitoires très précoces. En effet, Barth *et al.* ont précédemment démontré que la clairance d'une réinfection par le VHC par une souche hétérologue chez le modèle chimpanzé était associée à une expression hépatique plus élevée des ISG, des interférons de type I et II ainsi que des marqueurs CD56 (cellules NK) et CD8 (392). Leurs résultats suggèrent que l'élimination de la réinfection par le VHC dépend à la fois de la réponse immunitaire innée et cellulaire intrahépatique (392).

Plus particulièrement, une signature associée aux plasmocytes a été détectée au temps post-réinfection présentant une virémie positive (Chapitre 4 - Figure 2C). Parmi les gènes participant le plus à la régulation à la hausse du module (i.e. « leading edge genes », **Figure 13**), nous avons identifié les gènes TNFRSF17 (de l'anglais, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 17*) codant pour le récepteur liant spécifiquement Blys-BAFF (de l'anglais, « B-cell activating factor »), et TNFSF13B (de l'anglais, TNF Superfamily Member 13b), codant pour Blys-BAFF. Blys-BAFF est connue pour son implication dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (533). Querec *et al.* ont précédemment démontré qu'une signature incluant le gène TNFRSF17 a pu prédire avec précision (100%) la réponse des anticorps neutralisants chez les receveurs du vaccin YF-17D (509). Dans notre étude, l'expression du gène TNFRSF17 seule ne corrèle pas avec la réponse des anticorps neutralisants. Toutefois, les z-score calculés à partir des gènes participant le plus à la régulation à la hausse du module associé aux plasmocytes (voir section **1.10.2.3.**), comprenant TNFRSF17 et TNFSF13B, corrèlent avec la réponse aux anticorps la plus forte détectée par ELISA (de l'anglais, *enzyme-linked immunosorbent assay*), soit NS3 (Chapitre 4 - Figure S2). Cette corrélation confirme que la signature observée au cours de la phase aigüe précoce est bien associée à une réponse humorale spécifique du VHC.

5.2.2. Signatures transcriptomiques associées aux lymphocytes T fortes après le rappel du vaccin contre le VHC chez des sujets sains

Nous avons pu observer des changements importants des signatures transcriptomiques 24h après chaque vaccination, le rappel MVA-NS provoquant les changements transcriptomiques les plus forts (Chapitre 4 - Figure 2B-D). Ces observations peuvent expliquer la plus grande réactogénicité (i.e. plus de réactions adverses signalées) rapportée après MVA-NS, par opposition à ChAd3-NS3 (513). Grâce à l'utilisation des bases de données BTM et LM22, nous avons observé une régulation à la hausse des modules de gènes associés à une réponse immunitaire innée, l'inflammation et la signalisation par l'interféron 24h post-amorce et rappel, confirmant ainsi les signatures GO observées par Hartnell et al. (513). Rapidement après les signatures susmentionnées, nous avons également observé une régulation à la hausse des modules associés aux lymphocytes T transitoires (d4) *versus* soutenus (d60 et d63) après l'amorce ChAd3-NS et le rappel MVA-NS, respectivement (Chapitre 4 - Figure 1E). Nos observations au niveau transcriptomique sont cohérentes avec la capacité de ChAd3-NS à amorcer et de MVA-NS à stimuler à la fois les réponses des lymphocytes T CD4 et CD8 (465, 466, 468).

Des premières données publiées récemment ont indiqué que l'approche amorce/rappel ChAd3-NS/MVA-NS n'a pas permis de prévenir l'établissement d'une infection chronique chez les sujets à haut risque d'infection (Phase II) (469). Bien que les raisons immunologiques de cet échec ne soient pas encore comprises, les mutations d'échappement virales ou encore, une flexibilité ou réactivité croisée antigénique inter-génotypique restreinte des lymphocytes T mémoires induits par le vaccin envers les variants viraux circulants sont des mécanismes possibles (285, 287, 467, 469). En effet, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC induits par le vaccin chez les sujets sains présentaient une réactivité croisée limitée en réponse aux peptides de génotypes 3a et 4a (466, 467). Bien qu'une réactivité croisée des lymphocytes T envers les génotypes 1 et 3 limitée ait été rapportée (473), la clairance d'une réinfection hétérologue a été observée aussi bien chez le modèle chimpanzé (383), que chez les UDIs comme le rapporte notre présente étude (Chapitre 4 - sujets SR1 et SR3) ainsi qu'Osburn *et al.* (416).

Une optimisation de la stratégie vaccinale semble donc nécessaire sur cet aspect. L'ajout de l'adjuvant sIi_{tr} (de l'anglais, *truncated shark invariant chain*) à l'approche ChAd3-NS/MVA-NS (gt1b) a permis une amélioration des réponses des lymphocytes T chez l'homme lors d'un essai clinique de phase 1, sans toutefois accroître de façon significative la réactivité croisée des réponses des lymphocytes T aux antigènes du VHC de géotypes autres que 1b (471). Des résultats prometteurs ont été obtenus par le laboratoire du Dr. Barnes chez le modèle murin vacciné par une amorce ChAdOx1 exprimant des séquences virales NS hautement conservées entre la majorité des géotypes du VHC (gt1/3 ou gt1-6) formulée avec l'adjuvant sIi_{tr} (470, 475). Toutefois, les épitopes viraux présentés par les molécules HLA associées à une résolution spontanée de l'infection (i.e. HLA-A03,-B27 et B57; voir section 1.6.2.4.) présentent peu de conservation entre les géotypes et sous-types du VHC (297, 298, 318, 320), et ne sont donc pas, ou partiellement, inclus dans la stratégie vaccinale susmentionnée. Des études supplémentaires restent donc nécessaires afin de déterminer si l'augmentation de l'ampleur, la largeur et la réactivité croisée des lymphocytes T induit par la vaccination observée *in vitro* se traduira également par une immunité protectrice chez les individus à haut risque d'infection par le VHC.

5.2.3. Signatures transcriptomiques associées aux lymphocytes B absentes après le rappel du vaccin contre le VHC chez des sujets sains

Une forte signature plasmocytaire a également été détectée 7 jours après vaccination par l'amorce ChAd3-NS (Chapitre 4 - Figure 2C). Cette signature transcriptomique pourrait refléter une réponse humorale spécifique des protéines NS du VHC, néanmoins l'absence de ces signatures post-MVA-NS suggère que celles-ci peuvent refléter une réponse envers le vecteur ChAd3. En effet, des niveaux élevés de nAbs anti-ChAd3 ont été détectés après vaccination par l'amorce ChAd3-NS chez des sujets sains (534). Cette même étude a rapporté des titres faibles de nAbs anti-ChAd3 préexistants et l'absence d'impact de ces nAbs sur l'immunogénicité du vaccin (534). Néanmoins, une autre étude a été démontré qu'un titre des anticorps neutralisants anti-adénoviraux supérieur à 200, défini comme l'inverse du point final de neutralisation à 50 %, réduisait l'immunogénicité vis-à-vis des antigènes viraux insérés (535). Des résultats préliminaires présentés au cours d'un symposium par le Dr.Cox ont démontrés que 20% des UDIs vaccinés présentaient un titre d'anticorps neutralisants anti-adénoviraux supérieur à 200 (536).

Ces nAbs anti-adénoviraux pourraient donc représenter un autre mécanisme possible d'échec du vaccin ChAd3-NS/MVA-NS chez un cinquième des UDIs.

De plus, les modules associés aux lymphocytes B et plasmocytes sont des signatures transcriptomiques majeures manquantes après vaccination par MVA-NS en comparaison de la phase aiguë précoce de la réinfection naturelle par le VHC (Chapitre 4 - Figure 2C). Étant donné que la stratégie vaccinale ne contient pas les glycoprotéines E1 et E2, l'absence de nAb en réponse à ChAd3-NS/MVA-NS est attendue. Ces premières observations soutiennent l'idée de combiner deux stratégies vaccinales induisant à la fois une immunité à médiation cellulaire et une immunité humorale avec la production de nAbs, et ce, afin de reproduire les réponses immunitaires observées dans les cas réels de clairance de la réinfection du VHC.

5.2.4. Activation et expansion des LBM spécifiques à E2 rapidement après une réexposition au VHC

Notre laboratoire a précédemment observé une augmentation de la fréquence des LBM spécifiques de gpE2 au cours de la phase aiguë tardive, précédée d'un pic de T_{FH} circulant activé (cT_{FH} ICOS⁺) total chez les sujets ayant résolu spontanément une infection primaire (270). En revanche, une augmentation de la fréquence des LBM spécifiques de gp E2 chez les sujets chroniques, quant à eux, n'a été observé qu'après le développement d'une infection persistante (i.e. plus d'un an après le début de l'infection), et ce, en l'absence d'expansion de cT_{fh} ICOS⁺ (270). Dans la présente étude, nous avons détecté une expansion des LBM spécifiques de gpE2 au cours de la phase aiguë précoce chez 3 des 8 sujets étudiés (SR3, SR7 et SR8) (Figure 2, Figure 3B). Ce pic est suivi d'une diminution de la fréquence des LBM spécifiques de la glycoprotéine E2 au cours de la phase aiguë tardive, ainsi qu'un inversement de leur phénotype puisqu'à ce stade 62,6% ont un phénotype au «repos» (Chapitre 4 - Figure 3G). Ces résultats sont compatibles avec une réponse mémoire rapide et forte, suivie d'une baisse de la fréquence et de l'activation à mesure que le virus est éliminé.

Les sujets SR5 et SR6 présentent une augmentation des titres d'anticorps anti-E2, sans toutefois afficher une augmentation des LBM E2-tétramère⁺ (Chapitre 4 - Figure 4).

Une augmentation de la fréquence des tétramères spécifiques de la glycoprotéine E2 chez les sujets SR5 et SR6 pourrait avoir été manquée ou non détectée en raison des LBM exprimant des BCR reconnaissant la séquence de génotype 1a autologue et non capturée par les tétramères présentant la glycoprotéine E2 de génotype 2a ou de moindre affinité.

De plus, nous n'avons pas détecté de population E2-tétramère+ exprimant le marqueur CD38, délinéant une population de cellules sécrétant des anticorps (ASC), au cours de la phase aigüe précoce chez les 3 sujets étudiés (SR3, SR7 et SR8), tandis qu'une augmentation des titres d'anticorps anti-E2 a été observée au même temps post-réinfection (Chapitre 4 - Figure 4). Suite à la réaction du CG, les lymphocytes B activés se différencient soit en ASC ou en LBM (voir section 1.6.2.2.2.). Le paradigme actuel propose que les deux populations d'ASC générés soient les plasmocytes à courte durée de vie et les plasmocytes à longue durée de vie qui migrent et résident au niveau de la moelle osseuse où ils vont conférer une immunité à long terme. L'expression des BCR liés à la membrane, qui est nécessaire pour le maintien et la survie à long terme des LBM, est perdue sur les plasmocytes matures qui vont favoriser la production de la forme sécrétoire de ces IgG (537). La localisation des plasmocytes à longue durée de vie et l'absence des BCR liés à la membrane des plasmocytes pourraient donc expliquer l'absence de LBM spécifiques de gpE2 (tétramère +) exprimant CD38 à partir des PBMCs des sujets SR3, SR7 et SR8.

5.2.5. Augmentation concertée des réponses des lymphocytes T et B spécifiques du VHC au cours de la phase aigüe précoce

Nous avons détecté une augmentation concomitante de la réponse des lymphocytes T et B spécifiques du VHC au début de l'infection aigüe. En effet, grâce à une approche ELISPOT, nous avons également observé une augmentation de la magnitude et du spectre des réponses des lymphocytes T spécifiques du VHC au cours de la phase aigüe précoce en comparaison de la pré-réinfection, auprès de la majorité des sujets excepté SR3 (Chapitre 4 - Figure 4). Néanmoins, dû à une limitation du nombre d'échantillons PBMC disponibles, un autre temps de pré-réinfection a été utilisé pour SR3 pour l'ELISPOT qui était de 813 jours avant la date estimée de réinfection.

Il est possible que la réponse observée pré-réinfection chez ce sujet reflète une réinfection par le génotype 1a non détecté par un test rt-PCR (de l'anglais, *real-time RT-polymerase chain reaction*) standard par notre laboratoire. Comme précédemment démontré par notre laboratoire (423), nos résultats supportent que la protection contre la persistance virale lors d'une réinfection par le VHC est associée à une magnitude et à un spectre plus élevé de la réponse totale des lymphocytes T spécifiques du VHC.

La mémoire protectrice dépend dans un premier temps des anticorps circulants sécrétés par les plasmocytes à longue durée de vie. Des anticorps anti-E2 ainsi qu'une neutralisation des VHCpp H77 ont été détectés chez les sujets SR2, SR5 et SR8 avant réinfection (Chapitre 4 - Figure 4). Toutefois, ces nAbs sécrétés n'ont pas permis une immunité stérilisante, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas empêché l'établissement de la réinfection par le VHC. Au cours de la réinfection, nous avons observé un pic des anticorps anti-E2 au cours de la phase aiguë précoce, rapidement suivi d'une diminution après le contrôle de la virémie. Ces résultats sont concordants avec l'absence de signatures plasmocytaires aux points de temps négatifs pour l'ARN du VHC (Chapitre 4 - Figure 2C), ainsi que la dynamique des LBM spécifiques de la glycoprotéine E2 (Chapitre 4 – Figure 3B).

L'élimination spontanée des réinfections par le VHC a été auparavant associée à la génération de nAb dans 60% des cas (416). De même, nous avons détecté des titres de nAbs plus élevés chez 6 des 8 sujets (75%) au stade aigu précoce en comparaison des temps de pré-réinfection. Ces nAbs neutralisent principalement les VHCpp exprimant la séquence consensus de la glycoprotéine E2 de génotype 1a. Néanmoins, il est important de noter que tous les sujets de cette étude ont été réinfectés par les génotypes 1a ou 1b, ce qui pourrait expliquer les faibles capacités de neutralisation croisée inter-génotypique au niveau polyclonal (i.e. plasma). Toutefois, on ne peut pas totalement exclure qu'au niveau monoclonal certains anticorps (mAbs) circulant à de faibles taux dans le sang puissent potentiellement neutraliser des souches hétérologues. En effet, Merat *et al.* ont démontré la présence de bnAbs monoclonaux ciblant les régions AR3 et AR4 de la glycoprotéine E2 chez des sujets capables d'éliminer spontanément plusieurs infections par le VHC (358). De tels bnAb spécifiques de la région AR3 ont été détectés jusqu'à 5 ans après l'élimination d'une infection primaire, ce qui suggère qu'une telle réponse pourrait aider à prévenir l'établissement d'une infection chronique lors d'une réexposition au VHC (358).

Dans notre étude, l'impact simultané des deux réponses immunitaires (i.e. cellulaire et humorale) sur la séquence virale infectante n'a pas été caractérisée. Toutefois, une étude élégante de Kinchen et al. a démontré la capacité des bnAbs à induire une pression immunitaire conduisant à des mutations au sein du site de liaison CD81 de la glycoprotéine E2 tôt au cours de l'infection (344). Ces bnAbs ont entraîné la sélection de virions à la capacité répliquative déficiente et ne présentant pas de mutations compensatoires, conduisant ainsi à une élimination spontanée de l'infection primaire par le VHC (344). De plus, Gu *et al.* ont démontré qu'une mutation au niveau du résidu N415 situé au niveau du domaine E provoque un changement global dans la structure de gpE2 qui augmente sa vulnérabilité à la neutralisation par d'autres nAbs (345). Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse que les réponses immunitaires cellulaires et humorales jouent un rôle-clé dans l'élimination de la réinfection par le VHC.

5.2.5. Limitations de l'étude

La cohorte hépatite HEPCO représente une opportunité unique d'étudier la réponse immunitaire au cours de la réinfection par le VHC (420). Néanmoins, notre étude, comme toute approche expérimentale, présente plusieurs limitations. HEPCO collecte des échantillons sanguins tous les trois mois après la clairance spontanée d'une première infection. Une réinfection est définie par la présence d'ARN viral après deux tests négatifs, et ce, afin d'exclure la possibilité d'une rechute de la première infection.

La réinfection par le VHC étant caractérisée par une durée et une ampleur réduites de la virémie (262), il est donc parfois possible de manquer des épisodes de réinfections qui sont rapidement éliminés entre deux prises de sang, comme cela pourrait être le cas du sujet SR3. Des intervalles de test d'ARN viral supérieurs à un mois empêchent la détection de 100% des cas de réinfection (419). Toutefois, notre approche (i.e. tous les trois mois) représente une probabilité de détecter 65% des épisodes de réinfection (60) et c'est donc un bon compromis entre la probabilité de détecter 100% des épisodes infectieux et le coût ainsi que la logistique associée à l'acquisition et à la conservation des échantillons de PBMC et de plasma.

De plus, tout comme la première infection par le VHC, l'impossibilité de déterminer la date exacte de début de la réinfection constitue une autre limitation de notre approche. En effet, nous estimons la date de réinfection comme étant la médiane entre le dernier test négatif et le premier test positif. Les temps longitudinaux post-réinfection sont donc tous différents pour chaque sujet. Cette approche limite également la comparaison des signatures transcriptomiques avec celles obtenues après vaccination (Chapitre 4 - Figure 2). Pour les mêmes raisons, il est également possible de ne pas avoir de temps ARN viral positif au cours de la phase aigüe précoce, comme c'est le cas du sujet SR2.

HEPCO fait le suivi de personnes UDI qui constituent une population marginalisée, très souvent sans domicile fixe, rendant leur suivi parfois difficile (Voir section 1.4.2.3.). Cela conduit dans certains cas à une interruption du suivi dû à une incapacité de contacter le participant ou dû à un comportement inadéquat et dangereux, comme ce fut le cas du sujet SR7 pour lequel nous n'avons pas de temps post-clairance de la réinfection (i.e. *Follow-up*).

Nous travaillons également avec une quantité d'échantillons de PBMC par sujets restreinte, limitant le nombre de paramètres que nous pouvons tester. En effet, dû à un nombre limité d'échantillons, nous n'avons pas pu évaluer la fréquence des LBM spécifiques de gpE2 pré-réinfection chez le sujet SR8 (Chapitre 4 - Figure 3).

Certaines limitations techniques existent également. En effet, il existe un nombre restreint de tétramères CMH de classe I disponibles pour chaque molécule HLA exprimée par les sujets de notre étude. Aucun tétramère n'a été disponible pour les sujets SR1 et SR3. Afin de contourner cette limitation, nous avons opté pour une approche ELISPOT, et ce, afin d'évaluer les réponses des lymphocytes T spécifiques du VHC (Chapitre 4 - Figure 4).

De plus, nous avons évalué la neutralisation des anticorps grâce à l'utilisation des VHCpp exprimant les gpE1|E2 de génotypes 1a, 2a et 3a, représentant les génotypes prévalents en Amérique du Nord (Voir section 1.2.1.). Dans ce système, l'association des virions avec les lipoprotéines n'est pas reproduite, et par conséquent, les VHCpp ont tendance à être plus sensibles à la neutralisation par les anticorps que le système VHCcc (376, 538) (Voir section 1.4.1.2. et 1.4.1.3.).

5.3. Importance de nos études

Une meilleure compréhension des corrélats de l'immunité protectrice est cruciale pour le développement d'un vaccin pan-génotypique efficace contre l'établissement d'une infection chronique par le VHC. Le suivi longitudinal de multiples infections naturelles chez les UDI (HEPCO) permet de déterminer les corrélats de l'immunité protectrice aux niveaux transcriptomique, clonotypique et fonctionnel qui pourront être suivis lors de nouveaux essais vaccinaux afin de déterminer le degré de protection qu'ils confèrent.

5.3.1. Rôle de la réponse humorale versus cellulaire dans le contrôle de l'infection primaire et secondaire par le VHC

Plusieurs études suggèrent que les nAbs sont associés à la clairance spontanée de l'infection primaire par le VHC (261, 262, 341-344). Toutefois, plusieurs études ont rapporté une clairance spontanée de l'infection en l'absence ou en présence de titre faible de nAbs, suggérant que la réponse humorale n'est pas le principal déterminant de la clairance virale (337-339) (voir section 1.6.3.). Les sujets développant une immunité humorale présentent des LBM exprimant des nAbs cross-réactifs détectables dans le sang périphérique jusqu'à 25 ans après la clairance spontanée d'une primo-infection par le VHC (358, 425). Néanmoins, notre étude (Chapitre 4), et d'autres (358, 416), démontrent que la présence de nAbs ne permet pas de prévenir l'établissement d'une réinfection par le VHC. Après réexposition virale, nous avons observé un pic des titres d'anticorps anti-E2, ainsi que de la capacité de neutralisation des anticorps contre les VHCpp de génotype 1a, au cours de la phase aigüe précoce, rapidement suivi d'une diminution après le contrôle de la virémie auprès de 6 des 8 sujets étudiés (Figure 2 – Chapitre 4). Osburn et al. avaient auparavant associé l'élimination spontanée des réinfections par le VHC à la génération de nAb dans 60% des cas (416). De plus, Merat *et al.* ont démontré la présence de bnAbs chez des sujets capables d'éliminer spontanément plusieurs infections par le VHC (358). L'ensemble de ces études suggère que les LBM exprimant des nAbs développés après clairance de la primo-infection contribueraient à la prévention de l'établissement d'une infection chronique après réexposition virale. Osburn et al. ont toutefois observé la présence de nAbs chez deux sujets ayant développé une infection chronique après réinfection (416).

Il est donc crucial de déterminer la cinétique des LBM spécifiques de gpE2, ainsi que l'étude de l'évolution de la dominance des nAbs, au cours de la réinfection chez les sujets SR versus CI après réinfection. Des études préliminaires ont été réalisées à partir de PBMCs de trois sujets ayant développé une infection chronique après une deuxième (CI2 et CI3) ou troisième infection (CI1) (Figure 14). Ces premiers résultats montrent un niveau faible (CI1), un niveau constant (CI2), ou encore un pic (CI3) de la fréquence des LBM spécifiques de gpE2 et des titres d'anticorps anti-gpE2 au cours de la phase aigüe précoce de la réinfection (Figure 14). Il est toutefois nécessaire d'évaluer la fréquence des LBM E2-tétramères + et de mesurer les titres d'anticorps anti-VHC à partir des échantillons d'un plus grand nombre de sujets CI (voir section **6.1.**).

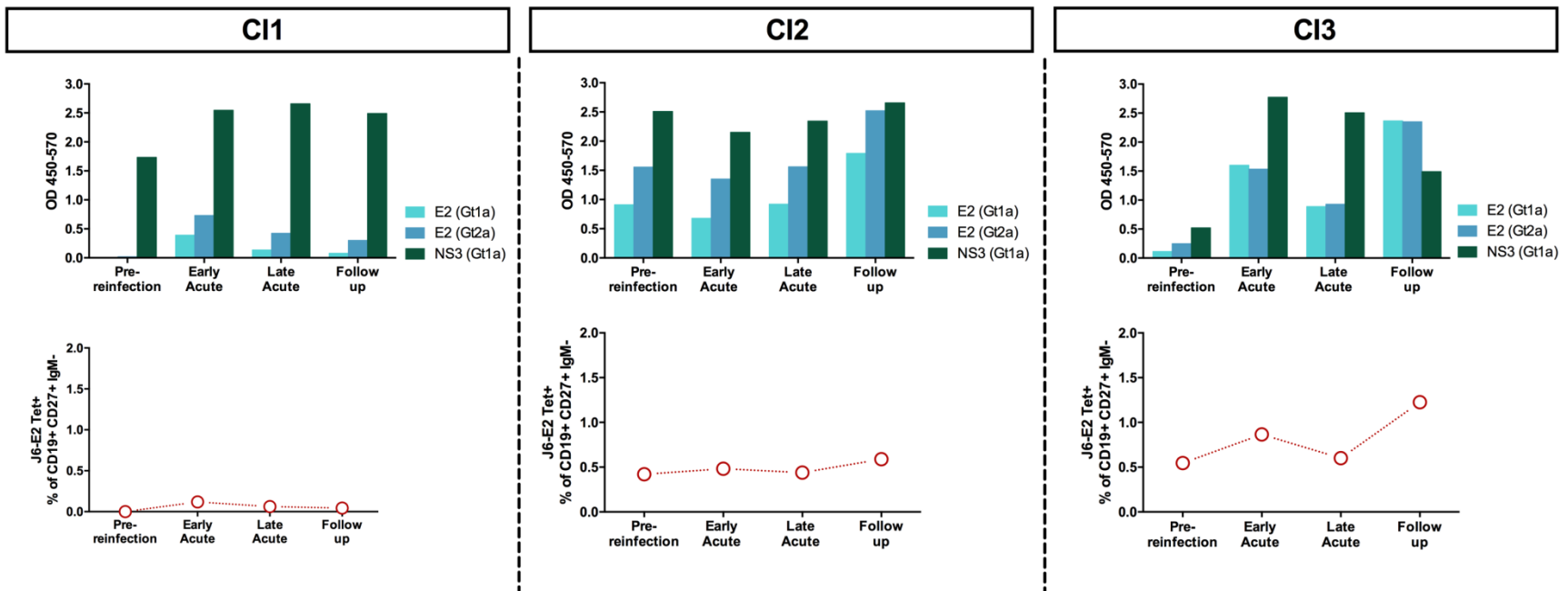


Figure 15 | Caractérisation longitudinale de la fréquence des LBM spécifiques de la glycoprotéine E2 et des titres d'anticorps anti-E2 au cours de la réinfection par le VHC chez trois sujets CI

Les graphiques présentés sur la première ligne combinent les réponses IgG anti-E2 (Gt1a et Gt2a) et NS3 (Gt1a) mesurées par ELISA à partir du plasma et représentées par la densité optique OD450-570nm. Les graphiques du bas affichent les fréquences longitudinales des LBM tétramères J6-E2 +.

5.3.2. Impact de nos études sur le design d'une stratégie vaccinale contre le VHC

Une stratégie vaccinale efficace doit induire une immunité antivirale protectrice similaire à celle observée au cours de la clairance naturelle des infections par le VHC. Nos observations soutiennent la nécessité de combiner deux stratégies vaccinales induisant une immunité à médiation cellulaire large et robuste contre les protéines virales NS et une immunité humorale avec la production de nAbs ciblant les gpE1|E2.

Bien qu'une charge virale moindre ait été mesurée chez les sujets vaccinés en comparaison du groupe placebo après infection, l'échec de l'approche amorce/rappel ChAd3-NS/MVA-NS (gt1b) à prévenir l'établissement d'une infection chronique chez les UDI (Phase II (469)) souligne la nécessité d'optimiser cette stratégie vaccinale. La diversité génétique du VHC, supérieure à celle du VIH, couplée au mécanisme d'évasion immunitaire, représente le principal défi associé au développement d'une stratégie vaccinale efficace.

L'utilisation du vecteur ChAdOx1 exprimant des séquences virales NS hautement conservées entre la majorité des génotypes (gt1-6) du VHC formulés avec l'adjuvant sIi_{tr} a permis de générer une meilleure réponse pan-génotypes des lymphocytes T en comparaison de l'approche ChAdOx1-NS (gt1b) chez le modèle murin (470). Cette approche représente l'avantage d'intégrer les épitopes pour lesquels des mutations d'échappements impacteraient la capacité répliquative du virus. Toutefois, celle-ci n'inclut pas les épitopes immunodominants présentés par HLA-A02 (NS3-1073 et NS3-1406), ni ceux, ou partiellement, présentés par les molécules HLA protectrices, HLA-A03,-B27 et B57 (470, 475). Combiner cette stratégie vaccinale avec une autre qui inclurait ces épitopes immunodominants et protecteurs, telle qu'utilisée dans le cas du VIH (539, 540), permettrait de contourner cette limitation. Des études supplémentaires restent donc nécessaires afin d'optimiser l'ampleur, la largeur et la réactivité croisée des lymphocytes T induits par une stratégie vaccinale à médiation cellulaire.

Une minorité de sujets sains vaccinés avec rgpE1|E2 dérivé d'un isolat de génotype 1a (HCV-1) ont développé des bnAb spécifiques à AR3, démontrant ainsi qu'il est possible d'induire leur production par une approche vaccinale (147, 452, 455).

Les équipes des Drs. Bull et Bailey ont défini les profils d'immunodominance au cours des infections primaires par le VHC et ont démontré une association entre une plus grande neutralisation du plasma et le ciblage des sites AR3 et AR4, tandis qu'une plus faible neutralisation est associée au ciblage des sites non-neutralisants (domaine A et AR1) de gpE2 (356, 541, 542). Ces premières études suggèrent qu'une stratégie vaccinale masquant les régions non-neutralisantes pourrait permettre de potentialiser la production de bnAbs contre les sites AR3 et AR4 (356, 541, 542). L'étude de l'évolution de la dominance des nAbs au cours de la phase aiguë des infections consécutives par des souches homologues et hétérologues sera essentielle pour confirmer cette hypothèse. Cela permettra également de déterminer le meilleur variant antigénique pour une induction de bnAbs optimale. De plus, l'importance de la réponse humorale au cours de la réinfection reflète la nécessité d'étudier la cinétique et le phénotype des cT_{FH} spécifiques du VHC (voir section 6.2.). Ces études dans l'ensemble permettront de définir *in fine* quelle sera la meilleure approche vaccinale (e.g. vecteur viraux, vaccin à ADN ou mRNA etc...) incluant le meilleur adjuvant (e.g. MF59, TLR etc...) et route de vaccination (e.g. injection par voie intramusculaire, sous-cutanée, intradermique etc...) qui potentialisera la production de bnAbs.

5.3.3. Évaluation de l'efficacité des stratégies vaccinales contre le VHC

Dans nos études, nous avons souhaité maximiser l'utilisation des bases de données publiques afin **1**) d'identifier les potentiels clonotypes cross-réactifs (Manuscrit 1 – Chapitre 3), et **2**) de caractériser les signatures transcriptomiques en commun entre une stratégie vaccinale et l'élimination spontanée des infections primaire et secondaire par le VHC (Manuscrit 2 – Chapitre 4). Dans l'ensemble, nos données contribuent également à ces ressources.

En effet, au fur et à mesure que davantage de séquences TCR β sont identifiées et conservées dans ces bases de données, elles peuvent être utilisées pour prédire les spécificités des lymphocytes T expansés au cours des infections par le VHC ou après vaccination.

Ces données peuvent également être utilisées afin d'améliorer le développement d'algorithmes permettant d'identifier les clonotypes de TCR spécifiques du VHC. En effet, Glanville et al. ont développé un algorithme appelé GLIPH (de l'anglais, *grouping of lymphocyte interactions by paratope hotspots*) grâce à l'utilisation des bases de données publiques. Cet algorithme regroupe les TCR présentant une forte probabilité de partager la même spécificité antigénique en raison à la fois des motifs conservés et de la similarité globale des séquences CDR3 (543). Nos données, ainsi que l'utilisation de ce type d'algorithme, ont toutes leur importance dans l'étude des répertoires des TCR β après les essais vaccinaux contre le VHC. En effet, Pogorelly et al. ont utilisé avec succès des séquences CDR3 publiées avec une spécificité connue (i.e. des cellules CMH de classe I tétramères +) pour l'annotation du répertoire TCR β obtenu à partir des CD8 totaux chez deux sujets ayant reçu une dose unique de vaccin contre la fièvre jaune (YF-17D) (544).

Nos données obtenues à partir des PBMC totaux permettront également de déterminer la capacité des essais vaccinaux à induire une réponse immunitaire similaire à une élimination spontanée des infections primaires et secondaires naturelles par le VHC au niveau transcriptomique. Toutefois, l'analyse transcriptomique des données obtenues à partir d'échantillons PBMCs totaux provenant de deux cohortes différentes (UDI *versus* sujets sains), ainsi que des temps post-infection et vaccination différents limitent nos comparaisons et l'identification de signatures précises en communs ou inversement, manquantes. L'utilisation d'une approche similaire à partir des échantillons de la phase II d'essai vaccinale du VHC permettrait

1) de confirmer les signatures manquantes (i.e. signatures plasmocytaires) observées chez les sujets sains (Phase I),

2) de mieux définir les différences entre les réponses immunitaires post-vaccination et post-résolution spontanée de multiples infections chez une même population (i.e. UDIs),

3) de comparer et définir au niveau transcriptomique les différences entre les réponses immunitaires pré et post-vaccination chez les sujets sains (Phase I) versus UDIs (Phase II).

Dans l'ensemble, ces analyses transcriptomiques pourraient permettre de mieux comprendre l'échec de cette stratégie vaccinale chez les UDI, ainsi que le possible impact de la prise de drogue par injection sur la réponse immunitaire en réponse au vaccin.

5.3.4. Conclusions

Dans l'ensemble, nos études ont permis d'approfondir nos connaissances sur les corrélats de l'immunité protectrice au niveau transcriptomique, clonotypique et fonctionnel au cours de multiples infections naturelles par le VHC.

Ces approches expérimentales nous ont permis d'identifier treize nouveaux clonotypes publics uniques expansés au cours d'une primo-infection indépendamment de l'issue de l'infection. Nous avons également pu déterminer que la présence d'un pool de lymphocytes T CD8 cross-réactifs joue un rôle limité dans le développement de l'infection primaire par le VHC. Au cours de la réinfection, nous avons observé une augmentation simultanée des réponses B et T mémoires spécifiques du VHC au stade aigu précoce aux niveaux transcriptomique et fonctionnel, suggérant un rôle collaboratif de la réponse immunitaire cellulaire et humorale dans la clairance de la réinfection par le VHC. Nos résultats soutiennent l'idée de combiner deux stratégies vaccinales induisant à la fois une immunité à médiation cellulaire et une immunité humorale, et ce, afin de reproduire les réponses immunitaires observées dans les cas réels de clairance de la réinfection du VHC.

Toutefois une caractérisation plus approfondie de la réponse B, T CD4 et T CD8 spécifique du VHC au cours de multiples infections reste nécessaire pour l'optimisation d'une stratégie vaccinale qui potentialisera l'induction d'une réponse mémoire T et B au répertoire, phénotype et fonctionnalité qui confèrera une immunité protectrice lors de l'exposition naturelle à différents variants du VHC.

Chapitre 6 | Perspectives

6.1. Caractérisation longitudinale de la réponse humorale chez les sujets développant une infection chronique après réinfection

Notre étude a démontré la présence d'un pic simultané de la réponse cellulaire et humorale spécifique du VHC au cours de la phase aiguë précoce chez les sujets ayant résolu deux infections consécutives. Notre étude, ainsi que celles publiées par Osburn *et al.* (416) et Merat *et al.* (358), dans l'ensemble suggèrent que l'élimination d'une réinfection par le VHC est caractérisée par la production de nAbs par les LBM et que ces derniers pourraient contribuer à la prévention de l'établissement d'une infection chronique après réexposition virale. Néanmoins, la présence de nAbs détectés à partir du plasma de deux sujets ayant développé une infection chronique après réinfection a été également reporté par Osburn *et al.* (416). Il est donc crucial de caractériser la cinétique de la réponse humorale spécifique du VHC au cours de la réinfection chez les sujets CI après réinfection. Des études préliminaires à partir d'un nombre limité de sujets ont démontré un niveau faible (CI1), constant (CI2), ou encore un pic (CI3) de la fréquence des LBM spécifiques de gpE2 et des titres d'anticorps anti-gpE2 au cours de la phase aiguë précoce de la réinfection (**Figure 14**). Toutefois la fréquence des LBM E2-tétramères + et les titres d'anticorps anti-VHC seront déterminés à partir des échantillons d'un plus grand nombre de sujets CI. La capacité de neutralisation des anticorps des sujets SR *versus* CI sera également évaluée grâce à l'utilisation d'une librairie de référence récemment développée par le laboratoire du Dr. Bailey et composée de 19 VHCpp de gt1a à gt6a (363). Ces premiers résultats permettront d'évaluer les différences entre les sujets SR *versus* CI au cours de la réinfection par le VHC.

6.2. Caractérisation de la cinétique, du phénotype et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC au cours de la réinfection chez les sujets SR versus CI

Les lymphocytes T CD4 ont un rôle crucial dans la régulation des lymphocytes T CD8 (voir section 1.6.2.2.1.) et de la réponse humorale (voir section 1.6.2.2.2.).

La caractérisation du rôle des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC au cours de la réinfection chez les sujets SR *versus* CI reste peu explorée à ce jour. Grâce à l'utilisation des tétramères CMH de classe II, Chen *et al.* ont observé une prolifération limitée et une disparition précoce des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC au cours de l'établissement d'une infection chronique après une primo-infection (250). Néanmoins, une fréquence très faible des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC au cours de l'infection, ainsi qu'une faible affinité entre les TCR $\alpha\beta$ et les complexes p-CMH-II, rendent l'utilisation des tétramères CMH de classe II pour la caractérisation directe *ex vivo* des T CD4 spécifiques du VHC ardue (545). Afin de contourner cette limitation, une approche permettant la détection de lymphocytes exprimant les marqueurs de surface induits par l'activation ou AIM (de l'anglais, « *activation-induced markers* ») sera utilisée par le laboratoire afin de détecter et de déterminer le phénotype des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques du VHC en réponse à différents pools de peptides du VHC. Cette approche précédemment utilisée dans les cas d'infection par le VIH, repose sur l'identification des marqueurs de surfaces CD69, PD-L1 et 4-1BB (546). Tel que précédemment reporté par Niessl *et al.* (547), l'utilisation des marqueurs CD69, CD40L et CXCR5 permet la détection des cT_{FH} spécifiques de l'antigène viral, et les marqueurs CCR6 et CXCR3 de déterminer leur lignée (voir section 1.6.2.2.2.). Cette même approche couplée à la détection des cytokines intracellulaires permettra également de déterminer la fonctionnalité des T CD8 et CD4 spécifiques du VHC (547). Cette approche présente également l'avantage de permettre l'étude de la polyfonctionnalité des T CD8 spécifiques du VHC à partir de PBMCs de sujets pour lesquels aucun tétramère n'est disponible, comme dans le cas des sujets SR1 et SR3 (Manuscrit 2 - Chapitre 4).

Dans l'ensemble, les objectifs 6.1. et 6.2. permettront d'approfondir nos connaissances sur les corrélats de l'immunité protectrice via la caractérisation de la réponse cellulaire et humorale spécifique du VHC au niveau phénotypique et fonctionnel chez les sujets SR *versus* CI après réexposition virale.

6.3. Caractérisation des corrélats de l'immunité protectrice au niveau transcriptomique par une approche sc-RNA-seq

L'utilisation d'une approche transcriptomique à partir de lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC a permis d'identifier une dérégulation des processus métaboliques au cours de la phase aigüe de la primo-infection chez les sujets CI *versus* SR (205). Cette étude par Wolski et al. a démontré que l'approche transcriptomique représente une opportunité unique de pouvoir détecter les dérégulations et différences au niveau transcriptomique apparaissant tôt au cours de l'infection. L'étude simultanée des signatures transcriptomiques et des répertoires de TCR | BCR des lymphocytes T CD8, CD4 et B spécifiques du VHC pré- et post-réinfection chez les sujets capables d'éliminer spontanément deux infections consécutives *versus* ceux développant une infection chronique après réexposition virale par une approche de séquençage unicellulaire (sc-RNAseq) restent non explorées. Dugan *et al.* ont récemment utilisé avec succès une approche de sc-RNAseq pour l'étude de l'évolution de la dominance des LBM spécifiques de SARS-CoV-2 (548). Une approche similaire à partir des LBM spécifiques de gpE2 couplés au sc-RNAseq des cT_{FH} spécifiques du VHC détecté par une approche de AIM assay (section 6.1. et 6.2.) chez les sujets SR *versus* CI après réinfection permettra d'accroître nos connaissances sur les corrélats de l'immunité protectrice cruciaux pour le développement d'une stratégie vaccinale à médiation cellulaire et humorale efficace.

6.4. Séquençage du génome viral

Notre laboratoire a précédemment démontré la présence de variants viraux non reconnus par les lymphocytes T mémoires spécifiques du VHC chez les sujets développant une infection chronique après réinfection (423). Nous avons également observé une expansion limitée du clonotype public 2 spécifique de l'épitope NS3-1073 chez le sujet SR/CI-2 au cours de la réinfection (voir section 5.1.3.; Chapitre 2 – Figure 4A).

Toutefois, le séquençage du génome viral complet, ou des épitopes viraux ciblés dans les cas où la charge virale serait trop faible, reste nécessaire afin d'élucider l'interaction entre le répertoire des TCR et BCR des lymphocytes T et B spécifiques du VHC et les signatures transcriptomiques correspondantes étudiées en section 6.3., avec les variant viraux de la souche infectante et ceux émergents au cours de l'infection.

6.5. Caractérisation approfondie de la restauration immunitaire adaptative spécifique du VHC après le traitement par les AADs

La vaccination des sujets guéris par les AAD représente un défi supplémentaire associé au développement d'une stratégie vaccinale efficace contre le VHC. En effet, les lymphocytes T CD8 spécifiques du VHC ont été exposés à leur antigène cible pendant une période prolongée résultant en une fonctionnalité altérée et le maintien d'une population CD8-ML spécifique du VHC présentant une cicatrice épigénétique après élimination de l'infection par les AAD (505-507). Si une telle cicatrice épigénétique est présente auprès des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC après traitement par les AAD reste non étudié à ce jour. Une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques du VHC circulants au profil phénotypique et transcriptomique associé aux T_{FH} après l'initiation du traitement par les AAD a été reportée par Smits et al. (549). Zoldan *et al.* ont récemment démontré grâce à une approche *in vitro* la capacité des cT_{FH} spécifiques du VHC au profil T_{H1} à soutenir la production d'anticorps par les lymphocytes B après traitement par les AAD (550). Bien qu'encore peu étudié, ces premières études suggèrent que les T_{FH} représentent une population-cible importante dans le cadre d'une stratégie vaccinale efficace à la fois chez les sujets séronégatifs et ceux guéris par les AAD. Par conséquent, la caractérisation approfondie au niveau phénotypique, fonctionnel et transcriptomique des lymphocytes T CD4 et B spécifiques du VHC pré- et post-traitement en comparaison des sujets ayant résolu spontanément deux infections consécutives tels que décrits en section 6.1., 6.2. et 6.3. est cruciale.

6.6. Conclusions finales

Malgré l'introduction des AADs en 2011, le risque de transmission élevé associé au sous-diagnostic considérable du VHC représente un frein majeur pour l'élimination globale de l'épidémie. Le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC reste crucial afin de freiner efficacement cette épidémie. Une connaissance limitée des corrélats de l'immunité protectrice au cours de multiples infections par le VHC constitue le principal défi associé au développement d'un vaccin efficace. Les travaux de recherches exposés dans la présente thèse constituent une avancée importante dans la compréhension des corrélats de l'immunité protectrice au niveau transcriptomique, phénotypique et fonctionnel associée à l'élimination spontanée de multiples infections par le VHC. Dans l'ensemble, ces recherches auront une importance pour le développement et l'évaluation de l'efficacité des stratégies vaccinales contre le VHC.

Chapitre 7 | Références

1. S. M. Feinstone, A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, P. V. Holland, Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767-770 (1975).
2. Q. L. Choo *et al.*, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362 (1989).
3. G. Kuo *et al.*, An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**, 362-364 (1989).
4. J. G. Donahue *et al.*, The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **327**, 369-373 (1992).
5. WHO., Global hepatitis report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017.
6. WHO., Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. Geneva: World Health Organization, 2016.
7. C. W. Spearman, G. M. Dusheiko, M. Hellard, M. Sonderup, Hepatitis C. *Lancet* **394**, 1451-1466 (2019).
8. S. Urbani *et al.*, PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* **80**, 11398-11403 (2006).
9. J. P. Messina *et al.*, Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **61**, 77-87 (2015).
10. B. Hajarizadeh, J. Grebely, G. J. Dore, Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 553-562 (2013).
11. S. Lanini, P. J. Easterbrook, A. Zumla, G. Ippolito, Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. *Clin Microbiol Infect* **22**, 833-838 (2016).
12. S. P. Kouyoumjian, H. Chemaitelly, L. J. Abu-Raddad, Characterizing hepatitis C virus epidemiology in Egypt: systematic reviews, meta-analyses, and meta-regressions. *Sci Rep* **8**, 1661 (2018).
13. A. G. Lim *et al.*, Curbing the hepatitis C virus epidemic in Pakistan: the impact of scaling up treatment and prevention for achieving elimination. *Int J Epidemiol* **47**, 550-560 (2018).
14. D. De Angelis *et al.*, An evidence synthesis approach to estimating Hepatitis C prevalence in England and Wales. *Stat Methods Med Res* **18**, 361-379 (2009).

15. I. T. Williams, B. P. Bell, W. Kuhnert, M. J. Alter, Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006. *Arch Intern Med* **171**, 242-248 (2011).
16. H. X. Wu *et al.*, Enhanced surveillance of newly acquired hepatitis C virus infection in Canada, 1998 to 2004. *Scand J Infect Dis* **38**, 482-489 (2006).
17. A. E. Jordan *et al.*, Prevalence of hepatitis C virus infection among HIV+ men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Int J STD AIDS* **28**, 145-159 (2017).
18. F. Jin, G. V. Matthews, A. E. Grulich, Sexual transmission of hepatitis C virus among gay and bisexual men: a systematic review. *Sex Health* **14**, 28-41 (2017).
19. N. A. Terrault *et al.*, Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology* **57**, 881-889 (2013).
20. L. Benova, Y. A. Mohamoud, C. Calvert, L. J. Abu-Raddad, Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* **59**, 765-773 (2014).
21. M. T. Niu, P. J. Coleman, M. J. Alter, Multicenter study of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients and hemodialysis center staff members. *Am J Kidney Dis* **22**, 568-573 (1993).
22. B. Moazen *et al.*, Prevalence of Drug Injection, Sexual Activity, Tattooing, and Piercing Among Prison Inmates. *Epidemiol Rev* **40**, 58-69 (2018).
23. S. L. Chen, T. R. Morgan, The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* **3**, 47-52 (2006).
24. E. Gupta, M. Bajpai, A. Choudhary, Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci* **8**, 19-25 (2014).
25. I. Bakr *et al.*, Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut* **55**, 1183-1187 (2006).
26. J. Grebely *et al.*, The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* **59**, 109-120 (2014).
27. S. Beinhart *et al.*, A diagnostic score for the prediction of spontaneous resolution of acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **59**, 972-977 (2013).
28. M. H. Heim, 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. *Nat Rev Immunol* **13**, 535-542 (2013).

29. J. D. Scott *et al.*, High rate of spontaneous negativity for hepatitis C virus RNA after establishment of chronic infection in Alaska Natives. *Clin Infect Dis* **42**, 945-952 (2006).
30. H. Watanabe *et al.*, Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: a population-based cohort study. *J Med Virol* **71**, 56-61 (2003).
31. P. Farci *et al.*, Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* **335**, 631-634 (1996).
32. S. Lingala, M. G. Ghany, Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* **44**, 717-734 (2015).
33. H. H. Thein, Q. Yi, G. J. Dore, M. D. Krahn, Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* **48**, 418-431 (2008).
34. F. Kanwal, J. R. Kramer, J. Ilyas, Z. Duan, H. B. El-Serag, HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology* **60**, 98-105 (2014).
35. M. H. Lee *et al.*, HCV Genotype 6 Increased the Risk for Hepatocellular Carcinoma Among Asian Patients With Liver Cirrhosis. *Am J Gastroenterol* **112**, 1111-1119 (2017).
36. K. R. Bhamidimarri, S. K. Satapathy, P. Martin, Hepatitis C Virus and Liver Transplantation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **13**, 214-220 (2017).
37. e. e. e. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol* **66**, 153-194 (2017).
38. A. K. Ara, J. P. Paul, New Direct-Acting Antiviral Therapies for Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **11**, 458-466 (2015).
39. M. P. Manns *et al.*, Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958-965 (2001).
40. M. W. Fried *et al.*, Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**, 975-982 (2002).
41. B. P. Lam, T. Jeffers, Z. Younoszai, Y. Fazel, Z. M. Younossi, The changing landscape of hepatitis C virus therapy: focus on interferon-free treatment. *Therap Adv Gastroenterol* **8**, 298-312 (2015).
42. J. S. Au, P. J. Pockros, Novel therapeutic approaches for hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther* **95**, 78-88 (2014).

43. S. M. Alavian *et al.*, Recommendations for the Clinical Management of Hepatitis C in Iran: A Consensus-Based National Guideline. *Hepat Mon* **16**, e40959 (2016).
44. B. Robertson *et al.*, Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* **143**, 2493-2503 (1998).
45. T. K. Scheel, C. M. Rice, Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* **19**, 837-849 (2013).
46. J. H. Han *et al.*, Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1711-1715 (1991).
47. B. Hoffman, Q. Liu, Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* **31**, 1449-1467 (2011).
48. R. K. Jangra, M. Yi, S. M. Lemon, Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* **84**, 6615-6625 (2010).
49. C. L. Jopling, S. Schutz, P. Sarnow, Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* **4**, 77-85 (2008).
50. A. P. Roberts, A. P. Lewis, C. L. Jopling, miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* **39**, 7716-7729 (2011).
51. Y. Li, T. Masaki, D. Yamane, D. R. McGivern, S. M. Lemon, Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1881-1886 (2013).
52. T. Ito, M. M. Lai, An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* **254**, 288-296 (1999).
53. A. A. Kolykhalov, S. M. Feinstone, C. M. Rice, Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**, 3363-3371 (1996).
54. T. Tanaka, N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, K. Shimotohno, Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307-3312 (1996).
55. M. Irshad, I. Dhar, Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* **15**, 405-416 (2006).
56. T. Suzuki, K. Ishii, H. Aizaki, T. Wakita, Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1200-1212 (2007).

57. C. C. Kao, G. Yi, H. C. Huang, The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Curr Opin Virol* **17**, 66-73 (2016).
58. C. Voisset, J. Dubuisson, Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* **96**, 413-420 (2004).
59. G. Vieyres, J. Dubuisson, T. Pietschmann, Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses* **6**, 1149-1187 (2014).
60. T. Wakita *et al.*, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791-796 (2005).
61. P. Farci *et al.*, Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15394-15399 (1996).
62. D. E. Chandler, F. Penin, K. Schulten, C. Chipot, The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002702 (2012).
63. P. Luik *et al.*, The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12712-12716 (2009).
64. A. L. Wozniak *et al.*, Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* **6**, e1001087 (2010).
65. M. Hijikata *et al.*, Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* **67**, 4665-4675 (1993).
66. I. C. Lorenz, J. Marcotrigiano, T. G. Dentzer, C. M. Rice, Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831-835 (2006).
67. V. Madan, R. Bartenschlager, Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. *Viruses* **7**, 4461-4481 (2015).
68. C. I. Popescu *et al.*, NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278 (2011).
69. R. Bartenschlager, V. Lohmann, T. Wilkinson, J. O. Koch, Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* **69**, 7519-7528 (1995).
70. N. Yao, P. Reichert, S. S. Taremi, W. W. Prosser, P. C. Weber, Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* **7**, 1353-1363 (1999).

71. A. D. Kwong, J. L. Kim, C. Lin, Structure and function of hepatitis C virus NS3 helicase. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**, 171-196 (2000).
72. K. Morikawa *et al.*, Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* **18**, 305-315 (2011).
73. T. Phan, A. Kohlway, P. Dimberu, A. M. Pyle, B. D. Lindenbach, The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J Virol* **85**, 1193-1204 (2011).
74. D. Egger *et al.*, Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-5984 (2002).
75. L. Gao, H. Aizaki, J. W. He, M. M. Lai, Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78**, 3480-3488 (2004).
76. D. M. Jones, A. H. Patel, P. Targett-Adams, J. McLauchlan, The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol* **83**, 2163-2177 (2009).
77. S. Li *et al.*, Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* **391**, 257-264 (2009).
78. P. Zhao *et al.*, HCV NS4B induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Virus Res* **169**, 1-7 (2012).
79. V. Brass *et al.*, An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130-8139 (2002).
80. K. J. Blight, A. A. Kolykhalov, C. M. Rice, Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972-1974 (2000).
81. N. Krieger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* **75**, 4614-4624 (2001).
82. V. Lohmann, F. Korner, A. Dobierzewska, R. Bartenschlager, Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* **75**, 1437-1449 (2001).
83. Y. Shirota *et al.*, Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* **277**, 11149-11155 (2002).
84. J. Dubuisson, F. L. Cosset, Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol* **61**, S3-S13 (2014).

85. M. Lefevre, D. J. Felmlee, M. Parnot, T. F. Baumert, C. Schuster, Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* **9**, e95550 (2014).
86. M. T. Wong, S. S. Chen, Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell Mol Immunol* **13**, 11-35 (2016).
87. L. Kong *et al.*, Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **342**, 1090-1094 (2013).
88. J. Lupberger *et al.*, EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**, 589-595 (2011).
89. A. Ploss *et al.*, Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882-886 (2009).
90. C. M. Spahn *et al.*, Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* **291**, 1959-1962 (2001).
91. D. Moradpour, F. Penin, C. M. Rice, Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-463 (2007).
92. V. Lohmann, Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 167-198 (2013).
93. B. D. Lindenbach, Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 199-218 (2013).
94. Y. Miyanari *et al.*, The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089-1097 (2007).
95. S. M. Borgia *et al.*, Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis* **218**, 1722-1729 (2018).
96. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).
97. D. B. Smith *et al.*, Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318-327 (2014).
98. M. Martell *et al.*, Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **66**, 3225-3229 (1992).
99. A. U. Neumann *et al.*, Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-107 (1998).

100. P. Farci *et al.*, The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 339-344 (2000).
101. Y. Kai *et al.*, Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment. *Sci Rep* **7**, 41660 (2017).
102. V. Lohmann *et al.*, Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113 (1999).
103. H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, J. Sato, Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**, 3858-3863 (1982).
104. E. Foy *et al.*, Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**, 1145-1148 (2003).
105. E. Meylan *et al.*, Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172 (2005).
106. I. Woerz, V. Lohmann, and R. Bartenschlager, Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business? . *J. Viral Hepatitis*, 1-9 (2009).
107. R. Bartenschlager, V. Lohmann, F. Penin, The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* **11**, 482-496 (2013).
108. M. Hsu *et al.*, Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7271-7276 (2003).
109. B. Bartosch, J. Dubuisson, F. L. Cosset, Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633-642 (2003).
110. H. E. Drummer, A. Maerz, P. Poubourios, Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **546**, 385-390 (2003).
111. T. L. Tellinghuisen, M. J. Evans, T. von Hahn, S. You, C. M. Rice, Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* **81**, 8853-8867 (2007).
112. B. D. Lindenbach *et al.*, Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626 (2005).
113. T. Pietschmann *et al.*, Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7408-7413 (2006).

114. T. Kato *et al.*, Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808-1817 (2003).
115. J. M. Gottwein *et al.*, Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**, 364-377 (2009).
116. T. H. Carlsen *et al.*, Breadth of neutralization and synergy of clinically relevant human monoclonal antibodies against HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, and 3a. *Hepatology* **60**, 1551-1562 (2014).
117. P. Meuleman *et al.*, Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* **41**, 847-856 (2005).
118. D. F. Mercer *et al.*, Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**, 927-933 (2001).
119. J. Chen *et al.*, Persistent hepatitis C virus infections and hepatopathological manifestations in immune-competent humanized mice. *Cell Res* **24**, 1050-1066 (2014).
120. Q. Ding *et al.*, Mice Expressing Minimally Humanized CD81 and Occludin Genes Support Hepatitis C Virus Uptake In Vivo. *J Virol* **91**, (2017).
121. K. S. M. Yong, Z. Her, Q. Chen, Humanized Mouse Models for the Study of Hepatitis C and Host Interactions. *Cells* **8**, (2019).
122. E. Billerbeck, Y. de Jong, M. Dorner, C. de la Fuente, A. Ploss, Animal models for hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 49-86 (2013).
123. T. K. Scheel, P. Simmonds, A. Kapoor, Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Res* **115**, 83-93 (2015).
124. C. Firth *et al.*, Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* **5**, e01933-01914 (2014).
125. P. Klenerman, E. J. Barnes, Immunology taught by rats. *Science* **357**, 129-130 (2017).
126. E. Billerbeck *et al.*, Mouse models of acute and chronic hepacivirus infection. *Science* **357**, 204-208 (2017).
127. S. Trivedi *et al.*, Viral persistence, liver disease, and host response in a hepatitis C-like virus rat model. *Hepatology* **68**, 435-448 (2018).
128. E. Atcheson *et al.*, Use of an Outbred Rat Hepacivirus Challenge Model for Design and Evaluation of Efficacy of Different Immunization Strategies for Hepatitis C Virus. *Hepatology* **71**, 794-807 (2020).

129. A. S. Hartlage, P. Dravid, C. M. Walker, A. Kapoor, Adenovirus-vectored T cell vaccine for hepacivirus shows reduced effectiveness against a CD8 T cell escape variant in rats. *PLoS Pathog* **17**, e1009391 (2021).
130. R. E. Lanford, C. Bigger, S. Bassett, G. Klimpel, The chimpanzee model of hepatitis C virus infections. *ILAR J* **42**, 117-126 (2001).
131. E. Muchmore, H. Popper, D. A. Peterson, M. F. Miller, H. M. Lieberman, Non-A, non-B hepatitis-related hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *J Med Primatol* **17**, 235-246 (1988).
132. Y. K. Shimizu *et al.*, Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6441-6444 (1990).
133. S. Cooper *et al.*, Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**, 439-449 (1999).
134. A. Grakoui *et al.*, HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659-662 (2003).
135. N. H. Shoukry *et al.*, Memory CD8⁺ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **197**, 1645-1655 (2003).
136. N. H. Shoukry, J. Sidney, A. Sette, C. M. Walker, Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J Immunol* **172**, 483-492 (2004).
137. Y. Choi, H. P. Dienes, K. Krawczynski, Kinetics of miR-122 expression in the liver during acute HCV infection. *PLoS One* **8**, e76501 (2013).
138. Y. H. Choi, N. Jin, F. Kelly, S. K. Sakthivel, T. Yu, Elevation of Alanine Aminotransferase Activity Occurs after Activation of the Cell-Death Signaling Initiated by Pattern-Recognition Receptors but before Activation of Cytolytic Effectors in NK or CD8⁺ T Cells in the Liver During Acute HCV Infection. *PLoS One* **11**, e0165533 (2016).
139. T. J. Morin *et al.*, Human monoclonal antibody HCV1 effectively prevents and treats HCV infection in chimpanzees. *PLoS Pathog* **8**, e1002895 (2012).
140. C. A. Coburn *et al.*, Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity. *ChemMedChem* **8**, 1930-1940 (2013).
141. S. S. Carroll *et al.*, Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 926-934 (2009).
142. D. B. Olsen *et al.*, Sustained viral response in a hepatitis C virus-infected chimpanzee via a combination of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 937-939 (2011).

143. A. Folgori *et al.*, A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* **12**, 190-197 (2006).
144. J. Bukh, X. Forns, S. U. Emerson, R. H. Purcell, Studies of hepatitis C virus in chimpanzees and their importance for vaccine development. *Intervirology* **44**, 132-142 (2001).
145. I. o. M. U. a. N. R. C. (US). Committee on the Use of Chimpanzees in Biomedical and Behavioral Research: Assessing the Necessity. . *Washington, DC: National Academies Press* (2011).
146. K. Abe, T. Kurata, Y. Teramoto, J. Shiga, T. Shikata, Lack of susceptibility of various primates and woodchucks to hepatitis C virus. *J Med Primatol* **22**, 433-434 (1993).
147. F. Chen *et al.*, Antibody Responses to Immunization With HCV Envelope Glycoproteins as a Baseline for B-Cell-Based Vaccine Development. *Gastroenterology* **158**, 1058-1071 e1056 (2020).
148. A. Kapoor *et al.*, Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11608-11613 (2011).
149. P. D. Burbelo *et al.*, Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol* **86**, 6171-6178 (2012).
150. T. K. Scheel *et al.*, Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 2192-2197 (2015).
151. S. Pfaender *et al.*, Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology* **61**, 447-459 (2015).
152. B. Tegtmeyer *et al.*, Chronic equine hepacivirus infection in an adult gelding with severe hepatopathy. *Vet Med Sci* **5**, 372-378 (2019).
153. S. Pfaender, R. J. Brown, T. Pietschmann, E. Steinmann, Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg Microbes Infect* **3**, e21 (2014).
154. J. E. Tomlinson *et al.*, Pathogenesis, MicroRNA-122 Gene-Regulation, and Protective Immune Responses After Acute Equine Hepacivirus Infection. *Hepatology*, (2021).
155. A. Takaki *et al.*, Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **6**, 578-582 (2000).
156. S. Urbani *et al.*, Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **201**, 675-680 (2005).

157. J. Grebely *et al.*, Cohort profile: the international collaboration of incident HIV and hepatitis C in injecting cohorts (InC3) study. *Int J Epidemiol* **42**, 1649-1659 (2013).
158. A. L. Cox *et al.*, Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. *Gastroenterology* **136**, 26-31 (2009).
159. B. R. Edlin *et al.*, More rare birds, and the occasional swan. *Gastroenterology* **136**, 2412-2414 (2009).
160. A. L. Cox, D. L. Thomas, Hepatitis C virus vaccines among people who inject drugs. *Clin Infect Dis* **57 Suppl 2**, S46-50 (2013).
161. L. Maher *et al.*, Candidate hepatitis C vaccine trials and people who inject drugs: challenges and opportunities. *Vaccine* **28**, 7273-7278 (2010).
162. E. C. Shin, P. S. Sung, S. H. Park, Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol* **16**, 509-523 (2016).
163. J. Rehwinkel, M. U. Gack, RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* **20**, 537-551 (2020).
164. X. Du *et al.*, Hepatitis C virus replicative double-stranded RNA is a potent interferon inducer that triggers interferon production through MDA5. *J Gen Virol* **97**, 2868-2882 (2016).
165. K. Li *et al.*, Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology* **55**, 666-675 (2012).
166. S. Bender *et al.*, Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog* **11**, e1005264 (2015).
167. J. W. Schoggins *et al.*, A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **472**, 481-485 (2011).
168. P. Bellecave *et al.*, Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* **51**, 1127-1136 (2010).
169. P. S. Sung *et al.*, Roles of unphosphorylated ISGF3 in HCV infection and interferon responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10443-10448 (2015).
170. G. Randall *et al.*, Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **131**, 1584-1591 (2006).
171. X. Zhang *et al.*, Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation. *Nature* **517**, 89-93 (2015).

172. M. T. Dill *et al.*, Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* **140**, 1021-1031 (2011).
173. A. M. Abel, C. Yang, M. S. Thakar, S. Malarkannan, Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* **9**, 1869 (2018).
174. G. F. Njiomegnie *et al.*, Immunomodulation of the Natural Killer Cell Phenotype and Response during HCV Infection. *J Clin Med* **9**, (2020).
175. G. Alter *et al.*, Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* **55**, 278-288 (2011).
176. A. De Maria *et al.*, Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* **37**, 445-455 (2007).
177. J. Nattermann *et al.*, Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* **55**, 869-877 (2006).
178. B. Oliviero *et al.*, Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **137**, 1151-1160, 1160 e1151-1157 (2009).
179. S. Lunemann *et al.*, Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *J Infect Dis* **209**, 1362-1373 (2014).
180. E. Serti *et al.*, Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function. *Gastroenterology* **149**, 190-200 e192 (2015).
181. S. Crotta *et al.*, Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* **195**, 35-41 (2002).
182. K. Shortman, Y. J. Liu, Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-161 (2002).
183. K. Takahashi *et al.*, Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7431-7436 (2010).
184. M. Dreux *et al.*, Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* **12**, 558-570 (2012).
185. S. Pelletier *et al.*, Sustained hyperresponsiveness of dendritic cells is associated with spontaneous resolution of acute hepatitis C. *J Virol* **87**, 6769-6781 (2013).

186. A. Dolganiuc *et al.*, Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* **177**, 6758-6768 (2006).
187. R. S. Longman, A. H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, M. L. Albert, Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* **192**, 497-503 (2005).
188. A. Dolganiuc, E. Paek, K. Kodys, J. Thomas, G. Szabo, Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* **135**, 2119-2127 (2008).
189. E. H. Doyle *et al.*, Individual liver plasmacytoid dendritic cells are capable of producing IFNalpha and multiple additional cytokines during chronic HCV infection. *PLoS Pathog* **15**, e1007935 (2019).
190. D. Ge *et al.*, Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399-401 (2009).
191. D. L. Thomas *et al.*, Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798-801 (2009).
192. L. Prokunina-Olsson *et al.*, A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* **45**, 164-171 (2013).
193. M. Murakawa *et al.*, Impaired induction of interleukin 28B and expression of interferon lambda 4 associated with nonresponse to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* **30**, 1075-1084 (2015).
194. E. Terczynska-Dyla *et al.*, Reduced IFNlambda4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun* **5**, 5699 (2014).
195. S. I. Khakoo *et al.*, HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* **305**, 872-874 (2004).
196. A. K. Moesta *et al.*, Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* **180**, 3969-3979 (2008).
197. M. Depla *et al.*, IFN-lambda3 polymorphism indirectly influences NK cell phenotype and function during acute HCV infection. *Immun Inflamm Dis* **4**, 376-388 (2016).
198. M. K., Janeway's Immunobiology. *Garland Science*, (2012).

199. G. Teng, F. N. Papavasiliou, Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* **41**, 107-120 (2007).
200. A. J. Matthews, S. Zheng, L. J. DiMenna, J. Chaudhuri, Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv Immunol* **122**, 1-57 (2014).
201. J. J. Calis, B. R. Rosenberg, Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol* **35**, 581-590 (2014).
202. R. Thimme *et al.*, Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**, 1395-1406 (2001).
203. V. Kasprovicz *et al.*, High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* **82**, 3154-3160 (2008).
204. F. Lechner *et al.*, Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**, 1499-1512 (2000).
205. D. Wolski *et al.*, Early Transcriptional Divergence Marks Virus-Specific Primary Human CD8(+) T Cells in Chronic versus Acute Infection. *Immunity* **47**, 648-663 e648 (2017).
206. B. Bengsch *et al.*, Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358-373 (2016).
207. D. Wieland *et al.*, TCF1(+) hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat Commun* **8**, 15050 (2017).
208. C. R. Berkers, O. D. Maddocks, E. C. Cheung, I. Mor, K. H. Vousden, Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab* **18**, 617-633 (2013).
209. V. Barili *et al.*, Targeting p53 and histone methyltransferases restores exhausted CD8⁺ T cells in HCV infection. *Nat Commun* **11**, 604 (2020).
210. P. D. Kurktschiev *et al.*, Dysfunctional CD8⁺ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction. *J Exp Med* **211**, 2047-2059 (2014).
211. M. S. Abdel-Hakeem, N. H. Shoukry, Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol* **5**, 274 (2014).
212. D. R. Sen *et al.*, The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* **354**, 1165-1169 (2016).

213. S. H. Park, B. Rehermann, Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity* **40**, 13-24 (2014).
214. J. R. Larrubia *et al.*, Bim-mediated apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway impair reactivity of PD1(+)/CD127(-) HCV-specific CD8(+) cells targeting the virus in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Immunol* **269**, 104-114 (2011).
215. H. Radziewicz *et al.*, Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol* **82**, 9808-9822 (2008).
216. N. Nakamoto *et al.*, Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* **134**, 1927-1937, 1937 e1921-1922 (2008).
217. H. Radziewicz *et al.*, Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* **81**, 2545-2553 (2007).
218. D. L. Barber *et al.*, Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687 (2006).
219. P. K. Gupta *et al.*, CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* **11**, e1005177 (2015).
220. B. Bengsch *et al.*, Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* **6**, e1000947 (2010).
221. M. A. Paley *et al.*, Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* **338**, 1220-1225 (2012).
222. D. T. Utzschneider *et al.*, T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* **45**, 415-427 (2016).
223. V. Kasprovicz *et al.*, Hepatitis C virus (HCV) sequence variation induces an HCV-specific T-cell phenotype analogous to spontaneous resolution. *J Virol* **84**, 1656-1663 (2010).
224. M. J. Fuller *et al.*, Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 15001-15006 (2013).
225. D. Gardiner *et al.*, A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* **8**, e63818 (2013).

226. O. Khan *et al.*, TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211-218 (2019).
227. F. Alfei *et al.*, TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* **571**, 265-269 (2019).
228. A. C. Scott *et al.*, TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270-274 (2019).
229. H. Seo *et al.*, TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8(+) T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 12410-12415 (2019).
230. C. Yao *et al.*, Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8(+) T cell persistence in chronic infection. *Nat Immunol* **20**, 890-901 (2019).
231. V. Venturi, D. A. Price, D. C. Douek, M. P. Davenport, The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* **8**, 231-238 (2008).
232. L. Kjer-Nielsen *et al.*, A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* **18**, 53-64 (2003).
233. E. L. Turnbull *et al.*, HIV-1 epitope-specific CD8+ T cell responses strongly associated with delayed disease progression cross-recognize epitope variants efficiently. *J Immunol* **176**, 6130-6146 (2006).
234. M. Wolfl *et al.*, Hepatitis C virus immune escape via exploitation of a hole in the T cell repertoire. *J Immunol* **181**, 6435-6446 (2008).
235. S. Zhang *et al.*, Frequency, Private Specificity, and Cross-Reactivity of Preexisting Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8+ T Cells in HCV-Seronegative Individuals: Implications for Vaccine Responses. *J Virol* **89**, 8304-8317 (2015).
236. S. L. Tsai *et al.*, Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* **115**, 954-965 (1998).
237. J. J. Miles *et al.*, Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection. *J Immunol* **186**, 901-912 (2011).
238. M. DuPage, J. A. Bluestone, Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 149-163 (2016).
239. M. Matloubian, R. J. Concepcion, R. Ahmed, CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* **68**, 8056-8063 (1994).
240. K. M. Chang *et al.*, Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **33**, 267-276 (2001).

241. H. M. Diepolder *et al.*, Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* **346**, 1006-1007 (1995).
242. G. Missale *et al.*, Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* **98**, 706-714 (1996).
243. R. M. Hoffmann *et al.*, Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* **21**, 632-638 (1995).
244. R. Thimme *et al.*, Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15661-15668 (2002).
245. E. Keoshkerian *et al.*, Hepatitis C-specific effector and regulatory CD4 T-cell responses are associated with the outcomes of primary infection. *J Viral Hepat* **23**, 985-993 (2016).
246. B. Raziorrouh *et al.*, Virus-Specific CD4+ T Cells Have Functional and Phenotypic Characteristics of Follicular T-Helper Cells in Patients With Acute and Chronic HCV Infections. *Gastroenterology* **150**, 696-706 e693 (2016).
247. J. Schulze Zur Wiesch *et al.*, Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med* **209**, 61-75 (2012).
248. A. Ulsenheimer *et al.*, Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **37**, 1189-1198 (2003).
249. C. L. Day *et al.*, Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* **76**, 12584-12595 (2002).
250. D. Y. Chen *et al.*, Hepatitis C virus-specific CD4+ T cell phenotype and function in different infection outcomes. *J Clin Invest* **130**, 768-773 (2020).
251. K. Sugimoto *et al.*, Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* **38**, 1437-1448 (2003).
252. S. Smyk-Pearson *et al.*, Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* **197**, 46-57 (2008).
253. R. Cabrera *et al.*, An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **40**, 1062-1071 (2004).

254. T. Boettler *et al.*, T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* **79**, 7860-7867 (2005).
255. S. M. Ward *et al.*, Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* **47**, 316-324 (2007).
256. M. A. Claassen, R. J. de Knegt, H. W. Tilanus, H. L. Janssen, A. Boonstra, Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol* **52**, 315-321 (2010).
257. J. S. Yi, M. Du, A. J. Zajac, A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* **324**, 1572-1576 (2009).
258. H. Elsaesser, K. Sauer, D. G. Brooks, IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* **324**, 1569-1572 (2009).
259. A. Frohlich *et al.*, IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* **324**, 1576-1580 (2009).
260. H. Kared, T. Fabre, N. Bedard, J. Bruneau, N. H. Shoukry, Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog* **9**, e1003422 (2013).
261. J. M. Pestka *et al.*, Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6025-6030 (2007).
262. W. O. Osburn *et al.*, Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* **59**, 2140-2151 (2014).
263. P. Schaerli *et al.*, CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* **192**, 1553-1562 (2000).
264. C. S. Ma, E. K. Deenick, M. Batten, S. G. Tangye, The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* **209**, 1241-1253 (2012).
265. H. Ueno, J. Banchereau, C. G. Vinuesa, Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol* **16**, 142-152 (2015).
266. M. Locci *et al.*, Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* **39**, 758-769 (2013).
267. A. Heit *et al.*, Vaccination establishes clonal relatives of germinal center T cells in the blood of humans. *J Exp Med* **214**, 2139-2152 (2017).

268. R. Morita *et al.*, Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* **34**, 108-121 (2011).
269. J. Zhang *et al.*, Circulating CXCR3(+) Tfh cells positively correlate with neutralizing antibody responses in HCV-infected patients. *Sci Rep* **9**, 10090 (2019).
270. E. Salinas *et al.*, Early T follicular helper cell activity accelerates hepatitis C virus-specific B cell expansion. *J Clin Invest* **131**, (2021).
271. J. Feng *et al.*, Patients with chronic hepatitis C express a high percentage of CD4(+)CXCR5(+) T follicular helper cells. *J Gastroenterol* **47**, 1048-1056 (2012).
272. M. Spaan *et al.*, CD4+ CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. *J Hepatol* **62**, 303-310 (2015).
273. Z. H. Zhang *et al.*, Interleukin-7 Regulates T Follicular Helper Cell Function in Patients with Chronic Hepatitis C. *Viral Immunol* **31**, 417-425 (2018).
274. S. Crotty, Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* **29**, 621-663 (2011).
275. M. Koutsakos, T. H. O. Nguyen, K. Kedzierska, With a Little Help from T Follicular Helper Friends: Humoral Immunity to Influenza Vaccination. *J Immunol* **202**, 360-367 (2019).
276. M. A. Linterman *et al.*, Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* **17**, 975-982 (2011).
277. D. A. Cobb, O. K. Kim, L. Golden-Mason, H. R. Rosen, Y. S. Hahn, Hepatocyte-derived exosomes promote T follicular regulatory cell expansion during hepatitis C virus infection. *Hepatology* **67**, 71-85 (2018).
278. V. Appay *et al.*, Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* **168**, 5954-5958 (2002).
279. T. Ishikawa *et al.*, Protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *J Virol* **83**, 11777-11783 (2009).
280. L. Hua *et al.*, Cytokine-dependent induction of CD4+ T cells with cytotoxic potential during influenza virus infection. *J Virol* **87**, 11884-11893 (2013).
281. D. M. Brown, S. Lee, L. Garcia-Hernandez Mde, S. L. Swain, Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection. *J Virol* **86**, 6792-6803 (2012).
282. N. Aslan *et al.*, Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J Viral Hepat* **13**, 505-514 (2006).

283. M. Lucas *et al.*, Evidence of CD4(+) T cell-mediated immune pressure on the Hepatitis C virus genome. *Sci Rep* **8**, 7224 (2018).
284. L. B. Dustin, C. M. Rice, Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* **25**, 71-99 (2007).
285. A. L. Erickson *et al.*, The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **15**, 883-895 (2001).
286. J. Timm, C. M. Walker, Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med Microbiol Immunol* **204**, 29-38 (2015).
287. A. L. Cox *et al.*, Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* **201**, 1741-1752 (2005).
288. A. L. Cox *et al.*, Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* **42**, 104-112 (2005).
289. C. Neumann-Haefelin *et al.*, Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **47**, 1824-1836 (2008).
290. J. Soderholm *et al.*, Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* **55**, 266-274 (2006).
291. U. Seifert *et al.*, Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* **114**, 250-259 (2004).
292. J. Timm *et al.*, CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med* **200**, 1593-1604 (2004).
293. A. Walker *et al.*, Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing. *J Virol* **90**, 33-42 (2016).
294. E. Dazert *et al.*, Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *J Clin Invest* **119**, 376-386 (2009).
295. L. Uebelhoer *et al.*, Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness. *PLoS Pathog* **4**, e1000143 (2008).
296. S. Salloum *et al.*, Escape from HLA-B*08-restricted CD8 T cells by hepatitis C virus is associated with fitness costs. *J Virol* **82**, 11803-11812 (2008).

297. K. Fitzmaurice *et al.*, Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection. *Gut* **60**, 1563-1571 (2011).
298. C. Neumann-Haefelin *et al.*, Human leukocyte antigen B27 selects for rare escape mutations that significantly impair hepatitis C virus replication and require compensatory mutations. *Hepatology* **54**, 1157-1166 (2011).
299. C. Oniangue-Ndza *et al.*, Compensatory mutations restore the replication defects caused by cytotoxic T lymphocyte escape mutations in hepatitis C virus polymerase. *J Virol* **85**, 11883-11890 (2011).
300. S. Gaudieri *et al.*, Evidence of viral adaptation to HLA class I-restricted immune pressure in chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* **80**, 11094-11104 (2006).
301. C. M. Lange *et al.*, HLA class I allele associations with HCV genetic variants in patients with chronic HCV genotypes 1a or 1b infection. *J Hepatol* **53**, 1022-1028 (2010).
302. S. Merani *et al.*, Effect of immune pressure on hepatitis C virus evolution: insights from a single-source outbreak. *Hepatology* **53**, 396-405 (2011).
303. A. Rauch *et al.*, Divergent adaptation of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 to human leukocyte antigen-restricted immune pressure. *Hepatology* **50**, 1017-1029 (2009).
304. S. C. Ray *et al.*, Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* **201**, 1753-1759 (2005).
305. M. Ruhl *et al.*, CD8+ T-cell response promotes evolution of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Gastroenterology* **140**, 2064-2073 (2011).
306. J. Timm *et al.*, Human leukocyte antigen-associated sequence polymorphisms in hepatitis C virus reveal reproducible immune responses and constraints on viral evolution. *Hepatology* **46**, 339-349 (2007).
307. C. Neumann-Haefelin *et al.*, Analysis of the evolutionary forces in an immunodominant CD8 epitope in hepatitis C virus at a population level. *J Virol* **82**, 3438-3451 (2008).
308. J. R. Honegger *et al.*, Loss of immune escape mutations during persistent HCV infection in pregnancy enhances replication of vertically transmitted viruses. *Nat Med* **19**, 1529-1533 (2013).
309. S. L. Coss *et al.*, CD4+ T cell restoration and control of hepatitis C virus replication after childbirth. *J Clin Invest* **130**, 748-753 (2020).
310. A. Ciurea *et al.*, CD4+ T-cell-epitope escape mutant virus selected in vivo. *Nat Med* **7**, 795-800 (2001).

311. J. H. Wang, T. J. Layden, D. D. Eckels, Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* **64**, 662-673 (2003).
312. T. von Hahn *et al.*, Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132**, 667-678 (2007).
313. M. Lucas *et al.*, Tracking virus-specific CD4+ T cells during and after acute hepatitis C virus infection. *PLoS One* **2**, e649 (2007).
314. V. M. Fleming, G. Harcourt, E. Barnes, P. Klenerman, Virological footprint of CD4+ T-cell responses during chronic hepatitis C virus infection. *J Gen Virol* **91**, 1396-1406 (2010).
315. M. J. Fuller *et al.*, Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology* **51**, 378-387 (2010).
316. K. Fitzmaurice *et al.*, Additive effects of HLA alleles and innate immune genes determine viral outcome in HCV infection. *Gut* **64**, 813-819 (2015).
317. S. M. McKiernan *et al.*, Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* **40**, 108-114 (2004).
318. S. Ziegler *et al.*, Susceptibility to chronic hepatitis C virus infection is influenced by sequence differences in immunodominant CD8+ T cell epitopes. *J Hepatol* **58**, 24-30 (2013).
319. A. Rauch, S. Gaudieri, C. Thio, P. Y. Bochud, Host genetic determinants of spontaneous hepatitis C clearance. *Pharmacogenomics* **10**, 1819-1837 (2009).
320. A. Y. Kim *et al.*, Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B 57 and preservation of targeted epitopes. *Gastroenterology* **140**, 686-696 e681 (2011).
321. M. H. Kuniholm *et al.*, Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology* **51**, 1514-1522 (2010).
322. M. Ruhl *et al.*, Escape from a dominant HLA-B*15-restricted CD8+ T cell response against hepatitis C virus requires compensatory mutations outside the epitope. *J Virol* **86**, 991-1000 (2012).
323. J. Kemming *et al.*, ERAP1 allotypes shape the epitope repertoire of virus-specific CD8(+) T cell responses in acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **70**, 1072-1081 (2019).

324. C. Neumann-Haefelin *et al.*, Protective effect of human leukocyte antigen B27 in hepatitis C virus infection requires the presence of a genotype-specific immunodominant CD8+ T-cell epitope. *Hepatology* **51**, 54-62 (2010).
325. J. Schmidt *et al.*, Rapid antigen processing and presentation of a protective and immunodominant HLA-B*27-restricted hepatitis C virus-specific CD8+ T-cell epitope. *PLoS Pathog* **8**, e1003042 (2012).
326. C. Neumann-Haefelin *et al.*, Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* **43**, 563-572 (2006).
327. K. Nitschke *et al.*, HLA-B*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J Hepatol* **60**, 22-29 (2014).
328. M. Carrington, B. D. Walker, Immunogenetics of spontaneous control of HIV. *Annu Rev Med* **63**, 131-145 (2012).
329. D. N. Aisyah, L. Shallcross, A. J. Hully, A. O'Brien, A. Hayward, Assessing hepatitis C spontaneous clearance and understanding associated factors-A systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat* **25**, 680-698 (2018).
330. B. Bengsch, R. Thimme, H. E. Blum, Role of host genetic factors in the outcome of hepatitis C virus infection. *Viruses* **1**, 104-125 (2009).
331. M. Thursz, R. Yallop, R. Goldin, C. Trepo, H. C. Thomas, Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* **354**, 2119-2124 (1999).
332. S. Vejbaesya *et al.*, HLA association with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* **61**, 348-353 (2000).
333. B. Rehermann, M. Nascimbeni, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 215-229 (2005).
334. P. Farci *et al.*, Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7792-7796 (1994).
335. S. E. Bassett, D. L. Thomas, K. M. Brasky, R. E. Lanford, Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol* **73**, 1118-1126 (1999).
336. M. E. Major *et al.*, Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* **73**, 3317-3325 (1999).
337. D. M. Netski *et al.*, Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **41**, 667-675 (2005).

338. J. J. Post *et al.*, Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* **189**, 1846-1855 (2004).
339. M. Zeremski *et al.*, Hepatitis C virus-specific T-cell immune responses in seronegative injection drug users. *J Viral Hepat* **16**, 10-20 (2009).
340. J. Grebely *et al.*, Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis* **12**, 408-414 (2012).
341. K. A. Dowd, D. M. Netski, X. H. Wang, A. L. Cox, S. C. Ray, Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* **136**, 2377-2386 (2009).
342. A. M. Strasak *et al.*, Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis* **11**, 15 (2011).
343. M. R. Walker *et al.*, Clearance of hepatitis C virus is associated with early and potent but narrowly-directed, Envelope-specific antibodies. *Sci Rep* **9**, 13300 (2019).
344. V. J. Kinchen *et al.*, Broadly Neutralizing Antibody Mediated Clearance of Human Hepatitis C Virus Infection. *Cell Host Microbe* **24**, 717-730 e715 (2018).
345. J. Gu *et al.*, Escape of Hepatitis C Virus from Epitope I Neutralization Increases Sensitivity of Other Neutralization Epitopes. *J Virol* **92**, (2018).
346. K. G. Hadlock *et al.*, Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* **74**, 10407-10416 (2000).
347. D. X. Johansson *et al.*, Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16269-16274 (2007).
348. M. Law *et al.*, Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**, 25-27 (2008).
349. E. Giang *et al.*, Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6205-6210 (2012).
350. C. Logvinoff *et al.*, Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10149-10154 (2004).
351. R. E. Swann *et al.*, Broad Anti-Hepatitis C Virus (HCV) Antibody Responses Are Associated with Improved Clinical Disease Parameters in Chronic HCV Infection. *J Virol* **90**, 4530-4543 (2016).

352. K. Bjoro, S. S. Froland, Z. Yun, H. H. Samdal, T. Haaland, Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med* **331**, 1607-1611 (1994).
353. M. Boisvert *et al.*, Novel E2 Glycoprotein Tetramer Detects Hepatitis C Virus-Specific Memory B Cells. *J Immunol* **197**, 4848-4858 (2016).
354. J. M. Sugalski, B. Rodriguez, S. Moir, D. D. Anthony, Peripheral blood B cell subset skewing is associated with altered cell cycling and intrinsic resistance to apoptosis and reflects a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* **185**, 3019-3027 (2010).
355. V. Racanelli *et al.*, Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* **80**, 3923-3934 (2006).
356. J. R. Bailey *et al.*, Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI Insight* **2**, (2017).
357. C. H. Chan, K. G. Hadlock, S. K. Fong, S. Levy, V(H)1-69 gene is preferentially used by hepatitis C virus-associated B cell lymphomas and by normal B cells responding to the E2 viral antigen. *Blood* **97**, 1023-1026 (2001).
358. S. J. Merat *et al.*, Cross-genotype AR3-specific neutralizing antibodies confer long-term protection in injecting drug users after HCV clearance. *J Hepatol* **71**, 14-24 (2019).
359. F. Chen, N. Tzarum, I. A. Wilson, M. Law, VH1-69 antiviral broadly neutralizing antibodies: genetics, structures, and relevance to rational vaccine design. *Curr Opin Virol* **34**, 149-159 (2019).
360. D. F. Robbiani *et al.*, Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell* **169**, 597-609 e511 (2017).
361. A. I. Flyak *et al.*, HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. *Cell Host Microbe* **24**, 703-716 e703 (2018).
362. N. Tzarum *et al.*, Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human VH1-69 antibodies. *Sci Adv* **5**, eaav1882 (2019).
363. J. H. Salas *et al.*, An Antigenically Diverse, Representative Panel of Envelope Glycoproteins for Hepatitis C Virus Vaccine Development. *Gastroenterology* **162**, 562-574 (2022).
364. M. B. Zeisel, I. Fofana, S. Fafi-Kremer, T. F. Baumert, Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* **54**, 566-576 (2011).

365. J. Prentoe, J. Bukh, Hypervariable Region 1 in Envelope Protein 2 of Hepatitis C Virus: A Linchpin in Neutralizing Antibody Evasion and Viral Entry. *Front Immunol* **9**, 2146 (2018).
366. Y. K. Shimizu *et al.*, Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* **68**, 1494-1500 (1994).
367. A. J. Weiner *et al.*, Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3468-3472 (1992).
368. L. Liu *et al.*, Acceleration of hepatitis C virus envelope evolution in humans is consistent with progressive humoral immune selection during the transition from acute to chronic infection. *J Virol* **84**, 5067-5077 (2010).
369. Z. Y. Keck *et al.*, Antibody Response to Hypervariable Region 1 Interferes with Broadly Neutralizing Antibodies to Hepatitis C Virus. *J Virol* **90**, 3112-3122 (2016).
370. D. Bankwitz *et al.*, Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* **84**, 5751-5763 (2010).
371. J. Prentoe *et al.*, Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J Virol* **85**, 2224-2234 (2011).
372. F. Helle *et al.*, The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* **81**, 8101-8111 (2007).
373. F. Helle *et al.*, Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* **84**, 11905-11915 (2010).
374. B. Bartosch *et al.*, An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* **79**, 8217-8229 (2005).
375. M. Dreux *et al.*, High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* **281**, 18285-18295 (2006).
376. C. Fauvelle *et al.*, Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology* **150**, 206-217 e204 (2016).
377. L. Deng *et al.*, Syntenin regulates hepatitis C virus sensitivity to neutralizing antibody by promoting E2 secretion through exosomes. *J Hepatol* **71**, 52-61 (2019).

378. F. Wrensch *et al.*, Interferon-Induced Transmembrane Proteins Mediate Viral Evasion in Acute and Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* **70**, 1506-1520 (2019).
379. C. L. Brimacombe *et al.*, Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* **85**, 596-605 (2011).
380. M. T. Catanese *et al.*, Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J Virol* **87**, 8282-8293 (2013).
381. Z. Liu, J. J. He, Cell-cell contact-mediated hepatitis C virus (HCV) transfer, productive infection, and replication and their requirement for HCV receptors. *J Virol* **87**, 8545-8558 (2013).
382. P. Farci *et al.*, Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**, 135-140 (1992).
383. S. E. Bassett *et al.*, Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* **33**, 1479-1487 (2001).
384. M. E. Major *et al.*, Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol* **76**, 6586-6595 (2002).
385. S. H. Mehta *et al.*, Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* **359**, 1478-1483 (2002).
386. M. Nascimbeni *et al.*, Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol* **77**, 4781-4793 (2003).
387. A. M. Prince *et al.*, Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. *J Infect Dis* **192**, 1701-1709 (2005).
388. R. E. Lanford *et al.*, Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J Virol* **78**, 1575-1581 (2004).
389. J. Bukh *et al.*, Previously infected chimpanzees are not consistently protected against reinfection or persistent infection after reexposure to the identical hepatitis C virus strain. *J Virol* **82**, 8183-8195 (2008).
390. D. Meyer-Olson *et al.*, Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med* **200**, 307-319 (2004).
391. R. K. Ramalingam *et al.*, Kinetic analysis by real-time PCR of hepatitis C virus (HCV)-specific T cells in peripheral blood and liver after challenge with HCV. *J Virol* **82**, 10487-10492 (2008).

392. H. Barth *et al.*, Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* **54**, 1135-1148 (2011).
393. P. Scognamiglio *et al.*, Presence of effector CD8⁺ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. *J Immunol* **162**, 6681-6689 (1999).
394. M. J. Koziel, D. K. Wong, D. Dudley, M. Houghton, B. D. Walker, Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect Dis* **176**, 859-866 (1997).
395. T. Heller *et al.*, Occupational exposure to hepatitis C virus: early T-cell responses in the absence of seroconversion in a longitudinal cohort study. *J Infect Dis* **208**, 1020-1025 (2013).
396. E. Mizukoshi *et al.*, Hepatitis C virus (HCV)-specific immune responses of long-term injection drug users frequently exposed to HCV. *J Infect Dis* **198**, 203-212 (2008).
397. C. L. Day *et al.*, Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest* **112**, 831-842 (2003).
398. S. M. Kaech *et al.*, Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-1198 (2003).
399. G. Badr *et al.*, Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J Virol* **82**, 10017-10031 (2008).
400. E. C. Shin *et al.*, The frequency of CD127(+) hepatitis C virus (HCV)-specific T cells but not the expression of exhaustion markers predicts the outcome of acute HCV infection. *J Virol* **87**, 4772-4777 (2013).
401. L. Golden-Mason *et al.*, Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology* **44**, 1098-1109 (2006).
402. B. Bengsch *et al.*, Analysis of CD127 and KLRG1 expression on hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells reveals the existence of different memory T-cell subsets in the peripheral blood and liver. *J Virol* **81**, 945-953 (2007).
403. M. V. Kim, W. Ouyang, W. Liao, M. Q. Zhang, M. O. Li, The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8⁺ T cell responses to infection. *Immunity* **39**, 286-297 (2013).
404. D. T. Utzschneider *et al.*, Active Maintenance of T Cell Memory in Acute and Chronic Viral Infection Depends on Continuous Expression of FOXO1. *Cell Rep* **22**, 3454-3467 (2018).
405. S. C. Jameson, D. Masopust, Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* **31**, 859-871 (2009).

406. Y. Rochman, R. Spolski, W. J. Leonard, New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* **9**, 480-490 (2009).
407. C. D. Surh, J. Sprent, Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-862 (2008).
408. T. N. Pham *et al.*, Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* **78**, 5867-5874 (2004).
409. N. S. Veerapu, S. Raghuraman, T. J. Liang, T. Heller, B. Rehermann, Sporadic reappearance of minute amounts of hepatitis C virus RNA after successful therapy stimulates cellular immune responses. *Gastroenterology* **140**, 676-685 e671 (2011).
410. A. Y. Chen *et al.*, Persistence of Hepatitis C Virus Traces after Spontaneous Resolution of Hepatitis C. *PLoS One* **10**, e0140312 (2015).
411. M. A. Brehm *et al.*, T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol* **3**, 627-634 (2002).
412. L. F. Su, B. A. Kidd, A. Han, J. J. Kotzin, M. M. Davis, Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity* **38**, 373-383 (2013).
413. J. M. Micallef *et al.*, High incidence of hepatitis C virus reinfection within a cohort of injecting drug users. *J Viral Hepat* **14**, 413-418 (2007).
414. K. Page *et al.*, Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. *J Infect Dis* **200**, 1216-1226 (2009).
415. T. J. van de Laar *et al.*, Frequent HCV reinfection and superinfection in a cohort of injecting drug users in Amsterdam. *J Hepatol* **51**, 667-674 (2009).
416. W. O. Osburn *et al.*, Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* **138**, 315-324 (2010).
417. J. Grebely *et al.*, Hepatitis C virus reinfection in injection drug users. *Hepatology* **44**, 1139-1145 (2006).
418. C. K. Aitken *et al.*, High incidence of hepatitis C virus reinfection in a cohort of injecting drug users. *Hepatology* **48**, 1746-1752 (2008).
419. J. Grebely, D. L. Thomas, G. J. Dore, HCV reinfection studies and the door to vaccine development. *J Hepatol* **51**, 628-631 (2009).
420. R. Sacks-Davis *et al.*, Hepatitis C Virus Reinfection and Spontaneous Clearance of Reinfection--the InC3 Study. *J Infect Dis* **212**, 1407-1419 (2015).

421. R. Sacks-Davis, D. Horyniak, J. Grebely, M. Hellard, Behavioural interventions for preventing hepatitis C infection in people who inject drugs: a global systematic review. *Int J Drug Policy* **23**, 176-184 (2012).
422. G. J. MacArthur *et al.*, Interventions to prevent HIV and Hepatitis C in people who inject drugs: a review of reviews to assess evidence of effectiveness. *Int J Drug Policy* **25**, 34-52 (2014).
423. M. S. Abdel-Hakeem, N. Bedard, D. Murphy, J. Bruneau, N. H. Shoukry, Signatures of protective memory immune responses during hepatitis C virus reinfection. *Gastroenterology* **147**, 870-881 e878 (2014).
424. M. S. Abdel-Hakeem, M. Boisvert, J. Bruneau, H. Soudeyns, N. H. Shoukry, Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog* **13**, e1006191 (2017).
425. S. J. Merat *et al.*, Hepatitis C virus Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Isolated 25 Years after Spontaneous Clearance. *PLoS One* **11**, e0165047 (2016).
426. A. M. Hill, S. Nath, B. Simmons, The road to elimination of hepatitis C: analysis of cures versus new infections in 91 countries. *J Virus Erad* **3**, 117-123 (2017).
427. H. Razavi, Y. Sanchez Gonzalez, C. Yuen, M. Cornberg, Global timing of hepatitis C virus elimination in high-income countries. *Liver Int* **40**, 522-529 (2020).
428. J. Grebely *et al.*, Expanding access to prevention, care and treatment for hepatitis C virus infection among people who inject drugs. *Int J Drug Policy* **26**, 893-898 (2015).
429. Canadian Network on Hepatitis C. Hepatitis C elimination: Sustaining the Canadian response during and after COVID-19. *Canadian Liver Journal*, (2020).
430. S. Blach *et al.*, Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts. *J Hepatol* **74**, 31-36 (2021).
431. T. L. Applegate, E. Fajardo, J. A. Sacks, Hepatitis C Virus Diagnosis and the Holy Grail. *Infect Dis Clin North Am* **32**, 425-445 (2018).
432. J. Chhatwal *et al.*, The impact of direct-acting anti-virals on the hepatitis C care cascade: identifying progress and gaps towards hepatitis C elimination in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* **50**, 66-74 (2019).
433. J. Stone *et al.*, The Potential Impact of a Hepatitis C Vaccine for People Who Inject Drugs: Is a Vaccine Needed in the Age of Direct-Acting Antivirals? *PLoS One* **11**, e0156213 (2016).
434. J. A. Hahn *et al.*, Potential impact of vaccination on the hepatitis C virus epidemic in injection drug users. *Epidemics* **1**, 47-57 (2009).

435. N. Scott *et al.*, The role of a hepatitis C virus vaccine: modelling the benefits alongside direct-acting antiviral treatments. *BMC Med* **13**, 198 (2015).
436. M. Major *et al.*, Modeling of patient virus titers suggests that availability of a vaccine could reduce hepatitis C virus transmission among injecting drug users. *Sci Transl Med* **10**, (2018).
437. T. F. Baumert, C. Fauvelle, D. Y. Chen, G. M. Lauer, A prophylactic hepatitis C virus vaccine: a distant peak still worth climbing. *J Hepatol* **61**, S34-44 (2014).
438. T. Garske *et al.*, Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med* **11**, e1001638 (2014).
439. X. T. Hu *et al.*, Reduction patterns of Japanese encephalitis incidence following vaccine introduction into long-term expanded program on immunization in Yunnan Province, China. *Infect Dis Poverty* **8**, 102 (2019).
440. D. Akazawa *et al.*, Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* **145**, 447-455 e441-444 (2013).
441. S. Ramirez, J. Bukh, Current status and future development of infectious cell-culture models for the major genotypes of hepatitis C virus: Essential tools in testing of antivirals and emerging vaccine strategies. *Antiviral Res* **158**, 264-287 (2018).
442. K. Lothert *et al.*, Development of a downstream process for the production of an inactivated whole hepatitis C virus vaccine. *Sci Rep* **10**, 16261 (2020).
443. M. W. Wolf, U. Reichl, Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Rev Vaccines* **10**, 1451-1475 (2011).
444. G. A. Elmowalid *et al.*, Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8427-8432 (2007).
445. X. Forns *et al.*, Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* **32**, 618-625 (2000).
446. T. J. Liang, Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. *Nat Med* **19**, 869-878 (2013).
447. M. Houghton, Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev* **239**, 99-108 (2011).
448. S. A. Plotkin, Vaccines: past, present and future. *Nat Med* **11**, S5-11 (2005).

449. Q. L. Choo *et al.*, Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1294-1298 (1994).
450. J. C. Meunier *et al.*, Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis C virus. *J Infect Dis* **204**, 1186-1190 (2011).
451. Z. Stamatakis *et al.*, Hepatitis C virus envelope glycoprotein immunization of rodents elicits cross-reactive neutralizing antibodies. *Vaccine* **25**, 7773-7784 (2007).
452. S. E. Frey *et al.*, Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* **28**, 6367-6373 (2010).
453. R. Ray *et al.*, Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Infect Dis* **202**, 862-866 (2010).
454. J. A. Wong *et al.*, Recombinant hepatitis C virus envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies targeting multiple epitopes on the envelope glycoproteins associated with broad cross-neutralization. *J Virol* **88**, 14278-14288 (2014).
455. J. L. Law *et al.*, A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans. *PLoS One* **8**, e59776 (2013).
456. M. Logan *et al.*, Native Folding of a Recombinant gpE1/gpE2 Heterodimer Vaccine Antigen from a Precursor Protein Fused with Fc IgG. *J Virol* **91**, (2017).
457. T. B. Ruwona, E. Giang, T. Nieuwma, M. Law, Fine mapping of murine antibody responses to immunization with a novel soluble form of hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *J Virol* **88**, 10459-10471 (2014).
458. K. McCaffrey, I. Boo, P. Pountourios, H. E. Drummer, Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding. *J Virol* **81**, 9584-9590 (2007).
459. P. T. Vietheer *et al.*, The core domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs. *Hepatology* **65**, 1117-1131 (2017).
460. K. McCaffrey *et al.*, An Optimized Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Core Adopts a Functional Homodimer That Efficiently Blocks Virus Entry. *J Virol* **91**, (2017).
461. J. L. M. Law *et al.*, Role of the E2 Hypervariable Region (HVR1) in the Immunogenicity of a Recombinant Hepatitis C Virus Vaccine. *J Virol* **92**, (2018).
462. T. Ura, K. Okuda, M. Shimada, Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines (Basel)* **2**, 624-641 (2014).

463. S. H. Park *et al.*, Successful vaccination induces multifunctional memory T-cell precursors associated with early control of hepatitis C virus. *Gastroenterology* **143**, 1048-1060 e1044 (2012).
464. S. Colloca *et al.*, Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Sci Transl Med* **4**, 115ra112 (2012).
465. E. Barnes *et al.*, Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* **4**, 115ra111 (2012).
466. L. Swadling *et al.*, A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med* **6**, 261ra153 (2014).
467. C. Kelly *et al.*, Cross-reactivity of hepatitis C virus specific vaccine-induced T cells at immunodominant epitopes. *Eur J Immunol* **45**, 309-316 (2015).
468. F. Hartnell *et al.*, Characterizing Hepatitis C Virus-Specific CD4(+) T Cells Following Viral-Vectored Vaccination, Directly Acting Antivirals, and Spontaneous Viral Cure. *Hepatology* **72**, 1541-1555 (2020).
469. K. Page *et al.*, Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med* **384**, 541-549 (2021).
470. T. Donnison *et al.*, Viral vectored hepatitis C virus vaccines generate pan-genotypic T cell responses to conserved subdominant epitopes. *Vaccine* **38**, 5036-5048 (2020).
471. I. Esposito *et al.*, MHC class II invariant chain-adjuvanted viral vectored vaccines enhances T cell responses in humans. *Sci Transl Med* **12**, (2020).
472. N. Islam *et al.*, Hepatitis C cross-genotype immunity and implications for vaccine development. *Sci Rep* **7**, 12326 (2017).
473. A. von Delft *et al.*, The broad assessment of HCV genotypes 1 and 3 antigenic targets reveals limited cross-reactivity with implications for vaccine design. *Gut* **65**, 112-123 (2016).
474. H. Luxenburger *et al.*, Differential virus-specific CD8(+) T-cell epitope repertoire in hepatitis C virus genotype 1 versus 4. *J Viral Hepat* **25**, 779-790 (2018).
475. A. von Delft *et al.*, The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes. *Vaccine* **36**, 313-321 (2018).
476. G. A. Poland, I. G. Ovsyannikova, R. M. Jacobson, D. I. Smith, Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 653-664 (2007).

477. Z. Yan, Y. Wang, Viral and host factors associated with outcomes of hepatitis C virus infection (Review). *Mol Med Rep* **15**, 2909-2924 (2017).
478. B. Shi *et al.*, Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. *Theor Biol Med Model* **11**, 30 (2014).
479. T. C. Manso *et al.*, Next-generation sequencing reveals new insights about gene usage and CDR-H3 composition in the horse antibody repertoire. *Mol Immunol* **105**, 251-259 (2019).
480. K. A. Lang Kuhs *et al.*, Hepatitis C virus NS3/NS4A DNA vaccine induces multi-epitope T cell responses in rhesus macaques mimicking human immune responses [corrected]. *Mol Ther* **20**, 669-678 (2012).
481. B. Bamberg, M. Selgelid, C. Weijer, J. Savulescu, A. J. Pollard, Ethical Criteria for Human Challenge Studies in Infectious Diseases. *Public Health Ethics* **9**, 92-103 (2016).
482. T. Rampling *et al.*, Safety and High Level Efficacy of the Combination Malaria Vaccine Regimen of RTS,S/AS01B With Chimpanzee Adenovirus 63 and Modified Vaccinia Ankara Vectors Expressing ME-TRAP. *J Infect Dis* **214**, 772-781 (2016).
483. S. O. McPartlin, J. Morrison, A. Rohrig, C. Weijer, Covid-19 vaccines: Should we allow human challenge studies to infect healthy volunteers with SARS-CoV-2? *BMJ* **371**, m4258 (2020).
484. R. Lowe, N. Shirley, M. Bleackley, S. Dolan, T. Shafee, Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005457 (2017).
485. J. Reimand *et al.*, Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* **14**, 482-517 (2019).
486. J. Li *et al.*, Comparison of microarray and RNA-Seq analysis of mRNA expression in dermal mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* **38**, 33-41 (2016).
487. A. Subramanian *et al.*, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550 (2005).
488. H. Y. Benjamini Y, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B. Methodological* **57(1):289-300**, (1995).
489. D. Chaussabel *et al.*, A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* **29**, 150-164 (2008).

490. A. M. Newman *et al.*, Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* **12**, 453-457 (2015).
491. G. Gundem, N. Lopez-Bigas, Sample-level enrichment analysis unravels shared stress phenotypes among multiple cancer types. *Genome Med* **4**, 28 (2012).
492. C. B. Bigger, K. M. Brasky, R. E. Lanford, DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**, 7059-7066 (2001).
493. A. I. Su *et al.*, Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15669-15674 (2002).
494. C. B. Bigger *et al.*, Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* **78**, 13779-13792 (2004).
495. M. T. Dill *et al.*, Interferon-gamma-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology* **143**, 777-786 e776 (2012).
496. N. Hamdane *et al.*, HCV-Induced Epigenetic Changes Associated With Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response. *Gastroenterology* **156**, 2313-2329 e2317 (2019).
497. B. R. Rosenberg *et al.*, Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in patients with spontaneous viral clearance. *PLoS Pathog* **14**, e1007290 (2018).
498. G. J. van der Windt *et al.*, Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development. *Immunity* **36**, 68-78 (2012).
499. G. J. van der Windt *et al.*, CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14336-14341 (2013).
500. L. Trautmann *et al.*, Profound metabolic, functional, and cytolytic differences characterize HIV-specific CD8 T cells in primary and chronic HIV infection. *Blood* **120**, 3466-3477 (2012).
501. P. Fficaro *et al.*, Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B. *Nat Med* **23**, 327-336 (2017).
502. T. A. Doering *et al.*, Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8⁺ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* **37**, 1130-1144 (2012).
503. K. E. Pauken *et al.*, Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160-1165 (2016).

504. J. P. Scott-Browne *et al.*, Dynamic Changes in Chromatin Accessibility Occur in CD8(+) T Cells Responding to Viral Infection. *Immunity* **45**, 1327-1340 (2016).
505. N. Hensel *et al.*, Memory-like HCV-specific CD8(+) T cells retain a molecular scar after cure of chronic HCV infection. *Nat Immunol* **22**, 229-239 (2021).
506. P. Tonnerre *et al.*, Differentiation of exhausted CD8(+) T cells after termination of chronic antigen stimulation stops short of achieving functional T cell memory. *Nat Immunol* **22**, 1030-1041 (2021).
507. K. B. Yates *et al.*, Epigenetic scars of CD8(+) T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans. *Nat Immunol* **22**, 1020-1029 (2021).
508. D. Gaucher *et al.*, Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* **205**, 3119-3131 (2008).
509. T. D. Querec *et al.*, Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* **10**, 116-125 (2009).
510. H. I. Nakaya *et al.*, Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat Immunol* **12**, 786-795 (2011).
511. D. E. Zak *et al.*, Merck Ad5/HIV induces broad innate immune activation that predicts CD8(+) T-cell responses but is attenuated by preexisting Ad5 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3503-3512 (2012).
512. R. Thiebaut *et al.*, Gene Expression Signatures Associated With Immune and Virological Responses to Therapeutic Vaccination With Dendritic Cells in HIV-Infected Individuals. *Front Immunol* **10**, 874 (2019).
513. F. Hartnell *et al.*, A Novel Vaccine Strategy Employing Serologically Different Chimpanzee Adenoviral Vectors for the Prevention of HIV-1 and HCV Coinfection. *Front Immunol* **9**, 3175 (2018).
514. A. L. Cox, Challenges and Promise of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Med* **10**, (2020).
515. L. Trautmann *et al.*, Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* **175**, 6123-6132 (2005).
516. M. C. Iglesias *et al.*, Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* **118**, 2138-2149 (2011).
517. O. O. Yang *et al.*, Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **197**, 1365-1375 (2003).

518. D. C. Douek *et al.*, A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol* **168**, 3099-3104 (2002).
519. M. Kantzanou *et al.*, Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* **85**, 165-171 (2003).
520. P. Fytily *et al.*, Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073. *Vaccine* **26**, 3818-3826 (2008).
521. A. A. Eltahla *et al.*, Linking the T cell receptor to the single cell transcriptome in antigen-specific human T cells. *Immunol Cell Biol* **94**, 604-611 (2016).
522. M. Shugay *et al.*, VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res* **46**, D419-D427 (2018).
523. A. Huth, X. Liang, S. Krebs, H. Blum, A. Moosmann, Antigen-Specific TCR Signatures of Cytomegalovirus Infection. *J Immunol* **202**, 979-990 (2019).
524. V. Venturi *et al.*, Sharing of T cell receptors in antigen-specific responses is driven by convergent recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18691-18696 (2006).
525. H. Wedemeyer, E. Mizukoshi, A. R. Davis, J. R. Bennink, B. Rehermann, Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* **75**, 11392-11400 (2001).
526. G. Chen *et al.*, Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8(+) TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Rep* **19**, 569-583 (2017).
527. N. E. Annels, M. F. Callan, L. Tan, A. B. Rickinson, Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *J Immunol* **165**, 4831-4841 (2000).
528. E. S. Lee, P. G. Thomas, J. E. Mold, A. J. Yates, Identifying T Cell Receptors from High-Throughput Sequencing: Dealing with Promiscuity in TCRalpha and TCRbeta Pairing. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005313 (2017).
529. C. Rius *et al.*, Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations. *J Immunol* **200**, 2263-2279 (2018).
530. V. Kasprowicz *et al.*, Defining the directionality and quality of influenza virus-specific CD8+ T cell cross-reactivity in individuals infected with hepatitis C virus. *J Clin Invest* **118**, 1143-1153 (2008).

531. E. J. Grant *et al.*, Lack of Heterologous Cross-reactivity toward HLA-A*02:01 Restricted Viral Epitopes Is Underpinned by Distinct alpha-beta T Cell Receptor Signatures. *J Biol Chem* **291**, 24335-24351 (2016).
532. E. Rosati *et al.*, Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnol* **17**, 61 (2017).
533. F. Mackay, J. L. Browning, BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 465-475 (2002).
534. S. Capone *et al.*, Optimising T cell (re)boosting strategies for adenoviral and modified vaccinia Ankara vaccine regimens in humans. *NPJ Vaccines* **5**, 94 (2020).
535. N. Frahm *et al.*, Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. *J Clin Invest* **122**, 359-367 (2012).
536. A. Cox, Vaccines Against HCV | Harnessing Immunity to Eliminate Global Hepatitis. *Coalition for Global Hepatitis Elimination*, (2022).
537. T. Yoshida *et al.*, Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev* **237**, 117-139 (2010).
538. L. N. Wasilewski, S. C. Ray, J. R. Bailey, Hepatitis C virus resistance to broadly neutralizing antibodies measured using replication-competent virus and pseudoparticles. *J Gen Virol* **97**, 2883-2893 (2016).
539. B. Korber, W. Fischer, T cell-based strategies for HIV-1 vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **16**, 713-722 (2020).
540. B. Ondondo *et al.*, Novel Conserved-region T-cell Mosaic Vaccine With High Global HIV-1 Coverage Is Recognized by Protective Responses in Untreated Infection. *Mol Ther* **24**, 832-842 (2016).
541. M. D. Colbert *et al.*, Broadly Neutralizing Antibodies Targeting New Sites of Vulnerability in Hepatitis C Virus E1E2. *J Virol* **93**, (2019).
542. N. A. Brasher *et al.*, B cell immunodominance in primary hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **72**, 670-679 (2020).
543. J. Glanville *et al.*, Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* **547**, 94-98 (2017).
544. M. V. Pogorelyy *et al.*, Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 12704-12709 (2018).
545. A. Christophersen, Peptide-MHC class I and class II tetramers: From flow to mass cytometry. *HLA* **95**, 169-178 (2020).

546. J. Niessl *et al.*, Combination anti-HIV-1 antibody therapy is associated with increased virus-specific T cell immunity. *Nat Med* **26**, 222-227 (2020).
547. J. Niessl *et al.*, Persistent expansion and Th1-like skewing of HIV-specific circulating T follicular helper cells during antiretroviral therapy. *EBioMedicine* **54**, 102727 (2020).
548. H. L. Dugan *et al.*, Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets. *Immunity* **54**, 1290-1303 e1297 (2021).
549. M. Smits *et al.*, Follicular T helper cells shape the HCV-specific CD4⁺ T cell repertoire after virus elimination. *J Clin Invest* **130**, 998-1009 (2020).
550. K. Zoldan *et al.*, Th1-Biased Hepatitis C Virus-Specific Follicular T Helper-Like Cells Effectively Support B Cells After Antiviral Therapy. *Front Immunol* **12**, 742061 (2021).

Chapitre 8 | Appendices

APPENDIX I | Article publié dans Journal of Immunology (Manuscrit 1 – Chapitre 3)



Looking for human immune checkpoint targeting in humanized models for mono and combination therapies?

Fully validated models available for study at your site or preferred CRO



Expansion of Unique Hepatitis C Virus–Specific Public CD8⁺ T Cell Clonotypes during Acute Infection and Reinfection

This information is current as of August 2, 2021.

Sabrina Mazouz, Maude Boisvert, Mohamed S. Abdel-Hakeem, Omar Khedr, Julie Bruneau and Naglaa H. Shoukry

J Immunol published online 2 August 2021
<http://www.jimmunol.org/content/early/2021/08/02/jimmunol.2001386>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2021/08/02/jimmunol.2001386.DCSupplemental>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews!** 30 days* from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

*average

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2021 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Expansion of Unique Hepatitis C Virus–Specific Public CD8⁺ T Cell Clonotypes during Acute Infection and Reinfection

Sabrina Mazouz,^{*,†} Maude Boisvert,^{*} Mohamed S. Abdel-Hakeem,^{*,†,1} Omar Khedr,^{*} Julie Bruneau,^{*,‡} and Naglaa H. Shoukry^{*,§}

Hepatitis C virus (HCV) infection resolves spontaneously in ~25% of acutely infected humans where viral clearance is mediated primarily by virus-specific CD8⁺ T cells. Previous cross-sectional analysis of the CD8⁺ TCR repertoire targeting two immunodominant HCV epitopes reported widespread use of public TCRs shared by different subjects, irrespective of infection outcome. However, little is known about the evolution of the public TCR repertoire during acute HCV and whether cross-reactivity to other Ags can influence infectious outcome. In this article, we analyzed the CD8⁺ TCR repertoire specific to the immunodominant and cross-reactive HLA-A2–restricted nonstructural 3-1073 epitope during acute HCV in humans progressing to either spontaneous resolution or chronic infection and at ~1 y after viral clearance. TCR repertoire diversity was comparable among all groups with preferential usage of the TCR-β V04 and V06 gene families. We identified a set of 13 public clonotypes in HCV-infected humans independent of infection outcome. Six public clonotypes used the V04 gene family. Several public clonotypes were long-lived in responders and expanded on reinfection. By mining publicly available data, we identified several low-frequency CDR3 sequences in the HCV-specific repertoire matching human TCRs specific for other HLA-A2–restricted epitopes from melanoma, CMV, influenza A, EBV, and yellow fever viruses, but they were of low frequency and limited cross-reactivity. In conclusion, we identified 13 new public human CD8⁺ TCR clonotypes unique to HCV that expanded during acute infection and reinfection. The low frequency of cross-reactive TCRs suggests that they are not major determinants of infectious outcome. *The Journal of Immunology*, 2021, 207: 1–14.

Via their TCRs, an αβ heterodimer, CD8⁺ T cells recognize Ags presented by class I MHC molecules. TCR repertoire diversity is achieved through germline V, D, and J gene segment rearrangements and addition or deletion of nucleotides between segments, resulting in a specific CD8⁺ TCR or clonotype. The TCRAV and TCRBV for the α- and β-chains, respectively, encode CDR1 and CDR2, which interact with the MHC molecule (1). Ag-binding specificity is determined by the most variable region of the TCR, the CDR3 region, formed by the V-J α and V(D)J β junctions. An identical clonotype or CDR3 amino acid sequence detected in several individuals, termed “public,” was associated with better control of viral infections, including CMV and HIV, whereas less common or “private” repertoires were not (2–4).

Hepatitis C virus (HCV) infection has two dichotomous outcomes where ~25% of acutely infected subjects resolve spontaneously, whereas the rest acquire persistent infection. Expansion of HCV-

specific CD8⁺ T cells targeting multiple epitopes (i.e., broad) and producing several cytokines (i.e., polyfunctional) is essential to clear acute primary infection (5–7). Hence HCV represents a unique opportunity to examine the protective capacity of virus-specific CD8⁺ T cell public clonotypes. Cross-sectional studies reported the presence of public TCRs recognizing the hypervariable region 1 (HVR1) ³⁹⁸SLASLFTQGA ⁴⁰⁷ epitope of the E2 glycoprotein and the nonstructural 3 (NS3) ¹³⁹⁵HSKCKCDEL ¹⁴⁰³ (HSK) or ¹⁴³⁵ATDALMTGY ¹⁴⁴³ (ATD) HCV epitopes, irrespective of HCV infectious outcome (8, 9). These studies mostly relied on in vitro expansion of Ag-specific T cells before analysis that may have favored expansion of certain TCR clonotypes. Furthermore, very limited analysis was performed early during acute infection. Whether other immunodominant HCV epitopes favor the expansion of public clonotypes and whether they correlate with spontaneous resolution of acute infection remain unknown.

*Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; [†]Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; [‡]Département de Médecine Familiale et de Médecine d'Urgence, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and [§]Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

¹Current address: Institute for Immunology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA.

ORCID: 0000-0002-0090-3299 (S.M.); 0000-0001-9304-7796 (M.B.); 0000-0003-0226-3464 (M.S.A.-H.); 0000-0002-8817-8238 (N.H.S.).

Received for publication December 10, 2020. Accepted for publication June 9, 2021.

This work was supported by grants from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (U01AI131313, R01AI136533, and U19AI1159819), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; PJT-173467), Canada Research Chairs (Chaires de Recherche du Canada), Alberta Innovates-Health Solutions, and Fonds de Recherche du Québec–Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI). S.M. is supported by a doctoral fellowship from the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). CanHepC is funded by a joint initiative of CIHR (NHC142832) and the Public Health Agency of Canada. M.B. received postdoctoral fellowships from FRQS, American Liver Foundation, and CanHepC. M.S.A.-H. received doctoral fellowships from CIHR and CanHepC. J.B. is the Canada Research Chair in

Addiction Medicine. The funders had no role in the design and conduct of the study; in the collection, analysis, and interpretation of the data; or in the preparation, review, or approval of the manuscript.

S.M. designed and performed experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript; M.B. designed experiments and wrote the manuscript; M.S.A.-H. designed and performed experiments; O.K. analyzed data; J.B. recruited and followed subjects and provided clinical data; N.H.S. obtained funds, designed experiments, and wrote the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Naglaa H. Shoukry, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Tour Viger, Local R09.414, 900 Rue St-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Canada. E-mail address: naglaa.shoukry@umontreal.ca

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BLCL, B cell line; CanHepC, Canadian Network on Hepatitis C; CIHR, Canadian Institutes of Health Research; CRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal; EDI, estimated date of infection; HCV, hepatitis C virus; P/S, penicillin + streptomycin; R10, RPMI 1640 + 10% heat-inactivated FBS; R10-P/S-HEPES, R10 supplemented with P/S (1×) and 14 mM HEPES; YFV, yellow fever virus.

Copyright © 2021 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/21/\$37.50

The HLA-A2–restricted NS3-1073 ¹⁰⁷³CINGVCWTV¹⁰⁸¹ epitope, derived from the highly immunogenic NS3 protein, is one of the immunodominant epitopes during HCV infection (10–12). Spontaneous clearance of acute HCV was associated with an NS3-1073–specific CD8⁺ T cell response (13–15). Long-lived NS3-1073–specific memory CD8⁺ T cells were detected two decades after HCV spontaneous clearance, suggesting it may contribute to long-term protective immunity (10). Indeed, our group has previously demonstrated expansion of memory NS3-1073–specific CD8⁺ T cells in HCV resolvers after virus re-exposure and reinfection (5). In individuals who spontaneously resolved their reinfection, we observed focusing of the TCR repertoire with rapid and selective expansion of memory CD8⁺ T cell clonotypes with the highest functional avidity (16).

CD8⁺ T cells specific to the HCV NS3-1073 epitope are also known to be cross-reactive to several HLA-A2–restricted epitopes. The first cross-reactivity reported was against the NA-231 epitope of influenza virus (17). Other cross-reactivities were later identified against CMV (pp65) and EBV (LMP2) (17–19). In addition, a pre-existing pool of memory HCV NS3-1073–specific CD8⁺ T cells, induced by heterologous infections, was characterized in a cohort of healthy HCV-seronegative subjects (19). These memory HCV NS3-1073–specific CD8⁺ T cells influenced the T cell response to HCV peptide vaccine (19). These studies suggested that this cross-reactivity may contribute to enhanced spontaneous clearance or pathogenesis of acute HCV infection.

In this article, we characterized and compared the HCV NS3-1073–specific TCR repertoire during the very early acute phase of HCV infection and long-term follow-up in spontaneous resolvers (SRs) and during acute infection in subjects who developed chronic infection (CI). Our main objective was to characterize the presence of public clonotypes against this immunodominant epitope and their potential association with spontaneous HCV resolution directly *ex vivo*. We identified a common set of public clonotypes independent of infection outcome. Although several CDR3 sequences were shared with other non-HCV HLA-A2–restricted epitopes, these potentially cross-reactive clonotypes did not expand during acute HCV infection. The public clonotypes we identified were unique to HCV.

Materials and Methods

Study population

Study subjects were recruited among people who inject drugs enrolled in the Montreal Hepatitis C Cohort (20). Subjects were followed every 3 mo for HCV infection. Acute HCV primary infection was defined as a positive HCV RNA and/or anti-HCV Ab–positive test after a negative test in the past 24 wk. The estimated date of infection (EDI) was calculated as the median time between last negative and first positive RNA or Ab test. Spontaneous resolution was defined as viral clearance (HCV RNA negative) at \approx 24 wk (SR, $n = 8$), and CI was defined as HCV RNA positive at 24 wk (CI, $n = 6$). For the purpose of this study, two different time points were used: acute (<24 wk or 168 d) and follow-up (>49 wk or 343 d). Two HCV spontaneously resolved subjects who experienced a documented reinfection episode were recruited within the same cohort where reinfection was defined as a positive HCV-RNA test after two negative tests \geq 60 d apart. The detailed analysis of their immune response and T cell repertoire analysis were described previously (5, 16). Subjects' demographics are described in Table I. This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM; Protocol SL05.014).

Tetramer staining, flow cytometry, and cell sorting

The MHC class I monomer, HLA-A2 bound to the HCV NS3 peptide aa 1073–1081 (CINGVCWTV) [A2/NS3-1073], was synthesized by the National Institutes of Health Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA). Tetramers were prepared by adding 10 μ l of PE-labeled ExtrAvidin (Sigma, St. Louis, MO) five times, with 10-min incubation at room temperature after each addition. Cryopreserved PBMCs were thawed,

and CD8⁺ T cells were negatively selected using the MACS CD8⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Tetramer staining and cell surface staining were performed on isolated CD8⁺ T cells as previously described (16). Directly conjugated mAbs against the following cell-surface markers were used: CD3–Pacific Blue (clone UCHT1), CD8–Alexa Fluor 700 (clone RPA-T8), and CD45RO–BB515 (clone UCHL1), all from BD Biosciences (San Diego, CA). The LIVE/DEAD fixable aqua dead cell Stain Kit (Molecular Probes Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) was used to identify live cells. Cell sorting was performed using a BD Aria II cell sorter equipped with blue (488 nm), red (633 nm), and violet (405 nm) lasers (BD Biosciences), while multiparameter flow cytometry was performed using a BD LSRII instrument with the same setup and an additional yellow-green laser (561 nm) using FACSDiva software version 6.1.3 (BD Biosciences) at the CRCHUM flow cytometry core. Data files were analyzed using FlowJo software version 10.4.11 (BD Biosciences).

TCR V β -chain sequencing and analysis

FACS-sorted HCV-specific CD8⁺ T cells from each subject were sent to Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) for genomic DNA extraction followed by TCR β sequencing, as previously described (16). Data analyses were performed using ImmunoSEQ Analyzer software (v3.0) and R v3.5.1. All TCR repertoires were cleaned to remove sequences with a stop codon and those that are out of frame. The numbers of FACS-sorted CD8⁺ T cells, total and unique productive sequences, and clonality for each sample are detailed in Supplemental Table I. Diversity indices (Simpson diversity, Shannon entropy, CDR3 length, and NT additions) were provided by Adaptive Biotechnologies.

HCV NS3-1073 HCV epitope sequencing

HCV RNA was extracted from 500 μ l of plasma EDTA samples using QIAamp MinElute Virus spin kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's protocol. As previously described (21), purified viral RNA was reverse transcribed, PCR amplified, cloned, and sequenced at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montréal, QC).

VDJ database and computational analysis

We extracted HLA-A2–restricted Ag-specific TCR sequences from the VDJ database (<https://vdjdb.cdr3.net/>). Using R (<https://www.R-project.org/>) (22), we identified exact CDR3 amino acid sequence matches within this database (23) and our HCV NS3-1073 TCR repertoire dataset. Frequencies of identified CDR3 amino acid sequences in a particular subject's repertoire were summed up to quantify the percentage of clonotypes identical to other epitope(s)-specific TCR repertoire.

ELISPOT assay

IFN- γ ELISPOT assays were performed using 2×10^5 cryopreserved PBMCs, as previously described (24). The following peptides were used for this assay: HCV (NS3; CINGVCWTV), Flu (NA; CVNGSCFTV), CMV (pp65; NLVPMVATV), EBV (BMLF1; GLCTLVAML), Flu (M1; GILGFVFTL), yellow fever virus (YFV; NS4B; LLWNGPMAV), and Melanoma (MLANA; ELAGIGILTV). The HCV NS3-1073 peptide was synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (McGill University, Montréal, QC, Canada). The Flu NA-231 peptide was synthesized by JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany), whereas the other four were synthesized by ProImmune (Sarasota, FL).

Expansion of HCV-specific CD8⁺ T cells, peptide stimulation, and intracellular staining

HCV-specific CD8⁺ T cells were expanded as previously described (25). In brief, freshly thawed PBMCs were seeded in a 48-well plate at a concentration of 2×10^6 cells/well, in R10 (RPMI 1640 + 10% heat-inactivated FBS [Life Technologies]), supplemented with penicillin + streptomycin (P/S; 1 \times ; Wisent) and 14 mM HEPES (Wisent; R10-P/S-HEPES). Cells were stimulated with 10 μ g/ml HCV NS3 peptide (NS3-1073-1081; CINGVCWTV) for 2 wk at 37°C. Half of the medium was replenished every 3 d with R10-P/S-HEPES supplemented with 40 U/ml rIL-2 (National Institutes of Health AIDS Reagents Program) (R10-P/S-Hepes-IL-2, first rIL-2 addition on day 3). Expanded HCV-specific CD8⁺ T cells were then cryopreserved in freeze mix (FBS + 10% DMSO) at a concentration of 10^7 cells/ml. Thawed cells were restimulated in a 48-well plate at a concentration of 10^6 cells/well in the presence of 2×10^6 nonautologous irradiated (30 Gy) feeder cells and 0.01 μ g/ml anti-CD3 (Beckman Coulter), in R10-P/S-IL-2. Half of the medium was replenished every 3 d with R10-P/S-IL-2. After 2 wk, autologous EBV-transformed B cell lines (BLCLs), suspended in R10 medium, were irradiated at 100 Gy and prepulsed with either no peptide, 15 μ g/ml HCV NS3 peptide (NS3-1073-1081; CINGVCWTV), Flu

peptide (NA-231-239; CVNGSCFTV), or CMV peptide (pp65-495; NLVPMVATV) for 1 h at 37°C. BLCLs were then washed and incubated with HCV-specific T cells at a ratio of 10:1 (T cells:BLCL) for 6 h in AIM-V medium (Life Technologies) supplemented with 10% human serum (Wisent) and anti-CD107a-BUV395 Ab (clone H4A3; BD Bioscience). After 1 h of stimulation, 10 µg/ml brefeldin A (Sigma) and 6 µg/ml monensin (Sigma) were added to each well. At the end of the stimulation, cells were washed using FACS buffer (PBS, 1% FCS), surface staining was performed using directly conjugated mAbs (CD3–Pacific Blue [clone UCHT1], CD4-BV605 [clone RPA-T4], and CD8-allophycocyanin-H7 [clone SK1]), and live cells were identified as described earlier. Cells were then permeabilized with CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) for 15 min at 4°C in the dark, washed using PermWash buffer (BD Biosciences), and then incubated for 30 min at 4°C in the dark with anti-IFN-γ-PE-Cy7 (clone B27), anti-TNF-α-PerCP-Cy5.5 (clone MAb11), and anti-IL-2-allophycocyanin (clone MQ1-17H12) (all from BD Biosciences). Cells were then washed and fixed with 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS and analyzed by FACS as described earlier. Boolean gating and SPICE software were used for poly-functionality analysis (26).

Data availability

Raw data of all TCR sequences are available at <https://clients.adaptivebiotech.com/pub/mazouz-2021-ji> (DOI: 10.21417/SM2021JI).

Results

Comparable HCV NS3-1073-specific CD8⁺ TCR repertoire diversity regardless of HCV infection outcome

We analyzed the TCR repertoire of FACS-sorted MHC class I tetramer-reactive CD8⁺ T cells specific for the immunodominant HLA-A*0201-restricted NS3-1073 epitope in HCV-infected subjects ($n = 14$). Our cohort included samples collected during acute HCV infection (≤ 168 d after EDI) from either SRs (SR-Acute; $n = 4$) or subjects whose infections became chronic (CI-Acute; $n = 6$), as well as samples at a follow-up time point (≥ 347 d after EDI) after HCV clearance in the SR group (SR-Follow-up; $n = 8$) (Table 1). Four SR subjects had paired samples at both the acute and follow-up time points. Because the frequencies of NS3-1073-specific CD8⁺ T cells are dramatically reduced with progression toward chronic infection, we could not sort and analyze the repertoire of NS3-1073-specific CD8⁺ T cells in CI subjects at follow-up. The frequencies of HLA-A2/NS3-1073 tetramer⁺CD8⁺ T cells were not significantly different between groups (Fig. 1A, Supplemental Table I). In addition, we sorted and sequenced the TCR repertoire of total naive CD45RO⁺CD8⁺ T cells from two samples: SR.5-Acute and CI.5-Acute as controls for each group. TCR deep sequencing information, including number of sorted cells, productive total/unique sequences, and clonality, is presented in Supplemental Table I.

We compared the diversity of the repertoire in SR-Acute, SR-Follow-up, and CI-Acute samples using the Simpson diversity index, which integrates the number of clonotypes and their abundance (27) and ranges from 0 (high diversity, i.e., large repertoire) to 1 (low diversity, i.e., narrow repertoire) (Fig. 1B). We also examined the Shannon diversity, which integrates both the abundance and evenness (i.e., similarity of frequencies) of all clonotypes (28) and ranges from 0 (low diversity) to 1 (high diversity) (Fig. 1C). Both analyses demonstrated high diversity in all groups but no significant differences between groups (Fig. 1B and 1C). As shown by tree maps, the majority of samples displayed a broad TCR repertoire, with the top 10 sequences representing less than 25% of the total TCR repertoire in most samples (3/4 SR-Acute, 7/8 SR-Follow-up, 4/6 CI-Acute) (Fig. 1D). Only three samples (SR.1-Acute, SR.1-Follow-up, and CI.1-Acute) were more focused, with the top 10 sequences representing 55.8%, 43.5%, and 56.3% of their NS3-1073-specific TCR repertoire, respectively (Fig. 1D). Altogether, the accumulated frequencies of the top 10 TCR clonotypes showed no significant differences between the three groups (Fig. 1E).

Next, we assessed the CDR3 amino acid length distribution. The naive CD45RO⁺CD8⁺ TCR repertoires from SR.5-Acute and CI.5-Acute displayed a normal Gaussian distribution indicated by a coefficient of determination (R^2) close to 1 (Supplemental Fig. 1A, right). In contrast, the HCV NS3-1073-specific TCR repertoires were more skewed (R^2 ranged from 0.6 to 0.96) in all samples, suggesting Ag-specific clonotypic expansion (Supplemental Fig. 1A, left). The CDR3 lengths were skewed, but no particular amino acid length was preferentially overrepresented (Supplemental Fig. 1A, left). There were no significant differences in the CDR3 amino acid length distribution between SR-Acute, SR-Follow-up, and CI-Acute (represented as R^2 ; Supplemental Fig. 1B).

Altogether, these data suggest that SR-Acute, SR-Follow-up, and CI-Acute samples had similar highly diverse HCV NS3-1073-specific TCR repertoire.

TCRBV V04 and V06 gene families are preferentially used in all groups

To further characterize the HCV NS3-1073-specific TCR repertoire, we analyzed and compared the TCRBV gene usage between all groups. As we previously described (16), we stratified clonotypes at the nucleotide level into four distinct categories according to their abundance within the total repertoire analyzed in each subject: dominant (frequencies $\geq 1\%$), subdominant ($\geq 0.5\%$), low-abundance ($\geq 0.1\%$), and lowest-abundance clonotypes ($< 0.1\%$). Hereinafter, all HCV NS3-1073-specific TCR repertoire results presented will focus on dominant, subdominant, and low-abundance clonotypes only. The detailed raw TCR sequencing data for each subject are available online as described in *Materials and Methods*. Using a threshold frequency of $\geq 10\%$, we found that the most frequently used V gene families were V02–V07 and V09, irrespective of HCV infection outcome. Fig. 2A shows V02–V09 families, while all families are shown in Supplemental Fig. 2A. V04 and V06 were the two V gene families preferentially used in all groups. Also, V04 was significantly more frequently used as compared with V06 ($p \leq 0.05$) at the follow-up time point in SR (Fig. 2A). By examining paired naive and acute samples from SR.5 and CI.5, we observed that the preferential usage of V04 and V06 was not associated with their overrepresentation within the naive pool (Supplemental Fig. 2B). V02 was significantly enriched in CI-Acute as compared with SR-Follow-up ($p \leq 0.05$), but this was mainly driven by one outlier. Similarly, V09 was significantly enriched in SR-Acute as compared with SR-Follow-up ($p \leq 0.01$) and CI-Acute ($p \leq 0.001$) samples because of another outlier.

Next, we examined whether preferential usage of these V genes was sustained after resolution of acute HCV infection. We compared the TCR repertoire of paired samples from four SR subjects during acute infection and at a follow-up time point at > 49 wk after HCV infection (range, 367–503 d after EDI). The V gene family usage profiles remained comparable at follow-up (Fig. 2B). The V04 and V06 remained within the top four preferentially used families by all subjects (Fig. 2B–D). Altogether, these data demonstrate preferential V04 and V06 usage in all groups during acute infection. This preferential usage was sustained at follow-up in SR subjects.

Expansion of 13 HCV NS3-1073-specific public clonotypes irrespective of acute infection outcome and their longevity after spontaneous clearance

Next, we performed an in-depth analysis of all CDR3 sequences within the repertoire to identify public TCR clonotypes (CDR3 amino acid sequence) that are present in multiple individuals [reviewed by Li et al. (29)]. First, we sought to identify the number of common identical CDR3 sequences in all potential pairwise combinations among dominant, subdominant, and low-abundance clonotypes (Fig. 3A). As expected, the highest number of shared clonotypes was between samples belonging to the same subject at

Table 1. Study subjects' characteristics and demographics

| Subject ID | Sex | Age at Infection or Reinfection, y | Time Point Studied | Days after EDI | Genotype | Plasma HCV RNA, IU/ml | N5S-I073 Antigenomic Sequence ^a CTINGVGVTV ^b |
|----------------------|-----|------------------------------------|--------------------|----------------------|----------|-----------------------|---|
| SR.1 | F | 36 | Acute | 155 | I | <15 | ND |
| SR.2 | M | 45 | Follow-up | 413 | I | Undetectable | ND |
| SR.3 | M | 42 | Follow-up | 430 | N/A | Undetectable | ND |
| SR.4 | M | 40 | Follow-up | Unknown ^c | I | Undetectable | ND |
| SR.5 | F | 22 | Acute | 347 | Ia | Undetectable | ND |
| | | | | 29 | | 10,397 | ----- (1/6) --A----- (5/6) |
| SR.6 | M | 31 | Follow-up | 503 | N/A | Undetectable | ND |
| SR.7 | F | 21 | Follow-up | Unknown ^c | I | Undetectable | ND |
| | | | | 75 | | 4107 | ----- (2/7) -V----- (4/7) R----- (1/7) |
| SR.8 | M | 36 | Follow-up | 389 | Ia | Undetectable | ND |
| | | | | 168 | | 16,667 | ----- (4/5) |
| CL.1 | M | 38 | Follow-up | 367 | Ia | Undetectable | -----A (1/5) |
| CL.2 | F | 28 | Acute | 77 | Ia | 18,000 | ND |
| CL.3 | M | 56 | Acute | 68 | Ia | 3192 | ----- (8/8) |
| CL.4 | M | 48 | Acute | 91 | Ia | 5,128,614 | ----- (8/8) |
| CL.5 | M | 32 | Acute | 89 | Ia | 11,487,369 | ----- (6/6) |
| CL.6 | M | 21 | Acute | 83 | Ia | 2,106,667 | ----- (8/8) |
| SR/SR-1 ^d | M | 21 | Acute | 46 | Ia | 10,567 | ----- (5/5) |
| | | | Pre-reinfection | -375 | I | Negative | ND |
| | | | Peak reinfection | 32 | | Undetectable | ND |
| | | | Late reinfection | 180 | | Undetectable | ND |
| SR/CL-2 ^d | M | 29 | Pre-reinfection | -60 | Ia | Undetectable | ND |
| | | | Peak reinfection | 70 | | 644 | ----- (10/10) |
| | | | Late reinfection | 170 | | Positive (ND) | -----A----- (8/8) -----L-I (8/8) |

^aNumber of individual molecular clones sequenced.

^bHCV H77 (genotype Ia) reference sequence.

^cSubject was HCV Ab positive, HCV RNA negative (Resolver) at time of recruitment with no previous infection history.

^dThese data were previously published in Abdel-Hakeem et al. (5).

F, female; M, male; N/A, not available; ND, not done.

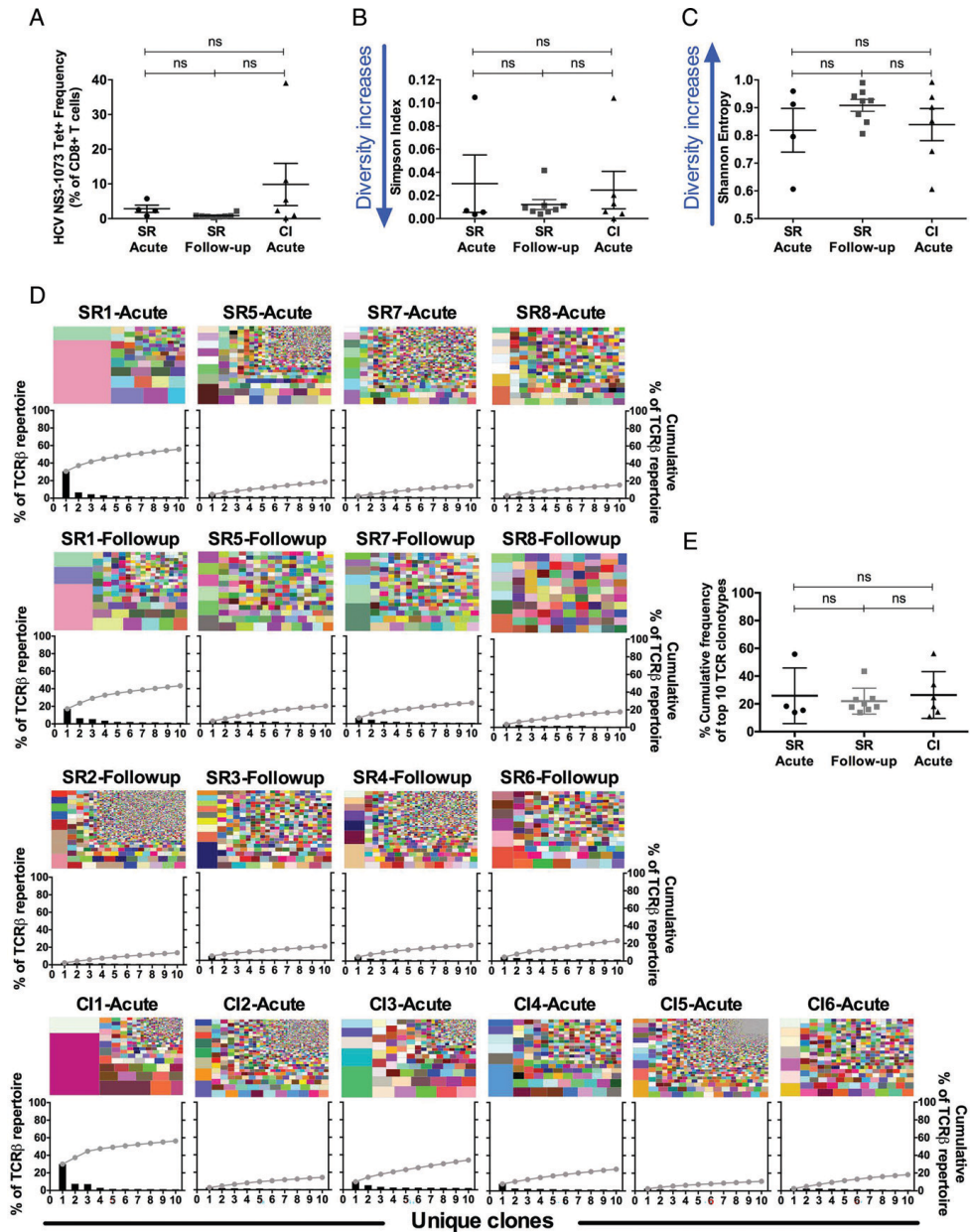


FIGURE 1. Comparable NS3-1073-specific CD8⁺ TCR repertoire diversity in SR-Acute, SR-Follow-up, and CI-Acute samples. Analysis of the TCRβ repertoire of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells sorted from the peripheral blood of SR subjects during either acute HCV (SR-Acute; $n = 4$) or follow-up (SR-Follow-up; $n = 8$) and subjects with CI during acute HCV (CI-Acute; $n = 6$). The subjects' clinical characteristics, demographics, and time points tested are indicated in Table I. **(A)** Frequencies of HLA-A2/NS3-1073 tetramer⁺ CD8⁺ T cells in the indicated samples. **(B and C)** Simpson diversity (B) and Shannon entropy (C) of all the specific repertoires in the analyzed samples. **(D)** Tree maps show each sample's TCR repertoire. (*Figure legend continues*)

two different time points (e.g., SR.1-Acute and SR.1-Follow-up). In contrast, CI.4-Acute did not share any clonotypes with SR.5-Acute, SR.5-Follow-up, and SR.8-Follow-up. All other pairwise comparisons revealed the presence of 1–11 identical CDR3 sequences (Fig. 3A). To refine our analyses, we designated a given clonotype as “public” if it was present in at least two subjects at a cumulative frequency of $\geq 0.5\%$, irrespective of infection outcome. Using these criteria, we identified a set of 13 public clonotypes (Fig. 3B, Supplemental Table II). These public clonotypes and their cumulative frequencies in each sample are summarized in Supplemental Table II. Six public clonotypes (1, 3, 4, 7, 10, and 13) used the V04 gene family. Two of them (public clonotypes 7 and 10) were highly related because they were both 13 aa long with only 1 aa difference (Supplemental Table II). These public clonotypes did not segregate samples by group, underscoring that their expansion was independent of infection outcome (Fig. 3B). One public TCR clonotype (CASSQEPGAPNTGELFF [V04-02/J02-02]), hereinafter termed public clonotype 1, was detected in most samples (12/14) (Fig. 3B). The cumulative frequencies of this public clonotype were not significantly different between all groups (Fig. 3C). Other public clonotypes were detected in fewer subjects and at lower frequencies. Public clonotypes 2, 7, and 10–12 were primarily detected in resolvers, while public clonotype 13 was detected only in subjects with CI. Public clonotype 1 was long-lived and detectable at the follow-up time point in subjects SR.1, SR.5, SR.7, and SR.8 at a frequency of 0.28–2.65% at 1–2 y postinfection (Fig. 3B, Supplemental Table II). Other public clonotypes that were present during the acute phase at a frequency of $>1\%$ were also maintained at a high frequency at the follow-up time point. Altogether, these results suggest that HCV infection can prime the expansion of several public clonotypes. Several of these public clonotypes, including the dominant public clonotype 1, were long-lived and detectable in resolvers after HCV clearance.

The TCR- α -chain is an important determinant of the functionality of a public clonotype. However, it is technically challenging to identify the TCR $\alpha\beta$ paired sequences from bulk sequencing data. To gain an insight about the TCR $\alpha\beta$ pairing of the identified public clonotypes, we examined publicly available data. Eltahla et al. (30) examined paired TCR $\alpha\beta$ sequences via single-cell RNA sequencing of NS3-1073-specific CD8⁺ T cells from one subject who had spontaneously resolved primary HCV infection. Three of the public clonotypes we identified, including the dominant public clonotype 1 and public clonotypes 2 and 5, were also detected by Eltahla et al. (30), together with their corresponding TCR α sequences (Fig. 3D). These data confirm the presence of these public clonotypes in another unrelated study subject and potential paired TCR α sequences. However, additional studies are required to clone and analyze the impact of the different TCR- α -chain sequences on the functionality of these public clonotypes.

Expansion of HCV NS3-1073-specific public clonotypes is independent of autologous virus sequence

To assess whether the preferential expansion of certain public clonotypes was associated with a specific viral variant, we sequenced the region spanning the NS3-1073 epitope in autologous virus isolated from the plasma of subjects who had high viral loads that were high enough to sequence ($n = 9$; Table I). Compared with the epitope

reference sequence (CINGVCWTV), we did not detect any sequence variation in the autologous virus in the CI group. However, we detected variant viral sequences in three of the SR-Acute samples (SR.5, SR.7, and SR.8). All three subjects exhibited an expansion of public clonotype 1. Furthermore, the viral variants were not the same in all subjects, suggesting that a particular HCV NS3-1073 viral sequence is not the main driver of expansion of this public clonotype, and that this public clonotype may have the flexibility to recognize multiple variants of the same epitope.

Limited overlap between public clonotypes and HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells from seronegative subjects

Next, we sought to examine whether the dominant public clonotypes we detected were enriched because of a pre-existing pool of cross-reactive memory CD8⁺ T cells before HCV infection. Zhang et al. (19) had previously reported the presence of naive and memory HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells in HCV-seronegative subjects, suggesting that these T cells might, in part, be primed by previous heterologous infections. We searched for exact matches between the data from Zhang et al. (19) and ours. We identified four TCR clonotypes from our dataset that were also present in seronegative subjects. These four clonotypes contained only one public clonotype (public clonotype 4), while the other three clonotypes did not meet our public clonotype criteria (Table II). These results suggest that the public clonotypes detected in our study are unlikely to have originated from a memory pool of cross-reactive CD8⁺ T cells.

Expansion of NS3-1073-specific public clonotypes during HCV reinfection and spontaneous clearance

Next, we examined whether the public clonotypes that we identified and were long-lived would preferentially expand on HCV re-exposure and reinfection. We had previously published a longitudinal analysis of the HCV NS3-1073-specific TCR repertoires from two HCV resolvers with a documented HCV reinfection episode where one spontaneously cleared (SR/SR-1), while the other became persistently infected (SR/CI-2) (16). This divergent outcome was associated with different levels of expansion of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells in each subject (Fig. 4A). In subject SR/SR-1, NS3-1073-specific CD8⁺ T cells expanded from 0.46% to 3.37% during peak reinfection (3 wk after detection of reinfection) where $\sim 58\%$ of tetramer⁺ cells exhibited a CD127[−] effector phenotype. The frequency then stabilized at 0.57% at late reinfection (24 wk). In subject SR/CI-2, NS3-1073-specific CD8⁺ T cells were at 0.70% at pre-reinfection, decreased to 0.32% during peak reinfection (week 4), and then stabilized at 0.63% at late reinfection (week 24). Autologous virus sequencing in SR/CI-2 revealed a variant of the NS3-1073 epitope (Table I) that was not recognized by the pre-existing memory CD8⁺ T cells, which may explain the limited expansion of the NS3-1073 population in that subject (5).

Within the NS3-1073-specific FACS-sorted CD8⁺ T cells, public clonotype 1 was detected only in subject SR/CI-2. Although the overall tetramer frequency did not increase, this public clonotype expanded 2.49-fold at peak reinfection and remained within the dominant pool at late reinfection (Fig. 4A). Public clonotypes 2, 3, and 6 were present in both subjects. Public clonotype 2 was detectable at pre-reinfection at a frequency of 1.62% and 1.10% of the repertoire in SR/SR-1 and SR/CI-2, respectively. At peak reinfection, it

Each colored square represents a CDR3 clonotype and its proportion within the entire TCR repertoire. Clonotypes in common between paired samples (e.g., SR.1-Acute and SR.1-Follow-up) are represented using the same color. Apart from paired samples, colors were randomly chosen. Graphs below each tree map show the individual CDR3 clonotype frequency (left y-axis) and the cumulative frequency (gray circles and line graph) of the top 10 expanded clonotypes (right y-axis). (E) Cumulative frequencies of the top 10 clonotypes. ns, not significant.

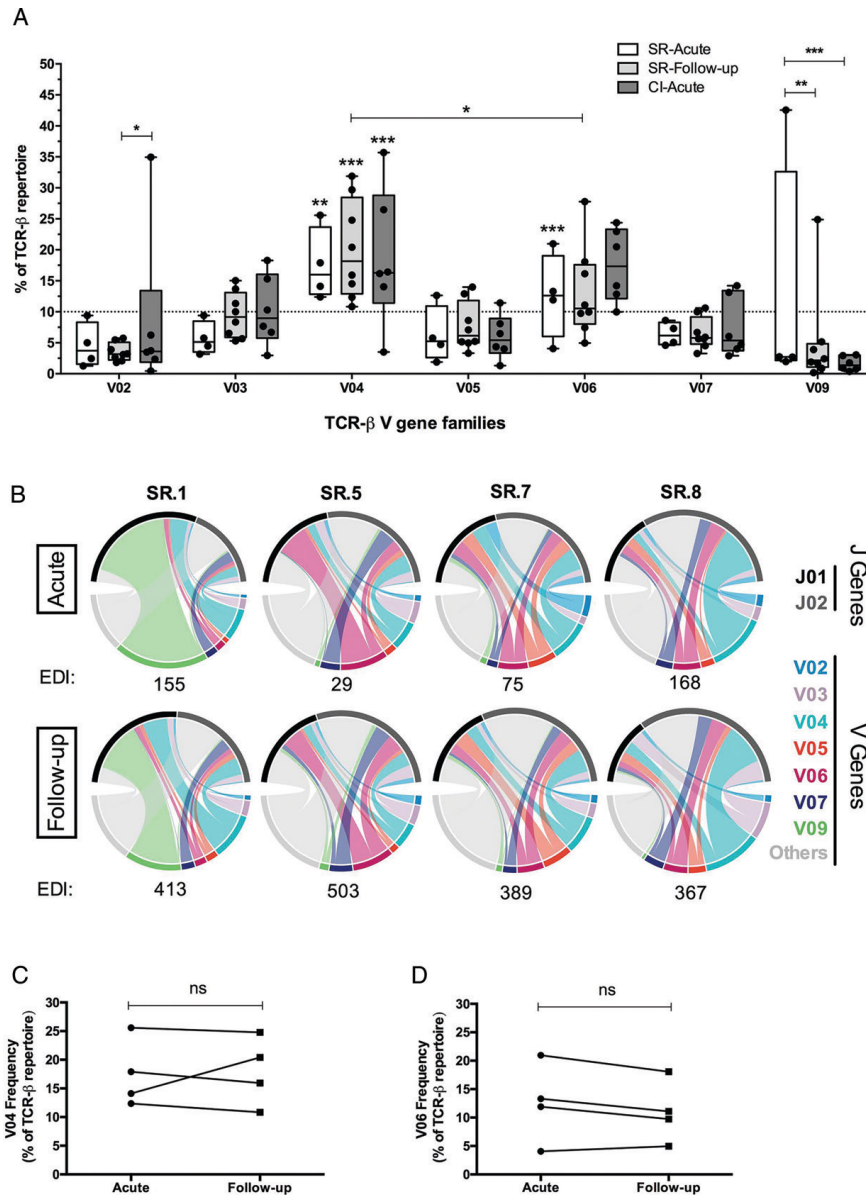


FIGURE 2. TCRBV04 and V06 V gene families are preferentially used by HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells from all groups. **(A)** Frequency of preferentially used TCRBV families among dominant ($\geq 1\%$), subdominant ($\geq 0.5\%$), and low-abundance clonotypes ($\geq 0.1\%$) in SR samples collected during acute ($n = 4$), follow-up ($n = 8$), and CI-Acute samples ($n = 6$) (two-way ANOVA; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$). In this figure, only V gene families of frequencies $\geq 10\%$ are shown, and only key TCRBV families that are significant as compared with at least three other families are highlighted. For the full representation, see Supplemental Fig. 2. **(B)** Evolution of J and corresponding V genes usage in paired samples from four SR subjects at the acute and follow-up time points, shown as chord diagrams representing frequencies of dominant, subdominant, and low-frequency clonotypes. The size of the colored arcs is proportional to V genes frequencies and the corresponding V-J pair. **(C and D)** Cumulative frequencies of **(C)** V04 and **(D)** V06 usage within dominant, subdominant, and low-frequency clonotypes in paired samples collected from SR subjects during acute and follow-up time points (Student *t* test). ns, not significant.

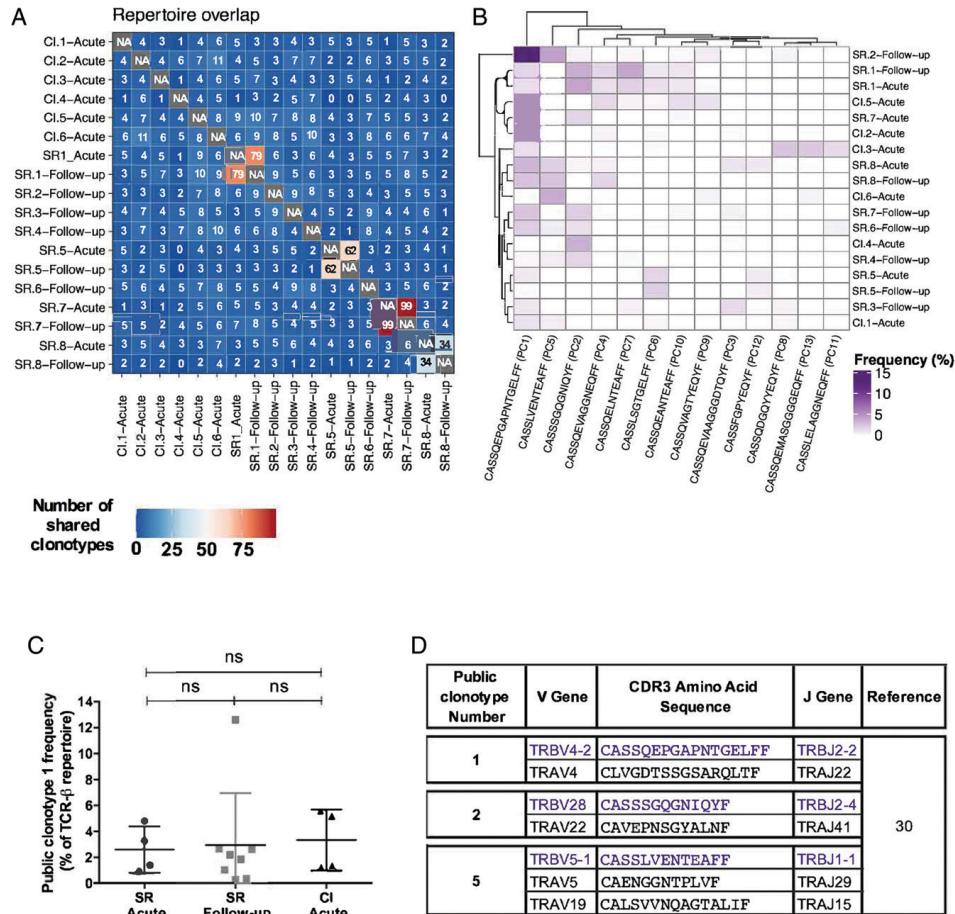


FIGURE 3. Identification of a set of HCV-specific public clonotypes irrespective of infection outcome. **(A)** The number of common CDR3 amino acid sequences among dominant ($\geq 1\%$), subdominant (0.50–0.99%), and low-abundance (0.49–0.10%) clonotypes of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells in analyzed samples represented as a heatmap. A clonotype was termed “public” if it was present in at least two subjects at a cumulative frequency $\geq 0.5\%$, irrespective of infection outcome. **(B)** Heatmap showing the cumulative frequencies of the CDR3 amino acid sequence of the 13 identified public clonotypes within dominant, subdominant, and low-abundance clonotypes. **(C)** Cumulative frequencies of public clonotype 1 within dominant, subdominant, and low-abundance clonotypes in SR samples collected during acute ($n = 4$), follow-up ($n = 8$), and CI-acute samples ($n = 6$) (one-way ANOVA). **(D)** Corresponding α -chain amino acid sequences of public clonotypes 1, 2, and 3 extracted from the study by Eltahlia et al. (30). ns, not significant.

expanded only in subject SR/SR-1, representing 3.85% of the effector (CD127⁻) and 0.90% of the memory (CD127⁺) CD8⁺ T cells repertoire. Public clonotype 3 slightly expanded (1.2-fold) in subject SR/CI-2. Public clonotype 6 was detectable at pre-reinfection at a higher frequency in SR/SR-1 (2.10%) as compared with SR/CI-2 (0.28%). It expanded to 2.25% of memory CD127⁺ T cells and to 1.53% of effector CD127⁻ T cells in SR/SR-1. It also expanded 1.57-fold in SR/CI-2. Public clonotypes 5 and 12 were detectable only in SR/CI-2 and were at low frequencies ($\leq 0.21\%$) at either pre-reinfection or late reinfection, respectively, and therefore are unlikely to have played a key role during reinfection (Fig. 4A).

We had previously established T cell clones from SR/SR-1 (clones R1–R5) (16), so we examined them for the presence of the

public clonotypes identified in this study. Two clones had public clonotypes: clone R2 carried public clonotype 2, and clone R4 carried a mix of public clonotypes 2 and 6 (Fig. 4B). These T cell clones also displayed high functional avidity (16) and polyfunctionality indices (Fig. 4C). In summary, these data suggest that pre-existing public clonotypes of NS3-1073-specific CD8⁺ T cells can expand on HCV re-exposure and reinfection, are polyfunctional, and may contribute to viral clearance.

Shared clonotypes between HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells and CD8⁺ T cells recognizing other HLA-A2-restricted epitopes

Previous studies reported that HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells can be cross-reactive and can recognize HLA-A2-restricted

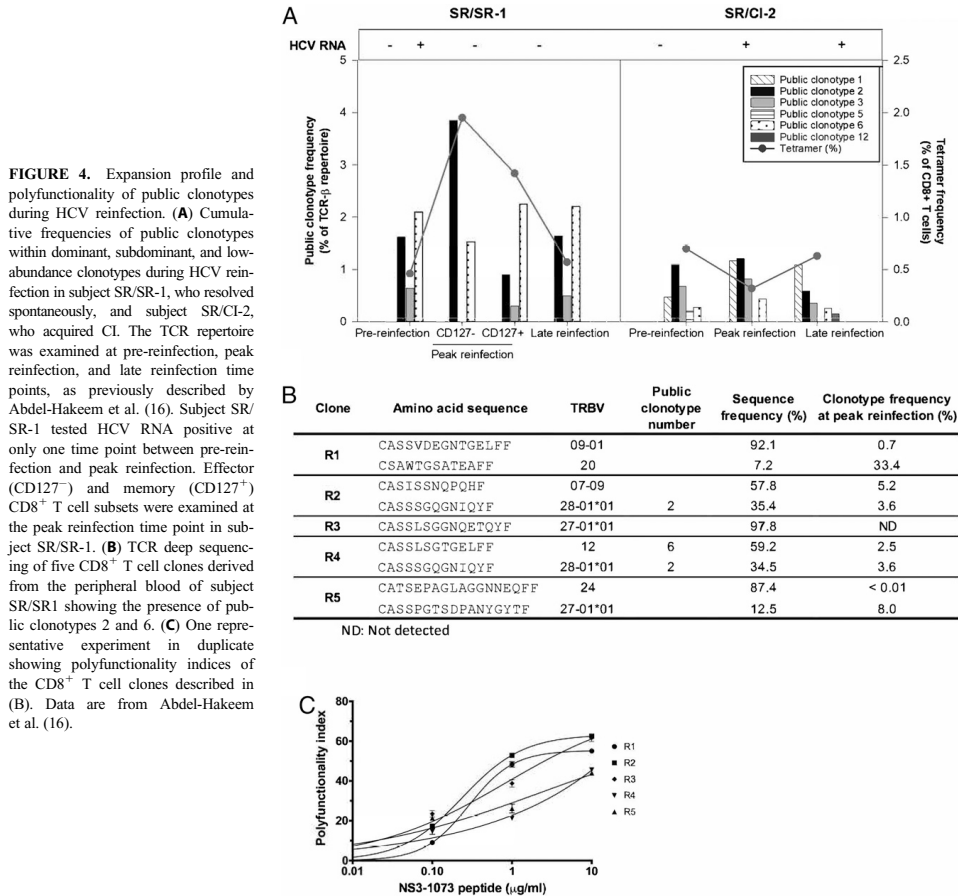
Table II. Overlap between NS3-1073-specific clonotypes from seronegative subjects and our dataset

| Public Clonotype Number | CDR3 Amino Acid Sequence | Subject ID | Acute | | | Follow-Up | | |
|-------------------------|--------------------------|------------|--------|---------------|-------|-----------|---------------|-------|
| | | | V Gene | Frequency (%) | Total | V Gene | Frequency (%) | Total |
| 4 | CASSQEVAGGNEQFF | SR.1 | V04-02 | 1.17 | 1.35 | V04-02 | 1.70 | 1.83 |
| | | | V04-03 | 0.18 | | V04-03 | 0.13 | |
| | | SR.7 | V04-03 | 0 | 0 | V04-03 | 0.20 | 0.20 |
| | | | V04-03 | 0.58 | 0.58 | V04-03 | 1.77 | 1.77 |
| | | CI.2 | V04-02 | 0.51 | 0.51 | ND | ND | ND |
| | | CI.3 | V04-02 | 0.12 | 0.12 | ND | ND | ND |
| CI.5 | V03 | 1.70 | 1.70 | ND | ND | ND | | |
| N/A | CASSPLGSSYEQYF | SR.3 | ND | ND | ND | V27-01 | 0.13 | 0.13 |
| | | SR.7 | V27-01 | 0.19 | 0.19 | V27-01 | 0.20 | 0.20 |
| | | SR.8 | V10-02 | 0.19 | 0.19 | V10-02 | 0 | 0 |
| | | SR.8 | V10-02 | 0.19 | 0.19 | V10-02 | 0 | 0 |

Data for the seronegative subjects are from Zhang et al. (19).
N/A, not available; ND, not done.

epitopes from other viruses, including influenza (NA-231), CMV (pp65), and EBV (LMP2) (17–19). However, these studies did not examine the TCR repertoires of cross-reactive T cells, and it is unknown whether the same clonotypes/public TCRs are expanded

during these different viral infections. Thus, we sought to identify HCV NS3-1073-specific clonotypes that are common with T cell repertoires specific for other HLA-A2-restricted epitopes and that may be cross-reactive. Using the online VDJ database developed by



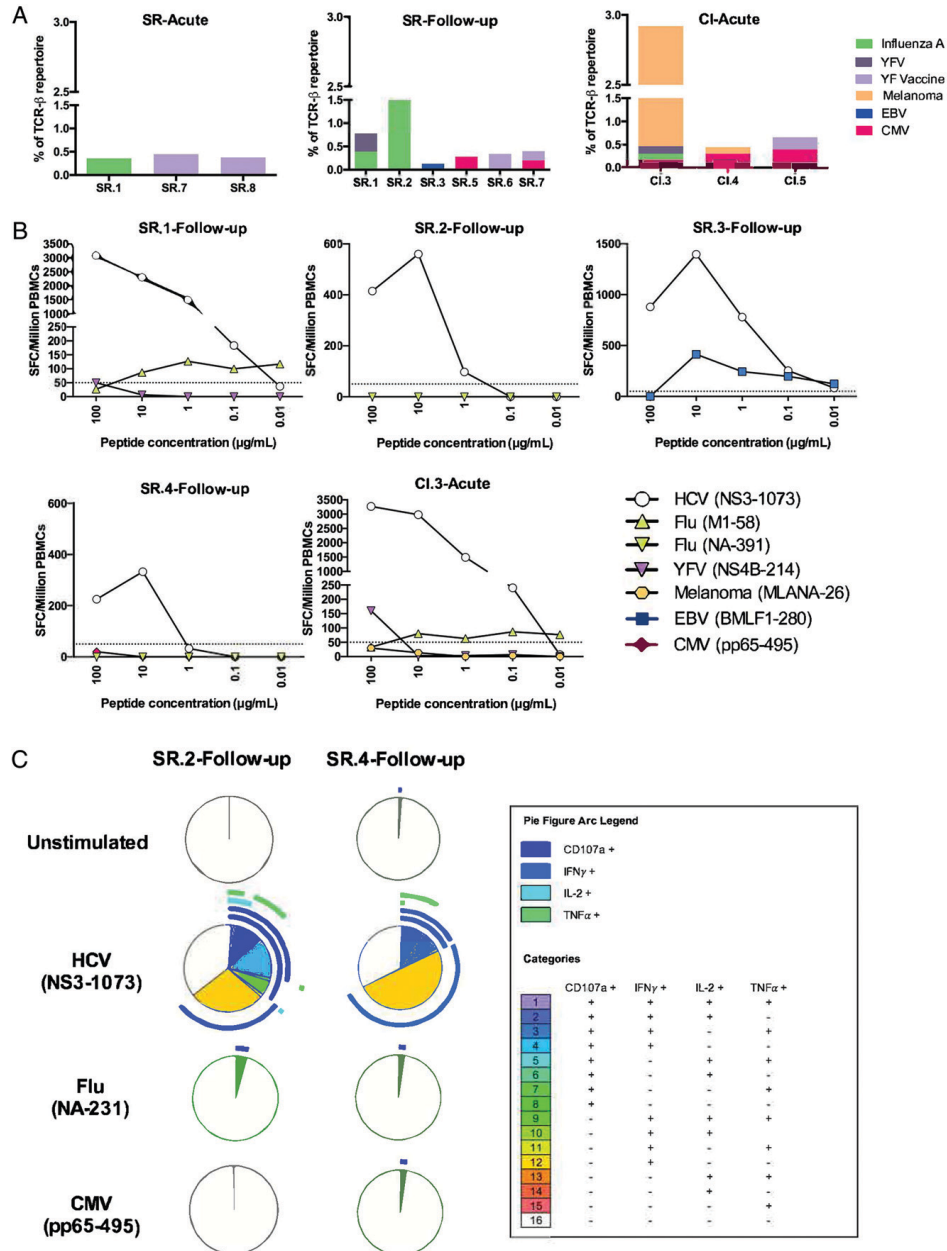


FIGURE 5. Limited recognition of HLA-A2-restricted epitopes by HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells. **(A)** Frequencies and predicted specificities of TCR clonotypes of HCV-specific CD8⁺ T cells from the indicated HCV-infected samples shared with other HLA-A2-restricted epitopes from the VDJ database. **(B)** PBMCs from four SR-Follow-up samples were tested in a dose-response IFN-γ ELISPOT assay against the cognate HCV (NS3-1073) epitope and the potentially cross-reactive HLA-A2-restricted epitope(s) based on the shared TCR clonotypes represented in (A) and Table III. *(Figure legend continues)*

Downloaded from <http://www.jimmunol.org/> at Univ of Montreal Biblio de la Sante on August 2, 2021

Shugay et al. (23) and CDR3 sequences from a study of the TCR repertoire after YFV vaccination by Pogorelyy et al. (31), we searched for exact matches between TCR clonotypes identified in our study and known clonotypes specific to various HLA-A2-restricted epitopes. The resulting list of shared CDR3 amino acid sequences, their cumulative frequencies in each subject, and the cognate epitope(s) are presented in Fig. 5A and Table III. Shared CDR3 amino acid sequences were found in three SR-Acute, six SR-Follow-up, and three CI-Acute samples. These shared clonotypes were specific to different Ags, including pp65 (CMV) (32), BMLF1 (EBV) (33), M1 (influenza) (32), NS4B (YFV) (34), and MLANA (Melanoma) (35) (Fig. 5A, Table III). However, these clonotypes represented only minor fractions of the repertoire of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells. The lowest frequency was 0.19% for YFV vaccine TCR in SR.7-Acute, whereas the highest was MLANA (Melanoma) at a frequency of 2.45% in CI.3-Acute (Fig. 5A, Table III).

The majority of the identified clonotypes were private (present in only one subject). Only one clonotype previously reported to be reactive to the M1 epitope (Influenza) (CASSQVQGTYEQYF) (32) was detected in three subjects, but the frequencies were less than 0.5% in two of these subjects, and therefore not meeting our criteria for designation as a public clonotype (Table III). Interestingly, none of the HCV NS3-1073 public clonotypes (Supplemental Table II) were shared with other HLA-A2-restricted Ags, suggesting that these public clonotypes are unique to HCV. Overall, despite the multiple shared clonotypes identified, they represented only a minor fraction of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cell repertoires (generally <1%), and they were thus unlikely to have contributed to viral clearance.

Limited recognition of HLA-A2-restricted epitopes by HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells

Next, we assessed the *in vitro* cross-reactivity of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells with other viral Ags. We selected three resolver follow-up samples from subjects SR.1, SR.2, and SR.3 and one chronic acute (CI.3-Acute) sample because they expressed TCR clonotypes shared with other HLA-A2-restricted epitopes (Fig. 5A). SR.4-Follow-up sample was used as a control because it did not contain any shared clonotypes. We used a dose-response IFN- γ ELISPOT assay to compare directly *ex vivo* the reactivity of PBMC samples against the HCV NS3-1073 epitope and the other potentially cross-reactive epitopes based on the shared TCR repertoire of each subject as depicted in Fig. 5A and Table III. We also examined the response against the Flu NA-231 epitope known to be cross-reactive with HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells (17, 19). All samples tested showed a strong response to HCV NS3-1073 and limited responses to the other HLA-A2-restricted epitopes (Fig. 5B).

To test whether any responses were missed because of low frequencies of cross-reactive CD8⁺ T cells, we expanded NS3-1073-specific CD8⁺ T cells *in vitro* by stimulation with the cognate peptide for 14 d as described in *Materials and Methods*. We then tested the polyfunctionality of these expanded cells by intracellular cytokine staining after stimulation with NS3-1073, CMV (pp65), or Flu (NA-231) and evaluated the production of IFN- γ , TNF- α , IL-2, and the degranulation marker CD107a (Fig. 5C). We selected two

samples, SR.2-Follow-up and SR.4-Follow-up, because they had high frequencies of NS3-1073 tetramer⁺CD8⁺ T cells (Supplemental Table I). They also exhibited different levels of V04 gene usage (21.57% versus 15.9%) and public clonotype 1 (6.86% versus 0.47%). Although SR.4-Acute expressed more IFN- γ at the individual cytokine level, SR.2-Acute displayed a higher frequency of CD8⁺ T cells producing more than one effector function (Fig. 5C). In contrast, very limited responses were detected after stimulation with pp65 (CMV) or NA-231 (Flu) where only low levels of CD107a were detected (Fig. 5C).

In summary, these results demonstrate that HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells share a very limited number of clonotypes with other HLA-A2-restricted epitopes and consequently exhibit low cross-reactivity, suggesting that they were not primed by other pathogens before HCV infection.

Discussion

We characterized and tracked directly *ex vivo* the TCR repertoire of the HCV-1073-specific CD8⁺ T cells during acute HCV in resolvers and subjects progressing to chronic infection, as well as at ~1 y after HCV resolution in resolvers. TCR repertoires responding to the conserved NS3-1073 epitope were highly diverse with preferential usage of the TRBV04 and V06 families regardless of infection outcome. We identified 13 public clonotypes unique to HCV that were shared across several subjects. Several of these public clonotypes were long-lived in resolvers and re-expanded on reinfection. In addition, we identified a set of TCR clonotypes shared with other HLA-A2-restricted epitopes suggesting potential cross-reactivity. However, these clonotypes were of low frequency and demonstrated limited cross-reactivity in *in vitro* assays and are thus unlikely to have played a major role in determining the outcome of primary acute HCV infection.

We demonstrated that the HCV NS3-1073-specific TCR β repertoire was diverse during early acute infection irrespective of infection outcome, and that this diversity persisted at long-term follow-up. Several studies demonstrated that a diverse CD8⁺ TCR repertoire is important in recognizing escape mutations in targeted epitopes that may arise during HIV or HCV infections (36–39). These studies suggested that having a more diverse repertoire early during acute infection allows refined selection of the most effective clonotype against the infecting virus sequence and potential escape mutations. In this study, we identified different viral variants of the HCV NS3-1073 epitope in resolvers. These variants are known to affect either HLA-A2 binding or TCR recognition (40, 41). The fact that subjects SR.5 and SR.8 spontaneously cleared their acute infection suggests that the diverse repertoire and the public TCRs identified in these subjects were flexible and were able to recognize both the reference sequence (used in the tetramers) and the autologous sequences effectively.

We identified a set of 13 NS3-1073-specific public clonotypes with different expansion profiles. This might be explained by the usage of a different α -chain leading to a TCR $\alpha\beta$ clonotype of higher or lesser affinity to the cognate epitope. We could not examine the TCR $\alpha\beta$ paired sequences in our study but were able to identify three of them from publicly available data (30). This approach

These included Flu (NA-231 and M1-58), YFV (NS4B-214), Melanoma (MLANA-26), EBV (BMLF1-280), and CMV (pp65-495) peptides. The frequencies of IFN- γ spot-forming cells (SFCs) per million PBMCs are shown for each sample. (C) HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells were expanded from the PBMCs of subjects SR.2 and SR.4 (at the follow-up time point) with the NS3-1073 peptide as indicated in *Materials and Methods*. Expanded HCV-specific CD8⁺ T cell lines were stimulated for 6 h with autologous EBV-transformed BLCLs prepulsed or not with either HCV (NS3 1073), Flu (NA-231), or CMV (pp65-495) peptides. Functionality was examined by flow cytometry as indicated in *Materials and Methods*. Boolean gating and SPICE software were used to assess polyfunctionality profiles of total CD8⁺ T cells in each sample.

Table III. List of NS3-1073-specific clonotype shared with other HLA-A2-restricted epitopes

| Subject ID | CDR3 Amino Acid Sequence | Acute | | Follow-up | | VDJ Database (23) | | | Reference | | |
|------------|--------------------------|--------|---------------|-----------|--------|-------------------|-------|--------------------------------|-----------|-------------|---------|
| | | V Gene | Frequency (%) | Total | V Gene | Frequency (%) | Total | Origin | | Protein | Epitope |
| | | | | | | | | | | | |
| SR.5 | CASSLSAFGATNEKLEFF | V07-06 | 0 | 0 | V07-06 | 0.28 | 0.28 | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| SR.7 | CASSSDNEQFF | V03 | 0 | 0 | V03 | 0.20 | 0.20 | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| CL.3 | CASSLSASTTEAF | V05-08 | 0.17 | 0.17 | V03 | ND | ND | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| CL.4 | CASSLVNEQFF | V13-01 | 0.15 | 0.15 | ND | ND | ND | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| CL.4 | CASSLLVAGVYEQYF | V07-09 | 0.15 | 0.15 | ND | ND | ND | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| CL.5 | CASSLGLYEQYF | V07-09 | 0.40 | 0.40 | ND | ND | ND | CMV | pp65 | NLVPVAVTV | 32 |
| SR.3 | CASSVGNQFF | ND | ND | ND | V09-01 | 0.13 | 0.13 | EBV | BMLF1 | GLCTLVAVMIL | 33 |
| SR.1 | CASSQVQGTVEQYF | V03 | 0.36 | 0.36 | V03 | 0.39 | 0.39 | Influenza A | MI | GLHGFVFTL | 32 |
| SR.2 | CASSQVQGTVEQYF | ND | ND | ND | V03 | 1.50 | 1.50 | Influenza A | MI | GLHGFVFTL | 32 |
| CL.3 | CASSQVQGTVEQYF | V03 | 0.13 | 0.13 | ND | ND | ND | Influenza A | MI | GLHGFVFTL | 32 |
| SR.1 | CASSQGANKEKLEFF | V04-02 | 0 | 0 | V04-02 | 0.39 | 0.39 | YFV | NS4B | LLWNGPMAV | 34 |
| CL.3 | CASSQGANKEKLEFF | V04-02 | 0.17 | 0.17 | ND | ND | ND | YFV | NS4B | LLWNGPMAV | 34 |
| SR.6 | CASSLVAEASSYEQYF | ND | ND | ND | V05-06 | 0.17 | 0.34 | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| SR.7 | CASSRAGDYEQYF | V28-01 | 0.19 | 0.19 | V28-01 | 0.20 | 0.20 | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| SR.8 | CASSFNNEQFF | V07-06 | 0.19 | 0.19 | V07-06 | 0 | 0 | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| SR.8 | CASSTNTDQYF | V11-01 | 0.19 | 0.19 | V11-01 | 0 | 0 | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| SR.7 | CASGGQSYEQYF | V12 | 0.26 | 0.26 | V12 | 0 | 0 | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| CL.5 | CASGGQSYEQYF | V12 | 0.26 | 0.26 | ND | ND | ND | YFV vaccine | NS4B | LLWNGPMAV | 31 |
| CL.3 | CASITLGGTEAF | V05-06 | 2.45 | 2.45 | ND | ND | ND | <i>Homo sapiens</i> (Melanoma) | MLANA | ELAGIGILTV | 35 |
| CL.4 | CASSLSGGQYEQYF | V27-01 | 0.15 | 0.15 | ND | ND | ND | <i>Homo sapiens</i> (Melanoma) | MLANA | ELAGIGILTV | 35 |

ND, not done.

remains very limited to one subject and three sequences. Additional studies using single-cell sequencing approaches coupled with cloning of the receptor(s) of interest and functional analysis would provide better insights about the role of the α -chain, the $\alpha\beta$ pairing, and a more accurate measure of functional avidity.

NS3-1073-specific public clonotypes were maintained within the memory pool and re-expanded on reinfection. We had previously reported that the NS3-1073-specific TCR repertoire becomes focused on reinfection with preferential expansion of CD8⁺ T cell clonotypes of high functional avidity (16). So, it is also possible that the expanded public TCRs are those with the highest functional avidity. Indeed, data from individual clones generated from subject SR/SR-1 contained two of the public clonotypes identified in this study. These clonotypes were of high functional avidity and poly-functionality indices. Additional testing using a broader panel of T cell clones will be required to validate that possibility.

The high prevalence of public clonotypes observed during acute HCV was also characterized by preferential usage of the TRBV04 gene family. One single TCR clonotype in particular (TRBV4-02/TRBJ02-02) was identified in 12 of 14 subjects. Other public clonotypes using the V04 gene family, specific to the CMV pp65 (42) and HIV p24 Gag-derived KK10 epitopes (3), were previously reported. The presence of such public clonotypes and their maintenance within the long-term memory pool were found to be shaped by convergent recombination (43). Indeed, our data demonstrate that combinatorial (Supplemental Table II) and/or junctional (data not shown) diversities contribute to generating the same amino acid sequence.

We identified CDR3 amino acid sequences shared with other HLA-A2-restricted epitopes. Wedemeyer et al. (17) were the first to characterize HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells cross-reactivity to the NA-231 epitope from the influenza virus. Yet, it was later shown that this HCV NS3-1073/NA-231 cross-reactivity is of low affinity (44), and that their structural conformation and their specific TCR repertoires are distinct (45). This is in line with our results where no HCV NS3-1073/FLU NA-231 shared CDR3 amino acid sequences were identified. Zhang et al. (19) had tested the directionality of this cross-reactivity and showed that HCV NS3-1073 peptides can induce CMV (pp65-495), Flu (M1-58), and EBV (LMP2-426) CD8⁺ T cells expansion (i.e., “reverse” cross-reactivity) and not vice versa (19, 44). Altogether, our data and others suggest that cross-reactivity of HCV NS3-1073-specific CD8⁺ T cells with other epitopes is more likely after HCV exposure.

We identified shared CDR3 amino acid sequences with multiple HLA-A2-restricted epitopes. Yet, the majority of shared clonotypes were of low frequency. Although we identified public clonotype 4 that was also present in the seronegative cohort, none of the public clonotypes identified in our study were shared with other HLA-A2-restricted epitopes. Technical confounders, such as the use of different sequencing approaches and in vitro expansion before analysis, may have limited our capacity to identify exactly matched CDR3 sequences. Nevertheless, there was little to no functional cross-reactivity of HCV NS3-1073-specific T cells in response to any of the shared HLA-A2-restricted epitopes. Overall, shared clonotypes represented only a minor fraction of the HCV NS3-1073-specific TCR repertoire. Thus, even though a pool of cross-reactive memory CD8⁺ T cells may exist before HCV infection, they play a limited role during primary HCV infection but may contribute to HCV-related liver disease severity as previously observed (18, 46).

In conclusion, our results demonstrate preferential usage of TRBV04 and V06 gene families, as well as the expansion of public TCR clonotypes unique to HCV, irrespective of infection outcome or autologous virus sequence. Additional studies examining the

Downloaded from <http://www.jimmunol.org/> at Univ of Montreal Biblio de la Sante on August 2, 2021

functional avidity of such public clonotypes and characterization of the TCR repertoire of other immunodominant HCV epitopes are required. Our data contribute to publicly available TCR repertoire databases that can be used to predict specificities of expanded T cells in specific pathological conditions or infections (47) and improve the development of algorithms to identify HCV-specific TCR clonotypes and their relationship to other specificities and to track HCV-specific clonotypes during future clinical trials for HCV vaccines (31, 48, 49).

Acknowledgments

We thank all study subjects for participating in this study, and we thank Dr. Dominique Gauchat and Philippe St-Onge of the flow cytometry core of the CRCHUM for technical help with cell sorting experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Turner, S. J., N. L. La Gruta, K. Kedzierska, P. G. Thomas, and P. C. Doherty. 2009. Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 286–290.
- Trautmann, L., M. Rimbart, K. Echasserieau, X. Saulquin, B. Neveu, J. Dechanet, V. Cerundolo, and M. Bonneville. 2005. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* 175: 6123–6132.
- Iglesias, M. C., J. R. Almeida, S. Fastenackels, D. J. van Bockel, M. Hashimoto, V. Venturi, E. Gostick, A. Urrutia, L. Woodrudge, M. Clement, et al. 2011. Escape from highly effective public CD8⁺ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* 118: 2138–2149.
- Ladell, K., M. Hashimoto, M. C. Iglesias, P. G. Wilmann, J. E. McLaren, S. Gras, T. Chikata, N. Kuse, S. Fastenackels, E. Gostick, et al. 2013. A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8⁺ T cells. *Immunity* 38: 425–436.
- Abdel-Hakeem, M. S., N. Bédard, D. Murphy, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2014. Signatures of protective memory immune responses during hepatitis C virus reinfection. *Gastroenterology* 147: 870–881.e8.
- Osburn, W. O., B. E. Fisher, K. A. Dowd, G. Urban, L. Liu, S. C. Ray, D. L. Thomas, and A. L. Cox. 2010. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 138: 315–324.
- Pesitka, J. M., M. B. Zeisel, E. Bläser, P. Schürmann, B. Bartosch, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, et al. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6025–6030.
- Tsai, S. L., Y. M. Chen, M. H. Chen, C. Y. Huang, I. S. Sheen, C. T. Yeh, J. H. Huang, G. C. Kuo, and Y. F. Liaw. 1998. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 115: 954–966.
- Miles, J. J., D. Thanmanichanon, S. Moneer, U. K. Nivarthi, L. Kjer-Nielsen, S. L. Tracy, C. K. Aitken, R. M. Brennan, W. Zeng, L. Marquart, et al. 2011. Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 186: 901–912.
- Takaki, A., M. Wiese, G. Maertens, E. Depla, U. Seifert, A. Liebetrau, J. L. Miller, M. P. Manns, and B. Rehermann. 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat. Med.* 6: 578–582.
- Ward, S., G. Lauer, R. Isaba, B. Walker, and P. Klenerman. 2002. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin. Exp. Immunol.* 128: 195–203.
- Lauer, G. M., M. Lucas, J. Timm, K. Ouchi, A. Y. Kim, C. L. Day, J. Schulze Zur Wiesch, G. Paranhos-Baccala, I. Sheridan, D. R. Casson, et al. 2005. Full-breadth analysis of CD8⁺ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J. Virol.* 79: 12979–12988.
- Lechner, F., D. K. Wong, P. R. Dunbar, R. Chapman, R. T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B. D. Walker. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 191: 1499–1512.
- Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 194: 1395–1406.
- Grüner, N. H., T. J. Gerlach, M. C. Jung, H. M. Diepolder, C. A. Schirren, W. W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiari, et al. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J. Infect. Dis.* 181: 1528–1536.
- Abdel-Hakeem, M. S., M. Boisvert, J. Bruneau, H. Soudeyns, and N. H. Shoukry. 2017. Selective expansion of high functional avidity memory CD8⁺ T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS Pathog.* 13: e1006191.
- Wedemeyer, H., E. Mizukoshi, A. R. Davis, J. R. Bennink, and B. Rehermann. 2001. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J. Virol.* 75: 11392–11400.
- Urbani, S., B. Amadei, P. Fisicaro, M. Pilli, G. Missale, A. Bertoletti, and C. Ferrari. 2005. Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 201: 675–680.
- Zhang, S., R. K. Bakshi, P. V. Suneetha, P. Fytily, D. A. Antunes, G. F. Vieira, R. Jacobs, C. S. Klade, M. P. Manns, A. R. Kraft, et al. 2015. Frequency, Private Specificity, and Cross-Reactivity of Preexisting Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8⁺ T Cells in HCV-Seronegative Individuals: Implications for Vaccine Responses. *J. Virol.* 89: 8304–8317.
- Grebely, J., M. D. Morris, T. M. Rice, J. Bruneau, A. L. Cox, A. Y. Kim, B. H. McGovern, N. H. Shoukry, G. Lauer, L. Maher, et al.; InC Study Group. 2013. Cohort profile: the international collaboration of incident HIV and hepatitis C in injecting cohorts (InC3) study. *Int. J. Epidemiol.* 42: 1649–1659.
- Badr, G., N. Bédard, M. S. Abdel-Hakeem, L. Trautmann, B. Willems, J. P. Villeneuve, E. K. Haddad, R. P. Sékaly, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2008. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J. Virol.* 82: 10017–10031.
- R Core Team. 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Shugay, M., D. V. Bagaev, I. V. Zvyagin, R. M. Vroomans, J. C. Crawford, G. Dolton, E. A. Komech, A. L. Sycheva, A. E. Koneva, E. S. Egorov, et al. 2018. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res.* 46(D1): D419–D427.
- Pelletier, S., C. Drouin, N. Bédard, S. I. Khakoo, J. Bruneau, and N. H. Shoukry. 2010. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J. Hepatol.* 53: 805–816.
- Wieland, D., J. Kemming, A. Schuch, F. Emmerich, P. Knolle, C. Neumann-Haefelin, W. Held, D. Zehn, M. Hofmann, and R. Thimme. 2017. TCF1⁺ hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat. Commun.* 8: 15050.
- Roederer, M., J. L. Nozzi, and M. C. Nason. 2011. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A* 79: 167–174.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Shannon, C. E. 1948. The mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27: 379–423.
- Li, H., C. Ye, G. Ji, and J. Han. 2012. Determinants of public T cell responses. *Clin. Res.* 22: 33–42.
- Eltahla, A. A., S. Rizzetto, M. R. Pirozyan, B. D. Betz-Stablein, V. Venturi, K. Kedzierska, A. R. Lloyd, R. A. Bull, and F. Luciani. 2016. Linking the T cell receptor to the single cell transcriptome in antigen-specific human T cells. *Immuno. Cell Biol.* 94: 604–611.
- Pogorelyy, M. V., A. A. Minervina, M. P. Touzel, A. L. Sycheva, E. A. Komech, E. I. Kovalenko, G. G. Karganova, E. S. Egorov, A. Y. Komkov, D. M. Chudakov, et al. 2018. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: 12704–12709.
- Chen, G., X. Yang, A. Ko, X. Sun, M. Gao, Y. Zhang, A. Shi, R. A. Mariuzza, and N. P. Weng. 2017. Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8⁺ TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Rep.* 19: 569–583.
- Annels, N. E., M. F. Callan, L. Tan, and A. B. Rickinson. 2000. Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *J. Immunol.* 165: 4831–4841.
- Lee, E. S., P. G. Thomas, J. E. Mold, and A. J. Yates. 2017. Identifying T Cell Receptors from High-Throughput Sequencing: Dealing with Promiscuity in TCRα and TCRβ Pairing. *PLoS Comput. Biol.* 13: e1005313.
- Rius, C., M. Attaf, K. Fungatt, V. Bianchi, M. Legut, A. Bovay, M. Donia, P. Thor Straten, M. Peakman, I. M. Svane, et al. 2018. Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail to Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations. *J. Immunol.* 200: 2263–2279.
- Wöfl, M., A. Rutebemberwa, T. Mosbrugger, Q. Mao, H. M. Li, D. Netski, S. C. Ray, D. Pardoll, J. Sidney, A. Sette, et al. 2008. Hepatitis C virus immune escape via exploitation of a hole in the T cell repertoire. *J. Immunol.* 181: 6435–6446.
- Meyer-Olson, D., N. H. Shoukry, K. W. Brady, H. Kim, D. P. Olson, K. Hartman, A. K. Shintani, C. M. Walker, and S. A. Kalams. 2004. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J. Exp. Med.* 200: 307–319.
- Yang, O. O., P. T. Sarkis, A. Ali, J. D. Harlow, C. Brander, S. A. Kalams, and B. D. Walker. 2003. Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 197: 1365–1375.
- Douek, D. C., M. R. Betts, J. M. Brenchley, B. J. Hill, D. R. Ambrozak, K. L. Ngai, N. J. Karandikar, J. P. Casazza, and R. A. Koup. 2002. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J. Immunol.* 168: 3099–3104.
- Fytily, P., G. N. Dalekos, V. Schlaphoff, P. V. Suneetha, C. Sarrazin, W. Zauner, K. Zachou, T. Berg, M. P. Manns, C. S. Klade, et al. 2008. Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8⁺ T-cell epitope NS3-1073. *Vaccine* 26: 3818–3826.
- Söderholm, J., G. Ahlén, A. Kaul, L. Frelin, M. Alheim, C. Barnfield, P. Liljeström, O. Weiland, D. R. Milich, R. Bartenschlager, and M. Sällberg. 2006. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 55: 266–274.

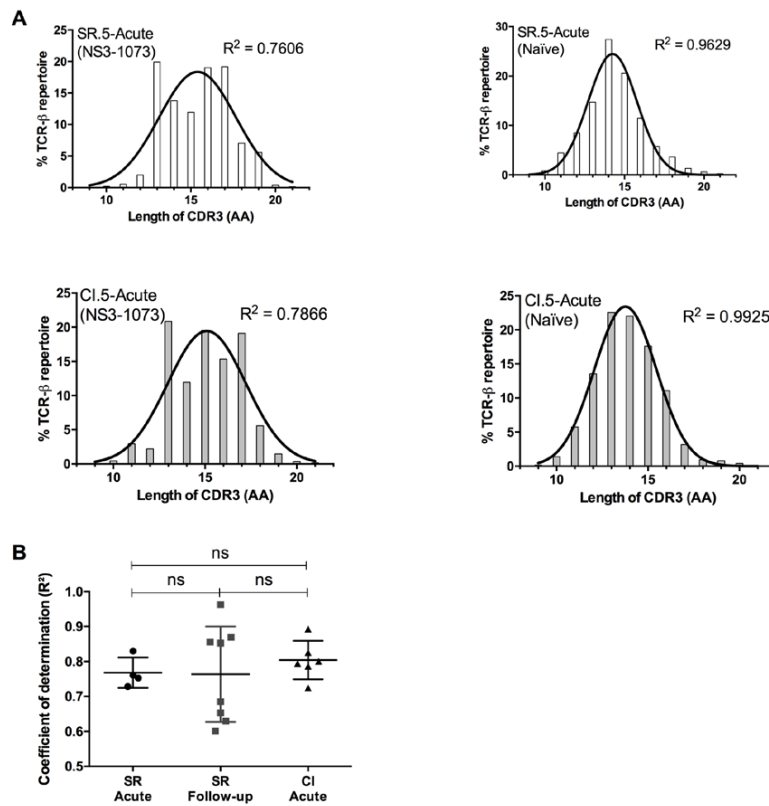
42. Huth, A., X. Liang, S. Krebs, H. Blum, and A. Moosmann. 2019. Antigen-Specific TCR Signatures of Cytomegalovirus Infection. *J. Immunol.* 202: 979–990.
43. Venturi, V., M. F. Quigley, H. Y. Greenaway, P. C. Ng, Z. S. Ende, T. McIntosh, T. E. Asher, J. R. Almeida, S. Levy, D. A. Price, et al. 2011. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J. Immunol.* 186: 4285–4294.
44. Kasprovicz, V., S. M. Ward, A. Turner, A. Grammatikos, B. E. Nolan, L. Lewis-Ximenez, C. Sharp, J. Woodruff, V. M. Fleming, S. Sims, et al. 2008. Defining the directionality and quality of influenza virus-specific CD8+ T cell cross-reactivity in individuals infected with hepatitis C virus. *J. Clin. Invest.* 118: 1143–1153.
45. Grant, E. J., T. M. Josephs, S. A. Valkenburg, L. Wooldridge, M. Hellard, J. Rossjohn, M. Bharadwaj, K. Kedzierska, and S. Gras. 2016. Lack of Heterologous Cross-reactivity toward HLA-A*02:01 Restricted Viral Epitopes Is Underpinned by Distinct $\alpha\beta$ T Cell Receptor Signatures. *J. Biol. Chem.* 291: 24335–24351.
46. Vali, B., R. Tohn, M. J. Cohen, A. Sakhdari, P. M. Sheth, F. Y. Yue, D. Wong, C. Kovacs, R. Kaul, and M. A. Ostrowski. 2011. Characterization of cross-reactive CD8+ T-cell recognition of HLA-A2-restricted HIV-Gag (SLYNTVATL) and HCV-NS5b (ALYDVVSKL) epitopes in individuals infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. *J. Virol.* 85: 254–263.
47. Gantner, P., A. Pagliuzza, M. Pardons, M. Ramgopal, J. P. Routy, R. Fromentin, and N. Chomont. 2020. Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat. Commun.* 11: 4089.
48. Glanville, J., H. Huang, A. Nau, O. Hatton, L. E. Wagar, F. Rubelt, X. Ji, A. Han, S. M. Krams, C. Pettus, et al. 2017. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* 547: 94–98.
49. Pogorelyy, M. V., A. A. Minervina, D. M. Chudakov, I. Z. Mamedov, Y. B. Lebedev, T. Mora, and A. M. Walczak. 2018. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *eLife* 7: e33050.

Supplementary Table S1: TCR deep-sequencing summary information

| Sample Name | HCV NS3-1073 Tet+ Frequency (% of CD8 ⁺ T cells) | Sorted Cells (Number) | Productive Sequences (Total) | Productive Sequences (Unique) ^a | Clonality ^b |
|----------------|---|-----------------------|------------------------------|--|------------------------|
| SR.1-Acute | 2.55 | 25 815 | 8 422 | 783 | 0.3935 |
| SR.1-Follow-up | 2.16 | 5 459 | 766 | 244 | 0.1941 |
| SR.2-Follow-up | 0.83 | 27 279 | 9 834 | 3 399 | 0.1525 |
| SR.3-Follow-up | 0.63 | 1 505 | 777 | 461 | 0.0590 |
| SR.4-Follow-up | 0.89 | 14 051 | 4 691 | 1 475 | 0.1240 |
| SR.5-Acute | 5.74 | 49 531 | 15 141 | 2 093 | 0.2043 |
| SR.5-Follow-up | 0.73 | 3 041 | 362 | 241 | 0.0445 |
| SR.6-Follow-up | 0.51 | 910 | 595 | 299 | 0.0759 |
| SR.7-Acute | 2.30 | 10 888 | 2 900 | 1 306 | 0.0875 |
| SR.7-Follow-up | 0.70 | 3 871 | 496 | 299 | 0.0742 |
| SR.8-Acute | 0.77 | 2 753 | 521 | 339 | 0.0405 |
| SR.8-Follow-up | 0.27 | 756 | 113 | 103 | 0.0101 |
| CI.1-Acute | 2.33 | 15 485 | 8 699 | 653 | 0.3935 |
| CI.2-Acute | 5.42 | 35 471 | 9 739 | 1 805 | 0.1476 |
| CI.3-Acute | 11.03 | 27 433 | 8 421 | 650 | 0.2568 |
| CI.4-Acute | 0.95 | 2 714 | 675 | 302 | 0.0980 |
| CI.5-Acute | 39.08 | 285 445 | 61 180 | 5 103 | 0.18 |
| CI.6-Acute | 0.19 | 2 092 | 718 | 402 | 0.0617 |

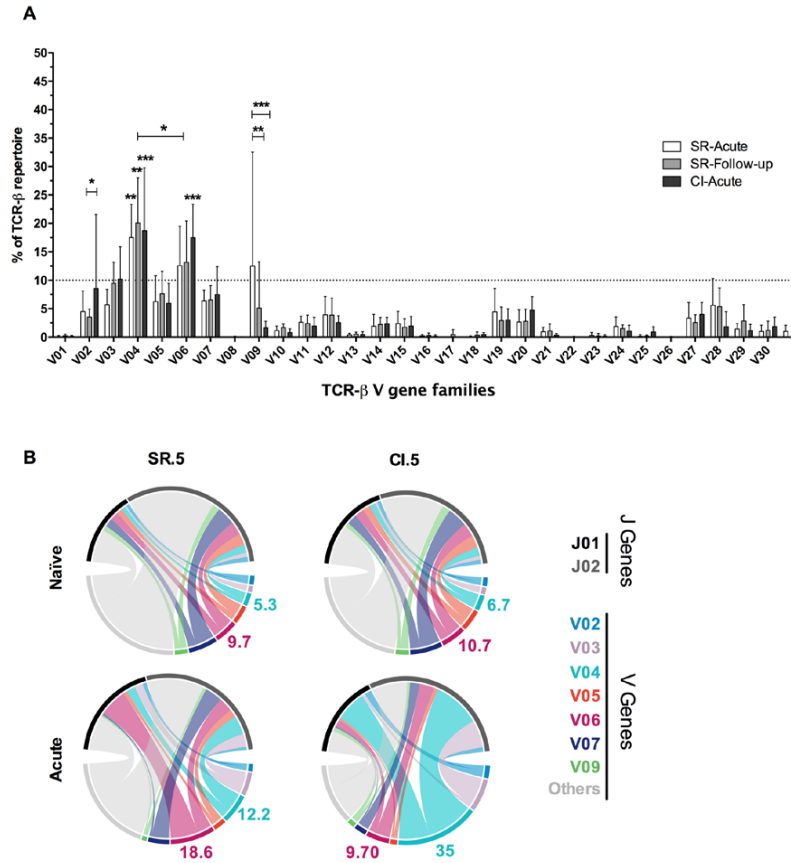
^aThe number of sequences in the sample that are in-frame and do not contain a STOP codon.

^bClonality measures the TCR repertoire distribution. It ranges from 0 (all clonotypes are equally abundant) to 1 (all clonotypes originated from a unique progenitor cell).



Supplementary Figure S1. Comparable NS3-1073 specific CD8⁺ T cell repertoire (TCR) CDR3 length between SR-Acute, SR-Follow-up and CI-Acute.

(A) Representative CDR3 amino acid (AA) length distribution analysis of the HCV-specific (left) and naïve (right) repertoire of SR.5 (Top) and CI.5 (Bottom) subjects. (B) Pooled data of the coefficient of determination (R^2) to compare CDR3 length distribution in all SR and CI subjects. One-way ANOVA; ns: not significant.



Supplementary Figure S2. V gene family usage of HCV NS3-1073 specific and naïve CD8⁺ T cells.
(A) Frequency of all TCRBV families among dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant ($\geq 0.5\%$) and low abundance clonotypes ($\geq 0.1\%$) in SR subjects during acute ($n=4$) and follow-up ($n=8$) as well as CI-acute ($n=6$). Two-way ANOVA; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ****: $p \leq 0.0001$. The dotted line indicates the 10% threshold used to select highly utilized V gene families. For simplicity, only key V gene families and those significant compared to at least three other families are highlighted. **(B)** V and corresponding J gene usage of HCV naïve (top) and HCV NS3-1073 specific CD8⁺ T cells (bottom) from SR.5-Follow-up and CI.5-Acute samples shown as chord diagrams representing frequencies of the dominant ($\geq 1\%$), sub-dominant ($\geq 0.5\%$), low frequency ($\geq 0.1\%$) and lowest abundance ($< 0.1\%$) clonotypes. The size of the colored arcs is proportional to V genes frequencies and the corresponding V-J pair

APPENDIX II | Article additionnel

Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in patients with spontaneous viral clearance

PloS Pathogen, 2018

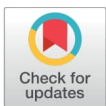
RESEARCH ARTICLE

Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in patients with spontaneous viral clearance

Brad R. Rosenberg^{1,2*}, Marion Depla³, Catherine A. Freije², Denis Gaucher³, Sabrina Mazouz^{3,4}, Maude Boisvert³, Nathalie Bédard³, Julie Bruneau^{3,5}, Charles M. Rice^{6,7}, Naglaa H. Shoukry^{3,8*}

1 Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States of America, **2** Program in Immunogenomics, The Rockefeller University, New York, NY, United States of America, **3** Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada, **4** Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, **5** Département de médecine familiale et de médecine d'urgence, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, **6** Laboratory of Virology and Infectious Disease, The Rockefeller University, New York, NY, United States of America, **7** Center for the Study of Hepatitis C, The Rockefeller University, New York, NY, United States of America, **8** Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

* brad.rosenberg@mssm.edu (BRR); naglaa.shoukry@umontreal.ca (NHS)



OPEN ACCESS

Citation: Rosenberg BR, Depla M, Freije CA, Gaucher D, Mazouz S, Boisvert M, et al. (2018) Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in patients with spontaneous viral clearance. *PLoS Pathog* 14(9): e1007290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290>

Editor: Lynn Dustin, The Rockefeller University, UNITED STATES

Received: May 21, 2018

Accepted: August 22, 2018

Published: September 17, 2018

Copyright: © 2018 Rosenberg et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: RNA-Seq data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE119117 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119117>).

Funding: This study was supported by grants from The Rockefeller University Center for Basic and Translational Research on Disorders of the Digestive System through the generosity of the

Abstract

Most individuals exposed to hepatitis C virus (HCV) become persistently infected while a minority spontaneously eliminate the virus. Although early immune events influence infection outcome, the cellular composition, molecular effectors, and timeframe of the host response active shortly after viral exposure remain incompletely understood. Employing specimens collected from people who inject drugs (PWID) with high risk of HCV exposure, we utilized RNA-Seq and blood transcriptome module (BTM) analysis to characterize immune function in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) before, during, and after acute HCV infection resulting in spontaneous resolution. Our results provide a detailed description of innate immune programs active in peripheral blood during acute HCV infection, which include prominent type I interferon and inflammatory signatures. Innate immune gene expression rapidly returns to pre-infection levels upon viral clearance. Comparative analyses using peripheral blood gene expression profiles from other viral and vaccine studies demonstrate similarities in the immune responses to acute HCV and flaviviruses. Of note, both acute dengue virus (DENV) infection and acute HCV infection elicit similar innate antiviral signatures. However, while transient in DENV infection, this signature was sustained for many weeks in the response to HCV. These results represent the first longitudinal transcriptomic characterization of human immune function in PBMC during acute HCV infection and identify several dynamically regulated features of the complex response to natural HCV exposure.

Leona M. and Harry B. Helmsley Charitable trust, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-133680), Alberta Innovates-Health Solutions, Fonds de recherche en Santé – Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI), and the National Institutes of Health (NIH, U19AI111825). BRR is supported in part by NIH grant DP5OD012142. MD and MB received postdoctoral fellowships from the American Liver Foundation and the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). CanHepC is funded by a joint initiative of the CIHR (NHC-142832) and the Public Health Agency of Canada. SM holds a doctoral fellowship from CanHepC. MB holds a postdoctoral fellowship from FRQS. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of liver disease, with an estimated 71 million people infected worldwide. Following exposure, a subset of individuals spontaneously clears the virus while a majority progress to chronic infection. The immune functions active during the initial, acute infection by HCV are not well understood, due in part to difficulties associated with studying the early stages of this disease in humans. Most individuals acutely infected with HCV are asymptomatic and do not initially seek medical care, which presents challenges in conducting prospective longitudinal studies. Here, by employing specimens from a rare research cohort of individuals sampled before infection, during infection, and after spontaneous viral clearance, we use RNA-Seq to characterize the early immune processes active in acute HCV. Our analysis identified a robust innate antiviral gene signature that corresponds with HCV viremia. In addition, comparisons to other immune transcriptomics datasets demonstrated that the immune response to acute HCV shares many features with responses to flaviviruses. These results offer a detailed longitudinal description of immune function active during the spontaneous resolution of acute HCV infection and provide insight into the early events that may contribute to viral clearance.

Introduction

Despite the recent breakthrough of highly effective direct acting antiviral therapies, hepatitis C virus (HCV) remains a significant public health threat. New infections, especially among people who inject drugs (PWID), are likely to increase in the absence of a prophylactic vaccine [1]. Effective vaccine development is hampered by our limited understanding of how protective immunity is established in the acute stages of natural infections. Acute HCV infection has two dichotomous outcomes, spontaneous resolution (~25% of infections) or chronic infection (~75% of infections) [2]. Immune functions following viral exposure remain incompletely understood due in part to the limited availability of paired pre-infection and longitudinal acute infection research samples from recently exposed, largely asymptomatic individuals.

Previous work has established roles for innate and adaptive immunity in the host response to acute HCV. Genetic polymorphisms at the IFNL3/4 locus, NK cell activity, and dendritic cell function influence infection outcomes [3, 4]. Effective adaptive immunity is also essential for HCV clearance. HCV-specific CD4 and CD8 T cell responses are induced in most acutely infected individuals irrespective of outcome. However, failure to sustain CD4 T cell responses is associated with viral persistence, which in turn leads to CD8 T cell dysregulation and exhaustion [3, 4]. The role of B cells in acute HCV is less clear. Although not consistent across all studies, anti-HCV neutralizing antibodies have been associated with spontaneous clearance during primary and secondary infections, suggesting that they may contribute to long-term protective immunity [5]. Kinetics and crosstalk between these innate and adaptive responses remain incompletely defined.

Systems-level transcriptomic methods have emerged as powerful tools for profiling human immune responses [6]. Examining peripheral blood transcriptome data has provided integrated maps of host response dynamics following vaccination or infection, and the associated interplay of innate and adaptive immune components [7–10]. Studies of the responses to yellow fever and influenza vaccines have identified shared gene expression signatures associated with strong antibody responses [7, 9–12]. Related studies of influenza [13] and hepatitis B

virus (HBV) vaccines [14] have underscored the role of baseline inflammation and host factors in determining the outcome of vaccination. Although challenging due to logistical demands and interindividual variation, analogous methods have also been successful in characterizing the human immune response to “real world” acute infections by pathogens such as dengue virus (DENV) [15]. We reasoned that similar transcriptomic approaches, with the potential to extract large amounts of data from relatively limited sample material would be useful in characterizing the response to acute HCV.

The first microarray studies of acute HCV infection performed on serial liver biopsies from a limited number of chimpanzees showed that innate immune responses are rapidly induced in the liver irrespective of infection outcome [16, 17]. Spontaneous HCV clearance was associated with upregulation of genes linked to CD4 T cells and lymphocyte migration to the liver [16, 17]. More recent transcriptomic studies of HCV-specific T cells indicate that metabolic dysregulation during acute infection may influence the outcome of the antiviral T cell response [18]. Transcriptome analysis in human livers demonstrated elevated IFN γ -stimulated gene expression in acute infection, but elevated IFN α -stimulated gene expression during chronic infection [19]. Additional microarray studies described elevated interferon stimulated gene (ISG) expression in peripheral immune cells during chronic HCV [20].

Despite our understanding of certain aspects of the host response to HCV, the composition and dynamics of the early antiviral response in acute infection have not been fully defined. Here, we characterize the host response to acute HCV through transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). We performed RNA-Seq on longitudinal samples collected before, during and after acute HCV infections that resulted in spontaneous resolution or chronic infection. Our analysis provides a detailed characterization of the inflammatory and ISG signatures active in the spontaneous resolution of acute HCV, and identifies similarities with responses to flavivirus vaccines and infections.

Results

RNA-Seq analysis of PBMC from individuals before, during and after acute HCV infection

Identifying and recruiting research subjects shortly after HCV exposure is challenging due to the typically asymptomatic nature of the infection [2]. The Montreal Hepatitis C Cohort (HEPCO) recruits and follows PWID at high risk of HCV exposure and infection [21]. Longitudinal samples from this cohort provide a rare opportunity to explore the dynamics of the immune response to acute HCV. Here, we examined PBMC from 14 individuals (Tables 1 and 2) who became infected with HCV, of whom 6 spontaneously cleared the virus (Resolution group) and 8 progressed to chronic infection (Chronic group). We performed RNA-Seq on PBMC samples collected at several time points relative to HCV exposure: Pre-infection, Early acute, Late acute, and Follow up (Fig 1A) as described in Materials and methods.

We first performed principal component analysis (PCA) to assess the degree to which gene expression patterns corresponded with sample group assignments. Within the Resolution group, we observed clear separation (first principal component, 32.6% explained variance, patient-specific variation removed as detailed in Materials and Methods) of the Early acute samples from Pre-infection and Follow up samples (Fig 1B, and S1A Fig). Some of the Late acute samples also separated from Pre-infection and Follow-up samples but grouped with the Early acute samples; this grouping corresponded with detectable HCV viremia. Within the Chronic group, although some general trends were apparent, PCA did not clearly separate samples according to experimental group (S1A and S1B Fig). The cause of this intersample heterogeneity in the chronic group is not clear. The Resolution and Chronic groups are similar

Table 1. Patient demographics and clinical information for samples analyzed by RNA-Seq: Resolution group.

| Patient Code | Sex | Age at infection | Ethnicity | rs12979860 IFNL4 genotype | HCV genotype | Testing interval (days) ^a | | Estimated days post-infection | ALT (U/L) | AST (U/L) | HCV viremia |
|--------------|-----|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------|-----------|-------------|
| R1 | F | 23 | Indigenous ^b | CC | ND ^c | 32 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -196 | 29 | 33 | - |
| | | | | | | | Early acute | 16 | 199 | 80 | + |
| | | | | | | | Late acute | 105 | 42 | 61 | + |
| | | | | | | | Follow up | 503 | 31 | 57 | - |
| R2 | M | 44 | Caucasian | CC | 1a | 65 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -114 | 23 | 34 | - |
| | | | | | | | Early acute | 33 | 25 | 36 | + |
| | | | | | | | Follow up | 340 | 28 | 38 | - |
| R3 | M | 24 | Caucasian | CC | 3a | 71 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -35 | 29 | 37 | - |
| | | | | | | | Early acute | 48 | 458 | 334 | + |
| | | | | | | | Late acute | 126 | 18 | 26 | - |
| | | | | | | | Follow up | 392 | 21 | 40 | - |
| R4 | M | 25 | Caucasian | CC | 1 | 84 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -42 | 24 | 37 | - |
| | | | | | | | Early acute | 42 | 2076 | 1335 | + |
| | | | | | | | Late acute | 138 | 18 | 30 | - |
| | | | | | | | Follow up | 409 | 23 | 37 | - |
| R5 | F | 38 | Eastern European | CC | 3a | 84 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -131 | 33 | 25 | - |
| | | | | | | | Early acute | 42 | 618 | 807 | + |
| | | | | | | | Late acute | 108 | 25 | 34 | + |
| | | | | | | | Follow up | 197 | 19 | 28 | - |
| R6 | M | 47 | Caucasian | CT | 1a | 91 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -45 | 20 | 31 | - |
| | | | | | | | Early acute | 68 | 449 | 208 | + |
| | | | | | | | Late acute | 130 | 37 | 39 | + |
| | | | | | | | Follow up | 179 | 23 | 36 | - |

^a The interval (in days) between the last negative and first positive HCV qualitative RNA test available on record. Values do not necessarily coincide with the availability of research samples or research visits

^b The term Indigenous respectfully refers to the First Nations, Inuit, and Métis Peoples of Canada

^c ND: Not Done

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.t001>

with regard to age and ethnicity (Tables 1 and 2), and are drawn from the same populations. At this limited sample size, we suspect that confounding self-reported factors (e.g. other minor

Table 2. Patient demographics and clinical information for samples analyzed by RNA-Seq: Chronic group.

| Patient Code | Sex | Age at infection | Ethnicity | rs12979860 IFNL4 genotype | HCV genotype | Testing interval (days) ^a | | Estimated days post-infection | ALT (U/L) | AST (U/L) | HCV viremia |
|--------------|-----|------------------|-------------------------|---------------------------|--------------|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------|-----------|-------------|
| C1 | M | 39 | Caucasian | CC | 1a | 76 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -38 | 38 | 48 | - |
| | | | | | | | Early acute | 52 | 117 | 96 | + |
| | | | | | | | Late acute | 117 | 48 | 54 | + |
| | | | | | | | Follow up | 381 | 257 | 54 | + |
| C2 | M | 43 | Caucasian | CC | 1a | 164 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -166 | 33 | 56 | - |
| | | | | | | | Late acute | 111 | 53 | 98 | + |
| | | | | | | | Follow up | 444 | 34 | 84 | + |
| C3 | M | 33 | Caucasian | CC | 1a | 91 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -259 | 18 | 29 | - |
| | | | | | | | Early acute | 46 | 22 | 44 | + |
| | | | | | | | Late acute | 103 | 436 | 299 | + |
| | | | | | | | Follow up | 385 | 37 | 44 | + |
| C4 | M | 26 | Caucasian | CC | 3a | 19 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -342 | 30 | 30 | - |
| | | | | | | | Early acute | 37 | 481 | 294 | + |
| | | | | | | | Late acute | 110 | 92 | 46 | + |
| | | | | | | | Follow up | 381 | 259 | 175 | + |
| C5 | M | 31 | Indigenous ^b | CT | 1a | 85 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -125 | 35 | 36 | - |
| | | | | | | | Early acute | 43 | 287 | 171 | + |
| | | | | | | | Late acute | 109 | 181 | 129 | + |
| | | | | | | | Follow up | 406 | 87 | 63 | + |
| C6 | M | 27 | Caucasian | CC | 3 | 106 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -53 | 26 | 25 | - |
| | | | | | | | Early acute | 53 | 69 | 58 | + |
| | | | | | | | Late acute | 114 | 100 | 96 | + |
| | | | | | | | Follow up | 374 | 100 | 50 | + |
| C7 | M | 26 | Caucasian | CT | 1a | 162 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -126 | 26 | 40 | - |
| | | | | | | | Late acute | 126 | 162 | 203 | + |
| | | | | | | | Follow up | 420 | 69 | 98 | + |
| C8 | M | 31 | Caucasian | CC | 1a | 35 | | | | | |
| | | | | | | | Pre-infection | -66 | 18 | 33 | - |
| | | | | | | | Early acute | 26 | 110 | 84 | + |

(Continued)

Table 2. (Continued)

| Patient Code | Sex | Age at infection | Ethnicity | rs12979860 IFNL4 genotype | HCV genotype | Testing interval (days) ^a | Estimated days post-infection | ALT (U/L) | AST (U/L) | HCV viremia | |
|--------------|-----|------------------|-----------|---------------------------|--------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-------------|---|
| | | | | | | | Late acute | 131 | 54 | 46 | + |
| | | | | | | | Follow up | 284 | 38 | 40 | + |

^a The interval (in days) between the last negative and first positive HCV qualitative RNA test available on record. Values do not necessarily coincide with the availability of research samples or research visits

^b The term Indigenous respectfully refers to the First Nations, Inuit, and Métis Peoples of Canada

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.t002>

non-HCV infections, inflammatory conditions, etc.) may contribute to variation in gene expression patterns. We reasoned that, given the considerable interindividual variation apparent in human gene expression data generally, and the additional variation potentially introduced by approximate time point sampling of “real world” acute HCV infection, a statistical analysis on appropriately grouped samples would be most likely to provide high quality,

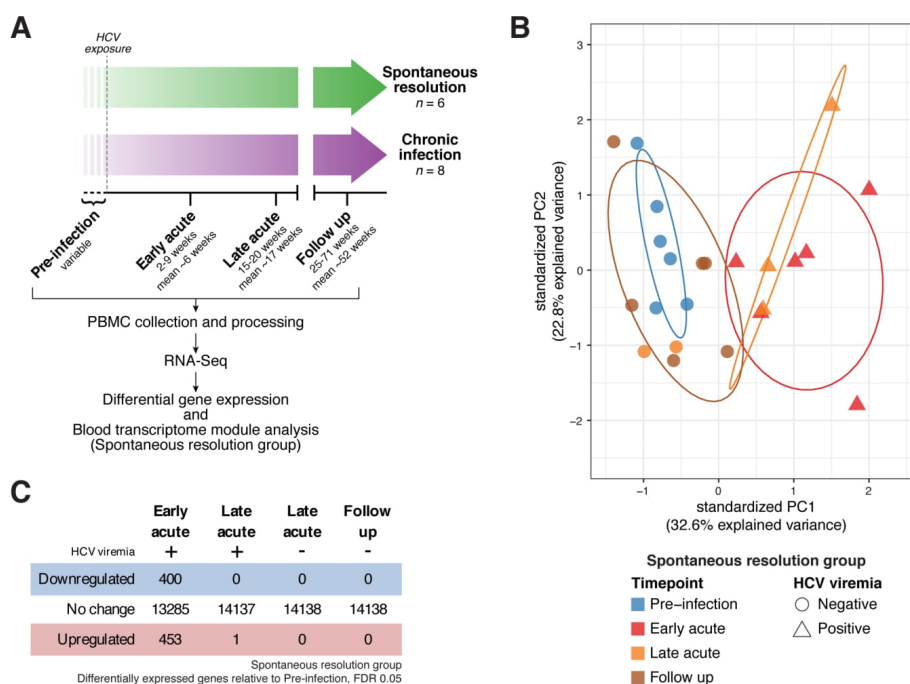


Fig 1. Study design and differential gene expression analysis in the Resolution group. (A) Overall study design. (B) Principal component analysis (PCA) of gene expression in the Resolution group (patient-specific gene expression variation removed as detailed in Materials and Methods). Color denotes time point, shape denotes HCV viremia status. Ellipses indicate 68% normal probability for each group (for Resolution group, Late Acute timepoint, ellipse plotted for positive HCV viremia samples only). (C) Summary of differential gene expression analysis results in the Resolution group. See also S1 and S2 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g001>

generalizable results regarding the immune response to HCV. Therefore, we chose to focus the remainder of our analysis on the Resolution group, which we further partitioned based on viremia status: Early acute, Late acute (positive HCV viremia), Late acute (negative HCV viremia) and Follow up.

Acute HCV infection elicits a dynamic host response in peripheral immune cells, which rapidly normalizes after viral clearance

We began our analysis by examining changes in individual gene expression patterns. Applying differential gene expression testing across all time point groups, we detected numerous genes whose expression values were significantly altered during acute HCV infection and resolution (F -test q -value < 0.1 , S1 Table). As gene expression dynamics and PCA (Fig 1B) suggested that the most pronounced changes occurred in samples with detectable viremia, we conducted pairwise differential gene expression testing for each post-infection time point group *versus* pre-infection baseline. We detected 853 individual genes differentially expressed at the Early acute time point, with few genes meeting significance thresholds in other groups (q -value < 0.05 , Fig 1C, S2 Table). Based on PCA (and subsequent analyses described below), the low number of significant genes detected in the Late acute, positive HCV viremia group was likely due to the small number of samples ($n = 3$) available for analysis. Overall, these results indicate that during acute infection, the immune response to HCV includes substantial changes to peripheral blood transcriptional signatures. These differences are most pronounced during the Early acute stage of infection, but appear to persist (at least in part) during periods of detectable viremia.

The immune response to acute HCV infection is characterized by transcriptional changes associated with diverse immune functions, including innate antiviral defense, B cells, monocytes and inflammation

With a goal of translating gene expression patterns to specific immune functions modulated in acute HCV, we next focused our analysis on the differential regulation of blood transcriptome modules (BTMs) [11, 22] rather than individual genes. Each BTM contains a set of genes with correlated expression patterns, annotated with associated biological functions. Using the MROAST gene set enrichment tool [23], we found 60 BTMs to be differentially enriched (q -value < 0.05 , details in Materials and methods) during Early acute infection as compared to Pre-infection baseline (Fig 2B, S3 Table). Of note, as in the above differential gene expression analysis, changes in BTM activity were apparent in the Late acute, positive HCV viremia group but did not clear significance thresholds. At the Follow up time point, BTM activity was indistinguishable from Pre-infection levels. The activities of all differentially enriched BTMs in individual patient samples are presented in Fig 2A.

BTMs differentially enriched at the Early acute time point correspond to diverse immune functions and cell types. We further classified enriched BTMs at high level biological annotations based on categories defined by Kazmin et al [24]. Gene expression dynamics and directionality were generally similar for BTMs within the same category. Categories containing BTMs upregulated in the response to Early acute HCV include interferon/antiviral sensing, inflammatory/TLR/chemokines, monocytes, DC activation, and antigen presentation. Of note, upregulation of the "T cell surface, activation (M36)" BTM corresponded with an increased frequency of HCV-specific CD8⁺ T cells, as measured by peptide-MHC tetramer analysis (A2/NS3-1073) for HLA-A*0201⁺ patient series ($n = 3$, S2 Fig). Multiple downregulated BTMs were annotated in the B cell category. Taken together, these results indicate that the response to acute HCV infection involves a robust innate antiviral gene expression program in

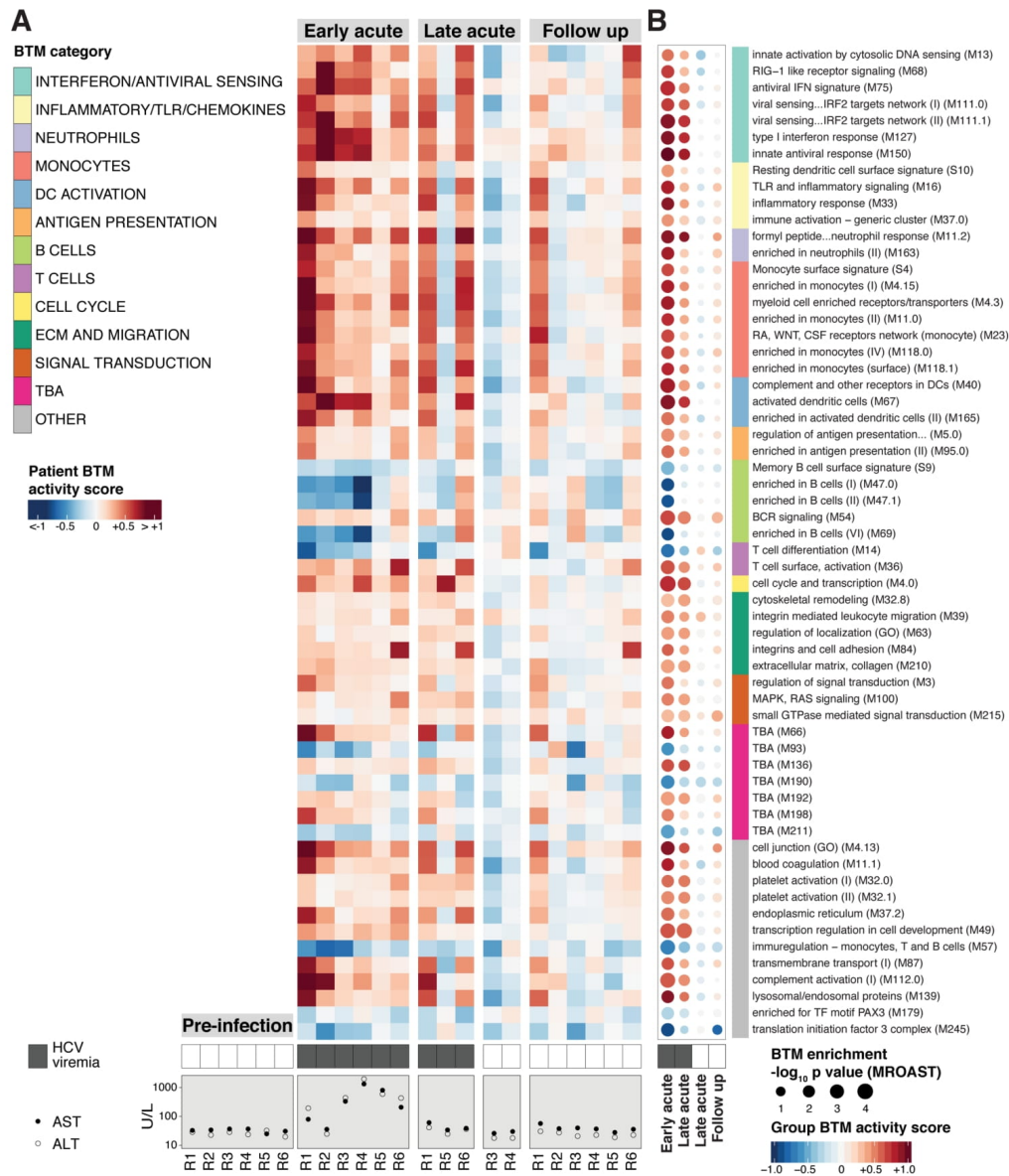


Fig 2. Acute HCV infection elicits a dynamic host response in peripheral immune cells. (A) Heatmap of median \log_2 fold-change sample level activity scores for the 60 BTMs differentially enriched (MROAST q-value < 0.05) at any time point (relative to Pre-Infection). Rows represent individual BTMs (category indicated on color sidebar, right), columns represent individual patient samples at indicated time points. HCV viremia (presence/absence of viral RNA by RT-PCR) and transaminase (AST, ALT) data are presented below corresponding samples. (B) "BTM dot plot" of differentially enriched BTMs by analysis group (relative to Pre-infection, any time point, MROAST q-value < 0.05). Dot color and intensity indicate direction and magnitude (group-level BTM activity score), respectively, of differential BTM enrichment. Dot size is proportional to significance ($-\log_{10}$ p-value, MROAST). BTM category indicated on color sidebar. HCV viremia status (presence/absence of viral RNA by RT-PCR) is denoted by filled/unfilled boxes at bottom of plot. See also S3 Table. BTM list order is preserved between (A) and (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g002>

peripheral immune cells, inflammatory signals, and changes associated with innate and adaptive cell types.

Acute HCV infection elicits a pronounced innate immune response typified by Type I IFN stimulated gene expression in peripheral immune cells

During acute infection, HCV triggers a potent IFN-mediated antiviral response in the liver [16, 17, 19, 25]. In our PBMC analysis, BTMs associated with the innate antiviral response were strongly upregulated during acute HCV (Fig 2, S3 Fig). At Early and Late acute time points, this upregulation corresponded with detectable HCV viremia; samples from individuals who achieved viral clearance by the Late acute time point displayed innate antiviral BTM activity similar to Pre-infection levels. Based on these results, we sought to further characterize our observations from BTM analysis using complementary reference data to describe the innate antiviral response. We tested for enrichment of a 277 gene "PBMC ISG set" empirically derived from RNA-Seq analysis of PBMC stimulated *ex vivo* with Type I IFN [26]. In agreement with BTM results, this ISG collection was significantly upregulated in the Early acute and the Late acute, positive HCV viremia time point groups, but not in the Late acute, negative HCV viremia or Follow up time point groups (Fig 3A).

We extended this analysis to define which ISGs best define the PBMC innate antiviral response to acute HCV by intersecting the PBMC ISG set with the list of differentially expressed genes at the Early acute time point (as compared to Pre-infection). The resulting list, comprised of 105 PBMC ISGs, includes ISGs previously implicated in the peripheral blood response to HCV (CXCL10) [27–29], "classical" ISGs (Mx1, OAS1, ISG15), ISG transcription factors (STAT1, STAT2, IRF7), as well as ISGs associated with immunomodulation (IL15, CD38). When intersecting this "acute HCV PBMC ISG signature" with ISG lists derived from IFN stimulated PBMC [30] or HCV liver microarray datasets (Fig 3B), we noted overlap (44/105 acute HCV PBMC ISGs) with ISG induction in acutely infected chimpanzee liver ([25], 5–11 weeks post-infection), and less overlap (16/105 acute HCV PBMC ISGs) with acutely infected human liver ([19], <6 months post-infection). This discrepancy may be due to temporal differences in liver biopsy acquisition; the human study sampled from a broader time window and described a predominantly Type II IFN signature (perhaps reflecting infiltrating adaptive immune cells later in infection). Overall, these results indicate that acute HCV infection, despite its hepatotropism, initiates a robust type I interferon response in peripheral immune cells.

To evaluate a component of this signature at the protein level, we measured levels of CXCL10 (IP-10), an important factor in the innate response to HCV [27, 31, 32], in corresponding plasma samples (available from most of the same patient-timepoint conditions examined by RNA-Seq). Similar to the patterns observed in RNA-Seq data, plasma CXCL10 levels were elevated in all samples measured at the Early acute timepoint, and later returned to baseline levels with viral clearance (Fig 3C). Furthermore, plasma CXCL10 values correlated with PBMC CXCL10 expression levels measured by RNA-Seq (Pearson's $r = 0.69$, $p = 0.00071$) (Fig 3D). These data indicate that RNA-Seq gene expression measures in PBMC reflect the systemic protein levels of an interferon-induced chemokine during acute HCV infection.

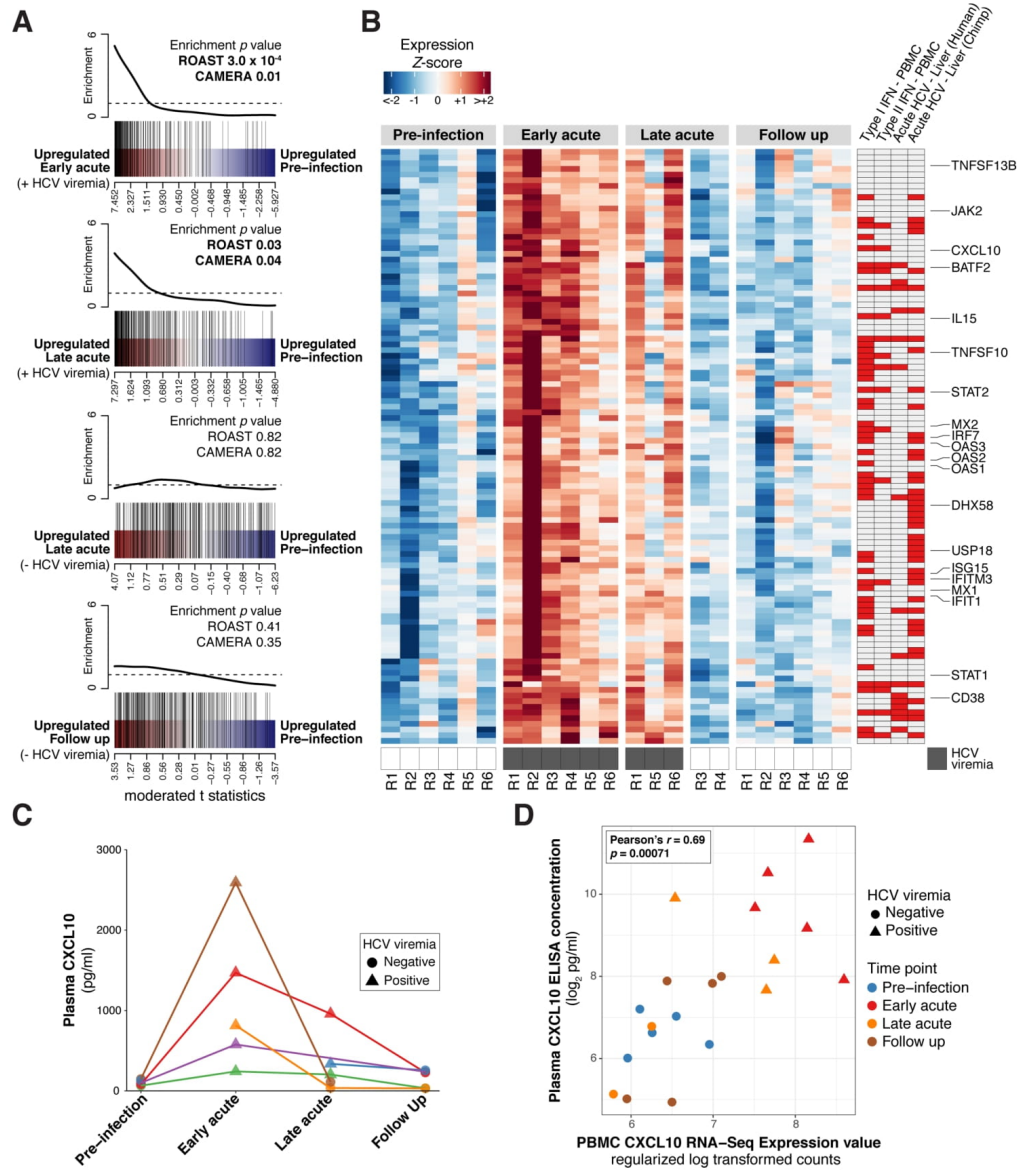


Fig 3. The peripheral immune response to acute HCV infection is characterized by upregulated innate antiviral/interferon signatures. (A) Barcode plots depicting differential enrichment of a PBMC ISG set for the indicated acute HCV time points relative to Pre-Infection. Red-blue color bar represents all genes ordered by differential expression statistics (moderated t statistic) for the designated contrast. PBMC ISG set member genes are highlighted by vertical black lines. Corresponding line plot displays sliding average of set enrichment. MROAST and CAMERA test p -values for PBMC ISG set enrichment are presented with each plot. (B) Heatmap displaying scaled expression values (normalized \log_2 read counts per million, scaled to z -scores by gene) for acute HCV PBMC ISG signature genes (as described in text) at Pre-Infection and Early acute time points. Select ISGs are annotated. Sidebars designate differential ISG expression in the indicated transcriptomics study (red indicates concordant upregulation): Type I IFN–PBMC and Type II IFN–PBMC [30], Acute HCV–Liver (Human) [19], Acute HCV–Liver (Chimpanzee) [25]. See also S4 Table. (C) Plasma CXCL10 concentration (pg/mL) for the indicated acute HCV time points. Each color (points/lines) denotes data from a single patient. (D) Plasma CXCL10 concentration (pg/mL) and CXCL10 RNA-Seq gene expression measures (regularized log transformed counts) from corresponding PBMC samples. Point color denotes time point analysis group, point shape denotes HCV viremia status (presence/absence of viral RNA by RT-PCR).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g003>

B cell transcriptional signatures decrease in acute HCV infection

Several BTMs related to B cells (M47.0, M47.1, M69, S9) were found to be downregulated during Early acute HCV infection (Fig 2B). The M54 (“BCR signaling”) BTM was a notable exception and was significantly upregulated in the Early acute time point group. Most individual genes within downregulated B cell-associated BTMs demonstrated reduced expression values (Fig 4A). Rather than a decrease in gene expression output by B cells, we suspected that such a general reduction in B cell transcriptional signatures might correspond to a decrease in B cell frequency within PBMC. Therefore, we used flow cytometry to quantify the relative frequency (Fig 4B) and fold-change (Fig 4C) of CD19+ B cells in samples for which sufficient experimental material remained available. Although the limited sample numbers were insufficient to achieve statistical significance in an analysis incorporating both time point and HCV viremia status, we observed an intriguing trend of diminished B cell frequency as a fraction of total PBMC (relative to Pre-infection values, per patient) that appeared to correspond to detectable viremia at Early acute and Late acute time points (Fig 4B and 4C).

The immune response to acute HCV shares features with the response to yellow fever vaccination

Peripheral blood transcriptome studies have been effective in providing useful “reference” profiles of protective immune responses to different vaccines [7, 9–11, 13]. In an effort to contextualize the Acute HCV response with additional well-characterized responses to different immune challenges, we compared acute HCV PBMC transcriptional profiles to analogous, microarray studies of the PBMC response to live attenuated vaccines (yellow fever 17D, YFV; influenza, LAIV), an inactivated viral vaccine (trivalent influenza vaccine, TIV), a polysaccharide vaccine (meningococcal polysaccharide vaccine, MPSV4), and a conjugated polysaccharide vaccine (meningococcal conjugate vaccine, MCV4). After measuring BTM enrichment with GSEA (pre-ranked) [33] for each dataset (peak response vs. pre-vaccination, acute HCV infection vs. Pre-Infection), we compared responses by overlap of differentially regulated BTMs (GSEA FDR 0.01, workflow in S4 Fig). Similar to the analysis strategy described by Li et al. [11], this approach enables qualitative comparisons across methods (RNA-Seq, different microarray platforms), and modulates somewhat the statistical effects of varied sample sizes. The acute HCV response shared more significant BTMs with YFV than with any other vaccine (Fig 5). Both the acute HCV and YFV responses included interferon/antiviral sensing BTMs, inflammation-associated BTMs, and modules related to T cell proliferation.

The immune response to acute HCV infection resembles the brief, early response to acute DENV infection, but is sustained over many weeks

Although the above vaccine comparisons provide informative functional context regarding the nature of the acute HCV response as compared to defined immune challenges, vaccines, by

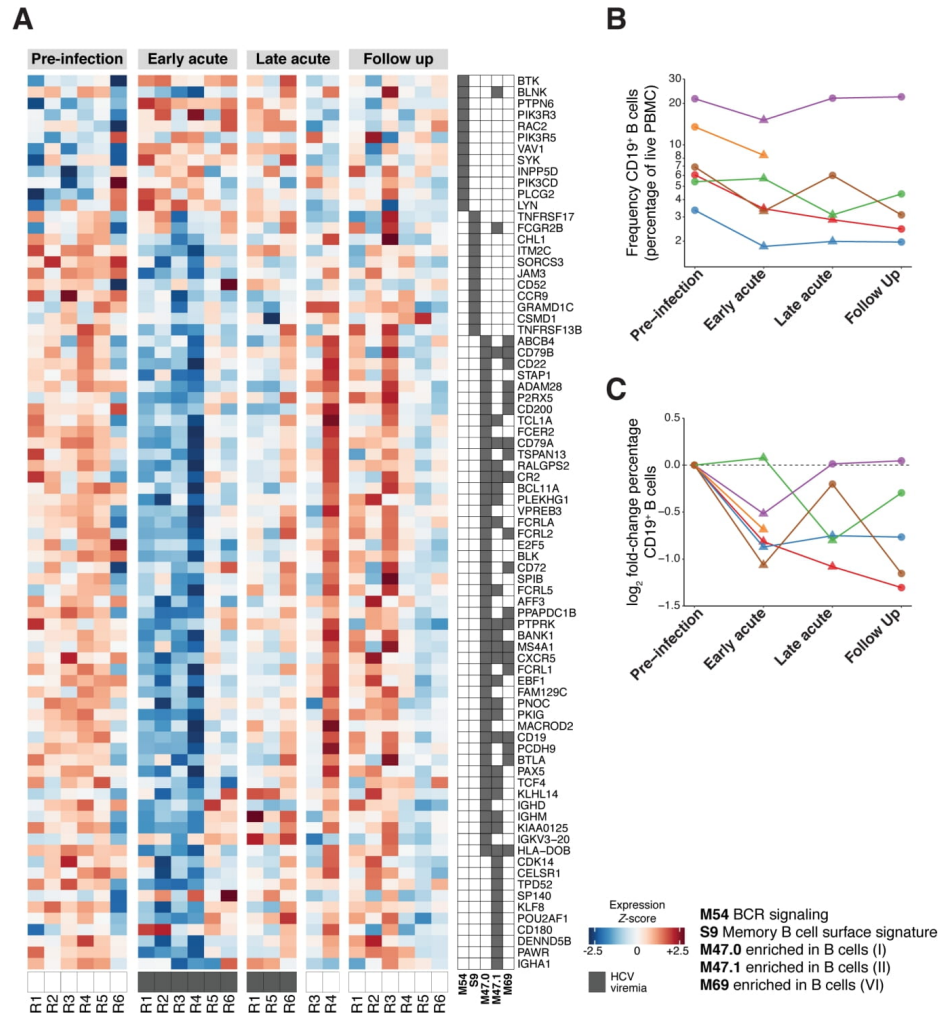


Fig 4. Decreased B cell transcriptional signatures in acute HCV infection. (A) Heatmap displays individual patient sample scaled expression values (normalized log₂ read counts per million, scaled to z-scores by gene) for expressed genes composing select B cell-associated BTMs. BTM gene membership is denoted in accompanying grid annotation. Dark grey boxes along bottom of heatmap indicate detectable HCV viremia. (B) CD19⁺ B cell frequency (percentage of live PBMC as measured by flow cytometry) at indicated time points during acute HCV infection and resolution. Each color (points/lines) denotes data from a single patient. Y-axis on log₁₀ scale to facilitate visualization across different patients. (C) Log₂ fold-change (relative to corresponding patient pre-infection baseline) of CD19⁺ B cell frequency (percentage of live PBMC as measured by flow cytometry) at indicated time points during acute HCV infection and resolution. Each color (points/lines) denotes data from a single patient.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g004>

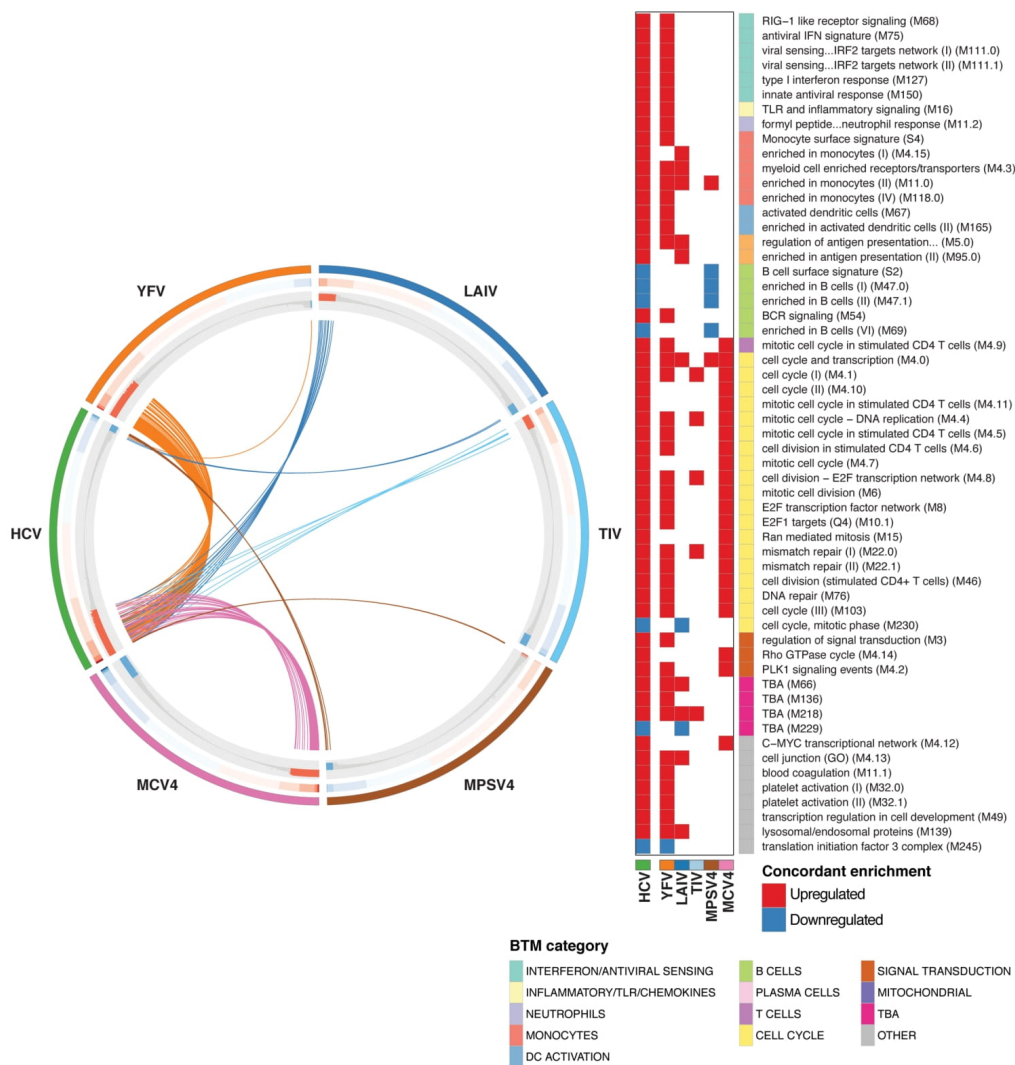


Fig 5. Comparison of immune responses to acute HCV and different vaccines. CIRCOS plot indicating BTM enrichment patterns shared between the Early acute HCV and indicated vaccine responses (day 7 post-vaccination versus pre-vaccination baseline). BTMs are ordered along each vaccine (or HCV) segment by GSEA Normalized enrichment score (NES) values in the corresponding dataset. Outer track color indicates HCV/vaccine dataset. Middle track heatmap plots NES values for each BTM. Inner track histogram plots $-\log_{10}$ p-values (GSEA pre-ranked) for BTM enrichment (relative to baseline); red positive bars indicate upregulation, blue negative bars indicate downregulation. For each vaccine group, each BTM demonstrating concordant activity (i.e. enriched, same directionality) with the response to Early acute HCV (Resolution group) is linked by an arc (colored by vaccine) to the HCV segment. BTMs concordant between Early acute HCV and any vaccine dataset are listed at right. Filled cells denote concordant enrichment relative to baseline (GSEA pre-ranked q-value < 0.01); red indicates upregulation, blue indicates downregulation. BTM category indicated on color sidebar.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g005>

definition, are not full potency infections. Therefore, in order to evaluate our HCV results in relation to a *bona fide* viral infection, we compared the acute HCV response (RNA-Seq data described here) to the response mounted against acute DENV infection (publicly available whole blood microarray data) [15]. First, we partitioned the DENV dataset into three groups based on distinct gene expression profiles (PCA analysis, S5 Fig); similar groupings were observed by Kwissa *et al* in their original analysis. These groups correspond to viral load and time post-symptom onset: High viral load (2–3 days), Moderate viral load (4–6 days), and Low viral load (5–9 days). Next, we measured BTM enrichment (acute infection groups *versus* matched convalescence “baselines”) and assessed which BTMs were similarly regulated in acute resolving HCV and acute resolving DENV infection. We observed considerable overlap in the BTM response to acute HCV and acute DENV, which included many of the modules also identified in the YFV comparison (Fig 6). Concordant enrichment of BTMs was most apparent in the DENV High viral load (2–3 days) condition, with increased activity of innate antiviral BTMs, inflammation BTMs and T cell proliferation BTMs, and decreased activity of B cell BTMs. Although upregulation of BTMs related to T cell proliferation seems to persist through lower viral load/late DENV time points, many BTMs associated with the innate response (inflammatory/TLR/chemokines, monocytes, a subset of interferon/antiviral sensing BTMs) do not appear to be differentially enriched beyond the High viral load (2–3 days) group. This analysis suggests that during acute DENV infection, the early host response is characterized by inflammatory signals, B cell changes, and an innate antiviral signature, which is diminished as the response incorporates adaptive immune functions (i.e. T cell proliferation). Although many of the same BTMs are involved, this temporal pattern is in sharp contrast to the timeline of the acute HCV response. At the Early acute stage (approximately 6 weeks post-infection), the HCV response appears similar to the apparently short-lived (days) initial response to acute DENV infection.

Discussion

Here we present a detailed transcriptomic characterization of early events in the human immune response to acute HCV infection in individuals that progress to spontaneous resolution. We detected wide-ranging changes in PBMC gene expression patterns, including those consistent with pronounced innate antiviral programs and inflammatory mediators. The patterns observed in the PBMC response to acute HCV shared many features with effective immune responses to YFV and acute DENV infection. To our knowledge, this study represents the first longitudinal transcriptomic investigation of the PBMC response to acute HCV in humans.

Studying the early immune response to HCV in humans is challenging, as infected individuals are not usually recognized until they progress to chronic infection. Even if research subjects are identified during acute stages, obtaining pre-infection samples for comparison is often impossible. We addressed these difficulties in a rare longitudinal study of HCV-naïve PWID [21, 34], through which we obtained acute infection and corresponding pre-infection baseline samples. Given this “real world” setting, we observed considerable variability in datasets from different patients. Differences in gene expression patterns could be due to complex factors associated with the PWID population enrolled in this study, including drug use, unstable socioeconomic conditions and exposures to additional (non-HCV) infections. Furthermore, the time of HCV infection is necessarily estimated and the samples grouped for each time point are not perfectly synchronized. Problems in assigning datasets to distinct analysis groups were particularly pronounced in samples from individuals who eventually progressed to chronic infection. Although reasons for greater consistency of expression patterns in the

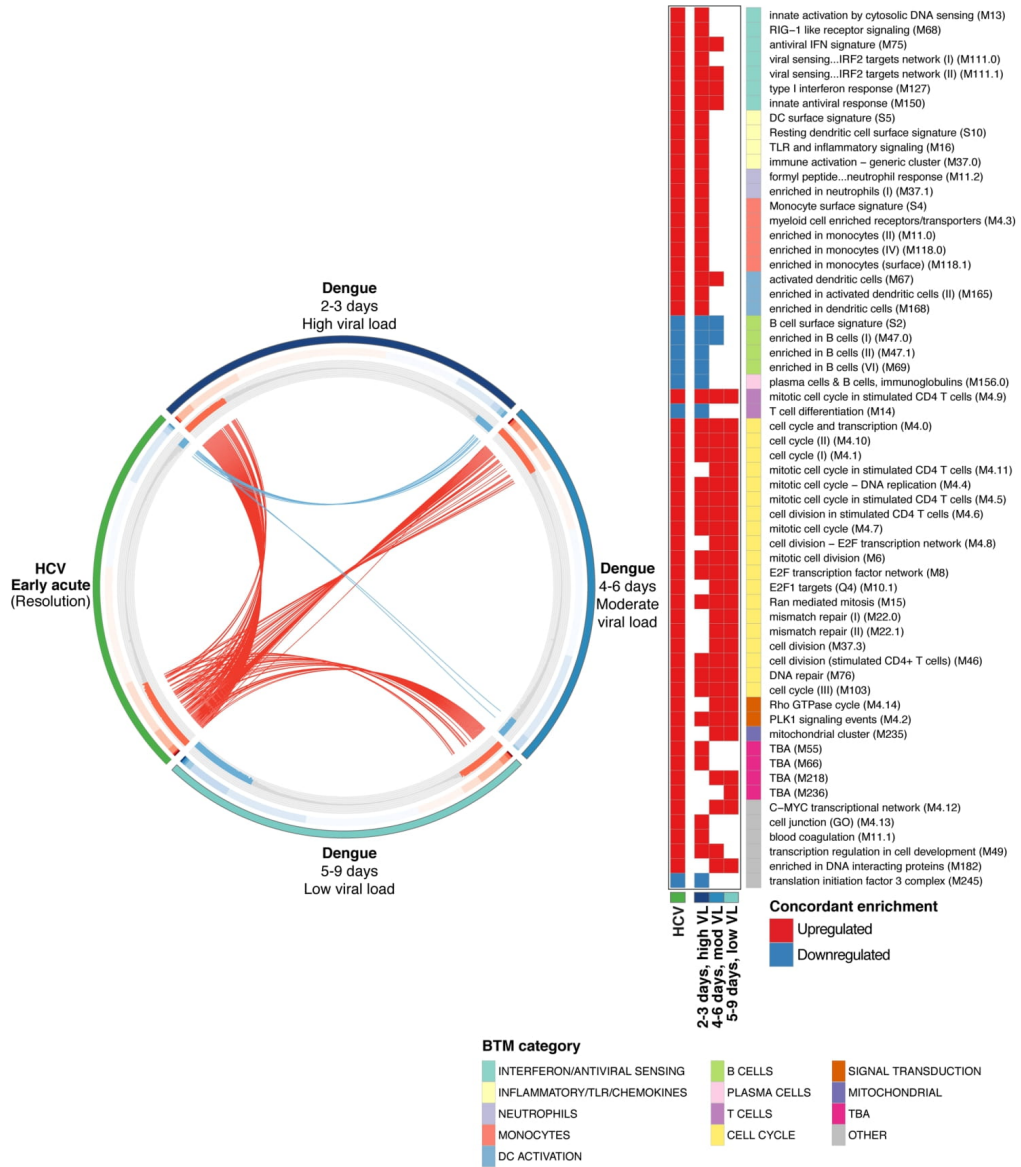


Fig 6. Comparison analysis of immune response to acute HCV and acute DENV infection. CIRCOS plot indicating BTM enrichment patterns shared between the Early acute HCV and acute DENV responses (DENV subgroups as defined in the main text). BTMs are ordered along each DENV subgroup (or HCV) segment by GSEA NES values in the corresponding dataset. Outer track color indicates HCV/DENV dataset. Middle track heatmap plots NES values for each BTM. Inner track histogram plots $-\log_{10}$ p-values (GSEA pre-ranked) for BTM enrichment (relative to baseline); red positive bars indicate upregulation, blue negative bars indicate downregulation. For each DENV subgroup, each BTM demonstrating concordant activity (i.e. enriched, same directionality) with the response to acute HCV is linked by an arc to the HCV segment. Each arc is colored by directionality of concordant enrichment (red indicates upregulation, blue indicates downregulation). BTMs concordant between acute HCV and any DENV subgroup dataset are listed at right. Filled cells denote concordant enrichment relative to baseline (Both acute HCV and indicated DENV subgroup datasets GSEA pre-ranked q-value < 0.01); red indicates upregulation, blue indicates downregulation. BTM category indicated on color sidebar.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007290.g006>

Resolution group remain unclear, much of the variation in the Chronic group samples appears unrelated to HCV infection timepoint (S1 Fig). We do not believe this heterogeneity is related to infection outcome. These issues might be overcome with a larger sample size, which was unfortunately not possible in the present study.

This study's original goal was to identify disparities in the initial response to infection that contribute to the differential outcomes of spontaneous infection versus chronicity. Indeed, recently reported analyses of HCV-specific T cells suggest that differences in metabolic networks engaged early in infection contribute to viral clearance [18]. In our datasets, the heterogeneous gene expression patterns measured in the Chronic group precluded a direct comparison to spontaneous resolution at this sample size. However, this longitudinal study did enable a detailed characterization of the peripheral immune response to acute HCV infection that results in spontaneous resolution. Within the Resolution group, we structured our analysis to evaluate changes relative to patient-specific Pre-infection samples and we observed several consistent and concordant transcriptomic patterns across most subjects analyzed. With the range of estimated infection dates, these results suggest that certain immune functions are active to some extent for at least several weeks during acute HCV.

Our results define a pronounced innate antiviral gene expression program active in PBMC during the Early acute stage of HCV infection. This response persisted through the Late acute time point in individuals with detectable HCV viremia. These observations are consistent with transcriptomic data from the chimpanzee model demonstrating rapid induction of ISGs in the liver during early acute HCV [16, 17]. Furthermore, we observed overlap in the PBMC ISG signature identified here and ISG expression patterns in acute HCV liver biopsy samples from infected patients and chimpanzees [19, 25]. This suggests that the innate antiviral response against acute HCV is not restricted to the liver and that the peripheral blood response corresponds to some extent with that at the site of infection. This response returned to baseline levels following viral clearance, suggesting a dependence on viral RNA.

We also observed a decrease in gene signatures associated with B cells. Such changes could reflect a decrease in B cell transcriptional activity, a decrease in the relative frequency of B cells, or both. Based in part on trends observed in flow cytometry analysis of a limited number of samples, we speculate that these patterns result from a diminished fraction of B cells within PBMC during acute HCV viremia. Although it is possible that this pattern could simply be a consequence of a corresponding relative increase in another cell type (e.g. monocytes, as suggested by BTM enrichment), we did not detect significant decreases in BTMs associated with other cell types (e.g. T cells, NK cells). As both RNA-Seq (as applied here to bulk PBMC samples) and flow cytometry are relative quantification methods, we cannot ascertain if these changes correspond to a decrease in the absolute frequency of B cells in peripheral blood. However, several recent studies have described mechanisms of virus- and IFN- mediated B cell dysregulation [35–37]. Future studies including sample collection focused on absolute immune cell quantification will be required to further explore this observation in the context of acute HCV infection.

Our comparative analyses revealed notable similarities between host responses to acute HCV and to effective vaccines. More specifically, we observed many shared features with the response to YFV, a live attenuated flavivirus that may be thought of as approximating an acute viral infection. As yellow fever virus is a related hepatotropic flavivirus, these similarities are not entirely surprising. In addition, the immune response during Early acute HCV infection shared many features with the immune response to acute DENV infection. Although challenging to make a formal comparison due to discrepancies in study design and timing, these qualitative results suggest that at least at some point during acute HCV, a response similar to that elicited by DENV is induced, likely reflecting the core innate antiviral programs activated in response to RNA virus infection. However, in acute HCV, ISG expression remains elevated long after initial infection and is maintained for many weeks of detectable viremia. This pattern is consistent with models in which adaptive immunity to HCV is delayed as compared to flavivirus infections, despite apparently similar robust IFN responses [16, 38, 39]. Even in the case of eventual spontaneous resolution, HCV outpaces these innate antiviral effectors, resulting in prolonged high-level viremia [38, 39]. Eventually, HCV-specific CD4 and CD8 T cells arise to eliminate the virus, after which innate antiviral signatures rapidly normalize. Failure to prime effective adaptive immunity results in chronic infection that is associated with persistent ISG expression (reviewed in [3, 4]).

This longitudinal study provides an initial assessment of the peripheral immune response to acute HCV at a systems level. Follow-up studies with a larger cohort and sufficient sample availability for complementary experimental methods (e.g. comprehensive flow cytometry analysis) will be required to validate these findings beyond the patients described here and determine the impact of these dynamically regulated immune processes on the differential outcome of acute HCV infection.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the ethics committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) (Protocol SL05.014). All research was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent.

Patients and samples

Subjects with acute HCV were recruited among high-risk PWID participating in the HEPSCO cohort as previously described [21, 34]. Estimated date of infection (EDI) was calculated as the median date between the last HCV negative and the first HCV positive test. Spontaneous viral resolution ($n = 6$) or chronic infection ($n = 8$) was defined as the absence or presence of HCV RNA, respectively, at 6 months post EDI (Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HCV Qualitative Test, version 2.0; Limit of detection: 15 IU/ml). PBMC samples from four time points were examined: i) Pre-infection baseline (Variable); ii) Early acute (2–9 weeks, mean 6 weeks); iii) Late acute (15–20 weeks, mean 17 weeks); and iv) Follow up (25–71 weeks, mean 52 weeks). Subjects' clinical characteristics, demographics, testing intervals and actual times post EDI for each sample are presented in Tables 1 and 2.

RNA-Seq library preparation and data processing

Cryopreserved PBMC samples were thawed, viability was assessed using trypan blue (>90% for all samples) and immediately processed for RNA extraction (approximately 7×10^6 PBMC

per sample, range: 4×10^6 – 11×10^6) with the Qiagen RNEasy Mini kit. RNA quality was assessed by Agilent Bioanalyzer 2100; all samples exhibited RNA integrity numbers (RIN) greater than 8. RNA-Seq libraries were prepared with the Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit v2. Libraries were sequenced in multiplex on the Illumina HiSeq 2500 platform in 100 nucleotide, single-end read configuration (range 3×10^7 – 7×10^7 total reads per library). Samples from the same patient series were always sequenced in the same multiplex pool to minimize batch effects.

Reads were mapped to the human genome reference (hg19) using the Tophat (v2.0.8b) alignment tool [40]. Read counts per gene were quantified against Ensembl (v66) transcript reference annotations (appended with gene annotation for *IFNL4*) using HTSeq-count (v0.5.4p3) [41].

Acute HCV gene expression and BTM analysis

Analysis was conducted within the R statistical framework. For principal component analysis, read counts were normalized and variance stabilized by regularized log transformation (rlog() function, DESeq2 package v1.18.1). Patient-specific gene expression variation was corrected using the removeBatchEffect() function in the limma package (v3.26.9), specifying time point and viremia status for preservation. For independent Spontaneous Resolution (Fig 1B) and Chronic infection (S1B Fig) PCAs, analysis included the top 500 most variable genes across samples from the indicated infection group. For joint Chronic Infection and Spontaneous Resolution PCA (S1A Fig), PCA was performed on a single gene list (top 1000 most variable genes across all samples), and Chronic and Resolution groups were plotted separately to facilitate visualization.

In order to incorporate the multiple covariates apparent in the experimental design, differential expression and BTM enrichment analyses were conducted with the voom-limma analysis workflow (v3.26.9) [42]. Prior to differential expression analysis, a filter was applied to remove genes with low expression values (genes with greater than one read count per million (cpm) in at least four samples were designated as “expressed”); 14,138 genes passed filter and were included in subsequent analyses. RNA-Seq read counts were scaled and normalized by the trimmed mean of M values (TMM) method (implemented in the edgeR package [43, 44]) and \log_2 transformed using voom [45]. All differential gene and gene set analyses were based on a linear model specifying covariates for patient, and a categorical joint factor incorporating time point and viremia status (Pre-infection, Early acute [positive viremia], Late acute [positive viremia], Late acute [negative viremia], Follow up). Differential gene and gene set analyses were adjusted for multiple testing by the method of Benjamini and Hochberg [46].

BTM gene memberships and annotations were obtained from Li et al [11], and enrichment tests were performed with MROAST [23] and the above described linear model. The MROAST tool was selected due to its capacity for complex experimental designs and voom-generated gene weights. Group level BTM activity scores were derived from the proportion of genes in a given BTM contributing to significance (i.e. genes in BTM with $|z| > \sqrt{2}$) as reported by MROAST, with sign indicating direction of enrichment relative to Pre-infection baseline. For visualizing BTM changes per individual patients (Fig 2A), sample level fold-change activity scores were calculated as the median \log_2 fold-changes (sample time point vs. Pre-infection, per patient) of BTM member genes for each module.

Acute HCV PBMC ISG signature

PBMC ISG set [26] enrichment testing was performed with ROAST [23] and CAMERA [47], using the above described linear model. Genes within the PBMC ISG set found to be differentially

expressed (q value < 0.05 , S4 Table) at the Early acute time point relative to Pre-infection baseline were selected as an “Acute HCV PBMC ISG signature.” The Acute HCV PBMC ISG signature gene list was intersected with lists of differentially expressed genes in different biological contexts as reported by corresponding publications: Acute HCV, Human Liver [19]; Acute HCV, Chimpanzee liver [25]; Type I IFN and Type II IFN, Human PBMC ex vivo [30].

BTM enrichment comparison: Acute HCV infection and vaccine signatures

Microarray data for PBMC responses to the following vaccines were obtained from the GEO database: YFV (GSE13485) [9], LAIV (GSE29615) and TIV (GSE29617) [48], MPSV4 (GSE52245) and MCV4 (GSE52245) [11]. In an effort to minimize the impact of different study designs, transcriptome platforms (RNA-Seq, different microarrays) and sample sizes, the GSEA (pre-ranked) approach was used to evaluate BTM activity in each individual dataset as follows (S4 Fig). For each vaccine dataset, differential gene expression analysis for peak response (day 7) versus pre-vaccination baseline (day 0) was performed with limma in parallel analysis workflows. Only those genes represented in all datasets were maintained for subsequent analysis. For each dataset, genes were ranked by moderated t -statistics, and input to the GSEA (pre-ranked) module on GenePattern (<http://genepattern.broadinstitute.org>). Comparative profiles of BTMs enriched in both Acute HCV and vaccine datasets (CIRCOS plots) were defined as the intersect of modules enriched at GSEA q value < 0.01 (concordant direction of up/down regulation) for each dataset (for Acute HCV, time point vs. Pre-Infection; for vaccines, peak response versus baseline).

BTM enrichment comparison: Acute HCV infection and acute DENV infection

Microarray data on the peripheral whole blood response to acute DENV infection [15] were obtained from GEO (GSE51808). Samples without paired convalescent controls were not included in analysis. Principal component analysis was used to identify distinct infection groups based on gene expression patterns: High viral load (2–3 days), Moderate viral load (4–6 days), and Low viral load (5–9 days). Differential gene expression analysis (acute DENV infection versus paired convalescent “baseline” controls) for each infection group was performed with limma. BTM profiles for each Acute HCV and DENV group were generated using the GSEA (pre-ranked) approach as described for vaccine comparisons.

Flow cytometry

Cryopreserved PBMCs were thawed and analyzed using different panels for T cells and B cells phenotyping against the following markers: CD3 (clone UCHT1), CD4 (clone RPA-T4), CD8 (clone SK1), CD10 (clone HI10a), CD19 (clone AJ25C1), CD20 (clone 2H7), CD21 (clone B-ly4), CD38 (clone HB7), CD56 (clone NCAM 16.2), IgM (clone G20-127), HLA-DR (G46-6), all from BD Bioscience (San Diego, CA); CD1 (clone L161), CD27 (Clone O323) both from Thermo-Fisher (Waltham, MA); CD22 (Clone HIB22), IgG (clone M1310G05) both from BioLegend (San Diego, CA). HLA-A2/NS3-1073 tetramers (HLA-A2 restricted HCV-NS3 peptide aa 1073–1081 (CINGVCWTV)) were obtained from the NIH Tetramer Core facility (Emory University, Atlanta, GA). Multiparameter flow cytometry was performed at the flow cytometry core of the CRCHUM using a BD LSRII instrument equipped with violet (405 nm), blue (488 nm), yellow-green (561 nm) and red (633 nm) lasers and FACSDiva version 8.0.1 (BD Biosciences). FCS data files were analyzed using FlowJo version 10.0.8 for Mac (Tree Star, Ashland, OR). Fluorescence minus one controls were used to set the analysis gates.

CXCL10 ELISA

CXCL10 levels in plasma were quantified using the human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol.

Supporting information

S1 Fig. Principal component analysis (PCA) of Resolution and Chronic group samples. (A) Joint PCA for Resolution and Chronic group samples. PCA was conducted on variance stabilized gene-level read counts, with correction for patient-specific gene expression variation as detailed in *Materials and Methods*. PCA included a single gene list (top 1000 most variable genes across all samples), and Chronic and Resolution groups were plotted separately to facilitate visualization. Ellipses indicate 68% normal probability for each group (for Resolution group, Late Acute timepoint, ellipse plotted for positive HCV viremia samples only).

(B) PCA for Chronic group samples. PCA was conducted on variance stabilized gene-level read counts, with correction for patient-specific gene expression variation as detailed in *Materials and Methods*. PCA was performed on the top 500 most variable genes across all Chronic group samples. Ellipses indicate 68% normal probability for each group.
(PDF)

S2 Fig. Frequency of HCV-specific CD8⁺ T cells during Acute HCV infection. (A) Example of HCV-tetramer (HLA-A2/NS3-1073) labeling as measured by flow cytometry (Patient R1). Values indicate percentage of tetramer⁺ events in Live, CD3⁺CD8⁺ gate.

(B) Line plot displaying HCV-specific T cell frequencies as measured by flow cytometry for n = 3 patients. Values indicate percentage of tetramer⁺ (HLA-A2/NS3-1073) events in Live, CD3⁺CD8⁺ gate.
(PDF)

S3 Fig. PBMC interferon/innate antiviral response to acute HCV infection. Heatmap displays individual sample scaled expression values (normalized log₂ read counts per million, corrected for patient-specific variation, scaled to z-scores by gene) for expressed genes composing enriched BTMs in the INTERFERON/ANTIVIRAL SENSING category. BTM gene membership is denoted in accompanying grid annotation. Dark grey boxes along bottom of heatmap indicate detectable HCV viremia.
(PDF)

S4 Fig. Schematic workflow for Comparative BTM enrichment analysis (Acute HCV infection and vaccine signatures). Full details in Materials and methods section.
(PDF)

S5 Fig. Principal component analysis (PCA) to determine sample groupings for acute DENV infection microarray datasets. PCA was conducted on all samples with infection and paired convalescence controls from GSE51808 [15]. After correction for sex-specific gene expression variation by the RemoveBatchEffect() function in limma, PCA was performed on the top 1000 most variable genes across all included samples. After assigning sample groupings based on initial PCA, plot colors and ellipses were included to facilitate visualization of group assignments. Ellipses indicate 68% normal probability for each group.
(PDF)

S1 Table. Differentially expressed genes across all Resolution timepoint group conditions (F test, FDR 0.1). Columns labeled with timepoint group denote log₂ fold-change in gene expression for the indicated condition relative to Pre-Infection baseline.
(TXT)

S2 Table. Differentially expressed genes, Resolution group, Early acute versus Pre-Infection baseline (FDR 0.05).

(TXT)

S3 Table. Differentially enriched BTMs, Resolution group, Early acute versus Pre-infection baseline (MROAST FDR 0.05).

(TXT)

S4 Table. Acute HCV PBMC ISG signature. Genes within the PBMC ISG set found to be differentially expressed (Resolution group, Early acute versus Pre-infection baseline, q value < 0.05) with associated statistics.

(TXT)

Acknowledgments

We thank the Rockefeller University Genomics Resource Center and the CRCHUM flow cytometry core for technical assistance. We also thank Mayte Suarez-Farinas and Joel Correa da Rosa for helpful discussion and advice on statistical analyses.

Author Contributions

Conceptualization: Brad R. Rosenberg, Marion Depla, Charles M. Rice, Naglaa H. Shoukry.

Formal analysis: Brad R. Rosenberg, Marion Depla, Catherine A. Freije, Denis Gaucher.

Funding acquisition: Brad R. Rosenberg, Charles M. Rice, Naglaa H. Shoukry.

Investigation: Marion Depla, Denis Gaucher, Sabrina Mazouz, Maude Boisvert, Nathalie Bédard.

Project administration: Naglaa H. Shoukry.

Resources: Julie Bruneau.

Supervision: Brad R. Rosenberg, Naglaa H. Shoukry.

Writing – original draft: Brad R. Rosenberg, Naglaa H. Shoukry.

Writing – review & editing: Brad R. Rosenberg, Marion Depla, Catherine A. Freije, Denis Gaucher, Sabrina Mazouz, Maude Boisvert, Nathalie Bédard, Julie Bruneau, Charles M. Rice, Naglaa H. Shoukry.

References

1. Martin NK, Vickerman P, Dore GJ, Hickman M. The hepatitis C virus epidemics in key populations (including people who inject drugs, prisoners and MSM): the use of direct-acting antivirals as treatment for prevention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015; 10(5):374–80. Epub 2015/08/08. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000179> PMID: 26248124; PubMed Central PMCID: PMC4659815.
2. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10(9):553–62. Epub 2013/07/03. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.107> PMID: 23817321.
3. Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol*. 2014; 5:274. Epub 2014/07/02. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00274> PMID: 24982656; PubMed Central PMCID: PMC4058636.
4. Park SH, Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014; 40(1):13–24. Epub 2014/01/21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.010> PMID: 24439265.

5. Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2014; 105:100–11. Epub 2014/03/04. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.013> PMID: 24583033; PubMed Central PMCID: PMC4034163.
6. Nakaya HI, Pulendran B. Vaccinology in the era of high-throughput biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1671). Epub 2015/05/13. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0146> PMID: 25964458; PubMed Central PMCID: PMC4527391.
7. Obermoser G, Presnell S, Domico K, Xu H, Wang Y, Anguiano E, et al. Systems scale interactive exploration reveals quantitative and qualitative differences in response to influenza and pneumococcal vaccines. *Immunity.* 2013; 38(4):831–44. Epub 2013/04/23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.008> PMID: 23601689; PubMed Central PMCID: PMC3681204.
8. Chaussabel D, Pascual V, Banchereau J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. *BMC biology.* 2010; 8:84. Epub 2010/07/14. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-84> PMID: 20619006; PubMed Central PMCID: PMC2895587.
9. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol.* 2009; 10(1):116–25. Epub 2008/11/26. doi: ni.1688 [pii] <https://doi.org/10.1038/ni.1688> PMID: 19029902.
10. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 2008; 205(13):3119–31. Epub 2008/12/03. doi: jem.20082292 [pii] <https://doi.org/10.1084/jem.20082292> PMID: 19047440.
11. Li S, Roupael N, Duraisingham S, Romero-Steiner S, Presnell S, Davis C, et al. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat Immunol.* 2014; 15(2):195–204. Epub 2013/12/18. <https://doi.org/10.1038/ni.2789> PMID: 24336226; PubMed Central PMCID: PMC43946932.
12. Nakaya HI, Hagan T, Duraisingham SS, Lee EK, Kwissa M, Roupael N, et al. Systems Analysis of Immunity to Influenza Vaccination across Multiple Years and in Diverse Populations Reveals Shared Molecular Signatures. *Immunity.* 2015; 43(6):1186–98. Epub 2015/12/20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.012> PMID: 26682988; PubMed Central PMCID: PMC4859820.
13. Tsang JS, Schwartzberg PL, Kotliarov Y, Bianco A, Xie Z, Germain RN, et al. Global analyses of human immune variation reveal baseline predictors of postvaccination responses. *Cell.* 2014; 157(2):499–513. Epub 2014/04/15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.031> PMID: 24725414; PubMed Central PMCID: PMC4139290.
14. Fourati S, Cristescu R, Loboda A, Talla A, Filali A, Raikar R, et al. Pre-vaccination inflammation and B-cell signalling predict age-related hyporesponse to hepatitis B vaccination. *Nature communications.* 2016; 7:10369. Epub 2016/01/09. <https://doi.org/10.1038/ncomms10369> PMID: 26742691; PubMed Central PMCID: PMC4729923.
15. Kwissa M, Nakaya HI, Onlamoon N, Wrammert J, Villinger F, Perng GC, et al. Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host Microbe.* 2014; 16(1):115–27. Epub 2014/07/02. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.001> PMID: 24981333; PubMed Central PMCID: PMC4116428.
16. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(24):15669–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.202608199> PMID: 12441396.
17. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2001; 75(15):7059–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.7059-7066.2001> PMID: 11435586
18. Wolski D, Foote PK, Chen DY, Lewis-Ximenez LL, Fauvelle C, Aneja J, et al. Early Transcriptional Divergence Marks Virus-Specific Primary Human CD8(+) T Cells in Chronic versus Acute Infection. *Immunity.* 2017; 47(4):648–63.e8. Epub 2017/10/19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.006> PMID: 29045899; PubMed Central PMCID: PMC5708133.
19. Dill MT, Makowska Z, Duong FHT, Merkofer F, Filipowicz M, Baumert TF, et al. Interferon-γ-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 2012; 143(3):777–86.e1-6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.044> PMID: 22677194
20. Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Vidaud M, et al. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int.* 2010; 30(9):1259–69. Epub 2010/07/17. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02283.x> PMID: 20633102; PubMed Central PMCID: PMC3071938.
21. Grebely J, Morris MD, Rice TM, Bruneau J, Cox AL, Kim AY, et al. Cohort profile: the International Collaboration of Incident HIV and Hepatitis C in Injecting Cohorts (InC3) Study. *Int J Epidemiol.* 2013; 42

- (6):1649–59. Epub 2012/12/04. <https://doi.org/10.1093/ije/dys167> PMID: 23203695; PubMed Central PMCID: PMC3887561.
22. Chaussabel D, Baldwin N. Democratizing systems immunology with modular transcriptional repertoire analyses. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(4):271–80. Epub 2014/03/26. <https://doi.org/10.1038/nri3642> PMID: 24662387; PubMed Central PMCID: PMC34118927.
 23. Wu D, Lim E, Vaillant F, Asselin-Labat ML, Visvader JE, Smyth GK. ROAST: rotation gene set tests for complex microarray experiments. *Bioinformatics*. 2010; 26(17):2176–82. Epub 2010/07/09. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq401> PMID: 20610611; PubMed Central PMCID: PMC2922896.
 24. Kazmin D, Nakaya HI, Lee EK, Johnson MJ, van der Most R, van den Berg RA, et al. Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malaria vaccination in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(9):2425–30. Epub 2017/02/15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621489114> PMID: 28193898; PubMed Central PMCID: PMC5338562.
 25. Yu C, Boon D, McDonald SL, Myers TG, Tomioka K, Nguyen H, et al. Pathogenesis of hepatitis E virus and hepatitis C virus in chimpanzees: similarities and differences. *J Virol*. 2010; 84(21):11264–78. Epub 2010/08/27. <https://doi.org/10.1128/JVI.01205-10> PMID: 20739520; PubMed Central PMCID: PMC2953165.
 26. Rosenberg BR, Freije CA, Imanaka N, Chen ST, Eitson JL, Caron R, et al. Genetic Variation at IFNL4 Influences Extrahepatic Interferon-Stimulated Gene Expression in Chronic HCV Patients. *J Infect Dis*. 2018; 217(4):650–5. Epub 2017/11/23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix593> PMID: 29165633; PubMed Central PMCID: PMC5853921.
 27. Grebely J, Feld JJ, Applegate T, Matthews GV, Hellard M, Sherker A, et al. Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2013; 57(6):2124–34. Epub 2013/01/18. <https://doi.org/10.1002/hep.26263> PMID: 23325615; PubMed Central PMCID: PMC3663887.
 28. Shin EC, Park SH, Demino M, Nascimbeni M, Mihalik K, Major M, et al. Delayed induction, not impaired recruitment, of specific CD8(+) T cells causes the late onset of acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011; 141(2):686–95. e1. Epub 2011/06/28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.05.006> PMID: 21699897; PubMed Central PMCID: PMC3359650.
 29. Zeremski M, Hooker G, Shu MA, Winkelstein E, Brown Q, Des Jarlais DC, et al. Induction of CXCR3- and CCR5-associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011; 55(3):545–53. Epub 2011/01/25. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.033> PMID: 21256906; PubMed Central PMCID: PMC3094733.
 30. Waddell SJ, Popper SJ, Rubins KH, Griffiths MJ, Brown PO, Levin M, et al. Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PLoS One*. 2010; 5(3):e9753. Epub 2010/03/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009753> PMID: 20339534; PubMed Central PMCID: PMC2842296.
 31. Beinhardt S, Aberle JH, Strasser M, Dulic-Lakovic E, Maieron A, Kreil A, et al. Serum level of IP-10 increases predictive value of IL28B polymorphisms for spontaneous clearance of acute HCV infection. *Gastroenterology*. 2012; 142(1):78–85 e2. Epub 2011/12/24. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.039> PMID: 22192885.
 32. Hajarizadeh B, Lamoury FM, Feld JJ, Amin J, Keoshkerian E, Matthews GV, et al. Alanine aminotransferase, HCV RNA levels and pro-inflammatory and pro-fibrogenic cytokines/chemokines during acute hepatitis C virus infection. *Virology journal*. 2016; 13:32. Epub 2016/02/26. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0482-x> PMID: 26911712; PubMed Central PMCID: PMC4765111.
 33. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(43):15545–50. Epub 2005/10/04. doi: 0506580102 [pii] <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102> PMID: 16199517.
 34. Cox AL, Page K, Bruneau J, Shoukry NH, Lauer GM, Kim AY, et al. Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. *Gastroenterology*. 2009; 136(1):26–31. Epub 2008/12/09. doi: S0016-5085(08)02080-5 [pii] <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.11.049> PMID: 19059257.
 35. Fallet B, Narr K, Ertuna YI, Remy M, Sommerstein R, Cornille K, et al. Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection. *Science Immunology*. 2016; 1(4). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah6817> PMID: 27872905
 36. Moseman EA, Wu T, de la Torre JC, Schwartzberg PL, McGavern DB. Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8+ T cell differentiation. *Science Immunology*. 2016; 1(4). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah3565>
 37. Sammiceli S, Kuka M, Di Lucia P, de Oya NJ, De Giovanni M, Fioravanti J, et al. Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Science Immunology*. 2016; 1(4). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah6789> PMID: 27868108

38. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2001; 194(10):1395–406. PMID: 11714747
39. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(24):15661–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.202608299> PMID: 12441397.
40. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology*. 2013; 14(4):R36. Epub 2013/04/27. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36> PMID: 23618408; PubMed Central PMCID: PMC34053844.
41. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31(2):166–9. Epub 2014/09/28. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638> PMID: 25260700; PubMed Central PMCID: PMC4287950.
42. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(7):e47. Epub 2015/01/22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007> PMID: 25605792; PubMed Central PMCID: PMC4402510.
43. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*. 2010; 11(3):R25. Epub 2010/03/04. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25> PMID: 20196867; PubMed Central PMCID: PMC2864565.
44. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26(1):139–40. Epub 2009/11/17. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616> PMID: 19910308; PubMed Central PMCID: PMC2796818.
45. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology*. 2014; 15(2):R29. Epub 2014/02/04. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29> PMID: 24485249; PubMed Central PMCID: PMC4053721.
46. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995; 57(1):289–300.
47. Wu D, Smyth GK. Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(17):e133. Epub 2012/05/29. <https://doi.org/10.1093/nar/gks461> PMID: 22638577; PubMed Central PMCID: PMC3458527.
48. Nakaya HI, Wrammert J, Lee EK, Racioppi L, Marie-Kunze S, Haining WN, et al. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. *Nat Immunol*. 2011; 12(8):786–95. Epub 2011/07/12. <https://doi.org/10.1038/ni.2067> PMID: 21743478; PubMed Central PMCID: PMC3140559.
49. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(1):207–10. Epub 2001/12/26. PMID: 11752295; PubMed Central PMCID: PMC4053721.

Curriculum Vitae

SABRINA MAZOUZ

• PhD Student •




EDUCATION

- 2016 - 2021 PhD Candidate**
PhD in Immunology and Virology - Université de Montréal  Montréal
CANADA
- 2014 Pastry Chef Certification**
Certificat d'Aptitude professionnelle (CAP) - Académie de Créteil  Créteil
FRANCE
- 2011 -2013 Master degree**
Master in Cellular Biology - Université Paris VI (Pierre et Marie Curie)  Paris
FRANCE
Grade: Good
- 2008 -2011 Bachelor Degree**
Life Sciences - Université Paris VI (Pierre et Marie Curie)  Paris
FRANCE



WORK EXPERIENCE

- 2014 Research Assistant**
(3 months) Department of Laboratory Medicine, Children's and Women's Health - Faculty of Medicine  Trondheim
Norway
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)
Laboratory: Prof. Marit W. Anthonsen



PUBLICATIONS

Articles published as first author

1. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Kader O, Bruneau J, Shoukry NH.
Expansion of Unique Hepatitis C Virus-Specific Public CD8+ T Cell Clonotypes during Acute Infection and Reinfection
Journal of Immunology. 2021 August. DOI: 10.4049/jimmunol.2001386
2. **Mazouz S**, Boisvert M, Shoukry NH, Lamarre D.
Reversing immune dysfunction and liver damage after direct-acting antiviral treatment for hepatitis C
Canadian Liver Journal. 2018 July. DOI: 10.3138/canlivj.1.2.007

Other peer-reviewed and published articles

1. Rosenberg BR, Depla M, Freije CA, Gaucher D, **Mazouz S**, Boisvert M, Bédard N, Bruneau J, Rice CM, Shoukry NH.
Longitudinal transcriptomic characterization of the immune response to acute hepatitis C virus infection in subjects with spontaneous viral clearance
PLoS Pathog. 2018 September. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007290.
 2. Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA, **Mazouz S**, Guthmiller JJ, Vijay R, Butler NS, Bruneau J, Shoukry NH, Krawczyk CM, Richer MJ.
Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity
Immunity. 2018 February. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.01.006.
 3. Dabo S, Maillard P, Collados Rodriguez M, Hansen MD, **Mazouz S**, Bigot DJ, Tible M, Janvier G, Helynck O, Cassonnet P, Jacob Y, Bellalou J, Gatignol A, Patel RC, Hugon J, Munier-Lehmann H, Meurs EF.
Inhibition of the inflammatory response to stress by targeting the interaction between PKR and its cellular activator PACT
Sci Rep. 2017 November. DOI: 10.1038/s41598-017-16089-8.
-

Other documents: Manuscripts in preparation

1. **Mazouz S**, Salinas E, Bédard N, Filali A, Khedr O, Abdel-Hakeem M, Siddique A, Bruneau J, Grakoui A and Shoukry NH.

Concerted HCV-specific T and B cell responses during acute HCV reinfection and clearance

Manuscript in preparation for submission to the Journal of Experimental Medicine

2. Siddique A, Law J, Abdel-Hakeem M, Baldwin L, Zang G, **Mazouz S**, Lorne Tyrrell D., Bruneau J, Houghton M, Shoukry NH.

Virus-specific T cells and neutralizing antibodies are independent correlates of long-term protective immunity against hepatitis C virus

Manuscript in preparation

3. Manuel Flores Molina *et al.*

Spatial and temporal characterization reveals unique and non-overlapping profiles of resident Kupffer cells and infiltrating monocyte-derived macrophages during acute liver injury

Manuscript in preparation

4. Mohamed Abdelnabi *et al.*

Sex-dependent hepatoprotective role of IL-22 in NAFLD-related fibrosis

Manuscript in preparation



PRESENTATIONS AT SCIENTIFIC CONFERENCES

Conferences and oral scientific presentations

1. **Mazouz S**, Bédard N, Khedr O, Filali A, Bruneau J, Shoukry NH.

Transcriptomic analyses of the immune response during HCV reinfection

26th International Symposium on HCV and related viruses, 2019, Seoul, South Korea

HCV 2019 Travel Award of 500\$

CRCHUM Travel Award of 700\$

2. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
Canadian Liver Meeting, 2018, Toronto, Canada

3. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Analysis of HCV-specific CD8 TCR repertoire during primary acute HCV infection to identify public clonotypes associated with spontaneous resolution of infection
Journée des étudiants, Stagiaires et résidents du réseau SIDA et maladies infectieuses. FRQS, 2016, Montréal, Canada

Poster presentations

1. **Mazouz S**, Bédard N, Salinas E, Khedr O, Filali A, Bruneau J, Grakoui A and Shoukry NH
Enriched plasma cell transcriptomic signatures and humoral responses during HCV reinfection and clearance
27th International Symposium on HCV and related viruses, 2021, Montréal, Canada

2. **Mazouz S**, Bédard N, Khedr O, Filali A, Bruneau J, Shoukry NH.
Transcriptomic analyses of the immune response during HCV reinfection
Canadian Liver Meeting, 2021, Montréal, Canada
Best poster presentation: 400\$

3. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
20ème congrès des étudiants, CRCHUM, 2018, Montréal, Canada

4. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
5ème journée de la recherche du département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal, 2017, Montréal, Canada

5. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
8ème journée scientifique du CRCHUM, 2017, Montréal, Canada

6. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
19ème congrès des étudiants, CRCHUM, 2017, Montréal, Canada

7. **Mazouz S**, Boisvert M, Abdel-Hakeem M, Bruneau J, Shoukry NH.
Increased usage of a public CD8 T cell clonotype in spontaneously resolved HCV infection
24th International Symposium on HCV and related viruses, Cape Cod, United-States



SCHOLARSHIPS



2017 - 2021 **Doctoral fellowship from the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC)**



TECHNICAL EXPERTISE

- **Immunological techniques:** Multiparameter flow cytometry for detection of surface and intracellular proteins, tetramer staining, enzyme linked immunospot (ELISpot), immunofluorescence microscopy
- **Cell biology techniques:** Isolation and culture of T cells from human blood, cell culture, cloning, transfection, RNA extraction, Western blot, production and purification of recombinant protein, cytotoxicity test (MTT, WST-1 and Methylene Blue), Immunoprecipitation, work with infectious material in BSL2 conditions.

-
- **Molecular biology techniques:** PCR, Real-time PCR
 - **Virological techniques:** Viral RNA extraction
 - **Computer software:** FlowJo, GraphPad Prism, SPICE, R